



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**MECANISMOS DE ACCIÓN DE  
MICROORGANISMOS MARINOS Y EL INDUCTOR  
DE RESISTENCIA ULVAN PARA EL CONTROL DE  
*Fusarium proliferatum* EN FRUTOS DE *Cucumis melo* L.  
var. *Reticulatus***

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

**Tomás Rivas García**

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2018

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 21 del Mes de Noviembre del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"MECANISMOS DE ACCIÓN DE MICROORGANISMOS MARINOS Y EL INDUCTOR DE RESISTENCIA ULVAN PARA EL CONTROL DE *Fusarium proliferatum* EN FRUTOS DE *Cucumis melo* L. var. *Reticulatus*"**

Presentada por el alumno:

**Tomás Rivas García**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Agricultura Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA


  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis G. Hernández Montiel (Co-Director)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Bernardo Murillo Amador (Co-Director)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Alejandra Nieto Garibay (Co-Tutor)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gabriel Rincón Enriquez (Co-Tutor)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Roberto Chiquito Contreras (Co-Tutor)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **Conformación de Comités**

### **Comité tutorial**

#### **Co-Director de tesis**

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

#### **Co-Director de tesis**

Dr. Bernardo Murillo Amador  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

#### **Co-Tutor**

Dra. Alejandra Nieto Garibay  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

#### **Co-Tutor**

Dr. Gabriel Rincón Enríquez  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

#### **Co-Tutor**

Dr. Roberto Gregorio Chiquito Contreras  
Universidad Veracruzana

### **Comité revisor**

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel  
Dr. Bernardo Murillo Amador  
Dra. Alejandra Nieto Garibay  
Dr. Gabriel Rincón Enríquez  
Dr. Roberto Gregorio Chiquito Contreras  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

### **Jurado de examen de grado**

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel  
Dr. Bernardo Murillo Amador  
Dra. Alejandra Nieto Garibay  
Dr. Gabriel Rincón Enríquez  
Dr. Roberto Gregorio Chiquito Contreras

### **Suplentes**

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez  
Dra. Arevik Poghosyan Melkonyan

## Resumen

El melón (*Cucumis melo* L.) es un fruto popular entre los cultivos hortícolas por su sabor y contenido nutricional. Por sus características fisiológicas y malas prácticas de manejo, es susceptible a enfermedades fúngicas como la pudrición del fruto ocasionada por *Fusarium* spp. causando pérdidas económicas considerables. Su control se basa en la aplicación de fungicidas sintéticos como el benomil, sin embargo, genera resistencia en los fitopatógenos, daños a la salud y contaminación ambiental. El control biológico es una alternativa al uso de los agroquímicos. Los microorganismos de ambientes marinos por sus características metabólicas pueden ser utilizados como agentes de control biológico (ACB). Para mejorar la eficiencia de los ACB, es importante elucidar los mecanismos de acción y realizar tratamientos conjuntos para obtener un amplio espectro de acción y resultados comparables a los de fungicidas sintéticos. Por otra parte, el uso de inductores de resistencia como ulvan, ha sido aplicado con éxito para el control de enfermedades en las plantas, existiendo poca información sobre su uso en poscosecha. Como objetivo se evaluaron los mecanismos antagónicos de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan como tratamiento individual o conjunto hacia *F. proliferatum* en frutos de melón. La identificación del fitopatógeno se realizó por claves taxonómicas y marcadores moleculares. Se realizó un screening para seleccionar los microorganismos marinos más eficientes en el control de la pudrición sobre frutos de melón. Se determinó que ulvan no tiene efecto directo sobre *D. hansenii* y *S. rhizophila*, al medirse la tasa de crecimiento de los ACB *in vivo* e *in vitro*. En los mecanismos de acción, la competencia por nutrientes y la producción de enzimas líticas se cuantificaron inoculando los ACB en medio a base de melón suplementado con pared celular del hongo. La producción de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) se evaluó por cultivo dual y la actividad biosurfactante por dispersión en membranas hidrófobas e hidrofílicas. En frutos inoculados con los ACB y ulvan se midió la actividad de enzimas antioxidantes y de defensa. *In vivo* se inocularon a los ACB para determinar la incidencia de enfermedad, lesión y parámetros de calidad. *D. hansenii* y *S. rhizophila* inhiben a *F. proliferatum* por mecanismos como parasitismo, competencia por nutrientes, micoparasitismo por enzimas líticas, biosurfactantes y VOCs. *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan inducen la actividad de enzimas antioxidantes y de defensa. Los ACB de este estudio pueden ser propuestos en tratamiento conjunto para el control poscosecha de la pudrición de melón.

**Palabras clave:** *Debaryomyces hansenii*, *Stenotrophomonas rhizophila*, ulvan, control biológico, microorganismos marinos.

---

Vo.Bo. Dr. Luis G. Hernández Montiel  
(Co-Director)

---

Vo.Bo. Dr. Bernardo Murillo Amador  
(Co-Director)

## Summary

Muskmelon (*Cucumis melo* L.) is a popular fruit between horticultural crops because its flavor and nutritional content. Muskmelon fruit possess physiological characteristics (climacteric stage) and inefficient manage, which make it susceptible to postharvest disease by *Fusarium* spp. fruit rot principally and economic losses. Synthetic fungicides such as benomil are the conventional treatment, but its indiscriminate use cause fungi resistance, healthy problems and pollution. Biocontrol is an emerging treatment based on the use of antagonistic microorganisms. Marine microorganisms are promissory candidates as biological control agents (BCAs) because it's metabolic characteristics. It is important to elucidate the mechanisms of action and to mix treatments in order to enhance the efficiency of individual treatments of BCAs to make them better than fungicides. On the other hand, the control of plant diseases with ulvan as resistance inducer has been successfully studied, but there are few reports about ulvan application in postharvest control diseases. The aim of this study was to evaluate antagonism mechanisms of *D. hansenii*, *S. rhizophila* and ulvan as single or mixed treatments against fruit rot caused by *F. proliferatum*. The phytopathogen identification was based on key taxonomic and molecular markers. After screening test, the more effective marine microorganisms in the biocontrol of fruit rot were selected and used in the next experiments. Ulvan did not have direct effect over *in vivo* and *in vitro* growth of BCAs. Nutrients competition and lytic enzymes production were evaluated on based muskmelon medium. VOCs excretion was evaluated by dual culture and bio-surfactants excretion by hydrophobic and hydrophilic membranes dispersion. Muskmelon were inoculated with BCAs and ulvan to determinate the activity of enzymes related to oxidative stress and defense. Muskmelon were also inoculated to quantification the incidence, lesion diameter and quality parameters. In conclusion, *D. hansenii* and *S. rhizophila* inhibited *F. proliferatum* growth by diverse mechanisms such as parasitism, nutrients competition, mycoparasitism by lytic enzymes, bio-surfactants and VOCs. Marine microorganism and ulvan induced antioxidant and defense enzymes activity. The BCAs on this study used as mixed treatment are a promissory alternative on postharvest control of fruit rot in muskmelon.

**Keywords:** *Debaryomyces hansenii*, *Stenotrophomonas rhizophila*, ulvan, biocontrol, marine microorganisms.

---

Vo.Bo. Dr Luis G. Hernández Montiel  
(Co-Director)

---

Vo.Bo. Dr. Bernardo Murillo Amador  
(Co-Director)

## Dedicatoria

A Dios por estar siempre a mi lado y confortarme en los momentos difíciles.

A mis padres Tomás y Melita, mis hermanos Ulises y Magda, quienes me han brindado su cariño y apoyo incondicional. Gracias por forjar los principios de quien soy ahora.

A Mariana, gracias por tu amor y paciencia.

A todos mis familiares y amigos, porque a pesar de la distancia, siempre han estado apoyándome.

“Creo que todos tenemos un poco de esa bella locura que nos mantiene andando cuando todo alrededor es tan inmensamente cuerdo” – Julio Cortázar

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado con número (CVU/Becario): 513468/287685, y el apoyo otorgado a través de los proyectos SEP-CONACY 181972 y Problemas Nacionales 2015-01-352 CONACYT (Responsable técnico: Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por el apoyo y oportunidades durante mi formación doctoral a través de los directivos, personal administrativo y la Dirección de Estudios de Posgrado. Gracias por permitirme formar parte de una institución de tanto prestigio.

A mi comité tutorial, Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, Dr. Bernardo Murillo, Dra. Alejandra Nieto Garibay, Dr. Gabriel Rincón Enríquez y Dr. Roberto Gregorio Chiquito Contreras, por sus contribuciones a este trabajo y su tiempo invertido en mi formación académica.

A mi co-director, el Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, gracias porque a pesar de todo nunca dejo de apoyarme e instruirme. Siempre será un orgullo haber formado parte del grupo de Fitopatología del CIBNOR.

A la M.C. Norma A. Ochoa Hernández del Laboratorio de Diagnostico Microbiológico por su apoyo técnico en la realización de las dinámicas de crecimiento.

Al M.C. Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica fisiológica por su valioso apoyo técnico durante la cuantificación de carbohidratos y actividades enzimáticas.

Al M. en D. Martin G. Aguilar del Laboratorio de Fitopatología, gracias por su apoyo.

Al técnico Ariel Cruz Villacorta del Laboratorio de Microscopia Electrónica por su apoyo en la captura de imágenes.

Al área de Posgrado y Formación de Recursos Humanos a la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez y Lic. Horacio Sandoval Gómez.

## Contenido

<b>Resumen.....</b>	<b>i</b>
<b>Summary.....</b>	<b>ii</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>iv</b>
<b>Contenido.....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Generalidades del melón .....	3
2.1.1 Importancia productiva .....	3
2.2 Manejo poscosecha del melón .....	4
2.2.1 Corte, almacenamiento y transporte .....	4
2.2.2 Control físico y químico de enfermedades .....	4
2.2.3 Problemas asociados al manejo poscosecha.....	6
2.3 <i>Fusarium proliferatum</i> .....	7
2.3.1 Morfología.....	7
2.3.2 Aislamiento e identificación.....	8
2.3.3 Enfermedad.....	8
2.4 Mecanismos de defensa en los frutos.....	9
2.4.1 Reconocimiento del patógeno y transducción de señales.....	10
2.4.2 Respuesta sistémica .....	11
2.4.3 Priming .....	12
2.5 Control biológico .....	13
2.5.1 Mecanismos de acción de los ACB .....	14
2.5.2 Competencia por espacio y nutrientes .....	14
2.5.3 Sustancias antimicrobianas.....	15
2.5.4 Parasitismo y enzimas líticas.....	16
2.5.5 Inducción de resistencia .....	16
2.5.6 Tolerancia al estrés oxidativo.....	17
2.5.7 Producción de sideroforos y competencia por hierro .....	17
2.5.8 Producción de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) y surfactantes .....	17
2.5.9 Mejora de la eficiencia del control biológico .....	18
2.6 Microorganismos aislados de ambientes extremos .....	20
2.6.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	21
2.6.2 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> .....	21



2.7 Inducción de resistencia .....	22
2.7.1 Inductores abióticos.....	22
2.7.2 Inductores bióticos.....	22
2.7.3 Polisacáridos de macroalgas como inductores de resistencia.....	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos específicos .....	27
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
6.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp. en frutos de melón ...	28
6.1.1 Aislamiento.....	28
6.1.2 Pruebas de patogenicidad .....	29
6.1.3 Micrografías .....	29
6.1.4 Identificación morfológica .....	30
6.1.5 Identificación molecular .....	30
6.1.6 Análisis filogenético.....	31
6.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento de los ACB.....	31
6.2.1 Screening de microorganismos marinos con potencial antagonico.....	31
6.2.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento <i>in vivo</i> de los ACB .....	32
6.2.3 Efecto de ulvan sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de los ACB .....	33
6.3 Competencia <i>in vitro</i> por nutrientes entre los ACB y <i>F. proliferatum</i> .....	33
6.3.1 Preparación de medio a base de melón.....	33
6.3.2 Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa .....	34
6.4 Inhibición <i>in vitro</i> de VOCs por los ACB.....	35
6.6 Producción <i>in vitro</i> de enzimas líticas por los ACB hacia <i>F. proliferatum</i> .....	35
6.6.1 Extracción de la pared celular del fitopatógeno .....	35
6.6.2 Producción de enzimas líticas .....	36
6.7 Actividad enzimática en frutos de melón tratados con los ACB, ulvan y <i>F. proliferatum</i> .....	37
6.7.1 Tratamientos y muestreo .....	37
6.7.2 Extracto para actividad enzimática.....	37
6.7.3 Actividad enzimática.....	38
6.8.1 Capacidad de adhesión <i>in vivo</i> de los ACB.....	39
6.9 Intervalo de tiempo entre la aplicación de los ACB, ulvan y <i>F. proliferatum</i> en frutos de melón.....	40
6.10 Incidencia de la enfermedad y calidad del fruto .....	40
6.10.1 Parámetros de calidad.....	41

<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
7.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp. en frutos de melón ...	43
7.1.1 Patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp.....	43
7.1.2 Identificación morfológica de <i>Fusarium</i> spp. ....	43
7.1.3 Identificación molecular y análisis filogenético.....	44
7.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento de los ACB.....	45
7.2.1 Screening de microorganismos marinos con potencial antagónico.....	46
7.2.3 Efecto de ulvan sobre el crecimiento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los ACB.....	47
7.3 Competencia por nutrientes entre los ACB y <i>F. proliferatum</i> .....	49
7.4 Producción <i>in vitro</i> de enzimas líticas por los ACB .....	49
7.5 Inhibición de VOCs por los ACB .....	49
7.6 Actividad bio-surfactante de los ACB .....	51
7.7 Actividad de enzimas de defensa en frutos de melón tratados con los ACB.....	51
7.8 Efecto <i>in vivo</i> de los ACB y ulvan hacia <i>F. proliferatum</i> .....	54
7.8.1 Capacidad de los ACB para adherirse a las estructuras fúngicas .....	54
7.9 Intervalos de aplicación de los ACB y <i>F. proliferatum</i> para el control de la pudrición en frutos de melón.....	55
7.10 Incidencia de la enfermedad y parámetros de calidad en frutos de melón post tratamiento con los ACB.....	57
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
8.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp. en frutos de melón ...	59
8.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento de los microorganismos marinos .....	60
8.2.1 Screening de microorganismos antagonistas.....	60
8.2.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los ACB.....	61
8.3 Mecanismos antagónicos de <i>D. hansenii</i> y <i>S. rhizophila</i> .....	61
8.3.1 Actividad antifúngica directa .....	62
8.3.2 Competencia por nutrientes.....	62
8.3.3 Parasitismo directo .....	63
8.3.4 Surfactantes y compuestos volátiles orgánicos (VOCs).....	63
8.4 Actividad de enzimas de defensa en frutos de melón tratados con los ACB y <i>F. proliferatum</i> .....	64
8.5 Efecto de los ACB sobre <i>F. proliferatum</i> en frutos de melón .....	65
8.6 Intervalos de tiempo entre la inoculación de los ACB y <i>F. proliferatum</i> para el control de la pudrición del fruto .....	67
8.7 Incidencia de la enfermedad y parámetros de calidad .....	67
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>

<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>70</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Manejo poscosecha del melón.....	5
<b>Figura 2.</b> Modelo zig-zag de reconocimiento y defensa en fruto. ....	11
<b>Figura 3.</b> Sistema de interacción hospedero-huésped-patógeno-medio ambiente.....	15
<b>Figura 4.</b> Identificación de <i>Fusarium</i> spp.....	44
<b>Figura 5.</b> Filograma de máxima parsimonia de cepas de <i>F. proliferatum</i> .....	45
<b>Figura 6.</b> Efecto de ulvan sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i> y <i>S. rhizophila</i> .....	48
<b>Figura 7.</b> Efecto de ulvan sobre el crecimiento de <i>D. hansenii</i> .....	48
<b>Figura 8.</b> Actividad enzimática <i>in vitro</i> de <i>D. hansenii</i> y <i>S. rhizophila</i> . ....	50
<b>Figura 9.</b> Efecto de los VOCs de <i>D. hansenii</i> y <i>S. rhizophila</i> hacia <i>F. proliferatum</i> . ....	51
<b>Figura 10.</b> Actividad bio-surfactante de <i>D. hansenii</i> y <i>S. rhizophila</i> en cascara de melón. ....	52
<b>Figura 11.</b> Interacción entre los ACB, ulvan y <i>F. proliferatum</i> en frutos de melón.....	56

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Tipos de polisacáridos de macroalgas utilizados como inductores de resistencia .	24
<b>Tabla II.</b> Genes para la identificación molecular de <i>Fusarium</i> spp.....	30
<b>Tabla III.</b> Colección de cepas de microorganismos aislados de ambientes marinos del CIBNOR utilizados en el screening.....	31
<b>Tabla IV.</b> Pruebas de patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp. en frutos de melón. ....	43
<b>Tabla V.</b> Análisis de las regiones $\beta$ -Tub, TEF-1 $\alpha$ e ITS1-5.8s-ITS4 obtenidas de diferentes aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de frutos de melón.....	45
<b>Tabla VI.</b> Efecto <i>in vitro</i> de los ACB sobre el crecimiento de <i>F. proliferatum</i> .....	46
<b>Tabla VII.</b> Efecto <i>in vitro</i> de los ACB sobre la germinación de esporas de <i>F. proliferatum</i> .....	47
<b>Tabla VIII.</b> Contenido de carbohidratos en medio a base de melón inoculado con los ACB y <i>F. proliferatum</i> .....	49
<b>Tabla IX.</b> Eficiencia de <i>D. hansenii</i> , <i>S. rhizophila</i> y ulvan para el control de <i>F. proliferatum</i> en frutos de melón.....	54
<b>Tabla X.</b> Efecto de los tiempos de aplicación de <i>D. hansenii</i> , <i>S. rhizophila</i> y ulvan sobre la incidencia de la enfermedad (%DI) de <i>F. proliferatum</i> en frutos de melón .....	56
<b>Tabla XI.</b> Efecto de los tiempos de aplicación de <i>D. hansenii</i> , <i>S. rhizophila</i> y ulvan sobre el diámetro de lesión (mm) de <i>F. proliferatum</i> en frutos de melón.....	57
<b>Tabla XII.</b> Efecto de <i>D. hansenii</i> , <i>S. rhizophila</i> y ulvan sobre parámetros de calidad de frutos de melón.....	58

## 1. INTRODUCCIÓN

El melón (*Cucumis melo* L.), es comercializado mundialmente por su sabor y contenido nutricional (SENASICA, 2010). Las variedades que más se cultivan son; *inodorus* (honey dew o melón liso) y *reticulatus* (cantaloupe) (CONABIO, 2015; SENASICA, 2010). México, ocupa el sexto lugar en exportación a nivel mundial (PRODUCE, 2017). Coahuila, Guerrero, Michoacán, Sonora y Durango son los principales estados productores (SIAP, 2017). En Baja California Sur, el cultivo del melón ocupa el séptimo lugar en valor de producción (CONABIO, 2015). Sin embargo, hay pérdidas de hasta el 50% de la producción por problemas de manejo poscosecha asociados a enfermedades fúngicas (Sharma *et al.*, 2009). La principal enfermedad en poscosecha es la pudrición del fruto ocasionada por *Fusarium* spp. Esta enfermedad disminuye drásticamente la calidad del fruto y su vida de anaquel (Wang *et al.*, 2010; Zvirin *et al.*, 2010). Los fungicidas sintéticos son el tratamiento convencional que utilizan los productores (Núnes, 2012). Sin embargo, su uso ocasiona problemas de salud, contaminación (Bokshi *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2013) y resistencia en los fitopatógenos (Mari *et al.*, 2012). El control biológico, es una alternativa al tratamiento convencional con productos sintéticos (Hussain *et al.*, 2015) y se fundamenta en el uso de microorganismos antagonistas (ej. levaduras y bacterias) o sus derivados para limitar o contrarrestar el desarrollo de fitopatógenos (Spadaro y Droby, 2016). Los agentes de control biológico (ACB) suelen aislarse de la superficie de plantas, suelo o sintetizarse a partir de sus metabolitos secundarios (Sharma *et al.*, 2009). Una propuesta reciente son los microorganismos de ambientes extremos (ej. ambientes marinos), los cuales, cuentan con características fisiológicas y metabólicas eficientes que les permiten crecer, reproducirse y alimentarse en condiciones ambientales poco favorables (Blunt *et al.*, 2013; Vero *et al.*, 2013). Estudios previos, han demostrado que microorganismos marinos como la levadura *Debaryomyces hansenii* y la bacteria *Stenotrophomonas rhizophila* han sido altamente eficientes para el control de enfermedades fúngicas en las plantas (Hernández-Montiel *et al.*, 2010a; Minkwitz y Berg, 2001). A estos ACB se les atribuyen mecanismos de acción como: la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, producción de compuestos volátiles, inducción de resistencia, entre otros (Hernández-Montiel *et al.*, 2010b; Medina-Córdova *et al.*, 2016). Debido a que los ACB aplicados individualmente suelen ser menos

eficientes que los fungicidas sintéticos, se investigan tratamientos conjuntos entre ACB e inductores de resistencia (Spadaro y Droby, 2016). Previamente, el polisacárido ulvan ya se ha reportado como inductor de resistencia en plantas (Abouraïcha *et al.*, 2015; Montealegre *et al.*, 2010). Por lo cual, el tratamiento conjunto con *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan podría incrementar la eficiencia de los tratamientos individuales para el control de enfermedades de las plantas ocasionados por fitopatógenos. Aunado a esto, se deben elucidar los mecanismos involucrados en el proceso para entender la interacción tritrófica entre el hospedero, el fitopatógeno y los ACB para incrementar la eficiencia del control (Droby *et al.*, 2009). Por lo anterior, en el presente estudio se evaluaron los mecanismos de acción de los ACB (*D. hansenii* y *S. rhizophila*) y su tratamiento conjunto con el inductor de resistencia ulvan para el control de *Fusarium proliferatum* en frutos de melón.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del melón

El melón (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* cv. *cantaloupe*) pertenece a la familia de las Cucurbitáceas donde se incluyen otros vegetales de importancia económica como el pepino, sandía y calabaza (CONABIO, 2015). Se considera a África y Asia como el centro de origen del cultivo debido a la presencia de variedades silvestres en esas regiones. Para la reproducción es necesaria la dispersión del polen por medio de vectores (CONABIO, 2015). Es un cultivo anual con ciclo fenológico de 90 a 110 días y temperaturas óptimas de 25 a 28 °C (SENASICA, 2010). Las principales variedades son; *inodorus* (honey dew o melón liso) y *reticulatus* (cantaloupe) (CONABIO, 2015). Durante la maduración y senescencia del melón hay procesos fisiológicos y bioquímicos que afectan su calidad (Hadfield *et al.*, 1995). Ocurren cambios en su color, textura, aroma y sabor (Shellie y Lester, 2004). Durante esta etapa el contenido de azúcares no aumenta y se presenta una abscisión en la zona del pedúnculo (Shellie, 1999). Este fenómeno está asociado al incremento en la respiración mediada por etileno y dióxido de carbono (climaterio).

#### 2.1.1 Importancia productiva

A nivel mundial destacan China, Turquía, Irán, Estados Unidos y España con 10.52 a 0.99 millones de toneladas de producción. España ocupa el primer lugar en exportación con 307,000 ton (USDA, 2018). Mientras que México ocupa el sexto lugar con 146,000 ton, siendo Estados Unidos su principal mercado (PRODUCE, 2017). A nivel nacional se siembra una superficie total de 19,627 ha en los estados de Coahuila, Guerrero, Sonora, Michoacán y Durango principalmente. El melón es una de las cucurbitáceas más importantes en México debido a la superficie sembrada, las divisas y los empleos que genera su cultivo (INIFAP, 2002). En Baja California Sur, el melón ocupa el séptimo lugar en valor de producción, se siembran aproximadamente 227 ha y genera anualmente una derrama económica cercana a los 4 millones de pesos (SIAP, 2017). Las regiones productoras de Baja California Sur se localizan en la zona de Todos Santos (Pescadero, El Carrizal, Ejido Agua amarga, Ejido San Luis, Ejido Juan Domínguez Cota y el valle de los planes) en el municipio de La Paz, la zona



agrícola del valle de Santo domingo en el municipio de Comondú y en la zona del Vizcaíno en el municipio de Mulegé (PRODUCE, 2017).

## **2.2 Manejo poscosecha del melón**

El melón tiene una vida promedio en poscosecha de 14 días a temperatura controlada de 2 °C con un 90% de HR (Sánchez-Estrada *et al.*, 2009). Para cumplir con los parámetros de calidad, el fruto no debe tener cicatrices, grietas, golpes y lesiones (SENASICA, 2010). El reticulado debe ser uniforme, debe tener un porcentaje de sólidos solubles totales del 9-11% (Sánchez-Estrada *et al.*, 2009). Bajo estos criterios, el fruto se clasifica como Premium y tipo 1,2 y 3. El melón Premium es de exportación, el tipo 1 para comercialización nacional, el tipo 2 es destinado al mercado regional y el tipo 3, se utiliza para procesos industriales (Shellie y Lester, 2004).

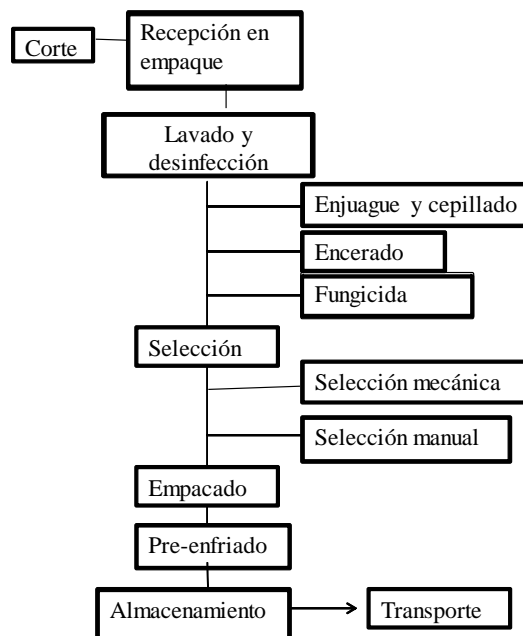
### **2.2.1 Corte, almacenamiento y transporte**

Las tareas durante el corte almacenamiento y transporte deben realizarse por personal calificado para asegurar la calidad del fruto (Fig. 1) (FAO, 1987). Al momento del corte, el tallo debe estar a media separación del pedúnculo para que el fruto madure correctamente y tenga más compuestos aromáticos (Shellie, 1999). Previo al almacenamiento, el pre enfriado a temperaturas de entre 10 y 15 °C retarda la senescencia y preserva azúcares y durante el almacenamiento, una atmosfera controlada con el 3-5% de O<sub>2</sub> y 10-20% de CO<sub>2</sub> reducen la respiración, la producción de etileno y la proliferación de microorganismos (Shellie y Lester, 2004).

### **2.2.2 Control físico y químico de enfermedades**

La pudrición es la principal enfermedad del melón en poscosecha. Los agentes causales son *Fusarium spp.*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichothecium roseum* (Wang *et al.*, 2010). El control de enfermedades inicia con buenas prácticas fitosanitarias durante el cultivo y continua con la aplicación de tratamientos físicos y químicos en poscosecha (FAO, 1987). El tratamiento físico convencional expone a bajas y altas temperaturas (2-5 °C y 57-62 °C) a los frutos (Sellie y Lester, 2004). El almacenamiento a bajas temperaturas disminuye

la tasa de respiración con lo cual se retrasa la maduración (Shellie, 2009). Para exponer a altas temperaturas se sumerge al fruto en agua caliente durante 30 s o se le aplica aire forzado durante 35 min (INIFAP, 2002). Como consecuencia se genera un cambio en el potencial de membrana de los hongos que disminuye la disponibilidad de ATP en las mitocondrias (Yang *et al.*, 2010). Algunos efectos del calor sobre el fruto son: inducción de resistencia, mejoramiento de firmeza e incremento de los ácidos tritratables (Sui *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Manejo poscosecha del melón.

Los principales tratamientos sintéticos utilizados en poscosecha del melón son los fungicidas; acibenzolar S-metil, azoxystrobin, benomil, tiofanato metálico, guazatine, imazalil, iprodione y azoxistrobin; y los desinfectantes como el hipoclorito de sodio (NaClO) (Sui *et al.*, 2014). La aplicación de fungicidas sintéticos es indispensable cuando el melón es empacado para su comercialización nacional o exportación (FAO, 1987). El lavado con hipoclorito de sodio a 200 ppm disminuye la proliferación de microorganismos y elimina los restos de materia orgánica presentes en la superficie del fruto (Núnes, 2012). Actúa como agente oxidante de las enzimas respiratorias con grupos sulfhidrilo (SH) como la succinato deshidrogenasa que interviene en el Ciclo de Krebs (McMurry, 2012). Otra alternativa química son los compuestos GRAS (Generally Regarded As Safe) dentro de los cuales están

aditivos alimenticios como el molibdato, bicarbonato de sodio y algunas otras sales (Bokshi *et al.*, 2007).

### **2.2.3 Problemas asociados al manejo poscosecha**

Un manejo poscosecha efectivo, es aquel que tiene la capacidad de inhibir o eliminar toda fuente de inóculo patógeno (Droby *et al.*, 2009). Sin embargo, los tratamientos empleados convencionalmente no aseguran la calidad e inocuidad del fruto (Bokshi *et al.*, 2007). En poscosecha hay pérdidas del 25% en países desarrollados y hasta del 50% en países subdesarrollados. Los problemas por mal manejo favorecen el desarrollo de enfermedades abióticas y bióticas (Núnes *et al.*, 2012). Las enfermedades abióticas se relacionan a factores ambientales como baja disponibilidad de nutrientes, temperaturas y pH extremos que impiden el desarrollo fisiológico normal de la planta, lo cual repercute en la calidad de los frutos (Liu *et al.*, 2013b; SAGARPA, 2012). Las enfermedades bióticas las ocasionan principalmente patógenos fúngicos como *Fusarium* spp. en melón (INIFAP, 2002). Los inóculos pueden provenir del campo y permanecer en estado de latencia o durante el manejo desde corte al transporte. En poscosecha las lesiones y heridas favorecen la penetración de los patógenos (Hussain *et al.*, 2015).

Los fungicidas sintéticos son el tratamiento convencional para prevenir enfermedades en poscosecha aún y cuando su uso presenta inconvenientes (Spadaro y Gullino, 2004). Estos productos químicos tienen efectos negativos sobre la salud, el medio ambiente y propician la resistencia en los fitopatógenos (Wisniewski *et al.*, 2016). Los factores que predisponen la resistencia microbiana a los fungicidas sintéticos son; la estructura química del compuesto utilizado (ej. bencimidazoles, fenilamidas, dicarboxamidas), mecanismo de acción del fungicida (ej. fungicidas sistémicos como azoxystrobim) y recombinación genética del fitopatógeno (ej. presencia de intrones, diploidia, entre otros) (Brent y Hollomon, 1998). Las regulaciones hacia fungicidas se han incrementado principalmente en la unión europea (UE). Los supermercados también limitan la venta de productos tratados químicamente (NOM-EM-038-FITO, 2002).

### **2.3 *Fusarium proliferatum***

*Fusarium* es un género cosmopolita con cerca de 80 especies identificadas. Sus cepas pueden ser saprofitos o fitopatógenos y, homotalicos o heterotalicos (sexual o asexual). *Fusarium* spp. es fitopatógeno para una amplia gama de hospederos (Leslie y Summerell, 2006). *F. proliferatum* fue descrito inicialmente como especie del género *Cephalosporium* por Mastushima (1971) y, posteriormente incluido como especie de *Fusarium* por Gerlach y Nirenberg (1976). Genera metabolitos secundarios como el ácido giberelico y micotoxinas como las fumonisinas. Estas micotoxinas tienen similitud estructural con los precursores de esfingolípidos actuando como inhibidores de la esfingosino N-acil transferasa que les confiere hepato y nefro toxicidad (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010).

#### **2.3.1 Morfología**

Según su morfología macroscópica, el micelio aéreo es de escaso a abundante, la pigmentación puede ser blanca, crema o purpura. Microscópicamente, el micelio es septado y los macroconidios, microconidios y clamidosporas son las estructuras asexuales de reproducción. Los macroconidios son las esporas primarias en la identificación del género. Estas estructuras no se conservan durante el cultivo *in vitro* y pudieran no estar presentes en algunas especies (Summerell *et al.*, 2003). Aunado a esto, la observación de macroconidios debe ser cuidadosa ya que algunos *Coelomyces* presentan estructuras parecidas (FAO, 2014). Los microconidios no son producidos por todas las especies (Summerell *et al.*, 2013). Las clamidosporas son el estado morfológico por el cual los hongos del género pueden permanecer por periodos prolongados en suelo y otros ambientes como saprofitos (Leslie y Summerell, 2006).

En la identificación a nivel de especie, *F. proliferatum* presenta micelio aéreo que inicialmente es blanco y posteriormente se torna morado (Summerell *et al.*, 2013). Los macroconidios son de paredes delgadas, relativamente rectos, apicalmente curvos, con 3 septos, y pueden ser de abundantes a nulos (sub-cultivos). Los microconidios son de base aplanada, sin septos, pueden formar cadenas moderadas o agregados, su distribución es abundante en el micelio aéreo y carecer de clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.3.2 Aislamiento e identificación**

Para el aislamiento, el tejido enfermo colectado debe ser de la zona circundante al tejido sano para disminuir la probabilidad de encontrar otros microorganismos que no son el agente causal, tal es el caso de *F. equiseti* y *F. semitectum* considerados colonizadores saprofitos en las lesiones (Summerell *et al.*, 2013). Durante el aislamiento e identificación, es importante considerar el medio de cultivo utilizado, la temperatura de incubación y los tiempos de exposición a la luz, ya que esto generará variabilidad en la morfología y fisiología del hongo cultivado. Para que la identificación sea precisa es importante simular las condiciones de quien describe a la especie que se busca identificar (Agrios, 2005). Las esporas y su morfología son primordiales en la identificación (Leslie y Summerell, 2006).

Los medios de cultivo idóneos para la identificación del género *Fusarium* son el agar hoja de clavel (CLA), el agar spezieller nährstoffarmer (SNA) y el agar papa dextrosa (PDA) (Leslie y Summerell, 2006). El medio CLA favorece la producción de macroconidios uniformes y, abundante producción de conidios (Summerell *et al.*, 2003). En SNA las colonias pueden permanecer largo tiempo debido a que hay esporulación y formación de microconidios. El medio PDA, permite observar claramente las características macroscópicas (Summerell *et al.*, 2003). *Fusarium* spp. cultivado en PDA puede perder su patogenicidad (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.3.3 Enfermedad**

Cuando un fitopatógeno logra colonizar al fruto puede acceder a la epidermis por medio de hifas (parásitos obligados) o entrar por lesiones (parásitos facultativos) (Núnes *et al.*, 2012). *Fusarium* spp. es un hemibiotrofo ya que penetra al melón a través de lesiones y tejido expuesto a senescencia y humedad, posteriormente puede alimentarse de células muertas (Sperschneider *et al.*, 2015). En el tejido externo (exocarpio) se forman manchas de 1 a 2.5 cm de diámetro y 1 cm de profundidad (Sui *et al.*, 2014). El tejido interior (mesocarpio) es de color blanco o rosa con un halo blanco, la consistencia es seca y esponjosa (Leslie y Summerell, 2006). El tejido enfermo se desprende fácilmente del tejido sano (Sui *et al.*,

2014). Antes de la cosecha, las lesiones permanecen verdes, mientras el resto del tejido se madura. La red en la zona afectada es más gruesa y de color oscuro. Otra característica es la formación de grietas o fisuras en la superficie del fruto (INIFAP, 2002). A nivel de especie, *F. proliferatum* puede causar enfermedad por infección natural o por inoculación (Zhang *et al.*, 2011). Esta especie causa una ruptura de los polímeros de pectina que mantienen unidas a las células del fruto por medio de la enzima poligalacturonasa (PG), lo cual causa el fenómeno de maceración. Esta enzima confiere virulencia y patogenicidad a este microorganismo hacia el melón ya que es la primera enzima secretada al momento de colonizar la superficie del fruto (Zhang *et al.*, 1999). El pH óptimo para que actúe esta enzima es de 6.0 lo cual coincide con el periodo de maduración del fruto, ya que su pH pasa de ser de 5.3 en etapa temprana al corte a 6.8 posteriormente (Sui *et al.*, 2014). Otras enzimas involucradas en su patogenicidad y virulencia son las proteasas,  $\beta$ -glucosidasas, catalasas, super óxido dismutasa y lipoxigenasa producidas por *F. proliferatum* (Leslie y Summerell, 2006).

#### **2.4 Mecanismos de defensa en los frutos**

Los frutos están bajo constante amenaza de fitopatógenos como hongos, bacterias y/o levaduras (Dukare *et al.*, 2018). En esta interacción huésped-patógeno, puede o no desarrollarse la infección (interacción compatible e incompatible) (Tian *et al.*, 2016). Para frenar la infección es fundamental que el reconocimiento del fitopatógeno y el despliegue de los mecanismos de defensa se lleven a cabo durante las primeras horas (Jones y Dangl, 2006). Esta defensa eficiente y multifacética es capaz de detener, disminuir o contrarrestar el desarrollo de enfermedades, se divide en constitutiva e inducida (Burketova *et al.*, 2015). La defensa constitutiva está conformada por barreras físicas como cera, cutícula y sustancias químicas con actividad antimicrobiana como fenoles, quininas, estilbenos, terpenoides y taninos (Agrios, 2005). La defensa inducida se genera por medio de una transducción de señales que inducirán la expresión de genes involucrados en la respuesta sistémica adquirida (RSA) y la respuesta sistémica inducida (RSI) (Silva *et al.*, 2006). Simultáneamente los fitopatógenos desarrollan efectores cuya finalidad es tratar de evadir el reconocimiento y la defensa del hospedero (Madriz-Ordeñana, 2002).

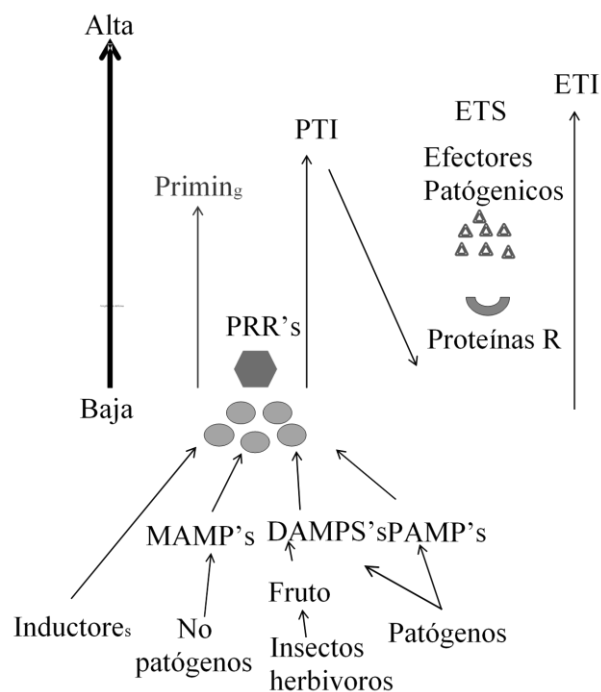
#### **2.4.1 Reconocimiento del patógeno y transducción de señales**

La interacción entre el huésped para defenderse y del fitopatógeno para suprimir dicha defensa es explicada por medio del modelo zig-zag (Fig. 2) (Jones y Dangl, 2006). La primera línea de reconocimiento se da por un mecanismo inespecífico donde se reconocen moléculas conservadas que forman parte de los microorganismos (Wiesel *et al.*, 2014). Dichas moléculas pueden ser los péptidos flg22 y elf18 derivados de flagelos de las bacterias, la quitina y sus derivados pos-degradación como N-acetil-quitin-glucosamina, glucanos presentes en la membrana de los hongos u oligo-galacturonidos derivados de pectinas que son producidos como consecuencia de la acción de enzimas y toxinas (Burketova *et al.*, 2015; Newman *et al.*, 2013). Según la función que desempeñan estos elicitores pueden ser denominados como patrones moleculares asociados a: microbios, fitopatógenos o daño (MAMP's, PAMP's o DAMP's) (Mauch-Mani, 2017). Estos elicitores son identificados por receptores de reconocimiento de patrones trans-membrana (PRR's). Esta primera línea de defensa inducida se denomina inmunidad activa por MAMP's o PAMP's (MTI/PTI) (Burketova *et al.*, 2015).

La inmunidad activada por efectores (ETI) es la segunda línea de reconocimiento (Cook *et al.*, 2015). Se expresa cuando los fitopatógenos son capaces de evadir el primer mecanismo de reconocimiento generando la inmunidad provocada por efectores (ETS) (Jones y Dangl, 2006). Se propone que estos efectores específicos son proteínas codificadas por los genes de avirulencia (Avr) en el fitopatógeno que son reconocidos por las moléculas codificadas por los genes de reconocimiento (R), también denominada interacción gen por gen (Newman *et al.*, 2013). La mayoría de los receptores codificados por los genes R se encuentran dentro de la célula y son proteínas del tipo repetición de nucleótidos vinculantes ricos en leucina (NB-LRR) (Burketova *et al.*, 2015). ETI genera una respuesta de defensa más rápida y amplia que MTI/PTI y se caracteriza por desencadenar una muerte celular conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR).

Posterior al reconocimiento por MTI/PTI o ETI, se desencadenan complejas cascadas de señalización donde están involucradas las especies reactivas de oxígeno (ROS), el flujo de

calcio, potasio, protones y el incremento de hormonas como el ácido salicílico, etileno, ácido jasmónico, entre otros (Olori-Great y Opara, 2017). El estallido oxidativo por ROS tiene acción antimicrobiana directa, genera una muerte celular y precede a la síntesis de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas, alteración de la membrana de las células estructurales por incremento de lignina y callosa, la activación de la transcripción de genes específicos relacionados a la patogénesis (PR) que codifican proteínas como  $\beta$ -1,3 glucanasas (PR-2), quitinasas (PR-3), proteasas y peroxidasas (PR-9) (Tian *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Modelo zig-zag de reconocimiento y defensa en fruto. Patrones moleculares asociados a microbios/daño/fitopatógenos (MAMP's, DAMP's, PAMP's). Receptores de reconocimiento trans-membrana (PRR's). Inmunidad activada por PAMP's (PTI). Susceptibilidad activada por efectores (ETS). Inmunidad activada por efectores (ETI).

#### 2.4.2 Respuesta sistémica

La respuesta sistémica se divide en respuesta sistémica adquirida (RSA) y respuesta sistémica inducida (RSI). RSA es una respuesta activa, de amplio espectro y que está asociada a una sobre expresión de genes PR (Cook *et al.*, 2015). Este tipo de respuesta ha demostrado ser efectiva contra una amplia variedad de fitopatógenos como hongos, bacterias y virus (Olori-



Great y Opara, 2017). La RSA es generada por fitopatógenos biótrofos y es dependiente de la señalización producida por el ácido salicílico (AS) (Jones y Dangl, 2006). RSA es una respuesta generada en todas las porciones del fruto o la planta que no están ligadas directamente al área de lesión (Hussain *et al.*, 2015). Por medio de esta vía de señalización, se sobre expresan genes relacionados a la patogénesis (genes PR). Algunos codifican proteínas líticas como  $\beta$ 1-3 glucanasa (GLU), quitinasa (CHI), Fenil alanina amonio liasa (PAL) y peroxidasa (POX) (Walters *et al.*, 2013).

La RSI, es generada por fitopatógenos necrótrofos y, es dependiente de la señalización producida por el ácido jasmónico y por el etileno (Madriz-Ordeñana, 2002). Es una respuesta inducible producida durante una interacción incompatible del fitopatógeno y el hospedero (teoría gen por gen) (García-Gutiérrez *et al.*, 2013). Por medio de esta vía de señalización, se da una resistencia ligada al sitio de la lesión y desarrollo primario de la enfermedad (Hussain *et al.*, 2015). En este proceso ocurren cambios bioquímicos para el refuerzo de las membranas celulares (lignina y suberina) y producción de antimicrobianos (fitoalexinas) que son mediados por PAL. Hay cambios en la síntesis de proteínas como CHI, GLU y POX. Este último está involucrado en la formación de lignina y peróxido de hidrógeno (Waewthongrak, 2014).

### **2.4.3 Priming**

Como ya se ha mencionado, la presencia de MAMP's, PAMP's, DAMP's y efectores desencadenan una respuesta de defensa de manera local o sistémica (RSA y RSI) (Tian *et al.*, 2016). Estos diferentes mecanismos de resistencia le ayudan al fruto a contener las posibles amenazas de los fitopatógenos. Otro mecanismo involucrado en la defensa es el priming. El cual, es un estímulo generado por MAMP's que no induce una respuesta específica y no tiene efecto negativo en el fruto y se caracteriza por un incremento en la capacidad de resistencia, la rapidez de la reacción y un estado de alerta (Mauch-Mani *et al.*, 2017). El priming puede ser generado por una gran variedad de estímulos físicos, químicos y biológicos que desencadenan memoria en el fruto ante posteriores amenazas (Romanazzi *et al.*, 2016).

## 2.5 Control biológico

Las primeras definiciones y experimentos donde se utiliza al control biológico como tratamiento alternativo a los fungicidas sintéticos datan de mediados de la década de los años ochenta (Liu *et al.*, 2013b; Wilson y Pusey, 1985). Desde entonces el control biológico se ha fundamentado en el aprovechamiento de microorganismos y el producto de los mismos para contener enfermedades en planta y fruto (Droby *et al.*, 2009). Con esta premisa se deriva la posibilidad de usar microorganismos antagonistas (ej. bacterias y levaduras) y sus derivados, como tratamientos en el control biológico (Venkateswarlu *et al.*, 2011). Los agentes de control biológico (ACB) son obtenidos de la superficie de los frutos (ej. microorganismos endófitos), de otras superficies como suelo (ej. microorganismos saprofitos) y ambientes extremos (ej. microorganismos halotolerantes) (Liu *et al.*, 2013b). Los tratamientos se realizan en pre y poscosecha. Sin embargo, en poscosecha se pueden controlar las variables ambientales, se facilita su aplicación y el tratamiento es dirigido únicamente a los frutos que se comercializarán (frutos de calidad) (Sharma *et al.*, 2009).

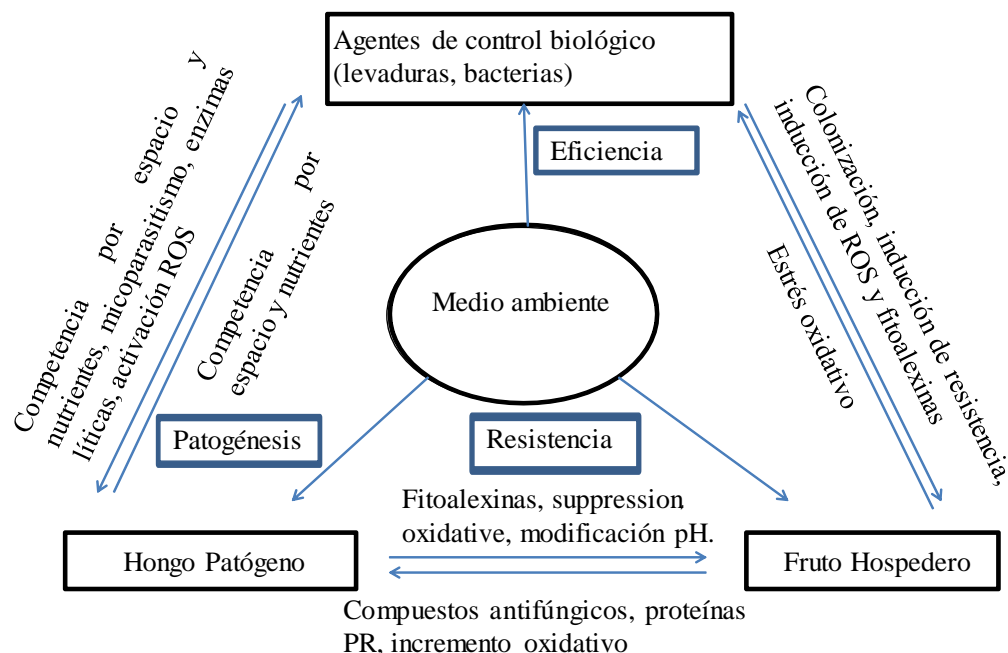
Las características de un ACB ideal son: amplio espectro, efectividad a bajas concentraciones, requerimiento nutricional mínimo, efecto prolongado, tolerancia a diferentes ambientes, resistencia a plaguicidas, nula patogenicidad, estabilidad genética y compatibilidad con otros tratamientos (Wilson y Wisniewski, 1989). Con base en estas características, destacan las levaduras, bacterias e inductores de resistencia como agentes de control hacia fitopatógenos (Liu *et al.*, 2013b). Las levaduras son fáciles de cultivar, no producen antibióticos, no contaminan el ambiente y no tienen efectos tóxicos. Las bacterias producen metabolitos secundarios efectivos para controlar a otros microorganismos (Mari *et al.*, 2012). Los inductores de resistencia estimulan los mecanismos de defensa en los frutos sin producir ningún efecto negativo y, a diferencia de los extractos, se utilizan sustancias bajo composición y concentraciones específicas (Burketova *et al.*, 2015). Estos agentes de control son administrados usualmente en poscosecha a concentraciones conocidas en solución acuosa por medio de sumergimiento o roseado del fruto (Liu *et al.*, 2013b).

### **2.5.1 Mecanismos de acción de los ACB**

Es difícil determinar los mecanismos de acción ejercidos por los ACB (Droby *et al.*, 2009). Debido a que los mecanismos pueden variar en función del sistema de interacción hospedero-fitopatógeno-ACB (Fig. 3). Además, la efectividad de los ACB suele atribuirse a una combinación de mecanismos (Jamalizadeh *et al.*, 2011). Por ello es importante elucidar los mecanismos de acción de los antagonistas ya que no se puede estandarizar su comportamiento, se puede mejorar la selección de antagonistas y es un requisito para la aprobación de biofungicidas como productos comerciales (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007; Núnes, 2012).

### **2.5.2 Competencia por espacio y nutrientes**

La competencia por espacio y nutrientes es la consecuencia del requerimiento de los mismos macro y micronutrientes como carbohidratos, nitrógeno, oxígeno y hierro por dos o más microorganismos (Francesco *et al.*, 2016). Se presenta principalmente en levaduras y es uno de los principales mecanismos de acción (Sharma *et al.*, 2009). Para que se lleve a cabo los microorganismos deben tener la capacidad de crecer rápidamente durante las primeras horas de inoculación sobre la superficie del fruto (Janisiewicz y Korsten, 2002); deben aprovechar de manera eficiente las fuentes limitadas de nutrientes con lo cual impiden el crecimiento de los fitopatógenos (Spadaro y Droby, 2016); unirse a células del huésped y a esporas e hifas del fitopatógeno por medio de compuestos surfactantes que impiden su germinación de esporas y crecimiento por reducción de espacio disponible y flujo de nutrientes (Droby *et al.*, 1989).



**Figura 3.** Sistema de interacción hospedero-huésped-fitopatógeno-medio ambiente.

### 2.5.3 Sustancias antimicrobianas

Hay una inhibición o destrucción de los fitopatógenos por metabolitos como toxinas y antibióticos que son producidos por los ACB. Los metabolitos pueden ser compuestos volátiles o no volátiles (Jamalizadeh *et al.*, 2011). Es un mecanismo ligado principalmente al control por bacterias. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* produce antibióticos como el iturin, surfactin y fengicina (García-Gutiérrez *et al.*, 2013). La producción de sustancias con actividad antimicrobiana puede estar condicionada por factores como oxígeno, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Di Francesco *et al.*, 2016). *Penicillium syringae* produce siringomicina en determinado estadio fisiológico y bajo condiciones donde exista disposición de nutrientes (Tampakaki *et al.*, 2009). Basados en los resultados *in vitro* es difícil determinar el impacto real (*in vivo*) de la producción de los compuestos antimicrobianos ya que muchas veces no es posible detectarlos (Bull *et al.*, 1998; Spadaro y Droby, 2016). Controversialmente se dice que es un mecanismo poco deseable en los microorganismos antagonistas debido a la posible generación de resistencia, sin embargo, es uno de los más importantes (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). De esto se deriva la duda de si los

microorganismos que producen antibióticos son dañinos para el medio ambiente y si se genera o no resistencia con el uso prolongado de los mismos (Núnes, 2012).

#### **2.5.4 Parasitismo y enzimas líticas**

En el parasitismo los ACB se alimentan del fitopatógeno, ocasionando una destrucción directa por lisis de estructuras como la membrana celular de los hongos. La membrana celular está compuesta principalmente por glucanos (50 - 60%), quitina (> 20%) y proteínas (20 - 30%) (Spadaro y Droby, 2016). Por lo cual, la excreción por los antagonistas de enzimas como glucanasas, quitinasas y proteasas está ligada a este mecanismo (Sharma *et al.*, 2009). Para que el parasitismo se lleve a cabo efectivamente es necesario un contacto directo entre el fitopatógeno y antagonista (Venkateswarlu *et al.*, 2012). Sharma *et al.* (2009), mencionan que es importante que las levaduras tengan la capacidad de adherirse a los fitopatógenos para que las enzimas sean efectivas. Por ejemplo, *Pillia guillermondi* se adhiere fuertemente a las hifas de *Botrytis cinérea* y *Penicillium* sp. con lo cual las hifas muestran una apariencia cóncava y daño en sus membranas (Wisniewski *et al.*, 1991).

#### **2.5.5 Inducción de resistencia**

Las plantas y los frutos tienen la capacidad de defenderse con diferentes mecanismos inducidos por la presencia de fitopatógenos o moléculas elicitoras que actúan como MAMP's. Los inductores pueden ser componentes de membrana o compuestos químicos de origen natural (Liu *et al.*, 2013a). Por medio de ellos se desencadenan cambios estructurales con posible expresión local o sistémica y cambios bioquímicos (Venkateswarlu *et al.*, 2012). La inducción de defensa incrementa la actividad de proteínas PR como las enzimas quitinasas,  $\beta$  1-3 glucanasas y proteasas. Bioquímicamente se intensifica la concentración fisiológica de ROS como peróxido de hidrógeno y de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas (Jamalizadeh *et al.*, 2011). Estructuralmente se refuerzan las células de la membrana celular del fruto por medio de la síntesis de lignina y callosa (Sharma *et al.*, 2009). La inducción de resistencia producida por los microorganismos antagonistas no genera enfermedad en el hospedero (Venkateswarlu *et al.*, 2012). *Bacillus subtilis* induce resistencia

en planta de melón por RSA con producción de especies reactivas de oxígeno y refuerzo de la membrana celular (García-Gutiérrez *et al.*, 2013).

### **2.5.6 Tolerancia al estrés oxidativo**

La producción de ROS es la primera respuesta del fruto ante la presencia de microorganismos sean o no fitopatógenos. Puede haber un segundo incremento de ROS con más intensidad en interacciones incompatibles (Spadaro y Droby, 2016). Por ello la tolerancia a ROS de un antagonista es importante (Liu *et al.*, 2013b). Liu *et al.* (2012), demostraron que una cepa de *Candida oleophila* adaptada al estrés oxidativo mostró mejores niveles de control biológico que las cepas no adaptadas. El anión super óxido puede servir como señal para la formación de biofilms. Esta modificación morfológica de los microorganismos para formar biofilms ayuda a incrementar la resistencia a dicho estrés (Droby *et al.*, 2009).

### **2.5.7 Producción de sideróforos y competencia por hierro**

Los sideróforos actúan uniéndose al hierro para transportarlo a través de receptores de membrana (Ali y Vidhale, 2013). El hierro es esencial para el crecimiento de los hongos y para su patogénesis. Participa en la transportación de electrones y es un cofactor de muchas enzimas. Kloepper *et al.* (1980), fueron los primeros en demostrar la importancia de la producción de sideróforos por *Pseudomonas fluorescens* como mecanismo de control biológico hacia *Erwinia carotovora*. También, *Metschnikowia pulcherrima* inhibió el crecimiento de *B. cinérea*, *Alternaria alternata* y *P. expansum* por la producción de sideróforos que agotaron el hierro disponible (Liu *et al.*, 2013a; Núnes, 2012).

### **2.5.8 Producción de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) y bio-surfactantes**

Los microorganismos antagonistas pueden producir metabolitos con actividad antifúngica, dentro de los cuales, los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) son importantes en la inhibición del crecimiento de hongos patógenos (Mari *et al.*, 2016). Los VOCs son una mezcla de compuestos lipofílicos de bajo peso molecular. La importancia de VOCs producidos por hongos (Morath *et al.*, 2012), levaduras (Di Francesco *et al.*, 2015) y bacterias

(Zheng *et al.*, 2013) han sido reportados en el control poscosecha de enfermedades. La levadura *Aureobasidium pullulans* produce VOCs como 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, alcohol fenetil y 2-metil-1-propanol que han mostrado actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinérea* y *Penicillium* spp. (Di Francesco *et al.*, 2014). En las bacterias, diferentes estudios reportan la producción de VOCs por *Bacillus* spp., *B. thuringiensis* y *B. pumilus* redujeron el 88.5% de la antracnosis en mangos por producción de VOCs (Zheng *et al.*, 2013).

Debido a que la tensión superficial es esencial en muchos procesos de la vida, organismos como levaduras y bacterias, han desarrollado bio-surfactantes para controlar la tensión superficial en su ambiente (Sunde *et al.*, 2017). Los bio-surfactantes tienen capacidad anfipática, lo cual, les permite migrar entre regiones hidrofílicas e hidrófobas según sea necesario y así reducir la tensión superficial (Cooper y Kennedy, 2010). Los bio-surfactantes están compuestos por ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos y proteínas surfactantes (Mnif y Ghribi, 2015b). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* secreta bio-surfactantes que le permiten formar biofilms como mecanismo de control hacia *P. expansum* en manzanas (Scherin *et al.*, 2003). En bacterias, *B. subtilis* secreta un bio-surfactante que le permite colonizar rápidamente la piel del fruto de melón (Wang *et al.*, 2010).

### **2.5.9 Mejora de la eficiencia del control biológico**

La mejora en el control biológico se realiza con la finalidad de incrementar su eficiencia, ampliar el espectro de acción y realizar acciones curativas (aparte de las acciones preventivas que se realizan) (Núnes, 2012). Las alternativas para su mejora son: A) Manipulación físico-química del ambiente, B) Uso simultaneo de varios microorganismos antagonistas, C) Modificación fisiológica y genética de los microorganismos, D) Combinación de tratamientos precosecha y poscosecha y, E) Integración con otros métodos (Janisiewicz y Korsten, 2002).

- A) Los frutos son almacenados a determinadas temperaturas, humedad relativa y concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> para ser preservados. Por lo cual, la manipulación físico-química no debe afectar la calidad del fruto. Dicha manipulación estimulará el

crecimiento y colonización de los ACB. Para ello, los nutrientes adicionados no deben beneficiar al fitopatógeno. El-Ghaouth *et al.* (2000), mencionan que la adición de 2-deoxi-D-Glucosa al 0.2% mejoró la actividad antagonista de *Candida saitoana* hacia *Penicillium* sp. en cítricos, con resultados similares a los del fungicida imazalil.

- B) Individualmente es difícil que los antagonistas presenten un amplio espectro. Por lo tanto, al utilizar en tratamiento conjunto a varios microorganismos compatibles se busca generar un amplio espectro de acción, incrementar la efectividad bajo diferentes cultivares y estadios de maduración del fruto, diversificar los mecanismos de acción y evitar la transformación genética (Sharma *et al.*, 2009). Antes de combinar antagonistas es fundamental comprobar que no haya un efecto antagónico entre ellos (Fukui *et al.*, 1999). Los resultados de la combinación de *Pseudomonas syringae* y *Sporobolomyces roseus* para el control de *P. expansum* en manzana fueron mejores a los obtenidos en el tratamiento individual de dichos antagonistas (Janisiewicz y Bors, 1995).
- C) Los microorganismos antagonistas son modificados fisiológicamente para adaptarse a las fluctuantes condiciones ambientales a las que son sometidos y para mejorar su acción como antagonistas. La adición de zinc en el medio de crecimiento de *P. fluorescens* incrementó la producción del antibiótico fenazina con lo cual se inhibió a *Gaeumannomyces graminis* en trigo (Slininger y Jackson, 1991). La manipulación genética es una actividad relativamente nueva, cuyo objetivo es la inserción de genes involucrados en la actividad anti-fúngica o de genes que mejoren el aprovechamiento de los nutrientes. No obstante, se deben tener en cuenta las regulaciones de los organismos genéticamente modificados (OGM) y el posible impedimento de su introducción como ACB en poscosecha de frutos (Núnes, 2012).
- D) Hay dos ventajas de los tratamientos precosecha para el control biológico de enfermedades en poscosecha. La primera ventaja es que el fruto ya está pre-colonizado con los ACB antes de la cosecha, donde podrían presentarse lesiones y daño. La segunda ventaja es que con este tratamiento se puede reducir la incidencia de enfermedades por fitopatógenos latentes (Janisiewicz y Korsten, 2002). Un tratamiento con *Cryptococcus infirmo-miniatus*, *C. laurentii* y *Rhodosporidium*



*glutinis* en pera, tres semanas antes de la cosecha, redujo hasta en un 96% la incidencia de la enfermedad por *B. cinérea* (Benbow y Sugar, 1999).

- E) Durante las últimas décadas se ha tratado de sustituir a los fungicidas sintéticos por tratamientos alternativos como agua y aire caliente, inductores de resistencia, compuestos GRAS y radiación UV, entre otros. Hasta el momento estos tratamientos no muestran resultados significativos como tratamientos individuales. No obstante, tratamientos con inductores de resistencia en conjunto con microorganismos antagonistas han mostrado una acción sinérgica en el control de enfermedades y sus resultados son equiparables a los obtenidos por fungicidas sintéticos (Spadaro y Gullino, 2004). Por ejemplo, la aplicación simultánea del ácido salicílico y *R. glutinis* controlaron de manera eficiente a *P. expansum* y *Alternaria alternata* en cereza, en comparación con los tratamientos individuales (Quin *et al.*, 2003). A nivel comercial se han creado productos como InovaCoat que es una combinación de *C. saitona* con quitosan o InovaCure que contiene *C. saitona* y una lisozima (Droby *et al.*, 2009).

## **2.6 Microorganismos aislados de ambientes extremos**

Los microorganismos utilizados como ACB comúnmente son epífitos y/o saprófitos (Sharma *et al.*, 2009). Sin embargo, en el manejo poscosecha los antagonistas son sometidos a cambios de pH, temperatura, estrés oxidativo y humedad que pueden afectar su eficiencia (Liu *et al.*, 2013b). Es por ello que microorganismos aislados de ambientes marinos y suelos antárticos han obtenido excelentes resultados como antagonistas en el control poscosecha de fitopatógenos (Hernández-Montiel *et al.*, 2010a). Estos microorganismos son sometidos a condiciones ambientales extremas que mejoran sus cualidades fisiológicas debido a la adaptación para reproducirse, crecer y alimentarse. Las adaptaciones que estos microorganismos tienen los hacen buenos candidatos como ACB. Por ejemplo, Vero *et al.* (2013), trabajaron con *Leucosporidium scottii* aislada de suelos antárticos para el control poscosecha de manzana, buscando microorganismos que estuvieran adaptados a las condiciones de almacenamiento de estos frutos y que también fueran buenos antagonistas contra *P. expansum* y *B. cinérea*.

### **2.6.1 *Debaryomyces hansenii***

El género *Debaryomyces* se conforma por levaduras haploides y algunas especies cuentan con un pseudomicelio primitivo o bien desarrollado. *Debaryomyces hansenii* se ha aislado de ambientes marinos, suelo y alimentos como quesos, vinos, cerveza, carne y productos azucarados (Hernández-Montiel *et al.*, 2010a). Esta levadura puede crecer a concentraciones mayores del 25% de NaCl, almacena más del 70% de su biomasa seca en lípidos, soporta altas concentraciones de dióxido de cloro y es resistente a algunos antimicrobianos como penconazol, benomil y cicloheximida (Breuer y Harms, 2006). *D. hansenii* como ACB ha obtenido resultados significativos en el control de enfermedades en uvas, cítricos, maíz, entre otros (Hernández-Montiel *et al.*, 2012; Medina-Cordoba *et al.*, 2016). Se le atribuye diversos mecanismos de acción como la producción de toxinas como miocin, producción de enzimas líticas como glucanasas y proteasas, competencia por espacio y nutrientes e inducción de resistencia (Hernández-Montiel *et al.*, 2010b).

### **2.6.2 *Stenotrophomonas rhizophila***

El género *Stenotrophomonas* está localizado en la subclase de las proteobacterias. En el género están las especies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas nitritireducens*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Stenotrophomonas acidaminophila*, *Stenotrophomonas Korensis*, *Stenotrophomonas terrae*, *Stenotrophomonas humi* y *Stenotrophomonas chelatiphaga*. Solo *S. maltophilia* y *S. rhizophila* presentan asociación con plantas. A diferencia de la primera, *S. rhizophila* no es patógena para los seres humanos (Alavi *et al.*, 2014). *S. rhizophila* se identificó y caracterizó por primera vez en el 2002 por Wolf *et al.* Dentro de las características de *S. rhizophila* destaca la cualidad de ser un promotor de crecimiento, sobrevivir a concentraciones del 4.5% de NaCl y tener interacción benéfica con las plantas (Berg *et al.*, 2010). Puede crecer a temperaturas de 4 °C e inhibirse su crecimiento a 40 °C. Esta tolerancia se da por medio de la acumulación de glucosil glicerol y trealosa para disminuir el potencial osmótico intracelular que le permitan a la célula llevar a cabo sus funciones metabólicas (Hageman *et al.*, 2008). Cultivos *in vitro* de *S. rhizophila* pueden producir enzimas degradadoras de la membrana de hongos, sideróforos y compuestos anti-fúngicos (Schmidt *et al.*, 2012). En poscosecha ya se han obtenido resultados significativos

para el control de antracnosis ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides* en mango (Hernandez-Montiel *et al.*, 2017).

## **2.7 Inducción de resistencia**

La susceptibilidad del fruto a la enfermedad puede ser disminuida por la inducción de resistencia (Droby *et al.*, 2009). Es definida como la acción de aplicar compuestos de origen biológico o químico para estimular el sistema de defensa en la planta o fruto sin generar ninguna enfermedad (Hussain *et al.*, 2015). Los inductores se dividen por su naturaleza en abióticos y bióticos con origen fisicoquímico y biológico respectivamente (Patel y Krishmanurly, 2013). Probenazol fue el primer producto comercializado como inductor de resistencia en Japón en 1975 (Walters *et al.*, 2013).

### **2.7.1 Inductores abióticos**

Dentro de los inductores abióticos de resistencia destacan los análogos de ácido salicílico. El acibenzolar es un compuesto no tóxico también conocido como ASM, Bion™, Actigard™. En frutos de melón actúa como RSA induciendo la síntesis de proteínas PR, incrementando la actividad de POD, PAL y CHT, la producción ROS, así como el contenido de fenoles totales, lignina, suberina y callosa (Prusky y Ludovica-Gullino, 2010). Derivado de estudios de estructura química de los benzotiadiazoles y su capacidad para inducir resistencia se descubrió otro compuesto análogo del ácido salicílico de menor precio llamado benzo-(1, 2, 3)-tiadiazol-7-carboxilato S-metil éster ó BTH con mejores resultados que su antecesor (ASM) en la inducción de resistencia (Walter *et al.*, 2013).

### **2.7.2 Inductores bióticos**

La resistencia se puede inducir a partir de productos de origen biológico. Hay registro del uso de algunos extractos, paredes celulares de levaduras y el uso de cepas atenuadas o avirulentas. Sánchez-Estrada *et al.* en el 2009 utilizaron células atenuadas de *Fusarium oxysporum* para inducir la resistencia en melón enfermo del mismo hongo, concluyendo que el inductor biótico y el fitopatógeno inducían los mismos mecanismos de defensa en melón con la misma intensidad. Harpin o Messenge™ es una proteína rica en glicina, resistente al

calor. Producido por el gen *hrpN* de la bacteria *Erwinia amylovora*. Es un bio-polímero de gran abundancia que tiene actividad antimicrobiana y puede activar la RSI en el fruto y HR (Prusky y Ludovica-Gullino, 2010; Waewthongrak *et al.*, 2015). Harpin en tratamiento poscosecha disminuyó la severidad de la enfermedad por *A. alternata*, *F. semitectum*, *T. roseum*. No demostró efecto fungicida *in vitro* e indujo la RSA (Prusky y Ludovica- Gullino, 2010).

### **2.7.3 Polisacáridos de macroalgas como inductores de resistencia**

Las macroalgas crecen rápidamente y tienen un alto contenido de biomasa. Los polisacáridos y otros compuestos bio-activos obtenidos en sus extractos han sido utilizados en la agricultura sin la necesidad de la síntesis de nuevas moléculas. Estas características favorecen la tendencia del mercado de productos eficientes, inocuos y sustentables (Vera *et al.*, 2011). A pesar de que se ha investigado poco sobre sus cualidades como estimulantes e inductores de resistencia en las plantas (Tabla I) (Araújo *et al.*, 2014), ya se ha demostrado el gran potencial de los mismos como inductores de resistencia (Klarzynski *et al.*, 2000; Mercier *et al.*, 2001).

Los principales polisacáridos de membrana de las algas verdes son los ulvanos; de las algas rojas son los agaranos y carragenanos; en algas cafés son los alginatos, fucanos y la laminarina (Vera *et al.*, 2011). El polisacárido ulvan, nombrado por primera vez así en 1993, está compuesto químicamente por el ácido glucurónico y ramnosa sulfatada (Alves *et al.*, 2013). Este polisacárido se obtiene a partir de procesos subsecuentes donde se involucran pasos como extracción, purificación, precipitación y liofilizado (Lahaye y Robic, 2007). Tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, productos de belleza, industria alimenticia y en la agricultura donde los extractos de *Ulva* spp. se utilizan como fertilizantes, promotores de crecimiento e inductores de resistencia (Araujo *et al.*, 2008; Cluzet *et al.*, 2004; De Freitas y Stadnik, 2015; Jaulneau *et al.*, 2010; Montealegre *et al.*, 2010; Paulert *et al.*, 2009).

**Tabla I.** Polisacáridos de macroalgas utilizados como inductores de resistencia en poscosecha.

Polisacárido	Alga	Fitopatógeno	Fruto	Resultados
Ulvan	<i>Ulva sp.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	Se sumergió al fruto en 0.1 g L <sup>-1</sup> de ulvan con posterior inoculación del patógeno (10 <sup>5</sup> esporas mL <sup>-1</sup> ) a las 48 h. Se redujo un 56% la incidencia, esto solo en condiciones controladas (Montealegre <i>et al.</i> , 2010).
Ulvan	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Penicillium expansum</i> ,	Manzana	20 µL de ulvan y oligoulvan (5 mg mL <sup>-1</sup> ) con inoculación de <i>P. expansum</i> y <i>B. cinérea</i> a las 12 h (10 <sup>5</sup> y 10 <sup>6</sup> esporas mL <sup>-1</sup> ). Ulvan redujo un 30% (p<0.5) la incidencia de <i>B. cinérea</i> . Oligoulvan fue altamente efectivo (p<0.01) contra ambos fitopatógenos (Abouraïcha <i>et al.</i> , 2015).
Oligoulvan		<i>Botrytis cinerea</i>		
Laminarina	<i>Laminaria J.V.Lamour</i>	<i>Monilinia laxa</i> , <i>Botrytis cinérea</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Cereza	Después de 7 días a 20 °C y 95% de HR, <i>M. laxa</i> y <i>B. cinérea</i> obtuvieron según el McKinney index solo un 13.1 y 25.6% de incidencia (Feliziani <i>et al.</i> , 2013).
	<i>Ochtodes secundiramea</i>  <i>Laurencia dendroidea</i>	<i>Colletotrichum musae</i>	Banana y Papaya	<i>Laurencia dendroidea</i> y <i>Ochtodes secundiramea</i> tuvieron acción anti-fúngica significativa con inhibición del 78.98 y 88.42% respectivamente para <i>C. musae</i> y 9.87 y 100% para <i>C. gloeosporioides</i> (Machado <i>et al.</i> , 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las pérdidas poscosecha por enfermedades fúngicas son un problema tanto para países desarrollados como países subdesarrollados. En la producción de melón, donde México ocupa los primeros lugares en exportación, los problemas de manejo favorecen la pudrición del fruto por hongos como *Fusarium* spp. La aplicación de fungicidas sintéticos es el manejo convencional para prevenir este tipo de enfermedades. No obstante, estos productos químicos generan contaminación ambiental, toxicidad, altos costos de producción y resistencia microbiana. A causa de ello, se han incrementado las medidas regulatorias de su uso y las dosis aplicadas.

El control biológico surge como una alternativa viable para contrarrestar dichos problemas. Particularmente, los microorganismos de origen marino presentan condiciones fisiológicas y metabólicas que los hacen excelentes candidatos para la protección poscosecha de frutos hacia enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos. Sin embargo, es desconocido si *D. hansenii*, *S. rhizophila* y el inductor de resistencia ulvan como tratamiento conjunto puede incrementar la eficiencia en el control de la pudrición en melón ocasionada por *F. proliferatum*, así como los mecanismos de acción involucrados en el proceso de protección. Su conocimiento es fundamental para mejorar la eficiencia del control biológico. También es un requisito para la formulación y registro de productos comerciales. Económicamente, se pueden disminuir las pérdidas poscosecha, se puede facilitar la exportación al cumplir las normas regulatorias, se obtiene un valor agregado en el producto cuyo tratamiento es compatible con la producción orgánica y se disminuyen los altos costos de producción asociados al uso de productos como los fungicidas sintéticos.

#### **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento conjunto de la levadura *D. hansenii*, la bacteria *S. rhizophila* y el inductor de resistencia ulvan disminuirán la enfermedad causada por *F. proliferatum* en frutos de melón debido a alguno de los mecanismos antagónicos como la competencia por nutrientes, enzimas líticas, VOCs, bio-surfactantes y/o la inducción de enzimas de defensa en el hospedero.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar los mecanismos involucrados de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan como tratamiento en conjunto o individual para el control de *F. proliferatum* en frutos de melón.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Aislar, identificar y determinar la patogenicidad de *Fusarium* spp. en frutos de melón.
- 2) Evaluar el efecto de ulvan sobre el crecimiento de los ACB.
- 3) Cuantificar *in vitro* la competencia por nutrientes de los ACB y *F. proliferatum*.
- 4) Determinar *in vitro* la producción de enzimas líticas de los ACB.
- 5) Evaluar *in vitro* la inhibición por VOCs de los ACB.
- 6) Identificar *in vitro* la actividad bio-surfactante de los ACB.
- 7) Cuantificar el contenido de enzimas de defensa en frutos de melón tratados con los ACB, ulvan y *F. proliferatum*.
- 8) Determinar el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de los ACB y ulvan sobre el control de *F. proliferatum* en frutos de melón.
- 9) Cuantificar el efecto del intervalo de tiempo entre la aplicación de los ACB, ulvan y *F. proliferatum* sobre el control de la pudrición en frutos de melón.
- 10) Determinar la incidencia de la enfermedad y parámetros de calidad de frutos de melón tratados con los ACB y ulvan.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Frutos

Los frutos de melón (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* cv. *cantaloupe*) fueron colectados de una huerta comercial localizada en El Pescadero, Baja California Sur, México. Para el aislamiento de *Fusarium* spp. se buscaron frutos con signos y síntomas de pudrición. Los frutos para los experimentos posteriores, se colectaron en madurez comercial, libres de heridas, sin enfermedad, uniformidad en peso y tamaño (frutos de calidad comercial tipo 1).

### Preparación de inóculos

*Fusarium* spp. Se sembraron taquetes de 0.5 cm de diámetro de cada aislamiento en placas con agar papa dextrosa (PDA, Difco 39 g L<sup>-1</sup>) más bactrol al 0.5%. Las placas se incubaron (Sanyo®, MIR-553) a 28 °C por 7 días. Después se colectaron las esporas y se ajustó su concentración con un hematocitometro.

*D. hansenii*. Se inoculó una alícuota en un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL de caldo papa dextrosa (CPD, Difco 39 g L<sup>-1</sup>), se incubó por 48 h a 28 °C en un agitador (Thermo scientific®, MAXQ4450) a 180 rpm. Las células se colectaron por centrifugación a 3000 rpm por 10 min y el sedimento se resuspendió en agua destilada estéril y se ajustó su concentración con un hematocitometro.

*S. rhizophila*. Se inoculó una alícuota en un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL de caldo soya tripticaseína (CST, Difco 30 g L<sup>-1</sup>), se incubó por 48 h a 28 °C en un agitador a 180 rpm. La concentración se ajustó utilizando un espectrofotómetro (Uv/Vis) a 660 nm (HACH®, DR 2700) y absorbancia de 1.

### 6.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp. en frutos de melón

#### 6.1.1 Aislamiento

*Fusarium* spp. fue aislado de frutos de melón con síntomas de pudrición. Se cortaron tres trozos del exocarpio (0.5 cm<sup>2</sup>) enfermo de cada fruto. Las muestras se lavaron con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) por 3 min y después dos lavados con agua destilada estéril. Los trozos se dejaron secar y se colocaron en placas con PDA más bactrol y, se incubaron a 28 °C por

7 días. Las colonias diferenciadas fueron resembradas mediante el método punta de hifa hasta obtener cultivos puros (Agrios, 2005). Los aislamientos se mantuvieron en placas con PDA y tubos inclinados a 4 °C.

### 6.1.2 Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad se siguió la metodología propuesta por Navarta *et al.* (2014) con modificaciones. Los hongos se cultivaron en PDA a 28 °C por 7 días. Las esporas se colectaron por raspado con una espátula y agua destilada estéril. La concentración se ajustó a  $1 \times 10^4$  esporas mL<sup>-1</sup>. Los frutos de melón fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 2% por 3 min, se enjuagaron en agua destilada estéril y se dejaron secar. Posteriormente, se realizaron heridas de 2 mm de diámetro. En cada herida se inoculó 20 µL de cada hongo aislado. Un grupo de frutos fue inoculado con agua destilada estéril como control. Los frutos se almacenaron a 27 °C y 90% de HR en recipientes de polipropileno estériles. A los 7 días de almacenamiento, se midió el diámetro de lesión con un vernier digital (Traceable® Digital Calipers) y se determinó el porcentaje de incidencia de la enfermedad (%DI) (Saravanakumar *et al.*, 2016) mediante la siguiente formula:

$$\% DI = \frac{FI}{TF} \times 100 \quad (1)$$

Dónde: Fi es el número de frutos infectados y TF es el total de frutos.

El diseño experimental fue completamente al azar y cada tratamiento se repitió diez veces. Se re-aisló cada hongo de los frutos enfermos en placas con PDA para confirmar los postulados de Koch (Agrios, 2005).

### 6.1.3 Micrografías

Se tomaron 0.5 cm<sup>2</sup> de tejido de los frutos inoculados con cada hongo. El tejido se fijó con glutaraldehído al 2% (v/v) por 5 min. Después, cada muestra se lavó con agua destilada estéril y se realizó una deshidratación parcial con gradientes ascendentes de etanol (30, 50, 70, 80, 95 y 100%, v/v) por 20 min. Las muestras se secaron a punto crítico con CO<sub>2</sub> y se cubrieron con oro para ser analizadas por MEB (Hitachi®, S-300 N).

#### 6.1.4 Identificación morfológica

Los hongos fitopatógenos aislados se cultivaron en PDA y agar hoja de clavel (AHC, 10 g mL<sup>-1</sup>) a 28 °C por 7 días (Schroers *et al.*, 2016). Las características morfológicas de cada hongo se determinaron con las claves taxonómicas descritas por Booth (1971), Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1994).

#### 6.1.5 Identificación molecular

Los hongos aislados se cultivaron en CPD a 28 °C por 7 días. La masa micelial fue recolectada para extraer el ADN según la metodología propuesta por Ochoa *et al.* (2007). Se amplificaron tres fragmentos de genes (Tabla II) utilizados como marcadores moleculares en la identificación de hongos. Los primers fueron sintetizados por la empresa Sigma-Genosys (EUA). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca iCycler Bio-Rad modelo T100 con un periodo de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (los cuales comprendían una desnaturalización a 95 °C por 1 min, la alineación por 30 s a 50 °C y una extensión de 1 min a 72 °C), con una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA<sup>®</sup>), y fueron teñidos con gel red (0.057 µL mL<sup>-1</sup>). Se visualizaron en un transiluminador marca Bio-Rad<sup>®</sup> (Gel Doc XR). Todos los productos de PCR fueron purificados (QIAquick kit, Qiagen<sup>®</sup>) y secuenciados (Genewiz<sup>®</sup>, New Jersey, EUA). Se compararon las regiones amplificadas de: ITS1- 5.8s – ITS4, β-Tubulina y TEF-1α de cada hongo con las secuencias de hongos almacenadas en la base de datos del GenBank por medio de la búsqueda local de alineamientos de secuencias nucleotídicas (BLAST).

**Tabla II.** Genes amplificados para la identificación molecular de cepas de *Fusarium* spp.

Gen	Secuencia (5' → 3')	Referencia
<b>Factor elongación transduccional (TEF-1α)</b>		
EF-1	ATGGGTAAGGAAGACAAGAC	O'Donell <i>et al.</i> , 1998
EF-2	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	
<b>Beta tubulina (BT)</b>		
BT 3	CGTCTAGAGGTACCCATACCGGCA	Tooley <i>et al.</i> , 2001
BT 5	GCTCTAGACTGCTTTCTGGCAGACC	
<b>Región inter- génica ribosomal</b>		
ITS1	TCCGTAGGTGAACCCTGCGG	Vilgalys <i>et al.</i> , 1994
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

### 6.1.6 Análisis filogenético

Para estudiar la relación evolutiva entre diferentes miembros de la compleja especie *F. proliferatum*, se realizó un análisis filogenético usando el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Se seleccionaron secuencias relevantes del marcador molecular ITS de la literatura y secuencias obtenidas por BLAST. Por parsimonia máxima se infirió el clado con base en 1000 repeticiones de las líneas de arranque (Bootstrap). Se utilizó una secuencia de ITS de una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (AY354393) como representante de una especie compleja en el género que causa pudrición del fruto. *Fusarium foetens* (KF467433.1) se utilizó como grupo externo.

## 6.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento de los ACB

### 6.2.1 Screening de microorganismos marinos con potencial antagonico

Previo a los experimentos del objetivo particular dos, se hicieron pruebas de antagonismo (screening) de bacterias y levaduras de la colección de microorganismos aislados de ambientes marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) (Tabla III). Se seleccionó a la bacteria y la levadura con mejores resultados en las pruebas de antagonismo para utilizarse en los objetivos posteriores.

**Tabla III.** Colección de cepas de microorganismos aislados de ambientes marinos del CIBNOR utilizados en el screening.

Microorganismos	Identificación	Claves
Levaduras	<i>Debaryomyces hansenii</i>	L01, L02, L03
	<i>Cryptococcus diffluens</i>	N02
	<i>Rhodotorula minuta</i>	R04, R06
Bacterias	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	RK01, RK02, RB01, RB02.
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ba01, Ba02.

#### 6.2.1.1 Inhibición del crecimiento micelial

Se inocularon taquetes de *F. proliferatum* de 0.5 cm de diámetro y 7 días de incubación a 28 °C en el centro de placas con PDA. En los dos extremos de cada placa (2.5 cm del centro) se inoculó por estría lineal de 4 cm a cada uno de los microorganismos (Tabla III). Después de

7 días de incubación (28 °C) se midió el área del crecimiento micelial utilizando el programa ImageJ®.

El porcentaje de inhibición (% I) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{G_c - G_t}{G_c} \times 100 \quad (2)$$

Dónde: G<sub>c</sub> es el área de crecimiento micelial del hongo en las placas control y G<sub>t</sub> es el área de crecimiento micelial del hongo en las placas con los tratamientos (Saravanakumar *et al.*, 2016).

El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron los diferentes antagonistas en confrontación con *F. proliferatum* y el fungicida sintético benomil (1000 ppm) como control.

#### **6.2.1.2 Inhibición de la germinación de esporas**

En microtubos de 1.5 mL se mezclaron 500 µL de la suspensión de *F. proliferatum* (1 x 10<sup>4</sup> esporas mL<sup>-1</sup>) y 500 µL de las suspensiones de levaduras (1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>) y/o bacterias (1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>). En otro grupo de microtubos se mezclaron 500 µL de benomil y 500 µL de la suspensión de *F. proliferatum* (1 x 10<sup>4</sup> esporas mL<sup>-1</sup>) como tratamiento control. Los microtubos con las mezclas se incubaron en agitación a 180 rpm y 28 °C. Cada 12 h se calculó el porcentaje de esporas germinadas (considerando una espora germinada cuando la hifa es igual o de mayor tamaño que la longitud que la espora). Las muestras se observaron en un microscopio óptico compuesto (CARL ZEISS, Primo Star). Para calcular el porcentaje de germinación, se contabilizó un total de 150 esporas por cada tratamiento (Kefialew y Ayalew, 2008; Wang *et al.*, 2008). El experimento terminó a las 48 h cuando el tratamiento con solo *F. proliferatum* tuvo un 100% de germinación. El diseño experimental fue completamente al azar. Los tratamientos se repitieron diez veces.

#### **6.2.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento *in vivo* de los ACB**

Para determinar el efecto del inductor de resistencia ulvan sintetizado (Elicityl-Oligotech®) sobre el crecimiento *in vivo* de *D. hansenii* y *S. rhizophila* se desinfectaron e hirieron los frutos según lo descrito previamente. En cada herida se inocularon 20 µL de: (1) 1 x 10<sup>6</sup>

células mL<sup>-1</sup> de *D. hansenii*, (2) 1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *S. rhizophila*, (3) 1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> de *D. hansenii* + 5 g L<sup>-1</sup> de ulvan, (4) 1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *S. rhizophila* + 5 g L<sup>-1</sup> de ulvan. Los frutos se colocaron en recipientes de polipropileno a 27 °C y 90% HR. Se tomaron muestras del tejido adyacente a la zona de lesión después de 1 h (tiempo 0) y después de 1, 2, 3 y 4 días. El tejido fue removido con un sacabocado estéril (5 mm en diámetro). El tejido se maceró en un mortero estéril con 5 mL de buffer de fosfatos estéril 0.5 M (pH 7.0). La concentración de la levadura se determinó con un hematocitometro (células mL<sup>-1</sup>), y para la bacteria se determinó la concentración por diluciones seriadas e incubación en placas (UFC mL<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron como el Log<sup>10</sup> células herida<sup>-1</sup> y Log<sup>10</sup> UFC herida<sup>-1</sup>). El diseño experimental fue completamente al azar. Cada tratamiento se repitió diez veces.

### **6.2.3 Efecto de ulvan sobre el crecimiento *in vitro* de los ACB**

En placas con PDA y AST, se colocaron 100 µL de *D. hansenii* (1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>) y *S. rhizophila* (1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) respectivamente. Con ayuda de una varilla de vidrio estéril se extendió de manera uniforme el volumen depositado. Después de 2 h, en cuatro puntos equidistantes de 2.5 cm al centro de la placa se colocaron sensidiscos (0.2 cm de diámetro). En los sensidiscos se depositaron 20 µL de ulvan (5 g L<sup>-1</sup>). Se utilizaron benomil y bactrol como control. Los tratamientos fueron: (1) 1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> *D. hansenii*, (2) 1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> *D. hansenii* + 5 g L<sup>-1</sup> ulvan, (3) 1 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> *D. hansenii* + benomil (4) 1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> *S. rhizophila*, (5) 1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> *S. rhizophila* + 5 g L<sup>-1</sup> ulvan, (6) 1 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> *S. rhizophila* + bactrol. Las placas se incubaron a 27 °C. A las 48 h se midió el área de crecimiento con el programa ImageJ<sup>®</sup> y se calculó el %I con la formula descrita anteriormente (2) (Cao *et al.*, 2011). El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento.

## **6.3 Competencia *in vitro* por nutrientes entre los ACB y *F. proliferatum***

### **6.3.1 Preparación de medio a base de melón**

Para preparar el medio a base de melón, se mezclaron 70 g del tejido del fruto (exocarpio y mesocarpio) y 1 L de agua destilada en matraz Erlenmeyer. Se esterilizó el matraz con el medio a 121 °C por 15 min y se vació el sobrenadante en matraces Erlenmeyer estériles (Eayre *et al.*, 2003). El medio a base del fruto se utilizó para determinar la competencia por

nutrientes durante la confrontación de *D. hansenii* y/o *S. rhizophila* contra *F. proliferatum*. En un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio a base del fruto se depositaron 100  $\mu\text{L}$  de la levadura y/o la bacteria. Los tratamientos fueron los siguientes: (1)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii*, (2)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *F. proliferatum*, (3)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila*, (4)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* +  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *F. proliferatum*, (5)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* +  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *F. proliferatum* y (6)  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *F. proliferatum*. Los matraces se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  y 180 rpm por 48 h. Después, Se tomó 1 mL de cada tratamiento para cuantificar la fructosa, sacarosa, glucosa y porcentaje de germinación de 150 esporas (Kefialew y Ayalew, 2008; Wang *et al.*, 2008). El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento.

### 6.3.2 Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa

#### Glucosa

Para la determinación del contenido de glucosa se utilizó el método GOD-PAP de Barham y Trinder (1972), utilizando el kit Randox (Randox México S.A. de C.V). Se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra con 200  $\mu\text{L}$  de la solución reactiva. Después de incubar 30 min se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm. Los valores se expresaron en  $\text{g L}^{-1}$ .

#### Fructosa

La fructosa se cuantificó por el método de Taylor (1995). Se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra, 20  $\mu\text{L}$  triptamida-HCl y 600  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado. Los tubos se mezclaron y calentaron a  $60^\circ\text{C}$  en baño maría por 15 min y se enfriaron en agua por 40 min. Finalmente, se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 518 nm. Las concentraciones se obtienen interpolando las absorbancias obtenidas con una curva de calibración de fructosa y sus valores se expresaron en  $\text{g L}^{-1}$ .

#### Sacarosa

La sacarosa se cuantificó con el método modificado de Bruner (1964). Se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra y 4  $\mu\text{L}$  de HCl 3 M. Posteriormente se calentó a  $100^\circ\text{C}$  en baño maría por 15 min. Para neutralizar se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de KOH 5N y 600  $\mu\text{L}$  de DNS (3,5-dinitro ácido

salicílico). La mezcla se calentó a 100 °C por 10 min en baño maría y se enfrió en agua con hielo. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. El resultado se interpoló con una curva de calibración de fructosa. Los valores se expresaron en g L<sup>-1</sup>.

#### **6.4 Inhibición *in vitro* de VOCs por los ACB**

Para determinar la inhibición *in vitro* de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por *D. hansenii* y *S. rhizophila* se realizó un cultivo dual. Se realizó un cultivo dual descrito por Raza *et al.* (2016) con modificaciones. Se inocularon 100 µL de la levadura ( $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) o la bacteria ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) en la superficie de placas con PDA y AST respectivamente. Después de 20 min, la tapa de las placas fue reemplazada con placas con PDA inoculadas en el centro con *F. proliferatum*. Inmediatamente después, se sellaron las dos placas con parafilm® y se incubaron por 7 días a 27 °C. Se utilizaron como control placas inoculadas solo con el hongo. Finalmente, se midió el área de crecimiento micelial (cm<sup>2</sup>) con el programa ImageJ® y se calculó el porcentaje de inhibición (% I) con la formula descrita anteriormente (2). Cada tratamiento se repitió diez veces y el diseño experimental fue completamente al azar.

#### **6.5 Actividad bio-surfactante de los ACB**

Para evaluar la actividad bio-surfactante, *D. hansenii* y *S. rhizophila* fueron inoculados por asada en un matraz Erlenmeyer con CPD y CST, respectivamente y, fueron incubados por 48 h a 28 °C en agitación a 180 rpm. Los cultivos de cada microorganismo se centrifugaron por 10 min a 5,000 rpm. Luego, se colocaron 20 µL del sobrenadante en una membrana hidrofóbica (Parafilm) y en cascara de melón (1 cm de diámetro). Siguiendo el método de Otsu *et al.* (2004), se midió el diámetro y el peso de las gotas después de 5 min. Se utilizaron CPD, CST y ADE como controles. Cada tratamiento se repitió diez veces. El diseño experimental fue completamente al azar.

#### **6.6 Producción *in vitro* de enzimas líticas por los ACB hacia *F. proliferatum***

##### **6.6.1 Extracción de la pared celular del fitopatógeno**

*F. proliferatum* se cultivó en PDB a 28 °C por 15 días. Posteriormente, el micelio fue colectado con gasas estériles y macerado en mortero estéril con nitrógeno líquido. La pared



celular de *F. proliferatum* obtenida se re-suspendió en una solución de NaCl 5 M y se sónico (Ultrasonic homogeneizer, Cole Parmer) durante 3 min. Inmediatamente después se centrifugo durante 20 min a 8,000 rpm. El sobrenadante fue descartado y la pared celular se lavó con agua destilada estéril y finalmente se secó a 60 °C por 24 h (Rey, 1998).

### **6.6.2 Producción de enzimas líticas**

Las suspensiones de *D. hansenii* y *S. rhizophila* (1 mL) en concentraciones de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> fueron depositadas en un matraz Erlenmeyer con 23 mL de medio mínimo de nitrógeno-levadura (nitrógeno-levadura 0.67%) con pared celular del hongo (1 mg mL<sup>-1</sup>) y agua destilada estéril como control. Los matraces Erlenmeyer fueron incubados a 28 °C por 48 h en agitación a 180 rpm. Se tomaron 5 mL de cada tratamiento inmediatamente después de inoculación (0 h) y a las 12, 24, 36 y 48 h. Las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm por 20 min a 4 °C y se colecto el sobrenadante para el ensayo enzimático (Garmendia *et al.*, 2005). Se determinó el contenido de proteína en las muestras por el método de Bradford (1976). Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento. El diseño experimental fue completamente al azar.

#### **β-1,3 glucanasa**

La actividad β-1,3 glucanasa (GLU) se cuantificó mezclando 62.5 μL de laminarina al 1% como sustrato y 62.5 μL del sobrenadante e incubando a 25 °C por 4 h. A cada muestra se le agregaron 130 μL de 3,5-dinitrosalisilico (DNS, 1%) y se calentó en baño maría hasta ebullición por 5 min. Se midió la absorbancia a 540 nm y se catalogó una unidad de la enzima como los μmol de azúcares reductores liberados por mg de proteína (Jijakli y Lepoivre, 1998).

#### **Quitinasa**

Se determinó la actividad quitinasa mezclando 10 μL de p-nitrofenol-N-acetil β-D-glucosamina con 90 μL de sobrenadante. Se incubó a 25 °C por 24 h y se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 540 nm. Una unidad (U) de la enzima se determinó como su capacidad para liberar un μmol de p-nitrofenol por mg de proteína (Castoria *et al.*, 2001; Gacto *et al.*, 2000).

#### **Proteasas**

Las proteasas se cuantificaron mezclando 100  $\mu\text{L}$  de una solución de azocaseína al 1% y buffer de acetato pH 5.0, se incubaron a 40 °C por 30 min. Posteriormente, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido tricloro acético al 10% y se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 15 min. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de NaOH (5.2 mM). Las muestras se midieron en espectrofotómetro a una absorbancia de 442 nm. Se definieron 10 unidades (U) de actividad de esta enzima como la cantidad que produce una absorbancia (0.1) en las condiciones de reacción (Benítez *et al.*, 2001).

## **6.7 Actividad enzimática en frutos de melón tratados con los ACB, ulvan y *F. proliferatum***

### **6.7.1 Tratamientos y muestreo**

Los frutos fueron desinfectados y tratados según lo descrito previamente. En las heridas se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de los siguientes tratamientos: (1)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  *D. hansenii*, (2)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila*, (3) 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (4)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan. Se utilizó agua destilada como control. Los frutos se almacenaron en recipientes de polipropileno a 27 °C y 90% de HR por 8 días. Se tomaron muestras cada 2 días con un escalpelo (1 x 1 cm, longitud y profundidad) de tejido adyacente a la zona inoculada. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta ser analizadas. El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento.

### **6.7.2 Extracto para actividad enzimática**

Para catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y súper oxido dismutasa (SOD) se homogeneizó en micro tubos 0.1 g de tejido muestreado con 3  $\mu\text{L}$  de 100 mM buffer de fosfato potásico frío con un pH de 6.8 con 0.1 M de EDTA. La mezcla fue filtrada y centrifugada a 16,000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue colectado para determinar la actividad enzimática. Para fenilalanina amonio liasa (PAL), el extracto se realizó en micro tubos con 0.25 g de muestra y fue homogeneizado con 10  $\mu\text{L}$  de buffer de borato de sodio (pH 8.0). El homogeneizado fue centrifugado a 5,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se utilizó el sobrenadante para medir la actividad enzimática. El contenido total de proteína se cuantificó utilizando el método descrito por Walker (2002).

### 6.7.3 Actividad enzimática

#### **Catalasa (CAT)**

Se determinó la actividad enzimática de CAT mezclando 100  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 100 mM con 30  $\mu\text{L}$  de metanol, 20  $\mu\text{L}$  del extracto de la muestra y 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (8.82 M). Inmediatamente después se cubrió la placa y se incubó en agitación a temperatura ambiente por 20 min. Se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de KOH (10 M) y 30  $\mu\text{L}$  de reactivo purlpad (23.5 M) al 1% en solución de 5% de HCl. Se incubó por 10 min. Finalmente, fueron añadidos 10  $\mu\text{L}$  de periodato de potasio 0.5 M en solución de KOH 0.5 M. La lectura en espectrofotómetro se realizó a 540 nm. La unidad de actividad CAT fue definida como la cantidad de enzima que provoca la formación de 1 nmol de formaldehído por min y, se expresó en min/mg de proteína (Johansson y Borg, 1988).

#### **Peroxidasa (POX)**

Para cuantificar la actividad enzimática de POX se mezclaron 300  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos (0.1 M), 5  $\mu\text{L}$  de la solución de guayacol (20.1 mM), 10  $\mu\text{L}$  del extracto de la muestra y 3  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12.3 mM). Después de mezclar se incubó a 30 °C por 10 min. La lectura en espectrofotómetro fue a 436 nm. La unidad de actividad POX fue definida como la cantidad de enzima que provoca la formación de tetra guayacol en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por min y se expresó en U/mg de proteína (Cavalcanti *et al.*, 2004).

#### **Superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad enzimática de superóxido dismutasa se calculó mezclando 1200  $\mu\text{L}$  de solución de fosfatos (0.1 M), 20  $\mu\text{L}$  del extracto de la muestra y 20  $\mu\text{L}$  de la solución xantina oxidasa (0.1 U de xantina oxidasa en 1 mL de sulfato de amonio 2 M). Registrar el cambio de absorbancia a 560 nm cada 20 s por 5 min. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% de la reacción del  $\text{O}_2$  en presencia del reactivo nitroazul de tetrazolio (NBT) y su actividad se expresó como U/mg proteína (Paoletti *et al.*, 1986).

#### **Fenil alanina amonio liasa (PAL)**

Para cuantificar la actividad de PAL se mezclaron 150  $\mu\text{L}$  del extracto de la muestra, 200  $\mu\text{L}$  de fenilalanina (40 mM) y 450  $\mu\text{L}$  de buffer Tris HCl (0.1 M). Se incubó a 37 °C por 30 min. La reacción se detuvo con 200  $\mu\text{L}$  de ácido tri-cloro acético (TCA) al 25%. La mezcla se centrifugo a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C. La actividad PAL se determinó en relación al ácido cinámico formado en absorbancia de 290 nm y las curvas estándar preparadas. La unidad se expresó como los  $\mu\text{moles}$  de ácido cinámico formados por minuto por miligramo de proteína (min/mg de proteína) (Tanaka *et al.*, 1974).

### **6.8 Efecto de los ACB y ulvan hacia *F. proliferatum* en frutos de melón**

Para determinar el efecto de la aplicación de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan, se prepararon los frutos según lo descrito previamente y se hicieron seis heridas equidistantes de 3 mm en cada fruto. Se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de cada agente de control según los siguientes tratamientos: (1)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii*, (2)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* (3) 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (4)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila*, (5)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (6)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (7)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (7) 1000 ppm benomil, (8) agua destilada estéril (control). Dos horas después se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *F. proliferatum*. Los frutos fueron almacenados en recipientes de polipropileno a 27 °C con 90% de HR. Después de 7 días, se determinó el porcentaje de incidencia de la enfermedad (%DI) con la formula descrita anteriormente (1) y el diámetro de lesión (mm). El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento.

#### **6.8.1 Capacidad de adhesión *in vivo* de los ACB**

Se tomaron 0.5  $\text{cm}^2$  del tejido de los frutos del experimento anterior para observar al microscopio electrónico de barrido y conocer la interacción entre los ACB y el fitopatógeno. Las muestras de los frutos se fijaron por inmersión con 2.5% de glutaraldehído en buffer de fosfatos a pH 7 durante 24 h. Posteriormente se observaron al microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-3000N).

### **6.9 Intervalo de tiempo entre la aplicación de los ACB, ulvan y *F. proliferatum* en frutos de melón**

Para determinar el intervalo de tiempo entre la aplicación de los ACB, ulvan y el fitopatógeno se siguió la metodología propuesta por Zhimo *et al.* (2017) con modificaciones. Los frutos fueron colectados y preparados según lo descrito anteriormente. Se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de *D. hansenii*, *S. rhizophila*, ulvan, benomil y agua destilada estéril a las 2, 12 y 24 h antes o a las 12 y 4 h después de inocular a *F. proliferatum* a una concentración de  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Los frutos se almacenaron en recipientes de polipropileno a 27 °C y 90% de HR. Después de 7 días se determinó la incidencia de la enfermedad (% DI) con la fórmula descrita anteriormente (1) y el diámetro de lesión (mm). Los tratamientos en cada tiempo de inoculación (2, 12 y 24 h antes y 12 y 24 h después del patógeno) fueron los siguientes: (1)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii*, (2)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* (3) 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (4)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila*, (5)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (6)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (7)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (7) 1000 ppm de benomil, (8) agua destilada estéril (control). Fue un diseño experimental completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento.

### **6.10 Incidencia de la enfermedad y calidad del fruto**

Frutos sin ningún tratamiento previo fueron saturados en solución con: (1)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii*, (2)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila*, (3) 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (4)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila*, (5)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (6)  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (7)  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *D. hansenii* +  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *S. rhizophila* + 5 g  $\text{L}^{-1}$  ulvan, (8) agua destilada estéril (control), (9) 1000 ppm de benomil. Los frutos se secaron por dos horas y se almacenaron en recipientes de polipropileno por 0 días a 27 °C y 90% de HR. Se registró la incidencia de frutos enfermos con la fórmula descrita anteriormente (1) y parámetros de calidad. El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento.

### 6.10.1 Parámetros de calidad

Los parámetros de calidad registrados para evaluar el efecto de los ACB sobre los frutos fueron: Pérdida de peso (%), firmeza (N), sólidos solubles totales (%) y pH. Para determinar la pérdida de peso, los frutos se pesaron antes y después de los 10 días de almacenamiento. La firmeza se determinó al aplicar una fuerza de 9.8 N con un analizador de textura (GY-Texture Analyzer) en dos lados opuestos en la zona ecuatorial del fruto. Para determinar los sólidos solubles totales (TSS) y pH se maceró una muestra homogénea del fruto con mortero. TSS se determinó con un refractómetro digital (PR - 32, Atago Co., Japón) a temperatura ambiente. El pH se determinó con gotas del jugo en un potenciómetro (Milwaukee, Ph54).

### 6.11 Análisis estadísticos

Para evaluar la ventaja del tratamiento combinado *in vivo* de los ACB con respecto a los tratamientos individuales (objetivo 8). Se analizó el tipo de interacción (aditiva, sinérgica o antagonista). El factor de sinergia (FS) se calculó con la fórmula de Abbott (Levy *et al.*, 1986).

$$FS = \frac{CO}{CE} \quad (3)$$

Dónde: CO es el porcentaje de control observado de los tratamientos combinados y CE es el porcentaje de control esperado de los tratamientos combinados. Para calcular CE se utilizó la siguiente formula:

$$CE = (Ca + Cb) - \left( \frac{Ca * Cb}{100} \right) \quad (4)$$

Dónde: Ca es el porcentaje de control del tratamiento con los ACB (*D. hansenii* o *S. rhizophila*) y Cb es el porcentaje de control del tratamiento b (ACB o ulvan). Si FS = 1, hay una interacción aditiva entre los tratamientos; si SF < 1, hay una interacción antagonista y si SF > 1, la interacción es sinérgica.

Se utilizó el programa estadístico Statistica v. 10.0 para Windows (StatSoft®, Inc., 2011) para los análisis estadísticos. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA's) y pruebas de comparación múltiple de medias (Fisher LSD,  $p \leq 0.05$ ). Cuando fue necesario, los datos

fueron transformados  $[\log_{10}(x+1)]$  para obtener una distribución normal antes de los análisis de varianza.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp. en frutos de melón

#### 7.1.1 Patogenicidad de *Fusarium* spp.

Se aislaron 12 hongos de tejido enfermo de frutos de melón (Tabla IV). La pudrición del fruto se observó después del segundo día de inoculación de cada hongo. El tejido de los frutos mostró un cambio de color a café oscuro con reblandecimiento del tejido, el exocarpio se observó blanco algodonoso. En etapas avanzadas de la pudrición, se observaron lesiones y fisuras en la cascara con abundante micelio aéreo blanco algodonoso. Dichos síntomas coinciden con los causados por *Fusarium* spp. En la prueba de patogenicidad, todos los hongos ocasionaron 100% de incidencia de la enfermedad sobre los frutos. En el diámetro de lesión, los frutos inoculados con la cepa FMP2 tuvieron el mayor diámetro de lesión con 27.05 mm.

**Tabla IV.** Pruebas de patogenicidad de *Fusarium* spp. en frutos de melón.

Cepa	Incidencia (%)	Diámetro de lesión (mm)
FMP1	100 <sup>*a</sup>	17.8 ± 0.6 <sup>d</sup>
FMP2	100 <sup>a</sup>	27.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
FMP3	100 <sup>a</sup>	19.6 ± 0.8 <sup>c</sup>
FMP4	100 <sup>a</sup>	15.1 ± 1.0 <sup>e</sup>
FMP5	100 <sup>a</sup>	21.7 ± 0.3 <sup>b</sup>
FMP6	100 <sup>a</sup>	17.2 ± 0.7 <sup>d</sup>
FMP7	100 <sup>a</sup>	17.0 ± 0.6 <sup>d</sup>
FMP8	100 <sup>a</sup>	22.1 ± 0.5 <sup>b</sup>
FMP9	100 <sup>a</sup>	15.2 ± 0.9 <sup>c</sup>
FMP10	100 <sup>a</sup>	19.0 ± 1.2 <sup>c</sup>
FMP11	100 <sup>a</sup>	22.0 ± 0.7 <sup>b</sup>
FMP12	100 <sup>a</sup>	17.5 ± 0.9 <sup>d</sup>

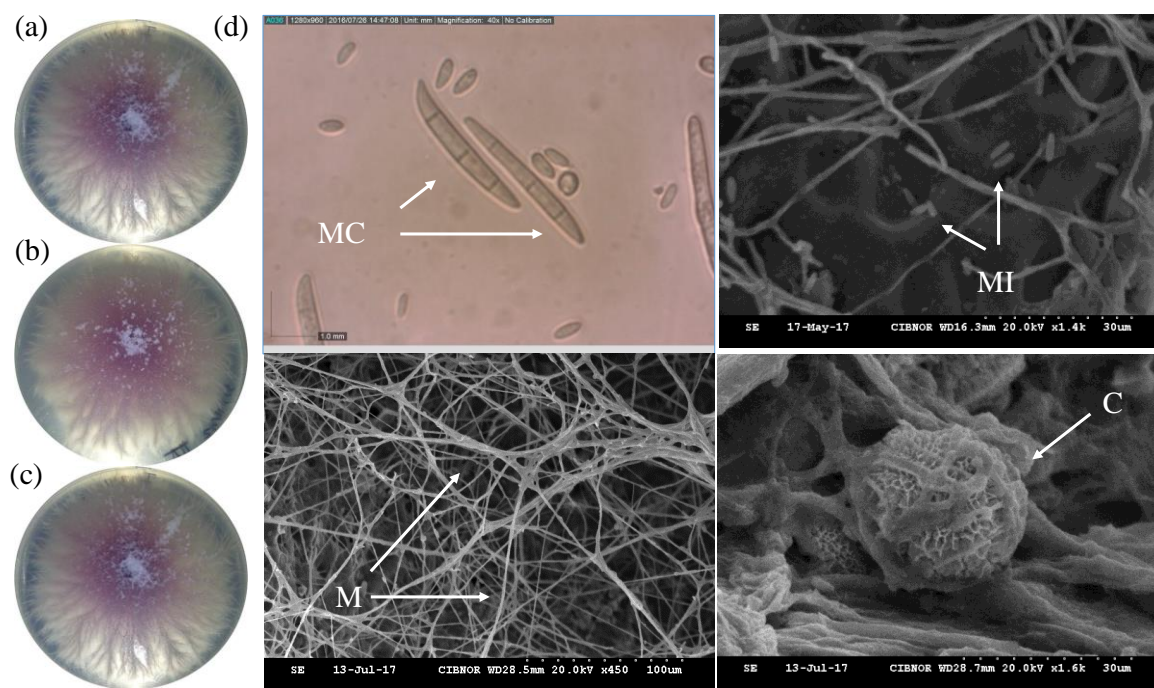
Notas: <sup>\*</sup>Los valores son la media ± Desviación estándar de diez repeticiones por tratamiento. Diferentes letras en cada columna difieren estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Fisher.

#### 7.1.2 Identificación morfológica de *Fusarium* spp.

Después de 5 días de incubación, todos los hongos desarrollaron micelio blanco que cubrió la placa por completo y se produjo una pigmentación violeta en los medios PDA y CLA. El hongo produjo micelio aéreo denso, blanco y hialino. Se observaron delgados macroconidios



con longitud de 22-29  $\mu\text{m}$  en longitud y 4.3-6.5  $\mu\text{m}$  en diámetro, con células apicalmente curvas de 3-5 septos. Los microconidios septados tuvieron longitud de 6.78-8.44  $\mu\text{m}$  y 2.43-3.12  $\mu\text{m}$  de diámetro y no formaron agregados. Se observaron clamidosporas (Fig. 4). Las características morfológicas observadas en los hongos aislados confirman su identificación como *Fusarium* spp.



**Figura 4.** Identificación de *Fusarium* spp. Características morfológicas de la cepa FMP2 (a), FMP3 (b) y FMP7 (c) de *Fusarium* cultivado en PDA a 28 °C por 7 días. Características microscópicas de la cepa FMP 2 de *Fusarium* (d), macroconidio [MC], microconidio [MI], micelio [M] y clamidosporas [C].

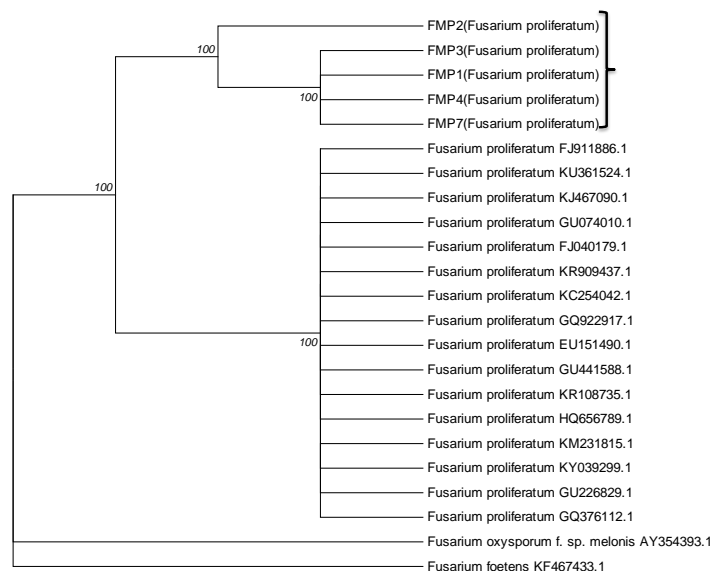
### 7.1.3 Identificación molecular y análisis filogenético

Los productos de PCR fueron de un tamaño de 600, 500 y 800 pb para las regiones de ITS1-5.8s-ITS4,  $\beta$ -Tub y TEF-1 $\alpha$ , respectivamente. De todos los hongos aislados, FMP1, FMP2, FMP3, FMP4 y FMP7 fueron identificados molecularmente como *F. proliferatum* (Tabla V).

**Tabla V.** Análisis comparativo de las secuencias obtenidas con la amplificación de la región de  $\beta$ -Tub, TEF-1 $\alpha$ , ITS1-5.8s-ITS4 de los diferentes hongos aislados de frutos de melón con las secuencias disponibles del NCBI.

	<b>Identificación molecular</b>	<b>Clave de acceso (<math>\beta</math>-Tub, TEF-1<math>\alpha</math>, ITS1-5.8s-ITS4)</b>	<b>Identidad (%)</b>
FP1	<i>Fusarium proliferatum</i>	KT218534.1; KP964908.1; KT803067.1	99; 100; 100
FP2	<i>Fusarium proliferatum</i>	KP964956.1; KP964908.1; KT803067.1	99; 99; 100
FP3	<i>Fusarium proliferatum</i>	KR861512.1; JX118976.1; KP132230.1	99; 100; 100
FP4	<i>Fusarium proliferatum</i>	KP313250.1; JQ762611.1; KT282392.1	99; 100; 100
FP7	<i>Fusarium proliferatum</i>	KF466444.1; KM462980.1; KT803757.1	99; 100; 100
FV8	<i>Fusarium verticilloides</i>	U27303.1; KF562131.1; KU204757.1	97; 100; 100

El árbol filogenético obtenido con base en las secuencias de *F. proliferatum* con la región ITS1-5.8s-ITS4, después del alineamiento mostro que las cepas de *F. proliferatum* aisladas pertenecen al mismo clado (Fig. 5). Al compararse estas secuencias con otras secuencias de la misma especie, las cepas FMP1, FMP2, FMP3, FMP4 y FMP7 forman un clado patológico distinto, lo cual indica que los hongos patógenos aislados son especie-específicos.



**Figura 5.** Filograma de máxima parsimonia de los fragmentos nucleotídicos obtenidos de las cepas de *F. proliferatum*: FMP1, FMP2, FMP3, FMP4 y FMP7 comparadas con las secuencias correspondientes de *Fusarium* spp. de la base de datos GenBank (identificados por número de acceso). El valor de las líneas de arranque (Bootstrap) fue de 1000 repeticiones.

## 7.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento de los ACB

## 7.2.1 Screening de microorganismos marinos con potencial antagónico

### Inhibición del crecimiento micelial de *F. proliferatum*

Después de 7 días de incubación, la levadura con mayor %I fue la cepa L02 de *D. hansenii* (83.4%), mientras que la de menor capacidad de inhibición fue la cepa N02 de *C. diffluens* (5.8%). En los tratamientos con bacterias, la cepa con mayor %I fue RK01 de *S. rhizophila* con 90.1% y la de menor inhibición fue la cepa RB02 de *S. rhizophila* con 59.8%. El crecimiento en el tratamiento donde solo se inoculó *F. proliferatum* fue de 26.4 cm<sup>2</sup> (Tabla VI). Las bacterias tuvieron mayor capacidad de inhibición que las levaduras. El %I de la bacteria marina *S. rhizophila* (cepa RK02) fue comparable al efecto del fungicida sintético (benomil).

**Tabla VI.** Efecto *in vitro* de levaduras y bacterias marinas sobre el crecimiento micelial de *F. proliferatum*.

Cepas	Crecimiento micelial (cm <sup>2</sup> )	Inhibición (%)
Control	26.40 ± 0.69 <sup>*e</sup>	-
<i>D. hansenii</i> (L01)	5.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	78.3 ± 0.6 <sup>b</sup>
<i>D. hansenii</i> (L02)	4.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	83.4 ± 0.5 <sup>a</sup>
<i>D. hansenii</i> (L03)	5.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	79.0 ± 0.4 <sup>b</sup>
<i>C. diffluens</i> (N02)	24.9 ± 1.3 <sup>c</sup>	5.8 ± 0.5 <sup>c</sup>
<i>R. minuta</i> (RO4)	22.4 ± 0.6 <sup>d</sup>	15.0 ± 0.6 <sup>d</sup>
<i>R. minuta</i> (RO4)	22.2 ± 1.6 <sup>d</sup>	15.8 ± 0.3 <sup>d</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RK01)	4.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	83.3 ± 0.8 <sup>a</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RK02)	2.6 ± 0.9 <sup>f</sup>	90.1 ± 0.5 <sup>e</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RB01)	10.3 ± 1.1 <sup>g</sup>	60.9 ± 0.3 <sup>f</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RB02)	10.6 ± 0.8 <sup>g</sup>	59.8 ± 0.9 <sup>f</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Ba01)	20.4 ± 1.3 <sup>h</sup>	77.3 ± 0.6 <sup>g</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Ba02)	20.3 ± 0.7 <sup>h</sup>	76.9 ± 0.6 <sup>g</sup>
Benomil	2.5 ± 1.2 <sup>f</sup>	90.5 ± 0.4 <sup>e</sup>

Notas: \* Cada valor es la media de diez repeticiones ± Desviación estándar. En la misma columna valores con diferente letra difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

### Inhibición de la germinación de esporas del fitopatógeno

En los tratamientos con levaduras, la cepa L02 de *D. hansenii* inhibió en mayor grado la germinación de esporas en un 52.8% y la cepa R04 de *R. minuta* inhibió en un 11.5%. En los tratamientos con bacterias, la cepa RK02 de *S. rhizophila* inhibió la germinación de esporas

en mayor porcentaje con un 78.6% y la cepa Ba02 de *B. amyloliquefaciens* inhibió la germinación de esporas en menor porcentaje con un 9.7% (Tabla VII). Después de 48 h de incubación, germinó el 100% de esporas de *F. proliferatum* en el tratamiento control. El porcentaje de inhibición de *S. rhizophila* (RK02) es comparable con el porcentaje de inhibición del fungicida sintético benomil.

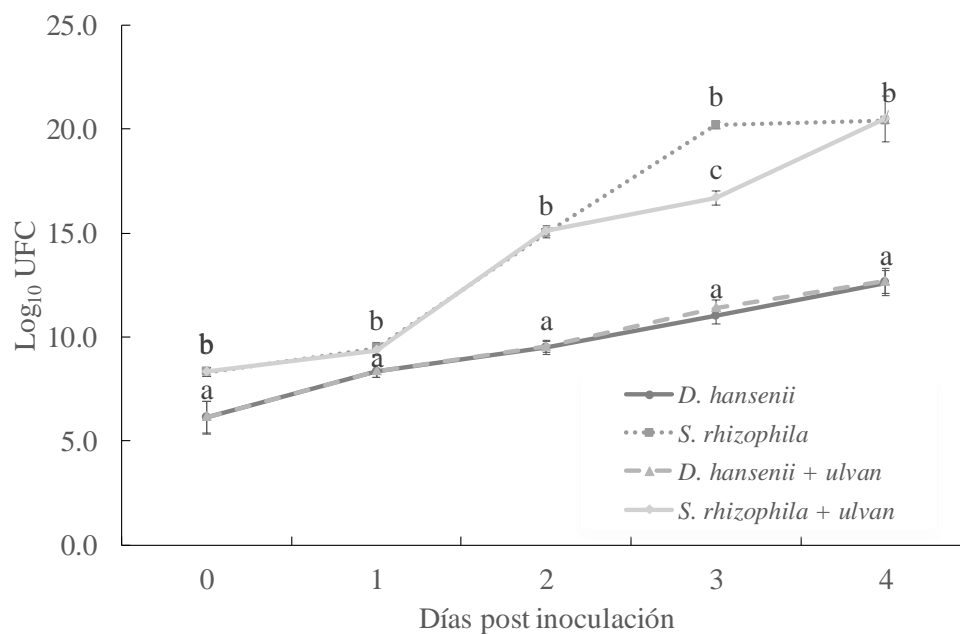
**Tabla VII.** Efecto *in vitro* de levaduras y bacterias marinas sobre la germinación de esporas de *F. proliferatum*.

Cepas	Esporas germinadas (%)	Inhibición (%)
Control	100% ± 2.4 <sup>*a</sup>	-
<i>D. hansenii</i> (L01)	56.4 ± 1.7 <sup>d</sup>	43.6 ± 1.6 <sup>c</sup>
<i>D. hansenii</i> (L02)	47.2 ± 1.2 <sup>e</sup>	52.8 ± 2.5 <sup>d</sup>
<i>D. hansenii</i> (L03)	56.3 ± 2.6 <sup>d</sup>	43.7 ± 1.4 <sup>c</sup>
<i>C. diffluens</i> (N02)	88.4 ± 1.3 <sup>b</sup>	11.6 ± 1.5 <sup>a</sup>
<i>R. minuta</i> (RO4)	88.5 ± 2.6 <sup>b</sup>	11.5 ± 2.6 <sup>a</sup>
<i>R. minuta</i> (RO4)	87.5 ± 1.6 <sup>c</sup>	12.5 ± 1.3 <sup>b</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RK01)	29.4 ± 1.7 <sup>a</sup>	70.6 ± 1.8 <sup>a</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RK02)	21.4 ± 1.9 <sup>f</sup>	78.6 ± 2.5 <sup>e</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RB01)	23.5 ± 1.1 <sup>g</sup>	76.5 ± 1.3 <sup>f</sup>
<i>S. rhizophila</i> (RB02)	65.2 ± 1.8 <sup>g</sup>	34.8 ± 0.9 <sup>f</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Ba01)	76.4 ± 1.3 <sup>h</sup>	23.6 ± 1.6 <sup>g</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Ba02)	90.3 ± 1.7 <sup>h</sup>	9.7 ± 1.6 <sup>g</sup>
Benomil	20.4 ± 1.2 <sup>f</sup>	79.6 ± 1.4 <sup>e</sup>

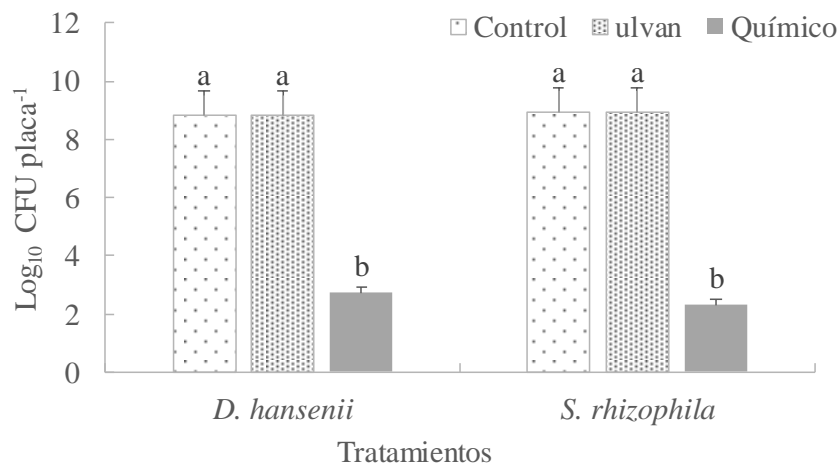
Notas: \* Cada valor es la media de diez repeticiones ± Desviación estándar. En la misma columna valores con diferente letra difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

### 7.2.3 Efecto de ulvan sobre el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de los ACB

El inductor de resistencia ulvan no mostró efecto significativo sobre el crecimiento *in vivo* (Fig. 6) ni sobre el crecimiento *in vitro* de *D. hansenii* y *S. rhizophila* (Fig. 7). Ambos microorganismos crecieron eficientemente en el tejido de los frutos de melón durante el periodo de tiempo cuantificado. Después de 3 días de incubación, hubo diferencias significativas entre el tratamiento individual de *S. rhizophila* y el tratamiento de *S. rhizophila* + ulvan. Durante el periodo de incubación, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos individuales o con la adición de ulvan. Estos resultados sugieren que ulvan no tiene un efecto directo *in vivo* e *in vitro* en el crecimiento de ambos agentes de control biológico. Los controles benomil y bactrol inhibieron el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de ambos microorganismos.



**Figura 6.** Dinámica de crecimiento de *D. hansenii* y *S. rhizophila* en presencia y ausencia de ulvan. Los datos presentados son la media  $\pm$  Desviación estándar. Valores con diferente letra difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 7.** Efecto de ulvan sobre el crecimiento de *D. hansenii* y *S. rhizophila*. Las barras verticales son la media de diez repeticiones  $\pm$  Desviación estándar. Diferentes letras difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

### 7.3 Competencia por nutrientes entre los ACB y *F. proliferatum*

*D. hansenii* y *S. rhizophila* consumieron los nutrientes de manera efectiva e inhibieron significativamente la germinación de esporas de *F. proliferatum* (Tabla VIII). *S. rhizophila* redujo significativamente el contenido de sacarosa ( $1.2 \text{ g L}^{-1}$ ), fructosa ( $0.7 \text{ g L}^{-1}$ ) y glucosa ( $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ). A pesar de que el tratamiento conjunto de *D. hansenii* y *S. rhizophila* tuvo la menor tasa de metabolización, inhibió la germinación de esporas de *F. proliferatum* en un 86%.

**Tabla VIII.** Contenido de carbohidratos en un medio a base de melón inoculado con los ACB y *F. proliferatum*.

Tratamientos	Contenido de carbohidratos ( $\text{g L}^{-1}$ )			Inhibición (%)
	Sacarosa	Fructosa	Glucosa	
<i>F. proliferatum</i>	$3.7 \pm 0.2^{*b}$	$1.1 \pm 0.1^{ab}$	$0.7 \pm 0.03^a$	-
<i>D. hansenii</i>	$1.9 \pm 0.1^c$	$1.0 \pm 0.1^{ab}$	$0.2 \pm 0.01^c$	$53 \pm 3^c$
<i>S. rhizophila</i>	$1.2 \pm 0.1^d$	$0.7 \pm 0.0^b$	$0.2 \pm 0.01^c$	$77 \pm 5^b$
<i>D. hansenii+S. rhizophila</i>	$2.0 \pm 0.1^c$	$1.2 \pm 0.1^a$	$0.5 \pm 0.01^b$	$86 \pm 4^a$
Medio de melón	$4.1 \pm 0.1^a$	$1.3 \pm 0.1^a$	$0.8 \pm 0.02^a$	-

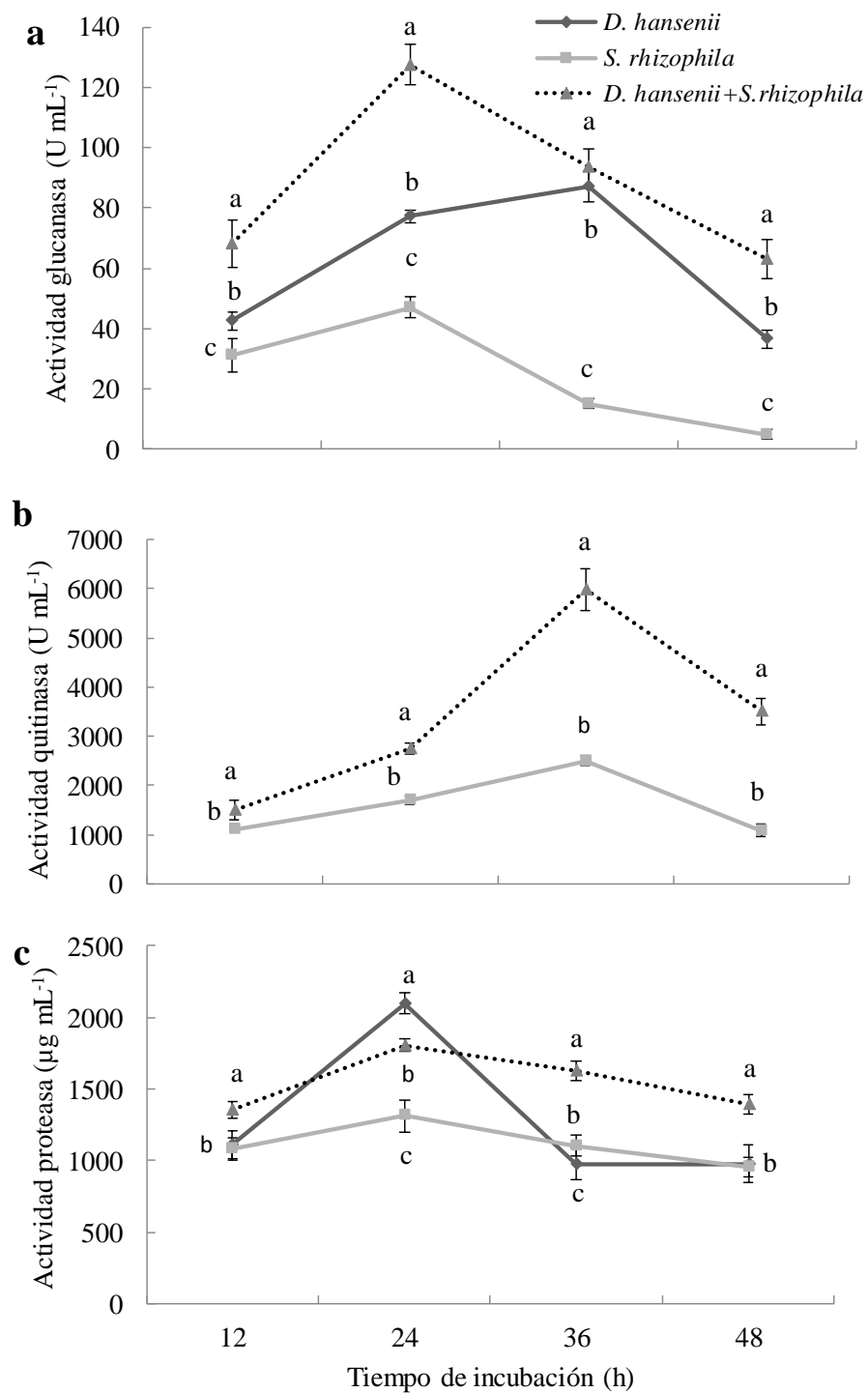
Notas: \* Cada valor es la media de diez repeticiones  $\pm$  Desviación estándar. En la misma columna valores con diferente letra difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

### 7.4 Producción *in vitro* de enzimas líticas por los ACB

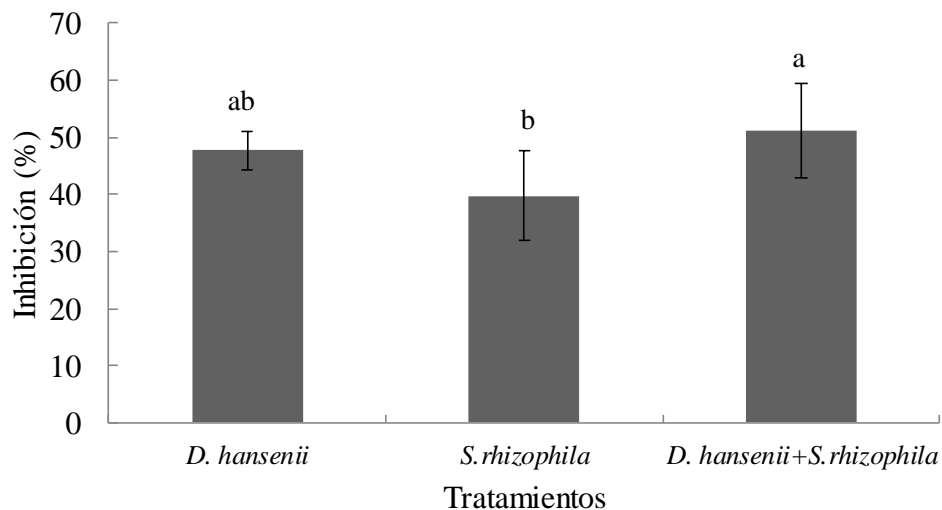
*S. rhizophila* presentó actividad enzimática extracelular de glucanasa, quitinasa y proteasa, mientras que *D. hansenii* sólo presentó actividad enzimática de glucanasa y proteasa (Fig. 8). El tratamiento conjunto de *D. hansenii+S. rhizophila* tuvo la más alta actividad de glucanasa ( $127.5 \text{ U mL}^{-1}$ ) y de actividad quitinasa ( $6591 \text{ U mL}^{-1}$ ). *D. hansenii* tuvo la más alta actividad de proteasa con  $2143 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 7.5 Inhibición de VOCs por los ACB

Los VOCs producidos por *D. hansenii* y *S. rhizophila* fueron efectivos en inhibir el crecimiento micelial del hongo (Fig. 9). Los tratamientos de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y *D. hansenii+S. rhizophila* inhibieron en un 45%, 36% y 51%, respectivamente el crecimiento de *F. proliferatum*.



**Figura 8.** Actividad enzimática *in vitro* producida por *D. hansenii* y *S. rhizophila*. Los datos son la media de diez repeticiones de cada tratamiento. Diferentes letras difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 9.** Efecto de los VOCs producidos por *D. hansenii* y *S. rhizophila* sobre el crecimiento micelial de *F. proliferatum*. Las barras son la media de diez repeticiones  $\pm$  Desviación estándar. Valores con diferente letra difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

### 7.6 Actividad bio-surfactante de los ACB

Las gotas del medio CPD y CST inoculados con *D. hansenii* y *S. rhizophila* se extendieron como una capa delgada en la superficie hidrofóbica de la cascara del fruto de melón, mientras que en los controles (CPD, CST y agua destilada estéril) las gotas permanecieron esféricas (Fig. 10). En el tratamiento con *S. rhizophila*, cuando las gotas se esparcieron en la membrana hidrofóbica (parafilm), la relación entre la velocidad de esparcimiento y el peso de la gota fue mayor que en el tratamiento con *D. hansenii* (Datos no mostrados).

### 7.7 Actividad de enzimas de defensa en frutos de melón tratados con los ACB

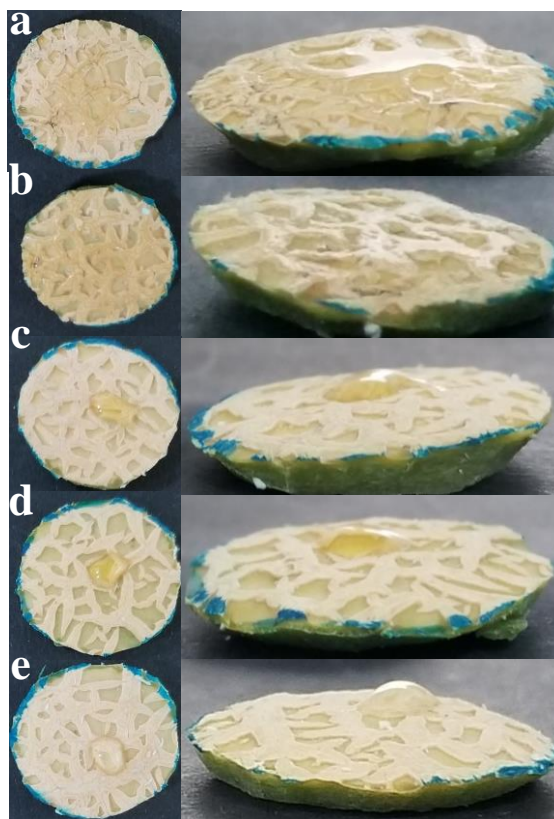
La actividad de SOD fue significativamente incrementada a los 4 y 6 días con los ACB en comparación con el tratamiento control (Fig. 11a). La actividad de SOD en los frutos tratados mostro una drástica disminución en los primeros 2 días y tuvo un incremento máximo a los 6 días post inoculación. La actividad de SOD disminuyo después de los 6 días de almacenamiento.

El tratamiento conjunto de los ACB tuvo la mayor actividad de SOD a los 6 días post inoculación. La actividad CAT fue significativamente inhibida por los tratamientos con los ACB (Fig. 11b). La actividad CAT disminuyo gradualmente durante el periodo de

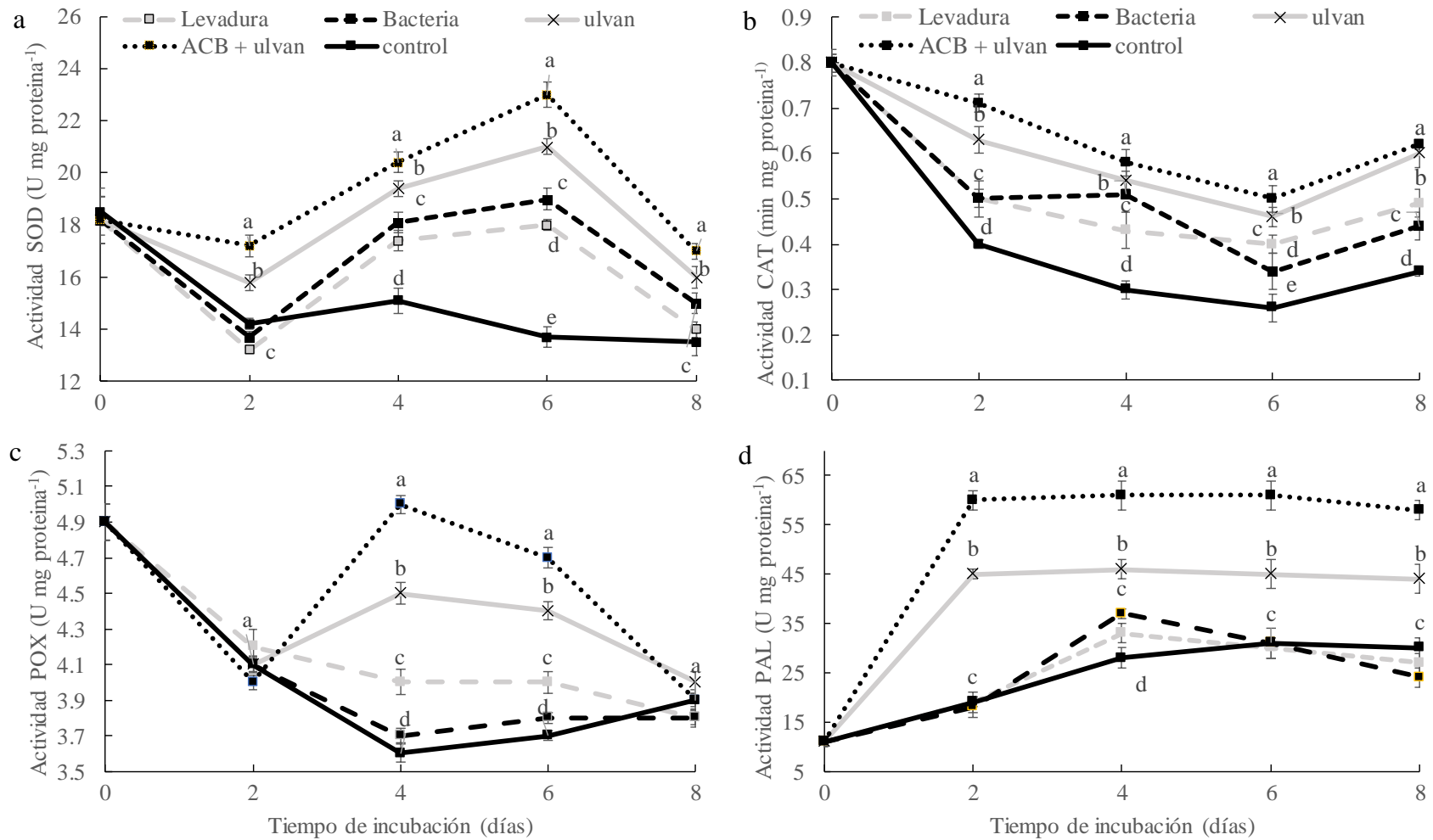


almacenamiento para todos los tratamientos y comenzó a incrementarse a partir de los 8 días post inoculación. Sin embargo, todos los tratamientos con los ACB individualmente o en conjunto mantuvieron mayor actividad CAT en comparación al tratamiento control. En comparación con el control, hubo un incremento significativo de POX a los 6 días en los tratamientos con los agentes control (Fig. 11c).

La mayor actividad de POX fue con el tratamiento conjunto de los ACB a los 4 días después de inoculación de los frutos de melón. Se observó una disminución de la actividad enzimática de POX después de los 4 días de almacenamiento que continuo en días posteriores. La actividad PAL se incrementó considerablemente con los tratamientos de los ACB (Fig. 11d). El tratamiento conjunto con los ACB mostró la mayor actividad PAL a partir del día 2 post inoculación y se mantuvo durante los días posteriores.



**Figura 10.** Actividad bio-surfactante por *D. hansenii* y *S. rhizophila* en cascara de melón. Gotas de: a) Sobrenadante de *D. hansenii* cultivado por 7 días en CPD, b) Sobrenadante de *S. rhizophila* cultivado por 7 días en CST. Como tratamientos control: c) CPD, d) CST y e) agua destilada estéril.



**Figura 11.** Efecto de *D. hansenii*, *S. rhizophila*, ulvan y su tratamiento conjunto en la actividad de a) SOD, b) CAT, c) POX y c) PAL en frutos de melón. ACB = Agentes de control biológico (*D. hansenii*+*S. rhizophila*). Levadura = *D. hansenii*, Bacteria = *S. rhizophila*. Los datos son la media de diez repeticiones de cada tratamiento. Diferentes letras difieren estadísticamente (Fisher,  $p \leq 0.05$ )

### 7.8 Efecto *in vivo* de los ACB y ulvan hacia *F. proliferatum*

Los ACB en tratamiento conjunto, disminuyeron en mayor proporción la incidencia de la enfermedad y el diámetro de lesión, que los tratamientos individuales (Tabla IX). Ulvan tuvo efecto reducido en el control de la incidencia de la enfermedad como tratamiento individual (14.3%). Sin embargo, ulvan en combinación con *D. hansenii* y *S. rhizophila* fue el tratamiento más efectivo (72.1%) y con mejores resultados que el fungicida sintético benomil (64.3%). De acuerdo a la fórmula de Abbott's (Levy *et al.*, 1986) y, en comparación con los tratamientos individuales, los tratamientos conjuntos tuvieron efecto sinérgico. El diámetro de lesión obtenido muestra un patrón similar a la incidencia de la enfermedad en cada tratamiento. Los resultados sugieren que ulvan incrementa la efectividad de *D. hansenii* y *S. rhizophila* como ACB contra la pudrición de frutos de melón causada por *F. proliferatum*.

**Tabla IX.** Eficiencia de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan sobre la disminución del diámetro de lesión y la incidencia de la pudrición ocasionada por *F. proliferatum* en frutos de melón.

Tratamientos	Diámetro de lesión (mm)	Reducción de incidencia (%)	CE	FS
<i>D. hansenii</i>	15.6 ± 0.7 <sup>a*</sup>	28.6 ± 3.1 <sup>a</sup>	-	-
<i>S. rhizophila</i>	12.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	35.7 ± 2.8 <sup>b</sup>	-	-
Ulvan	16.3 ± 0.9 <sup>c</sup>	14.3 ± 3.9 <sup>c</sup>	-	-
<i>D. hansenii</i> + <i>S. rhizophila</i>	6.7 ± 0.2 <sup>f</sup>	68.2 ± 3.5 <sup>f</sup>	49.2	1.7
<i>D. hansenii</i> +ulvan	14.5 ± 0.9 <sup>d</sup>	57.1 ± 4.3 <sup>d</sup>	38.8	1.5
<i>S. rhizophila</i> +ulvan	10.6 ± 0.9 <sup>e</sup>	64.3 ± 4.1 <sup>e</sup>	44.9	1.4
<i>D. hansenii</i> + <i>S. rhizophila</i> +ulvan	3.5 ± 0.2 <sup>g</sup>	73.5 ± 2.1 <sup>g</sup>	55.1	1.8
Benomil	6.5 ± 0.7 <sup>e</sup>	64.3 ± 2.4 <sup>e</sup>	-	-

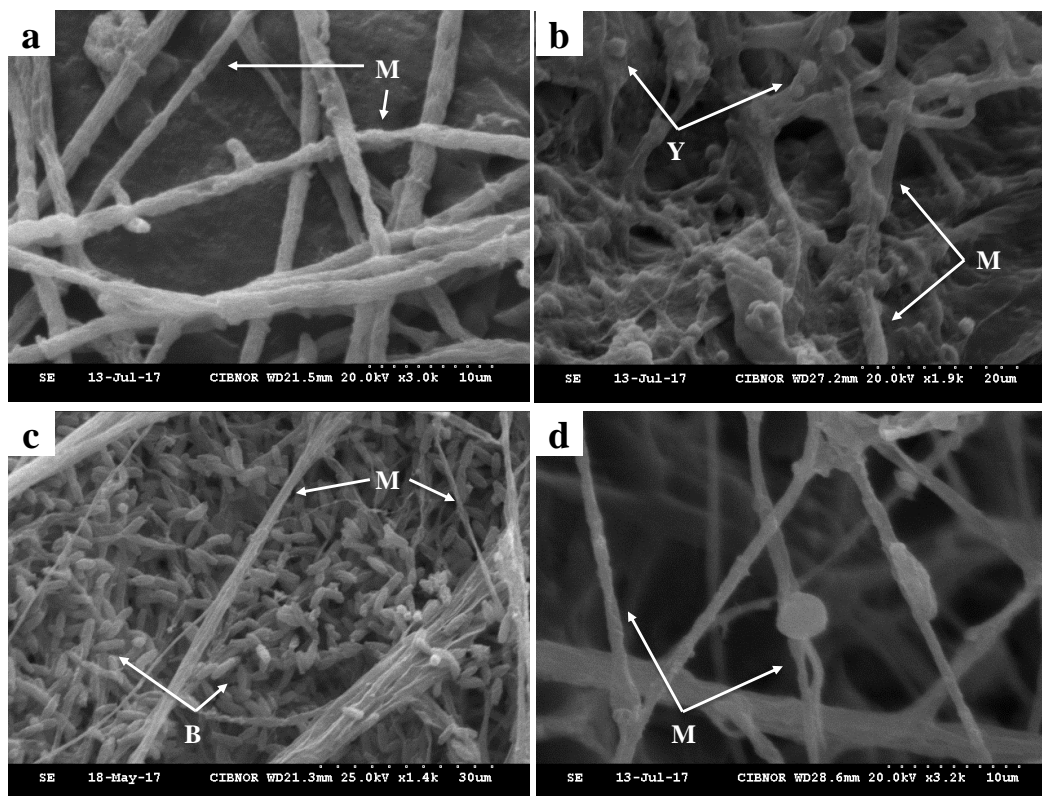
Notas: El porcentaje de control para cada tratamiento fue calculado comparando los tratamientos con el control (*F. proliferatum*+agua destilada estéril). CE: Efecto esperado o porcentaje de control esperado, FS: Factor de sinergia, mayor información en materiales y métodos. \*Cada valor es la media de diez repeticiones ± Desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa (Fisher,  $p \leq 0.05$ ).

#### 7.8.1 Capacidad de los ACB para adherirse a las estructuras fúngicas

En heridas de frutos inoculados con *D. hansenii* y *S. rhizophila* se observó micelio de *F. proliferatum* dañado (Fig. 12). En el tratamiento control, se observaron esporas e hifas ramificadas creciendo en tejido del fruto (Fig. 12a). *D. hansenii* y *S. rhizophila* tuvieron la capacidad de adherirse al micelio de *F. proliferatum* (Fig. 12b y 12c). En el tratamiento con *D. hansenii*+*S. rhizophila* se observan hifas más delgadas que en el resto de los tratamientos (Fig. 12d).

### **7.9 Intervalos de aplicación de los ACB y *F. proliferatum* para el control de la pudrición en frutos de melón**

El tiempo de inoculación de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan en pre o post inoculación de *F. proliferatum* tuvo efecto significativo en la reducción de la incidencia de la enfermedad (Tabla X) y en el diámetro de lesión (Tabla XI). En todos los tiempos de inoculación, los frutos de melón tratados con *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan antes de *F. proliferatum* tuvieron menor incidencia de la enfermedad y menor diámetro de lesión que aquellos frutos tratados con los ACB después de la inoculación con el fitopatógeno. A mayor tiempo de inoculación de los ACB previo al fitopatógeno, hubo menor incidencia de la enfermedad y menor diámetro de lesión en los frutos de melón. Los frutos inoculados con el tratamiento conjunto de *D. hansenii*+*S. rhizophila*+ulvan a las 24 h antes de la inoculación del fitopatógeno tuvieron los mejores resultados en la disminución de la enfermedad (87%) y menor diámetro de lesión (1.7 mm). Los frutos tratados con ulvan inoculado 24 h después del fitopatógeno tuvieron el menor porcentaje de reducción de la incidencia de la enfermedad (5.3%) y el mayor diámetro de lesión (27.7 mm). El fungicida sintético benomil no mostró efecto significativo ante los diferentes tiempos de incubación. Los resultados obtenidos determinan que *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan son efectivos como tratamiento preventivo.



**Figura 12.** Microscopía electrónica de barrido de la interacción entre los ACB y *F. proliferatum* en heridas de frutos de melón. (a) *F. proliferatum*, (b) *D. hansenii*+*F. proliferatum*, (c) *S. rhizophila*+*F. proliferatum*, (d) *D. hansenii*+*S. rhizophila*+*F. proliferatum*. M= Micelio, Y = Levadura, B = Bacteria.

**Tabla X.** Efecto de los tiempos de aplicación de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan en la reducción de incidencia de la enfermedad (%DI) ocasionado por *F. proliferatum* en frutos de melón.

Tratamientos	Antes (h)			Después (h)	
	24	12	2	12	24
<i>D. hansenii</i>	39.7 ± 2.3 <sup>a*</sup>	35.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	28.6 ± 3.1 <sup>a</sup>	17.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	10.7 ± 1.8 <sup>a</sup>
<i>S. rhizophila</i>	44.3 ± 3.1 <sup>b</sup>	40.2 ± 3.3 <sup>b</sup>	35.7 ± 2.8 <sup>b</sup>	20.6 ± 2.3 <sup>b</sup>	13.6 ± 3.3 <sup>c</sup>
Ulvan	48.9 ± 2.1 <sup>c</sup>	27.4 ± 1.4 <sup>c</sup>	14.3 ± 3.9 <sup>c</sup>	7.2 ± 2.1 <sup>c</sup>	5.3 ± 1.7 <sup>d</sup>
ACB	75.8 ± 1.1 <sup>d</sup>	72.5 ± 1.8 <sup>d</sup>	68.2 ± 3.5 <sup>f</sup>	39.2 ± 3.8 <sup>d</sup>	18.3 ± 3.4 <sup>e</sup>
<i>D. hansenii</i> +ulvan	70.2 ± 1.3 <sup>e</sup>	60.3 ± 2.2 <sup>e</sup>	57.1 ± 4.3 <sup>d</sup>	34.3 ± 1.6 <sup>e</sup>	11.1 ± 2.1 <sup>a</sup>
<i>S. rhizophila</i> +ulvan	75.3 ± 2.4 <sup>d</sup>	68.8 ± 4.1 <sup>f</sup>	64.3 ± 4.1 <sup>e</sup>	25.7 ± 2.0 <sup>f</sup>	15.7 ± 1.1 <sup>f</sup>
ACB+ulvan	87.6 ± 2.3 <sup>f</sup>	80.7 ± 3.4 <sup>g</sup>	73.5 ± 2.1 <sup>g</sup>	40.1 ± 1.2 <sup>d</sup>	17.4 ± 1.3 <sup>g</sup>
Benomil	66.5 ± 2.2 <sup>g</sup>	65.7 ± 3.2 <sup>e</sup>	64.3 ± 2.4 <sup>e</sup>	60.5 ± 2.4 <sup>g</sup>	59.5 ± 1.2 <sup>b</sup>

Notas: \* Cada valor es la media de diez repeticiones ± Desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa (Fisher,  $p \leq 0.05$ ). Reducción de la incidencia de la enfermedad: El porcentaje de control para cada tratamiento fue calculado comparando los tratamientos con el control (*F. proliferatum*+agua destilada estéril). ACB = Agentes de control biológico (*D. hansenii*+*S. rhizophila*). Tiempo transcurrido Antes y después (h) de la inoculación del patógeno (*F. proliferatum*).

**Tabla XI.** Efecto de los tiempos de aplicación de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan en el diámetro de lesión (mm) ocasionado por *F. proliferatum* en frutos de melón.

Tratamientos	Antes (h)			Después (h)	
	24	12	2	12	24
<i>D. hansenii</i>	11.5 ± 0.5 <sup>a*</sup>	12.5 ± 0.7	15.6 ± 0.7	20.8 ± 0.9	23.4 ± 0.7
<i>S. rhizophila</i>	9.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	10.5 ± 0.8	12.5 ± 0.9	18.3 ± 0.5	24.5 ± 1.3
Ulvan	8.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	10.6 ± 0.6	16.3 ± 0.9	24.7 ± 1.1	27.7 ± 0.8
ACB	7.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	8.7 ± 0.3	10.6 ± 0.2	15.3 ± 0.9	17.1 ± 1.3
<i>D. hansenii</i> +ulvan	10.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	12.4 ± 1.2	14.5 ± 0.9	19.4 ± 0.8	20.6 ± 0.9
<i>S. rhizophila</i> +ulvan	5.4 ± 0.2 <sup>d</sup>	6.0 ± 0.3	6.5 ± 0.9	17.7 ± 1.1	18.1 ± 1.2
ACB+ulvan	1.7 ± 0.2 <sup>e</sup>	2.3 ± 0.1	3.5 ± 0.2	14.5 ± 0.3	18.5 ± 0.1
Benomil	6.2 ± 0.3 <sup>f</sup>	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.7	6.9 ± 0.5	6.7 ± 0.3
Control	27.2 ± 0.7 <sup>g</sup>	27.8 ± 1.3	28.4 ± 1.2	28.8 ± 0.9	29.1 ± 1.2

Notas: \* Cada valor es la media de diez repeticiones ± Desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa (Fisher,  $p \leq 0.05$ ). ACB = Agentes de control biológico (*D. hansenii*+*S. rhizophila*). Tiempo transcurrido Antes y después (h) de la inoculación del patógeno (*F. proliferatum*).

### 7.10 Incidencia de la enfermedad y parámetros de calidad en frutos de melón post tratamiento con los ACB

Los frutos fueron saturados en solución para explorar la actividad preventiva de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan contra la pudrición del fruto. A pesar de que el 70% de los frutos en el tratamiento control desarrollaron síntomas de enfermedad después de 10 días de almacenamiento, la incidencia de la enfermedad (%DI) fue significativamente reducida con todos los tratamientos (Tabla XII). El tratamiento con los ACB+ulvan tuvo una DI de 8.3% con lo cual fue estadísticamente mejor que el tratamiento con benomil (10.0%). Todos los tratamientos combinados tuvieron menor DI que los tratamientos individuales (Tabla XII). En el tratamiento con benomil y el control se incrementaron significativamente la pérdida de peso y disminuyó la firmeza de los frutos. En los sólidos solubles totales, no se observó efecto significativo. Los tratamientos combinados disminuyeron el nivel de pH.

**Tabla XII.** Efecto de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan sobre la incidencia de la enfermedad y parámetros de calidad de frutos de melón.

Tratamientos	DI (%)	Pérdida de peso (gr)	Firmeza (N)	TSS (%)	pH
<i>D. hansenii</i>	33.3 ± 1.2 <sup>a*</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	9.2 ± 0.08 <sup>ac</sup>	6.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
<i>S. rhizophila</i>	26.7 ± 1.6 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	9.2 ± 0.09 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
Ulvan	23.3 ± 0.8 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.06 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
ACB	17.2 ± 1.1 <sup>g</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	9.3 ± 0.04 <sup>b</sup>	6.2 ± 0.2 <sup>b</sup>
<i>D. hansenii</i> +ulvan	20.0 ± 1.2 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	9.3 ± 0.08 <sup>bc</sup>	6.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
<i>S. rhizophila</i> +ulvan	13.3 ± 0.7 <sup>d</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	9.3 ± 0.06 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>b</sup>
ACB+ulvan	8.3 ± 0.8 <sup>f</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	9.3 ± 0.05 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.3 <sup>d</sup>
Benomil	10.0 ± 0.4 <sup>d</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.8 <sup>c</sup>	9.2 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.1 <sup>c</sup>
Control	70.0 ± 1.4 <sup>e</sup>	1.06 ± 0.08 <sup>c</sup>	4.0 ± 0.6 <sup>d</sup>	9.2 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.1 <sup>c</sup>

Nota: \* Los valores son la media ± Desviación estándar de diez repeticiones (tres frutas). Diferentes letras indican diferencia significativa (Fisher,  $P \leq .05$ ). ACB = Agentes de control biológico (*D. hansenii*+*S. rhizophila*).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp. en frutos de melón

*F. proliferatum* ha sido reportado como patógeno en maíz (Nguyen *et al.*, 2016), soya (Chang *et al.*, 2015), ajo (Dugan *et al.*, 2003), tomate (Gao *et al.*, 2016), piña (Stępień *et al.*, 2011), cebolla (Carrieri *et al.*, 2013), entre otros. Sin embargo, este es el primer reporte de *F. proliferatum* como agente causal de la pudrición de melón (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) en el Noroeste de México. La identificación del género y especie de *Fusarium* spp. se llevó a cabo por medio de características fenotípicas y varios marcadores moleculares (Booth, 1971; Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1994). La identificación molecular de hongos se realiza con base a la región interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) (Blaalid *et al.*, 2013; Schoch *et al.*, 2012), sin embargo, varias especies de *Fusarium* contienen regiones ortólogas que imposibilitan la identificación molecular con la amplificación de la región de ITS. Algunas regiones codificantes de genes nucleares como el factor de elongación 1- $\alpha$  (TEF-1- $\alpha$ ) y tubulina ( $\beta$ -Tub) permiten la identificación de las especies de *Fusarium* porque contienen una copia única en estos genes y tienen alto polimorfismo incluso en especies relativamente cercanas genéticamente (Geiser *et al.*, 2004; Kroon *et al.*, 2004). Por lo anterior, los marcadores moleculares elegidos comúnmente para la identificación de especies de *Fusarium* son los que amplifican las regiones de ITS, TEF-1- $\alpha$  y  $\beta$ -Tub (Araújo *et al.*, 2017; O'Donnell *et al.*, 2015; Stakheev *et al.*, 2016).

Los resultados de las pruebas de patogenicidad muestran que *F. proliferatum* es un hongo capaz de infectar a los frutos de melón en un promedio de dos días, por lo tanto, la rápida identificación permitirá un mejor monitoreo y mejores estrategias de control de la enfermedad (Araujo *et al.*, 2017). La mejora en la detección temprana y oportuna del fitopatógeno por medio de características taxonómicas fenotípicas y técnicas moleculares para ser usadas rutinariamente en laboratorios de fitopatología, permitirá incrementar la cantidad y calidad de alimento e incrementar las estrategias de control de enfermedades en plantas (Sanzani *et al.*, 2014). Aún y cuando la pudrición en frutos por *Fusarium* spp. se controla convencionalmente con fungicidas sintéticos, el uso de tratamientos alternativos



como ACB e inductores de resistencia podrían ser estrategias eficientes (Gopi y Thangavelu, 2014; Vargas-Gonzalez *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2013).

## 8.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento de los microorganismos marinos

### 8.2.1 Screening de microorganismos antagonistas

En numerosos estudios se han utilizado levaduras y bacterias epifitas como ACB hacia fitopatógenos en poscosecha (Spadaor y Droby, 2016). No obstante, la búsqueda por nuevas fuentes de aislamiento de buenos candidatos como ACB es prioritario (Pandey *et al.*, 2013). Los microorganismos que viven en ambientes marinos sobreviven a condiciones extremas de temperatura, presión osmótica y carencia nutricional; por ello podrían poseer capacidades metabólicas diferentes a las de cepas aisladas de otros ambientes terrestres (Chi *et al.*, 2010). Desafortunadamente, hay pocos estudios relacionados al efecto de microorganismos de ambientes marinos como ACB en poscosecha (Hernández-Montiel *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2010).

En estudios previos ya se ha evaluado la capacidad de inhibir la germinación de esporas y el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos por bacterias y levaduras aisladas de planta o suelo (Kröber *et al.*, 2016; Mnif y Ghribi, 2015a; Palazzini *et al.*, 2016; Reiss y Jorgensen, 2017). En las levaduras, las cepas de *D. hansenii* tuvieron los mejores resultados. Las cepas de *R. minuta* también mostraron actividad antagonista considerable. Ferraz *et al.* (2016), reporta que *R. minuta* inhibió en un 97.4% la germinación de esporas de *G. citri-aurantii*. La poca actividad antagonista de *C. difluens* en el experimento también la reporta Oro *et al.* (2016), donde cepas aisladas de ambientes extremos tuvieron poca actividad antagonista hacia *B. cinérea*, *P. expansum*, *A. carbonarius*, entre otros.

En las bacterias, las cepas de *S. rhizophila* tuvieron mejores resultados de inhibición en medio líquido y sólido. Anteriormente ya se ha reportado que las cepas del género tienen actividad antagonista contra patógenos (Dunne *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2012). Las cepas del género *Bacillus* mostraron, en menor nivel que *S. rhizophila*, actividad antagonista. Especies como *B. subtilis* (Reiss y Jørgensen, 2017), *B. amyloliquefaciens* (Kröber *et al.*, 2016), *B. velezensis* (Palazzini *et al.*, 2016), entre otros, son utilizados efectivamente como ACB.

### 8.2.2 Efecto de ulvan sobre el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de los ACB

Por su clasificación como inductor de resistencia, ulvan no debe tener actividad antifúngica directa (Cluzet *et al.*, 2004). Araujo *et al.* (2008) y Gonclave (2012), reportan que ulvan no inhibe la germinación de esporas ni el crecimiento micelial. Araujo *et al.* (2014), descubrieron que ulvan incrementó la germinación de esporas y formación de tubos germinativos de *C. gloeosporioides*. Nuestros resultados muestran que ulvan no tiene efecto directo en el crecimiento micelial y germinación de esporas de *F. proliferatum*. En otro estudio ulvan no tuvo efecto antifúngico directo contra *A. brassicola*, *C. lindemuthianum* y *Uromyces appendiculatus* (Borsato *et al.*, 2010; De Freitas *et al.*, 2015; Paulert *et al.*, 2009). La disparidad en los resultados puede estar ligada a la sensibilidad de las especies fúngicas a ulvan y a las diferentes metodologías utilizadas para probar la sensibilidad de los fitopatógenos hacia este inductor de resistencia.

Un inductor de resistencia que se utilizará como tratamiento conjunto con ACB, no debe tener efecto inhibitorio en el crecimiento de los agentes antagonistas (Hussain *et al.*, 2015). En la dinámica de crecimiento *in vivo* de la levadura antagonista *P. membranefaciens* en conjunto con el inductor BTH, este no tuvo ningún efecto en su crecimiento (Cao *et al.*, 2011). En nuestro estudio ulvan no tuvo efecto sobre el crecimiento *in vivo* o *in vitro* de *D. hansenii* y *S. rhizophila*.

### 8.3 Mecanismos antagónicos de *D. hansenii* y *S. rhizophila*

Según los resultados obtenidos, *D. hansenii* y *S. rhizophila* probablemente controlan *in vitro* la proliferación de *F. proliferatum* por mecanismos como: competencia por nutrientes, micoparasitismo por enzimas líticas y producción de metabolitos secundarios como VOCs y bio-surfactantes. Coincidentemente, Se ha reportado que la actividad antagónica de *D. hansenii* es mediada por mecanismos como enzimas líticas (ej. glucanasas y proteasas), competencia por espacio y nutrientes, inducción de resistencia y actividad de toxinas killer (Medina-Córdova *et al.*, 2018). En condiciones *in vitro* a *S. rhizophila* se le atribuyen mecanismos de acción para inhibir fitopatógenos como: producción de enzimas que degradan pared celular del hongo, sideróforos (Minkwitz y Berg, 2001) y compuestos volátiles anti-fúngicos (Kai *et al.*, 2007). En este trabajo, se reportan por primera vez los posibles

mecanismos de la actividad antagónica de *D. hansenii* y *S. rhizophila* involucrados en el control de *F. proliferatum* como agente causal de la pudrición de frutos de melón.

### 8.3.1 Actividad antifúngica directa

La actividad antifúngica directa de los ACB es un mecanismo de acción importante durante la colonización por el fitopatógeno (Dukare *et al.*, 2018). La eficiencia de este mecanismo está involucrada con la capacidad de colonizar rápidamente al hospedero (Janisiewicz y Korsten, 2002). Previamente, *D. hansenii* ha inhibido significativamente el crecimiento micelial de *Monilinia frutícola* (74.4%) y *M. fructigena* (44.1%) (Grzegorzczuk *et al.*, 2017). Previamente, *S. rhizophila* ha inhibido significativamente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (93%) (Hernández-Montiel *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos muestran que *D. hansenii*, *S. rhizophila* y su tratamiento conjunto inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *F. proliferatum* en un 45%, 36% y 51% respectivamente. Además, la dinámica de crecimiento de *D. hansenii* y *S. rhizophila* mostró que pueden colonizar rápidamente el tejido de los frutos de melón.

### 8.3.2 Competencia por nutrientes

La competencia por espacio y nutrientes es considerada uno de los principales mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas en el control biológico (Sharma *et al.*, 2009). Los microorganismos antagonistas deben tener la capacidad de competir efectivamente por los nutrientes disponibles en el nicho ecológico para colonizar y limitar el crecimiento del hongo patógeno (Samsudin *et al.*, 2016). Bacterias y levaduras deben crecer más rápido que el fitopatógeno para agotar primero los nutrientes disponibles y limitar su proliferación. Liu y Long (2013c), observaron que el antagonista *K. apiculata* solo inhibió la germinación de esporas de *P. italicum* solo bajo concentraciones limitadas de nutrientes, ya que en disponibilidad de nutrientes la inhibición no fue significativa. Los resultados obtenidos muestran que *D. hansenii*, *S. rhizophila* y el tratamiento conjunto inhibieron significativamente la germinación de esporas por disminución de sacarosa, fructosa y glucosa, que son la principal fuente de carbohidratos disponible en los frutos de melón (Shellie, 1999).

### 8.3.3 Parasitismo directo

Además de la competencia por espacio, los microorganismos antagonistas pueden inhibir a los fitopatógenos por el parasitismo directo (Saravanakumar *et al.*, 2016). El parasitismo directo o micoparasitismo es la habilidad de los microorganismos antagonistas de adherirse a las estructuras fúngicas y producir enzimas que las degraden (Dukare *et al.*, 2018). El micoparasitismo inicia cuando el antagonista reconoce al patógeno adhiriéndose al mismo (Jamalizadeh *et al.*, 2011). En este estudio, *D. hansenii* y *S. rhizophila* colonizaron las hifas de *F. proliferatum* con micoparasitismo al observar la reducción del grosor del micelio ante el tratamiento conjunto de los ACB. Después del reconocimiento y adhesión, los antagonistas secretan enzimas como glucanasas, quitinasas y proteasas para dañar las membranas fúngicas, que están compuestas principalmente por glucanos (50-60%), quitina (>20%) y glicoproteínas (20-30%) (Spadaro y Droby, 2016). El ensayo de actividad enzimática confirmó que *D. hansenii* produjo glucanasas y quitinasas; y *S. rhizophila* produjo glucanasas, quitinasas y proteasas *in vitro*.

### 8.3.4 Surfactantes y compuestos volátiles orgánicos (VOCs)

Recientemente se ha evaluado la función de metabolitos secundarios (ej. surfactantes y VOCs) como posibles mecanismos de acción de los ACB durante la supresión de patógenos fúngicos en poscosecha (Liu *et al.*, 2013). Levaduras y bacterias durante su ciclo de vida necesitan adherirse a diferentes interfaces compuestas por líquidos, aire y zonas hidrófobas; por ello los bio-surfactantes reducen la tensión superficial permitiéndoles adherirse y moverse a través de sustratos hidrófobos para poder crecer y esparcirse en el hospedero (Sunde *et al.*, 2017).

Los bio-surfactantes están compuestos de ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, proteínas y sus combinaciones (ej. lipoproteínas, glicoproteínas y glicolípidos) (Yañez-Ocampo *et al.*, 2013). En el control biológico, los bio-surfactantes actúan como estabilizadores de membrana celular e inhiben la unión del fitopatógeno a la superficie del hospedero (Lahkar *et al.*, 2018). Previamente, Nantawanit *et al.* (2010) y Wang *et al.* (2010), han reportado que *Trichoderma harzianum*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *P. fluorecens* y *P. guillermondii* han inhibido a fitopatógenos fúngicos por producción de bio-surfactantes.

A pesar de que metabolitos secundarios como antibióticos son estudiados frecuentemente, la investigación de VOCs es limitada. Estos compuestos son volátiles a temperatura ambiente y presión atmosférica. Químicamente los VOCs son alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos, entre otros (Li *et al.*, 2015; Munjal *et al.*, 2016). La levadura antagonista *A. pullulans* produce 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, alcohol fenil y 2-metil-1-propanol que tienen actividad antifúngica contra *C. acutatum*, *B. cinérea* y *Penicillium* spp. (Di Francesco *et al.*, 2015a). VOCs producidos por la bacteria antagonista *Bacillus* spp. inhibieron a *C. gloeosporioides* (85%) (Zheng *et al.*, 2013). En este estudio, los VOCs producidos por *D. hansenii* y *S. rhizophila* inhibieron significativamente el crecimiento micelial de *F. proliferatum*. VOCs producidos por el tratamiento conjunto fueron más efectivos que aquellos de los tratamientos individuales. La producción de VOCs es influenciada en gran manera por factores como tipo de cepa, etapa de crecimiento, disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH (Di Francesco *et al.*, 2015a).

#### **8.4 Actividad de enzimas de defensa en frutos de melón tratados con los ACB y *F. proliferatum***

Con los resultados obtenidos se propone que la eficiencia de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y principalmente de ulvan en tratamientos conjuntos o individuales para controlar la pudrición de melón por *F. proliferatum* está ligada a los mecanismos del fruto para incrementar la respuesta de defensa (ej. priming, síntesis de proteínas PR y estallido oxidativo) (Burketova *et al.*, 2015). Jaulneau *et al.* (2010), determinaron que la inducción de defensa en *Medicago truncatula* por ulvan es mediada por la ruta de señalización de JA. En trigo y arroz, ulvan indujo priming e incremento del estallido oxidativo inicial incrementando la resistencia contra el mildiu (Paulert *et al.*, 2010). Cluzet *et al.* (2004), concluyó por microarreglos que ulvan incrementa la expresión de genes codificantes para fitoalexinas, proteínas PR y proteínas estructurales.

En este estudio ulvan tuvo efecto moderado en el control de la incidencia de la enfermedad, no obstante, su efecto se atribuye a la inducción de respuesta sistémica adquirida (RSA) y al priming; mecanismos que actúan después de la respuesta sistémica inducida (RSI) (Cluzet *et al.*, 2004; Jaulneau *et al.*, 2010; Paulert *et al.*, 2010). Ya se ha reportado que *D. hansenii* induce resistencia en cítricos al incrementar la síntesis de fitoalexinas (Arras y Arru, 1999),

las cuales, están involucradas en la producción de moléculas que confieren resistencia a fitopatógenos fúngicos (Romanazzi *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en este estudio, reportan por primera vez la inducción de resistencia de *S. rhizophila* en frutos de melón para reducir la pudrición ocasionada por *F. proliferatum*. Sin embargo, para elucidar los mecanismos involucrados en la resistencia inducida en frutos de melón por *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan se necesita una investigación exhaustiva posterior.

Los resultados de estos experimentos, muestran evidencia suficiente para afirmar que los mecanismos de defensa en frutos de melón pueden ser inducidos por los ACB. En reportes previos ya se ha demostrado que se puede promover la inducción de resistencia en frutos de melón (Bi *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Una de las respuestas de defensa iniciales ante patógenos es el estallido oxidativo, donde se incrementan las especies reactivas de oxígeno ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ) (Tian *et al.*, 2016). A pesar de que las especies reactivas de oxígeno podrían contribuir a la defensa del fruto, pueden ser degradadas por enzimas antioxidantes como CAT, SOD y POX (Gill *et al.*, 2010).

CAT convierte a  $H_2O_2$  a  $O_2$  y  $H_2O$ , POD degrada al  $H_2O_2$  por oxidación de compuestos fenólicos (Tian *et al.*, 2007). Niveles altos de estas enzimas están asociados a la reducción del daño oxidativo y a retardar la senescencia (Lacan y Baccou, 1998). Se sabe que la actividad de PAL se puede incrementar como parte de los mecanismos de respuesta ante numerosos factores de estrés para el fruto (Prusky y Ludovica-Gullino, 2010). De acuerdo con Jetiyanon (2007), el incremento de la actividad de PAL obtenida con los agentes de control utilizados es suficiente para poder inhibir la invasión del patógeno y disminuir la incidencia de la enfermedad y el diámetro de la lesión.

### **8.5 Efecto de los ACB sobre *F. proliferatum* en frutos de melón**

La eficiencia de los tratamientos alternativos debe ser comparable al nivel de control de los fungicidas convencionales para obtener aceptación (Blackburn *et al.*, 2016). Obtener niveles de control comparables a los de los productos químicos convencionales con tratamiento individual de los ACB es difícil (Dukare *et al.*, 2018). Por lo tanto, se promueve un tratamiento conjunto antes que el tratamiento individual (Cao *et al.*, 2011). La mejora en la eficiencia del control biológico por mezcla de antagonistas e inductores de resistencia ha

mostrado mejores resultados que los tratamientos individuales (Panebianco *et al.*, 2015). Los ACB evaluados y sus tratamientos conjuntos mostraron diferente actividad antagonista en contra de *F. proliferatum*. El tratamiento conjunto de los ACB mostró un control *in vivo* e *in vitro* más efectivo que los tratamientos individuales. Los tratamientos conjuntos entre ACB e inductores de resistencia presentan ventajas como un amplio espectro de acción y alta eficiencia en el control de enfermedades bajo diferentes condiciones ambientales (Núnes, 2012).

El tratamiento conjunto de ACB puede generar una competencia entre ellos y reducir su eficiencia en comparación a los tratamientos individuales como lo reporta Klein *et al.* (2013). La explicación de la mejora en la eficiencia del tratamiento combinado entre *D. hansenii* y *S. rhizophila* podría ser que dichos microorganismos tienen diferentes requerimientos ecológicos o que ambos tienen la capacidad de adaptarse a diferentes hábitats (Xu *et al.*, 2011). Se debe analizar primero el índice de superposición de nicho, sus dinámicas de población y las interacciones entre ambos para concluir finalmente las causas de la mejora en la eficiencia del control de la pudrición del fruto por *F. proliferatum*. Ambos ACB como tratamiento individual o conjunto con ulvan inhibieron significativamente la incidencia de la enfermedad y el diámetro de lesión con mejores resultados que el fungicida benomil.

Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento conjunto de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan es promisorio para el control de la pudrición del fruto de melón por *F. proliferatum*. Anteriormente se ha reportado la eficiencia de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan como tratamientos individuales para controlar enfermedades por hongos fitopatógenos en poscosecha (Abouraïcha *et al.*, 2015; Berg *et al.*, 2010; Grzegorzcyk *et al.*, 2017). Sin embargo, esta es la primera investigación donde se usa a *D. hansenii*, *S. Rhizophila* y ulvan como tratamiento conjunto para control de la pudrición del fruto en melón. Otros estudios reportan que la actividad de los ACB puede ser mejorada con tratamientos conjuntos compatibles (Sharma *et al.*, 2009). Quitosan posee propiedades antifúngicas y la habilidad de inducir resistencia en los hospederos, con lo cual ha mejorado el efecto de ACB como las levaduras *C. saitona* y *C. laurentii* (Meng *et al.*, 2010). El tratamiento conjunto de  $\text{NaHCO}_3$  con la bacteria antagonista *Burkholderia spinosa* es efectivo en el control de la antracnosis en plátano (De Costa *et al.*, 2012).

## **8.6 Intervalos de tiempo entre la inoculación de los ACB y *F. proliferatum* para el control de la pudrición del fruto**

El estudio de los tiempos de inoculación de los ACB indica que la reducción en el tamaño de lesión y la disminución de la enfermedad están relacionadas con su alta tasa de reproducción, en comparación con el fitopatógeno, para colonizar más rápido el tejido en pre-tratamiento. Los tiempos de inoculación de ulvan indican que la reducción en el tamaño de lesión y la disminución de la enfermedad están relacionadas con su capacidad de inducir la resistencia y priming en los frutos. Por lo tanto, los ACB propuestos en este estudio deben ser utilizados en pre tratamiento para contrarrestar la pudrición de frutos de melón por *F. proliferatum*. Zhao *et al.* (2008), obtuvieron resultados similares al reportar que la eficiencia de *P. guilliermondi* contra *R. nigricans* fue mejor cuando los frutos de tomate se trataron 24 h antes de la inoculación del fitopatógeno. Lima *et al.* (2013), reportaron que la inoculación conjunta de *Wickerhamomyces anomalus* y *Meyerozyma guilliermondi* 12 y 24 h antes de *C. gloeosporioides* redujeron hasta el 13.8 y 30% respectivamente la incidencia de la enfermedad.

Cuando los ACB son inoculados antes que el fitopatógeno, tienen más tiempo de colonizar el fruto y reducir la disponibilidad de espacio y nutrientes en el hospedero. El estudio de la influencia de los tiempos de inoculación sobre la efectividad de los ACB es esencial para desarrollar estrategias de control en poscosecha. Los resultados demuestran la importancia de aplicar a los ACB inmediatamente después de la cosecha de los frutos. Como se ha demostrado en numerosos estudios, la competencia por nutrientes es uno de los mecanismos de acción más importantes (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008; Droby *et al.*, 2009; Jamalizadeh *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2008;).

## **8.7 Incidencia de la enfermedad y parámetros de calidad**

Se sabe que la resistencia a enfermedades fúngicas en poscosecha está asociada a la senescencia, la cual, disminuye considerablemente ante la senescencia del tejido (Pech *et al.*, 2008). En estudios previos, los parámetros de calidad en frutos de durazno no fueron deteriorados ante el tratamiento combinado de *P membranefaciens* y BTH para el control de



la pudrición azul por *P. expansum* (Cao *et al.*, 2011). El tratamiento conjunto de los ACB disminuyó significativamente la incidencia natural de la enfermedad y mantuvo la firmeza y peso de los frutos de melón. Inicialmente se incrementó el contenido de TSS en el fruto probablemente debido a hidrólisis de los polisacáridos insolubles a azúcares simples, pero posteriormente el contenido de TSS disminuyó cuando el tiempo de almacenamiento se incrementó, lo cual está relacionado al incremento en la tasa de respiración (Gupta *et al.*, 2014).

En nuestros resultados, ulvan en tratamiento conjunto con los ACB mostró el mayor contenido de TSS con lo cual, se retardo probablemente la tasa respiratoria. Durante la maduración de los frutos de melón, el pH se incrementa de aproximadamente 5.3 a 6.8 (Pech *et al.*, 2008). El incremento en el pH promueve la actividad de la enzima poligaracturonasa, la cual, está relacionada con la patogenicidad y virulencia de *F. proliferatum* (Leslie y Summerell, 2006; Zhang *et al.*, 2018). En los resultados obtenidos, ulvan y los tratamientos conjuntos con los ACB mantuvieron los valores más bajos de pH.

## 9. CONCLUSIONES

En la presente investigación, se demostró que *F. proliferatum* es el agente causal de la pudrición del fruto de melón. Este es el primer reporte de la pudrición de frutos de melón por *F. proliferatum* en el Noroeste de México. Los marcadores moleculares que amplifican las regiones de ITS, BT y EF 1 $\alpha$  permitieron la identificación molecular de las especies de *Fusarium*. El screening de microorganismos marinos es un método eficiente para seleccionar potenciales ACB en poscosecha. Ulvan no tiene efecto directo sobre el crecimiento de los ACB propuestos en este trabajo. Los resultados indican que *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan en tratamiento conjunto son una alternativa para el control de la pudrición del fruto de melón, incluso con mejores resultados a los obtenidos con los fungicidas sintéticos convencionales (benomil). Sin embargo, su eficiencia está condicionada a un tratamiento preventivo. *D. hansenii* y *S. rhizophila* inhiben la proliferación de *F. proliferatum* por mecanismos como: parasitismo directo, competencia por nutrientes, micoparasitismo por enzimas líticas, bio-surfactantes y VOCs. Los ACB y ulvan inducen la actividad de enzimas antioxidantes y enzimas de defensa, por ello disminuyen la incidencia natural de enfermedad e incrementan la vida de anaquel de los frutos de melón. Los mecanismos de acción de ambos agentes de control probablemente son complementarios, mientras que ulvan provee protección por inducción de resistencia en frutos de melón. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se incrementa el control de los mecanismos conjuntos de los ACB es complejo y probablemente es el resultado de interacciones entre *D. hansenii*, *S. rhizophila*, ulvan, fitopatógeno (*F. proliferatum*) y hospedero. Es necesario profundizar a nivel molecular para complementar los resultados obtenidos. Se propone una manera nueva de mejorar el efecto de los ACB (*D. hansenii* y/o *S. rhizophila*) para el control de la pudrición del fruto en poscosecha.

## 10. LITERATURA CITADA

Abouraïcha, E., Z. El Alaoui-Talibi, R. El Boutachfai, E. Petit, B. Courtois, J. Courtois, C. El Modafar. 2015. Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Sci. Hort.* 181:121-128.

Agrios, G. 2005. Fitopatología. Grupo. Noriega Segunda Edición. México DF. 838p.

Alavi, P., M.R. Starcher, C. Zachow, H. Müller, G. Berg. 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Front. Plant Sci.* 4:141-152.

Alavi, P., M.R. Starcher, G.G. Thallinger, C. Zachow, H. Müller, G. Berg. 2014. *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics.* 15(1):482.

Ali, S.S., N.N. Vidhale. 2013. Bacterial siderophore and their application: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2(12):303-312.

Alves, A., R.A. Sousa, R.L. Reis. 2013. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *J. Appl. Phycol.* 25(2):407-424.

Araújo, L., A.E. Gonçalves, M.J. Stadnik. 2014. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica.* 42(5):631-640.

Araújo, L., M.J. Stadnik, L.C. Borsato, R.M. Valdebenito-Sanhueza. 2008. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. *Trop. Plant. Path.* 33(2):148-152.

Araújo, N.A.F., M. Pasqual, L.A.S. Pio, E. Alves, N. de Matos Moura, S.D.S. Costa. 2017. Identification and aggressiveness of four isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Latundan banana in Brazil. *J. Phytopat.* 165(4):257-264.

Arras, G., S. Arru. 1999. Integrated control of postharvest citrus decay and induction of phytoalexins by *Debaryomyces hansenii*. *Adv. Hortic. Sci.* 76-81.

Barham, D., P. Trinder. 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst.* 97(1151):142-145.

Benbow, J.M., D. Sugar. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Dis.* 83:839-844.

Benítez, J.A., A.J. Silva, R.A. Finkelstein. 2001. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 69(10):6549-6553.

- Berg, G., D. Egamberdieva, B. Lugtenberg, M. Hagemann. 2010. Symbiotic plant-microbe interactions: stress protection, plant growth promotion, and biocontrol by *Stenotrophomonas*. *Symbioses and Stress*. 445-460.
- Bi, Y., Y.H. Ge, Y.C. Li, J.J. Wang, X.Y. Mao, X.W. Li. 2006. Postharvest acibenzolar-S-methyl treatment suppresses decay and induces resistance in Hami melon. *Acta Hort.* 1:393-399.
- Blaalid, R., S. Kumar, R.H. Nilsson, K. Abarenkov, P.M. Kirk, H. Kauserud. 2013. ITS 1 versus ITS 2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol. Ecol. Resour.* 13(2):218-224.
- Blackburn, D., D.I. Shapiro-Ilan, B.J. Adams. 2016. Biological control and nutrition: Food for thought. *Biol. Control.* 97:131-138.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.R. Prinsep. 2013. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 30(02):237-323.
- Bokshi, A.I., S.C. Morris, R. McConchie. 2007. Environmentally safe control of postharvest diseases of melons (*Cucumis melo*) by integrating heat treatment, safe chemicals, and systemic acquired resistance. *New Zeal. J. Crop. Hort.* 35(2):179-186.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Borsato, L.C., R.M. Di Piero, M.J. Stadnik. 2010. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. *Trop. Plant Pathol.* 35(5):318-322.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brent, K.J., D.W. Hollomon. 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk. Segunda edición. Fungicide Resistance Action Committee. Reino Unido. 48p.
- Breuer, U., H. Harms. 2006. *Debaryomyces hansenii*-an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 23(6):415-437.
- Bruner, R.L. 1964. Determination of reducing value. En: Whistler, R.L. (Ed.) *Methods of Carbohydrate Chemistry*. Academic press. New York. pp 67-71.
- Bull, C.T., M.L.K. Wadsworth, K.N. Sorenson, J. Takemoto, R. Austin, J.L. Smilanick. 1998. Syringomycin E produced by biological agents controls green mold on lemons. *Biol. Control.* 12:89-95.
- Burketova, L., L. Trda, P.G. Ott, O. Valentova. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnol. Adv.* 33(6):994-1004.

Cao, S., Z. Yang, Z. Hu, Y. Zheng. 2011. The effects of the combination of *Pichia membranefaciens* and BTH on controlling of blue mould decay caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. Food Chem. 124(3):991-996.

Carrieri, R., F. Raimo, A. Pentangelo, E. Lahoz. 2013. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. Crop. Prot. 43: 31-37.

Castoria R, F. De Curtis, G. Lima, V. De Cicco. 1997. b-1, 3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. Postharvest Biol. Technol. 12:293-300.

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

Cavalcanti, F.R., T.A. Oliveira, A.S. Martins-Miranda, R.A. Viégas, J.A.G. Silveira. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt stressed cowpea leaves. New Phytologist. 163(3):563-571.

Chanchaichaovivat, A., P. Ruenwongsa, B. Panijpan. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). Biol. Control. 42(3):326-335.

Chanchaichaovivat, A., B. Panijpan, P. Ruenwongsa. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. Biol. Control. 47(2):207-215.

Chang, K.F., S.F. Hwang, R.L. Conner, H.U. Ahmed, Q. Zhou, G.D. Turnbull, S.E. Strelkov, D.L. McLaren, B.D. Gossen. 2015. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada. Crop. Prot. 67:52-58.

Chi, Z.M., G. Liu, S. Zhao, J. Li, Y. Peng. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86(5):1227-1241.

Cluzet, S., C. Torregrosa, C. Jacquet, C. Lafitte, J. Fournier, L. Mercier, B. Dumas. 2004. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. Plant Cell. Environ. 27(7):917-928.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2015. Sistema de información de Organismos Vivos modificados (SIOVM)- Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. Consultado: 9/10/15 [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguiridad/pdf/20912\\_sg7.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguiridad/pdf/20912_sg7.pdf)

Cook, D.E., C.H. Mesarich, B.P. Thomma. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. Annu. Rev Phytopathol. 53:541-563.

- Cooper, A., M.W. Kennedy. 2010. Biofoams and natural protein surfactants. *Biophys Chem.* 151(3):96-104.
- De Costa, D.M., H.M.D.M. Gunawardhana. 2012. Effects of sodium bicarbonate on pathogenicity of *Colletotrichum musae* and potential for controlling postharvest diseases of banana. *Postharvest Biol. Technol.* 68:54-63.
- De Freitas, M.B., M.J. Stadnik. 2015. Ulvan-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria brassicicola* requires reactive oxygen species derived from NADPH oxidase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 90:49-56.
- Di Francesco, A., C. Martini, M. Mari. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *Eur. J. Plant Pathol.* 145(4):711-717.
- Di Francesco, A., L. Ugolini, L. Lazzeri, M. Mari. 2015a. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biol. Control.* 81:8-14.
- Di Francesco, A., R. Roberti, C. Martini, E. Baraldi, M. Mari. 2015b. Activities of *Aureobasidium pullulans* cell filtrates against *Monilinia laxa* of peaches. *Microbiol. Res.* 181:61-67.
- Droby, S., E. Chalutz, C.L. Wilson, M.E. Wisniewski. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35:794-800.
- Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarasin, C. Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52(2):137-145.
- Droby, S., M., Wisniewski, N., Teixidó, D., Spadaro, M.H. Jijakli. 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122:22-29.
- Dugan, F.M., B.C. Hellier, S.L. Lupien. 2003. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathol.* 52(3):426-426.
- Dukare, A.S., S. Paul, V.E. Nambi, R.K. Gupta, R. Singh, K. Sharma, R.K. Vishwakarma. 2018. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1-16.
- Dunne, C., Y. Moënne-Loccoz, J. McCarthy, P. Higgins, J. Powell, D.N. Dowling, F. O'Gara. 1998. Combining proteolytic and phloroglucinol producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium* mediated damping off of sugar beet. *Plant Pathol.* 47(3):299-307.

- Eayre, C. G., M. Skaria, C.T. Bull, B. Mackey. 2003. An avirulent *Galactomyces* species that controls green mold of citrus caused by *Penicillium digitatum*. *Subtropical Plant Sci.* 55:46-50.
- El-Ghaouth, A., J. Smilanick, M. Wisniewski, C. Wilson. 2000. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Dis.* 84:249-253.
- Feliziani, E., M. Santini, L. Landi, G. Romanazzi. 2013. Pre and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biol. Technol.* 78:133-138.
- Ferraz, L.P., T. da Cunha, A.C. da Silva, K.C. Kupper. 2016. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiol. Res.* 188:72-79.
- De Freitas, M.B.D., M.J. Stadnik. 2012. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 78:8-13
- Fukui, R., H. Fukui, A.M. Alvarez. 1999. Comparison of single versus multiple bacteria on biological control of anthurium blight. *Phytopathology.* 89:366-373.
- Fundación Produce Baja California Sur (PRODUCE). 2017. Agenda de Innovación tecnológica para el estado de Baja California Sur. Consultado: 27/07/17 [http://www.cofupro.org.mx/cofupro/agendas/agenda\\_bcs.pdf](http://www.cofupro.org.mx/cofupro/agendas/agenda_bcs.pdf)
- Gacto, M., J. Vicente-Soler, J. Cansado, T.G. Villa. 2000. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. *J. Appl. Microbiol.* 88(6):961-967.
- Gao, J., J. Wang, C. Yang, Y. Wang, B.H. Lu, L.N. Yang. 2017. *Fusarium proliferatum*, a new pathogen causing *Codonopsis lanceolata* root rot in China. *Plant Disease.* 101(9): 1679-1679.
- García-Gutiérrez, L., H. Zerriouh, D. Romero, J. Cubero, A. Vicente, A. Pérez-García. 2013. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid dependent defence responses. *J. Microbial. Biotech.* 6(3):264-274.
- Garmendia, G., F. Garat, E. Silvera, I. de Aurrecoechea, S. Vero. 2005. Levaduras nativas como controladores de enfermedades postcosecha de frutas en Uruguay. *Agrociencia.* 9(1-2):327-335.
- Geiser, D.M., M. del Mar Jiménez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T.J. Ward, K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:473-479.

Gerlach, W., Nirenberg, H.I. 1982. The genus *Fusarium*-a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Land Forstwirtschaft Berlin-Dahlem. 209:1-406.

Gill, S.S., N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48:909-930.

Gonçalves, A.E., M.J. Stadnik. 2012. Interferência de ulvana no desenvolvimento e melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Trop. Plant Path.* 37:431-437.

Gopi, M., R. Thangavelu. 2014. Suppression of *Fusarium* wilt disease of banana by Zimmu (*Allium cepa* x *Allium sativum*) leaf extract. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8:2904-2915.

Grzegorzczak, M., C. Restuccia, G. Cirvilleri. 2016. Biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* and *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast strains against phytopathogenic fungi of the species *Monilinia*. *New Biotech.* (33):S209.

Grzegorzczak, M., B. Żarowska, C. Restuccia, G. Cirvilleri. 2017. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol.* 61:93-101.

Gupta, N., S.K. Jain. 2014. Storage behavior of mango as affected by postharvest application of plant extracts and storage conditions. *J. Food Sci. Tech.* 51(10):2499-2507.

Hadfield, K.A., J.K. Rose, A.B. Bennett. 1995. The respiratory climacteric is present in Charentais (*Cucumis melo* cv. *Reticulatus* F1 Alpha) melons ripened on or off the plant. *J. Exp. Bot.* 46(12):1923-1925.

Hagemann, M., K. Ribbeck-Busch, S. Klähn, D. Hasse, R. Steinbruch, G. Berg. 2008. The plant-associated bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* expresses a new enzyme for the synthesis of the compatible solute glucosylglycerol. *J. Bacteriol.* 190(17):5898-5906.

Hernández-Lauzardo, A.N., S. Bautista-Baños, M.G. Velázquez-del Valle, A. Hernández-Rodríguez. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25(1):66-74.

Hernández-Montiel, L.G., C.P. Larralde-Corona, S. Vero, M.G. López-Aburto, J.L. Ochoa, F. Ascencio-Valle. 2010a. Characterization of yeast *Debaryomyces hansenii* for the biological control of blue mold decay of Mexican lemon. *CyTA J. Food.* 8(1):49-56.

Hernández-Montiel, L.G., J.L. Ochoa, E. Troyo-Diéguez, C.P. Larralde-Corona. 2010b. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biol. Technol.* 56(2):181-187.

Hernández-Montiel, L.G., R.J. Holguín-Pena, C.P. Larralde-Corona, R. Zulueta-Rodríguez, E. Rueda-Puente, M. Moreno-Legorreta. 2012. Effect of inoculum size of yeast



*Debaryomyces hansenii* to control *Penicillium italicum* on Mexican lime (*Citrus aurantiifolia*) during storage. *CyTA J. Food.* 10(3):235-242.

Hernández-Montiel, L.G., R. Zulueta-Rodriguez, C. Angulo, E.O. Rueda-Puente, E.E. Quiñonez-Aguilar, R. Galicia. 2017. Marine yeasts and bacteria as biological control agents against anthracnose on mango. *J. Phytopathol.* 165(11-12):833-840.

Hussain, M., M.I. Hamid, M.U. Ghazanfar. 2015. Salicylic acid induced resistance in fruits to combat against postharvest pathogens: a review. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 48(1):34-42.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2002. El melón tecnologías de producción y comercialización. Consultado: 9/10/15. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1962/EI%20melon.%20tecnologias%20de%20produccion%20y%20comercializacion.pdf?sequence=1>

Jamalizadeh, M., H.R Etebarian, H. Aminian, A. Alizadeh. 2011. A review of mechanisms of action of biological control organisms against postharvest fruit spoilage. *EPPO Bulletin.* 41(1):65-71.

Janisiewicz, W.J., L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40(1):411-441.

Janisiewicz, W.J., B. Bors. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3261-3267.

Jaulneau, V., C. Lafitte, C. Jacquet, S. Fournier, S. Salamagne, X. Briand, M.T. Esquerré-Tugayé, B. Dumas. 2010. Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:1-11.

Jetiyanon, K. 2007. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus strains* (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biol. Control.* 42(2):178-185.

Jijakli, M.H., P. Lepoivre. 1998. Characterization of an exo- $\beta$ -1, 3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology.* 88(4):335-343.

Johansson, L.H., L.A. H. Borg. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 174:331-336.

Jones, J.D., J.L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444(7117):323-329.

Kai, M., U. Effmert, G. Berg, B. Piechulla. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187(5):351-360.

- Kefialew, Y., A. Ayalew. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). Postharvest Biol. Technol. 50(1):8-11.
- Klein, M.N., A.C. Silva, M.R. Lopes, K.C. Kupper. 2013. Application of microorganisms, alone or in combination, to control postbloom fruit drop in citrus. Trop. Plant Pathol. 38(6): 505-512.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teinize, M.N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plantgrowth promoting rhizobacteria. Nature. 286:885-886.
- Kröber, M., B. Verwaaijen, D. Wibberg, A. Winkler, A. Pühler, A. Schlüter. 2016. Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. J. Biotech. 231:212-223.
- Kroon, L.P.N.M., F.T. Bakker, G.B.M. Van Den Bosch, P.J.M. Bonants, W.G. Flier. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Fungal Genet. Biol. 41(8):766-782.
- Lacan, D., J.C. Baccou. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in non-netted muskmelon fruits. Planta. 204:377-382.
- Lahaye, M., A. Robic. 2007. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. Biomacromolecules. 8(6):1765-1774.
- Lahkar, J., D. Goswami, S. Deka, G. Ahmed. 2018. Novel approaches for application of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* for biocontrol of *Colletotrichum capsici* responsible for anthracnose disease in chilli. Eur. J. Plant Pathol. 150(1):57-71.
- Leslie, J.F., B.A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Pub. Segunda edición. Ames, IA, USA. 387 p.
- Levy, Y., M. Benderly, Y. Cohen, U. Gisi, D. Bassand. 1986. The joint action of fungicides in mixtures: 432 comparison of two methods for synergy calculation. EPPO Bulletin. 16:651-657.
- Li, X.Y., Z.C. Mao, Y.X. Wu, H.H. Ho, Y.Q. He. 2015. Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase micro extraction with gas chromatography-mass spectrometry. Biocontrol Sci. Techn. 25(2):132-143.
- Lima, J.R., D.M.F. Gondim, J.T.A. Oliveira, F.S.A. Oliveira, L.R.B. Gonçalves, F.M.P. Viana. 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. Postharvest Biol. Technol. 83:58-64.

- Liu, H., W. Jiang, Y. Bi, Y. Luo. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. *Jiubao*) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biol. Technol.* 35(3):263-269.
- Liu, J., M. Wisniewski, S. Droby, J. Norelli, V. Hershkovitz, S. Tian, R. Farrell. 2012. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80(3):578-590.
- Liu, J., M. Wisniewski, T. Artlip, Y. Sui, S. Droby, J. Norelli. 2013a. The potential role of PR-8 gene of apple fruit in the mode of action of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, in postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol. Technol.* 85:203-209.
- Liu, J., Y. Sui, M. Wisniewski, S. Droby, Y. Liu. 2013b. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 167(2):153-160.
- Liu, P., L. Luo, C.A. Long. 2013c. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. *Biol. Control.* 67(2):157-162.
- Machado, L.P., S.T. Matsumoto, C.M. Jamal, M.B. da Silva, D. da Cruz Centeno, P.C. Neto, N.S. Yokoya. 2014. Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi. *J. Sci. Food Agr.* 94(9):1739-1744.
- Madriz-Ordeñana, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas. *Revista Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica.* 63:22-32.
- Mari, M., S. Bautista-Baños, D. Sivakumar. 2016. Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biol. Technol.* 122:70-81.
- Mari, M., C. Martini, M. Guidarelli, F. Neri. 2012. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biol. Control.* 60(2):132-140.
- Matsushima, T. 1971. Some interesting fungi imperfecti. *Nat Sci Mus Bull.*
- Mauch-Mani, B., I. Baccelli, E. Luna, V. Flors. 2017. Defense priming: An adaptive part of induced resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68(1).
- McMurry, J. 2012. Química orgánica. Editorial Cengage Learning. Octava edición. México. 1375 p.
- Medina-Córdova, N., R. López-Aguilar, F. Ascencio, T. Castellanos, A.I. Campa-Córdova, C. Angulo. 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biol. Control.* 97:70-79.

- Medina-Córdova, N., S. Rosales-Mendoza, L.G. Hernández-Montiel, C. Angulo. 2018. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biol. Control*. 121:216-222.
- Meng, X.H., G.Z. Qin, S.P. Tian. 2010. Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage. *LWT-Food Sci. Technol.* 43(4):596-601.
- Minkwitz, A., G. Berg. 2001. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Clin. Microbiol.* 39(1):139-145.
- Mnif, I., D. Ghribi. 2015a. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protec.* 77:52-64.
- Mnif, I., D. Ghribi. 2015b. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Sci.* 104(3):129-147.
- Montealegre, J.R., C. López, M.J. Stadnik, J.L. Henriquez, R. Herrera, R. Polanco, L.M. Pérez. 2010. Control of grey rot of apple fruits by biologically active natural products. *Trop. Plant Pathol.* 35(5):271-276.
- Morath, S.U., R. Hung, J.W. Bennett. 2012. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.* 26(2-3):73-83.
- Munjal, V., A.V. Nadakkakath, N. Sheoran, A. Kundu, V. Venugopal, K. Subaharan, S. Rajamma, S.J. Eapen, A. Kumar. 2016. Genotyping and identification of broad spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17. *Biol. Control.* 92:66-76.
- Nantawanit, N., A. Chanchaichaovivat, B. Panijpan, P. Ruenwongsa. 2010. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biol. Control.* 52(2):145-152.
- Navarta, L.G., J. Calvo, P. Posetto, S. Cerutti, J. Raba, D. Benuzzi, M.I. Sanz. 2014. Postharvest control of gray mold in apples with lyophilized formulations of *Cryptococcus laurentii*: the effect of cold stress in the survival and effectiveness of the yeast. *Food Bioprocess Tech.* 7(10):2962-2968.
- Nelson, P.E., M.C. Dignani, E.J. Anaissie. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:479-504.
- Newman, M.A., T. Sundelin, J.T. Nielsen, G. Erbs. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 4:139.

Nguyen, T.T.X., H.W. Dehne, U. Steiner. 2016. Histopathological assessment of the infection of maize leaves by *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, and *F. verticillioides*. *Fungal Biol.* 120(9):1094-1104.

Nirenberg, H.I. 1976. Untersuchungen uber die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-u. Forstwirtsch. Berlin-Dahlem.* 169:1-117.

Norma Oficial Mexicana. Fito NOM-EM-038-FITO-2002. Norma oficial mexicana con carácter de emergencia, requisitos para la aplicación y certificación de buenas prácticas agrícolas y de manejo para la producción y empaque de melón cantaloupe. Consultado: 30/11/2015. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/fito/fito038em-02.pdf>

Núnes, C.A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.* 133(1):181-196.

O'Donnell, K., T.J. Ward, V.A. Robert, P.W. Crous, D.M. Geiser, S. Kang. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5):583-595.

Olori-Great, N.G., E.U. Opara. 2017. Defence mechanisms in plants against invading plant pathogenic microbes in Nigeria. *J. Agriculture Sust.* 10(1).

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 1987. Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas. Consultado: 24/09/15 <http://www.fao.org/docrep/x5055s/x5055S00.htm#Contents>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2014. Evolution of fusarium taxonomy: morphological, biological and phylogenetic diagnostic concept. Consultado: 30/09/15 [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/caribbeantr4/06Evolution.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/caribbeantr4/06Evolution.pdf)

Oro, L., M. Ciani, F. Comitini. 2016. Yeasts from xerophilic environments reveal antimicrobial action against fruit pathogenic molds. *J. Food Saf.* 36(1):100-108.

Otsu, Y., Y. Matsuda, H. Mori, H. Ueki, T. Nakajima, K. Fujiwara, M. Matsumoto, N. Azuma, K. Kakutani, T. Nonomura, Y. Sakuratani. 2004. Stable phylloplane colonization by entomopathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* KPM-018P and biological control of phytophagous ladybird beetles *Epilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 14(5):427-439.

Palazzini, J., C. Dunlap, M. Bowman, S. Chulze. 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat). *Microbiological Res.* 9:30-36.

- Pandey, S., A. Sree, S.S. Dash, D.P. Sethi, L. Chowdhury. 2013. Diversity of marine bacteria producing beta-glucosidase inhibitors. *Microb. Cell Factories*. 12(1):35.
- Panebianco, S., A. Vitale, G. Polizzi, F. Scala, G. Cirvilleri. 2015. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. *Biol. Control*. 84:19-27.
- Paoletti, F., D. Aldinucci, A. Mocali, A. Caparrini. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem*. 154(2): 536-541.
- Patel, H., R. Krishnamurthy. 2013. Elicitors in plant tissue culture. *J. Pharmacogn. Phytochem*. 2(2):60-65.
- Paulert, R., D. Ebbinghaus, C. Urlass, B.M. Moerschbacher. 2010. Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. *Plant Pathol*. 59(4): 634-642.
- Paulert, R., V. Talamini, J.E.F. Cassolato, M.E.R. Duarte, M.D. Nosedá, A.J. Smânia, M.J. Stadnik. 2009. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Plant Dis. Protect*. 116:263-270.
- Pech, J.C., M. Bouzayen, A. Latché. 2008. Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Sci*. 175(1-2):114-120.
- Prusky, D., M. L. Gullino. 2010. *Postharvest pathology*. Springer. 212 p.
- Qin, G.Z., S.P. Tian, Y. Xu, Y.K. Wan. 2003. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 62:147-154.
- Raza, W., J. Wang, Y. Wu, N. Ling, Z. Wei, Q. Huang, Q. Shen. 2016. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 100(17):7639-7650.
- Reiss, A., L.N. Jørgensen. 2017. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade® ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713). *Crop Protec*. 93:1-8.
- Ren, Y., Y. Wang, Y. Bi, Y. Ge, Y. Wang, C. Fan, D. Li, H. Deng. 2012. Postharvest BTH treatment induced disease resistance and enhanced reactive oxygen species metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Eur. Food Res. Technol*. 234(6):963-971.
- Rey, M. 1998. Mejoramiento de cepas de Trichoderma para su utilización como agente de control biológico (Tesis Doctoral) Universidad de Sevilla. España. 186 p.

Romanazzi, G., S.M. Sanzani, Y. Bi, S. Tian, P.G. Martínez, N. Alkan. 2016. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 122: 82-94.

Samsudin, N.I.P., A. Medina, N. Magan. 2016. Relationship between environmental conditions, carbon utilisation patterns and Niche Overlap Indices of the mycotoxigenic species *Fusarium verticillioides* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Fungal Ecol.* 24:44-52.

Sánchez-Estrada, A., M.E. Tiznado-Hernández, A.J. Ojeda-Contreras, A.I. Valenzuela-Quintanar, R. Troncoso-Rojas. 2009. Induction of enzymes and phenolic compounds related to the natural defence response of netted melon fruit by a bio-elicitor. *J. Phytopathol.* 157(1):24-32.

Sanzani, S.M., M.G. Li Destri Nicosia, R. Faedda, S.O. Cacciola, L. Schena. 2014. Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. *J. Phytopathol.* 162(1):1-13.

Saravanakumar, K., C. Yu, K. Dou, M. Wang, Y. Li, J. Chen. 2016. Synergistic effect of Trichoderma-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biol. Control.* 94:37-46.

Scherm, B., G. Ortu, A. Muzzu, M. Budroni, G. Arras, Q. Migheli. 2003. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *J. Plant Pathol.* 205-213.

Schmidt, C.S., M. Alavi, M. Cardinale, H. Müller, G. Berg. 2012. *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils.* 48(8):947-960.

Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, A.N. Miller. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109(16):6241-6246.

Schroers, H.J., G.J. Samuels, N. Zhang, D.P. Short, J. Juba, D.M. Geiser. 2016. Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium solani*) and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia.* 108:806-819.

Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA). 2012. Plan rector sistema nacional producto melón. Consultado: 14/11/15 [http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP\\_CNSP\\_MELON/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR\\_CNSP\\_%20MELON\\_%202012.pdf](http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP_CNSP_MELON/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CNSP_%20MELON_%202012.pdf)

Servicio de Información Agro-alimentaria y pesquera (SIAP). 2017. Producción Agrícola Cíclicos y Perenes. Modalidad Riego y temporal en Melón. Consultado: 27/10/18 <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria (SENASICA). 2010. Información técnica del melón mexicano para exportación. Consultado: 23/09/15 [www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp%3FIdDocumento%3D23492%26IdUrl%3D47168+%&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx](http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp%3FIdDocumento%3D23492%26IdUrl%3D47168+%&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx)

Sharma, R.R., D. Singh, R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control*. 50(3):205-221.

Shellie, K.C. 1999. Muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit ripening and postharvest quality after a preharvest spray of amino ethoxy vinyl glycine. *Postharvest Biol. Technol.* 17(1):55-62.

Shellie, K.C., G. Lester. 2004. Netted melons. The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks. USDA-ARS. *Agricultural Handbook*. (66).

Silva, M.D.C., V. Várzea, L. Guerra-Guimarães, H.G. Azinheira, D. Fernandez, A.S. Petitot, B. Bertrand, P. Lashermes, M. Nicole. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1):119-147.

Slininger, P.J., MA. Jackson. 1991. Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:388-92.

Spadaro, D., M.L. Gullino. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int. J. Food Microbiol.* 91(2):185-194.

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

Sperschneider, J., D.M. Gardiner, L.F. Thatcher, R. Lyons, K.B. Singh, J.M. Manners, J.M. Taylor. 2015. Genome-wide analysis in three *Fusarium* pathogens identifies rapidly evolving chromosomes and genes associated with pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* 7(6):1613-1627.

Stakheev, A.A., D.R. Khairulina, S.K. Zavriev. 2016. Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *Int. J. Food Microbiol.* 225:27-37.

Stępień, Ł., G. Koczyk, A. Waśkiewicz. 2011. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *J. Appl. Genet.* 52(4):487.

Sui, Y., S. Droby, D. Zhang, W. Wang, Y. Liu. 2014. Reduction of *Fusarium* rot and maintenance of fruit quality in melon using eco-friendly hot water treatment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21(24):13956-13963.

Summerell, B.A., B. Salleh, J.F. Leslie. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 87(2):117.



- Sunde, M., C.L. Pham, A.H. Kwan. 2017. Molecular characteristics and biological functions of surface-active and surfactant proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 86:585-608.
- Tampakaki, A.P., E. Hatziloukas, N.J. Panopoulos. 2009. Plant pathogens, bacteria. *Encyclopedia of Microbiology*. Tercera edición. 655-677.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Tanaka, Y., M. Kojima, I. Uritani. 1974. Properties, development and cellular-localization of cinnamic acid 4-hydroxylase in cut-injured sweet potato. *Plant Cell Physiol.* 15(5):843-854.
- Taylor, K.A. 1995. A colorimetric fructose assay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53(3):215-227.
- Tian, S.P., G.Z. Qin, B.Q. Li, Q. Wang, X.H. Meng. 2007. Effects of salicylic acid on disease resistance and postharvest decay control of fruits. *Stewart Postharvest Rev.* 6:2.
- Tian, S., R. Torres, A.R. Ballester, B. Li, L. Vilanova, L. González-Candelas. 2016. Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: Virulence and resistance. *Postharvest Biol. Technol.* 122:11-21.
- Tooley, P.W., E.D. Goley, M.M. Carras, R.D. Frederick, E.L. Weber. 2001. Characterization of *Claviceps* species pathogenic on sorghum by sequence analysis of the  $\beta$ -tubulin gene intron 3 region and EF-1 $\alpha$  gene intron 4. *Mycologia.* 541-551.
- Torres-Sánchez, L., L. López-Carrillo. 2010. Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud Pública Méx.* 52(5):461-467.
- Tu, Q., J. Chen, J. Guo. 2013. Screening and identification of antagonistic bacteria with potential for biological control of *Penicillium italicum* of citrus fruits. *Sci. Hort.* 150:125-129.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2018. World agricultural production. Consultado: 27/10/2018. <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/worldag-production/worldag-production-10-11-2018.pdf>
- Vargas-Gonzalez, G., V. de Paul Alvarez-Reyna, C. Guigon-Lopez, P. Cano-Rios, F. Jimenez-Diaz, J. Vasquez-Arroyo, M. Garcia-Carrillo. 2016. Pattern of use high risk pesticides in the crop of melon (*Cucumis melo L.*) in the Comarca Lagunera. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* 3(9):367-378.
- Venkateswarlu, B., A.K. Shanker, C. Shanker, M. Maheswari. 2011. Crop stress and its management: Perspectives and strategies. Springer Science & Business Media. Primera edición. Netherland. 612 p.

- Vera, J., J. Castro, A. Gonzalez, A. Moenne. 2011. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine Drugs*. 9(12):2514-2525.
- Vero, S., G. Garmendia, M.B. González, O. Bentancur, M. Wisniewski. 2013. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus domestica*). *FEMS Yeast Res.* 13(2):189-199.
- Vilgalys, R., J.S. Hoppole, D.S. Hibbett. 1994. Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: the impact of molecular systematic studies. *Mycol. Helv.* 6:73-91.
- Waewthongrak, W., S. Pisuchpen, W. Leelasuphakul. 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 99:44-49.
- Walker, J.M. 2002. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press. 11-14.
- Walters, D.R., J. Ratsep, N.D. Havis. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* 64(5):1263-1280.
- Wang, Y., Y. Bao, D. Shen, W. Feng, T. Yu, J. Zhang, X.D. Zheng. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *Int. J. Food Microbiol.* 123(3):234-239.
- Wang, Y., Z. Xu, P. Zhu, Y. Liu, Z. Zhang, Y. Mastuda, L. Xu. 2010. Postharvest biological control of melon pathogens using *Bacillus subtilis* EXWB1. *J. Plant Path.* 645-652.
- Wiesel, L., A.C. Newton, I. Elliott, D. Booty, E.M. Gilroy, P.R. Birch, I. Hein. 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Front. Plant. Sci.* 5:655.
- Wilson, C.L., M.E. Wisniewski. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27(1):425-441.
- Wilson, C.L., P.L. Pusey. 1985. Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis.* 69(5):375-378.
- Wisniewski, M., C. Biles, S. Droby. 1991. The use of yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. En: Wilson, C.L., Chalutz, E. (Eds.), *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables*. Proc. Workshop, US Department of Agriculture, ARS-92, pp. 167-183.
- Wisniewski, M., S. Droby, J. Norelli, J. Liu, L. Schena. 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biol. Technol.* 122:3-10.

- Wolf, A., A. Fritze, M. Hagemann, G. Berg. 2002. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(6):1937-1944.
- Xu, X.M., P. Jeffries, M. Pautasso, M.J. Jeger. 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology.* 101(9):1024-1031.
- Yang, B., L. Yongcai, G. Yonghong, W. Yi. 2010. Induced resistance in melons by elicitors for the control of postharvest diseases. En: Prusky, D. y Ludovica-Gullino, M (ed.). *Postharvest Disease Pathology.* Springer Netherlands. 31-41 pp.
- Yañez-Ocampo, G., A. Wong-Villarreal. 2013. Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *Bio. Tecnología.* 17(3):12-28.
- Zhang, Z.K., Y. Bi, J.J. Wang, J.J. Deng, Y.H. Ge, D.F. Xie, Y. Wang. 2011. Multiple pre-harvest treatments with acibenzolar-Smethyl reduce latent infection and induce resistance in muskmelon fruit. *Sci. Hortic.* 130:126-132
- Zhang, J., B.D. Bruton, C.L. Biles. 1999. *Fusarium solani* endo-polygalacturonase from decayed muskmelon fruit: purification and characterization. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54(5):171-186.
- Zhao, Q., W. Ran, H. Wang, X. Li, Q. Shen, S. Shen, Y. Xu. 2013. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. *Biol. Control.* 58(2):283-292.
- Zhao, Y., K. Tu, X. Shao, W. Jing, Z. Su. 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 49(1):113-120.
- Zheng, M., J. Shi, J. Shi, Q. Wang, Y. Li. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biol. Control.* 65(2):200-206.
- Zhimo, V.Y., D. Dilip, J. Sten, V.K. Ravat, D.D. Bhutia, B. Panja, J. Saha. 2017. Antagonistic Yeasts for Biocontrol of the banana postharvest anthracnose pathogen *Colletotrichum musae*. *J. Phytopathol.* 165(1):35-43.
- Zvirin, T., R. Herman, Y. Brotman, Y. Denisov, E. Belausov, S. Freeman, R.P. Treves. 2010. Differential colonization and defense responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1· 2. *Plant. Pathol.* 59(3):576-585.