



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**MECANISMOS ANTAGÓNICOS DE *Debaryomyces  
hansenii* HACIA *Penicillium italicum* Y SU EFECTO  
EN LA PROTECCIÓN POSCOSECHA  
DEL LIMÓN MEXICANO**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

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

p r e s e n t a

**Luis Guillermo Hernández Montiel**

La Paz, B.C.S. Junio de 2009

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 25 del Mes de Mayo del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**MECANISMOS ANTAGÓNICOS DE *Debaryomyces hansenii* HACIA *Penicillium italicum* Y SU EFECTO EN LA PROTECCIÓN POSCOSECHA DEL LIMÓN MEXICANO**

Presentada por el alumno: Luis Guillermo Hernández Montiel

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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

### LA COMISIÓN REVISORA



---

DR. ENRIQUE TROYO DIÉGUEZ  
DIRECTOR DE TESIS



---

DRA. CLAUDIA PATRICIA  
LARRALDE CORONA  
CO-TUTOR



---

DR. RICARDO VÁZQUEZ JUÁREZ  
CO-TUTOR



---

DRA. AREVIK POGHOSYAN  
MELKONYAN  
CO-TUTOR



---

DR. RAMÓN JAIME HOLGUÍN PEÑA  
CO-TUTOR



---

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **Comité Tutorial**

La presente Tesis Doctoral se llevo a cabo bajo la supervisión de los siguientes investigadores:

**Dr. José Luis Ochoa Ochoa<sup>†</sup>**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
**Director**

**Dr. Enrique Troyo Diéguez**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
**Co-Director**

**Dr. Ricardo Vázquez Juárez**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
**Tutor**

**Dra. Arevik Poghosyan Melkonyan**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
**Tutor**

**Dr. Ramón Jaime Holguín Peña**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
**Tutor**

**Dra. Claudia Patricia Larralde Corona**

Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional  
**Tutor**

## **Comité Revisor**

**Dr. Enrique Troyo Diéguez**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dr. Ricardo Vázquez Juárez**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. Arevik Poghosyan Melkonyan**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dr. Ramón Jaime Holguín Peña**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. Claudia Patricia Larralde Corona**

Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional

## **Jurado en el Examen de Grado**

**Dr. Enrique Troyo Diéguez**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dr. Ricardo Vázquez Juárez**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. Arevik Poghosyan Melkonyan**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dr. Ramón Jaime Holguín Peña**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. Claudia Patricia Larralde Corona**

Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional

**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (Suplente)

## Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), por haberme dado la oportunidad de superarme académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de la beca No. 144710.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. José Luis Ochoa†, Dr. Enrique Troyo Diéguez, Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Dra. Arevik Poghosyan Melkonyan, Dr. Ramón Jaime Holguín Peña y Dra. Claudia Patricia Larralde Corona, por su apoyo académico y personal.

Al personal de la Dirección de Posgrado del CIBNOR: Dra. Thelma Castellanos Cervantes (ex-directora de Posgrado), Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Beatriz A. Gálvez González, Claudia E. Olachea León, Lupita Sánchez Vázquez y Horacio Sandoval Gómez, por su excelente labor.

A la Dra. Elisa Serviere Zaragoza, por sus valiosas sugerencias para la presentación de un mejor manuscrito de tesis.

A la Dra. Gina Holguín Zehfus†, por sus amistad, la cual a través de ella hizo posible el inicio de una nueva etapa en mi vida al venir a este Estado tan bondadoso para todos aquellos que venimos a trabajar.

Al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, el cual siendo Coordinador del Programa de Agricultura en Zonas Áridas, me brindo la oportunidad dentro del CIBNOR de poder trabajar con el Dr. José Luis Ochoa.

A la Dra. Silvana Vero y al Dr. Pedro Mondino, ambos de la Universidad de la República en Montevideo, Uruguay, por haberme brindado su amistad y ayuda en todo momento, haciendo fructífera mi estancia por aquel país.

A Isabel C. Rodríguez Luna del Laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional por su gran amistad y apoyo técnico.

A los que coincidimos en algún momento como parte del grupo del Dr. Ochoa y nos unió una amistad: Lupita, Erick, Alejandra, Ernesto, Hever, Sergio, Marco, Carlos, Omar, Amaury, Ariel, Lety, Goretti, Erika, Claudia, Leiber, Francisco, Iván, Cristian, Iliana y Manuel.

A Javier Caraveo Patiño, por su amistad y los momentos compartidos.

Al Biol. Mar. Roberto Hernández y Daniel Ceseña del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica de la ULSA del CIBNOR, por su valioso apoyo técnico.

A Claudia y Francisco López, por su apoyo y amistad brindada justo en el momento que más lo necesitábamos, La Familia Hernández-López (Luis, Lupita y Sebastián) les agradeceremos eternamente.

A mis amigos: Carlos, Liliana, Guillermo (tocayo), Paco, Jaime, Ofe, Rita, Rebeca, Ruth, Luis y Cesar.

A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en el desarrollo de esta tesis, les agradezco su apoyo.

## Dedicatorias

A Dios, por enseñarme que la fe nunca hay que perderla.

A mi esposa María Guadalupe López Aburto, por todos los momentos que hemos pasado juntos en nuestro camino, por tu fortaleza en tiempos difíciles y por demostrarme que siempre estarás conmigo apoyando mis decisiones. Tú eres parte importante de cada momento de mi vida, te amo.

A mi hijo Aarón Emmanuel, eres importante en mi vida y aunque exista distancia entre nosotros, siempre estaremos juntos.

A mi hijo Joshué Sebastián, por enseñarme que todo se puede lograr, por tu fortaleza, amor y cariño. Estoy muy orgulloso de ti y gracias por haberme elegido como tu papá. No te voy a fallar.

A mi madre Elvira Montiel Alarcón, por tu apoyo incondicional, por tu amor y sobre todo, por ser una gran mamá y amiga. Siempre estaré agradecido por tener unos padres como ustedes.

A mi padre Esteban Hernández Aguilar, sabes que este objetivo de mi vida no solo es mío, también es tuyo, gracias por tu apoyo y demostrarme en todo momento que no estoy solo. Aunque nos separe la distancia, quiero que sepas que siempre estaré contigo, te quiero papá.

A mis hermanas Mónica y Nora Hernández Montiel, por su apoyo incondicional y por demostrarme su amor, ambas van conmigo siempre. Las amo.

A mis sobrinos Andrea, Iván y Arely, por los momentos que hemos pasado juntos y por su apoyo, los quiero.

A mi hermano Aldo Esteban†, aunque siempre te extraño, se que estas conmigo, fuiste, eres y serás siempre mi ejemplo a seguir.

A la Familia López Aburto, en especial al Prof. Arnulfo López y Maestra Eva Aburto, por su apoyo y por demostrarme siempre su afecto y cariño, siempre estaré agradecido con ustedes. Gracias por todo.

A mi tutor Dr. José Luis Ochoa†, por la oportunidad que me brindo de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo, confianza, consejos, pero sobre todo por enseñarme a dar el máximo esfuerzo bajo cualquier circunstancia. Siempre estaré agradecido con usted.

## ÍNDICE GENERAL

|  | Página |
|--|--------|
| Comité Tutorial.....   | i      |
| Comité Revisor.....  | ii     |
| Agradecimientos.....   | iii    |
| Dedicatorias.....  | v      |
| Índice General.....  | vi     |
| Índice de Figuras.....   | ix     |
| Índice de Tablas.....  | xi     |
| Prefacio.....  | xii    |
| Resumen.....   | xiii   |
| Abstract.....  | xv     |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1      |
| 1.1. Producción de cítricos en México.....   | 1      |
| 1.1.2. Limón mexicano ( <i>Citrus aurantifolia</i> [Christm.] Swingle).....  | 2      |
| 1.1.2.1. Generalidades del cultivo.....  | 2      |
| 1.1.2.2. Comercialización.....   | 4      |
| 1.1.2.3. Manejo poscosecha.....  | 5      |
| 1.1.2.4. Perdidas poscosecha.....  | 7      |
| 1.1.2.5. Principales hongos patógenos poscosecha de cítricos.....  | 7      |
| 1.2. Control biológico de hongos en poscosecha de cítricos.....  | 9      |
| 1.2.1. Uso de levaduras como agentes de control biológico en cítricos.....   | 9      |
| 1.2.1.1. Mecanismos antagónicos de levaduras.....  | 11     |
| 1.2.1.1.1. Competencia por espacio y nutrientes en el hospedero.....   | 11     |
| 1.2.1.1.2. Toxinas <i>killer</i> .....   | 12     |
| 1.2.1.1.3. Producción de enzimas que degradan pared celular en hongos.....   | 14     |
| 1.2.1.1.4. Inducción de resistencia.....   | 17     |
| 1.2.1.2. Levadura <i>Debaryomyces hansenii</i> .....   | 18     |
| Justificación.....   | 21     |
| 2. HIPÓTESIS.....  | 23     |
| 3. OBJETIVO GENERAL.....   | 23     |
| 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 23     |
| 4. CAPÍTULO: Identificación a través de técnicas moleculares de <i>Penicillium italicum</i> aislado de limón mexicano..... | 24     |
| 4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 24     |
| Procedencia de <i>Penicillium italicum</i> .....   | 24     |
| Postulados de Koch.....  | 24     |
| Patógeno.....  | 24     |
| Prueba de patogenicidad.....   | 24     |
| Crecimiento del hongo y extracción de ADN.....   | 25     |
| Identificación molecular.....  | 25     |
| 4.2. RESULTADOS.....   | 26     |
| Patogenicidad de <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón mexicano.....  | 26     |
| Identificación molecular de <i>Penicillium italicum</i> .....  | 26     |
| 4.3. DISCUSIÓN.....  | 28     |



|  |    |
|--|----|
| 5. CAPÍTULO: Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antagónica de distintas levaduras de <i>Debaryomyces hansenii</i> hacia el hongo <i>Penicillium italicum</i> mediante la competencia de espacio y/o nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas y toxinas <i>killer</i> ..... | 29 |
| 5.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 29 |
| Procedencia de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> .....  | 29 |
| Competencia de carbono entre levaduras antagónicas y <i>Penicillium italicum</i> .....   | 30 |
| Cultivo <i>in vitro</i> de levaduras <i>D. hansenii</i> en medio de limón mexicano.....  | 30 |
| Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Debaryomyces hansenii</i> sobre <i>Penicillium italicum</i> ....   | 31 |
| Dinámica poblacional de levaduras.....   | 31 |
| Competencia por nutrimentos <i>in vitro</i> .....  | 31 |
| Inhibición de la germinación de esporas de <i>Penicillium italicum</i> .....   | 32 |
| Análisis estadístico.....  | 32 |
| Evaluación de la producción de enzimas por <i>Debaryomyces hansenii</i> .....  | 32 |
| Prueba API-ZYM.....  | 32 |
| Enzimas hidrolíticas.....  | 33 |
| Extracción de pared celular de <i>Penicillium italicum</i> .....   | 33 |
| Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Debaryomyces hansenii</i> con paredes de <i>P. italicum</i> .....  | 33 |
| Actividad $\beta$ -1,3 glucanasa.....  | 33 |
| Actividad quitinasa.....   | 34 |
| Determinación de proteasas.....  | 34 |
| Evaluación de las toxinas <i>killer</i> .....  | 34 |
| 5.2. RESULTADOS.....   | 36 |
| Competencia de nutrimentos entre levaduras y <i>P. italicum</i> .....  | 36 |
| Crecimiento de levaduras antagónicas en diferentes medios de cultivo.....  | 36 |
| Eficiencia del antagonismo <i>in vitro</i> de levaduras hacia <i>Penicillium italicum</i> ....   | 37 |
| Dinámicas de crecimiento de levaduras en medio albedo y flavedo limón.....   | 38 |
| Competencia por nutrimentos.....   | 41 |
| Inhibición de esporas de <i>Penicillium italicum</i> por levaduras antagónicas.....  | 41 |
| Determinación de enzimas por parte de <i>Debaryomyces hansenii</i> .....   | 41 |
| Producción de enzimas hidrolíticas por parte de levaduras antagónicas.....   | 46 |
| Antibiosis <i>in vitro</i> por efecto del factor <i>killer</i> .....   | 48 |
| 5.3. DISCUSIÓN.....  | 50 |
| Crecimiento de <i>Debaryomyces hansenii</i> en un medio elaborado a base de limón mexicano.....  | 50 |
| Antagonismo de levaduras hacia <i>Penicillium italicum</i> por competencia de nutrimentos.....   | 50 |
| Efecto de la producción de enzimas en el antagonismo de <i>Penicillium italicum</i> .....  | 51 |
| Efecto del factor <i>killer</i> sobre el hongo <i>Penicillium italicum</i> .....   | 53 |
| 6. CAPÍTULO: Cuantificación de la protección poscosecha de frutos de limón mexicano inoculados con levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> hacia la pudrición del moho azul ocasionada por <i>Penicillium italicum</i> bajo condiciones ambientales y de almacenamiento.....              | 54 |
| 6.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 54 |

|  |    |
|--|----|
| Inoculación de frutos de limón mexicano con <i>Debaryomyces hansenii</i> y <i>Penicillium italicum</i> .....   | 54 |
| Levaduras antagonicas.....   | 54 |
| Hongo patógeno.....  | 54 |
| Inoculación de frutos.....   | 54 |
| Protección <i>in vivo</i> de limón mexicano a temperatura ambiente y almacenamiento.....   | 55 |
| Evaluación <i>in vivo</i> de diferentes dosis de levaduras para controlar a <i>Penicillium italicum</i> .....  | 56 |
| Análisis estadístico.....  | 57 |
| 6.2. RESULTADOS.....   | 58 |
| Protección de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> en limón mexicano para disminuir el daño del moho azul ocasionado por <i>Penicillium italicum</i> ..... | 58 |
| Temperatura ambiente (25° C y 85% de humedad relativa-HR).....   | 58 |
| Temperatura de almacenamiento (13° C y 90% de humedad relativa-HR).....  | 61 |
| Efecto de la dosis de levadura para el control del moho azul en limón mexicano bajo condiciones ambientales (25° C y 85% HR).....                            | 63 |
| Efecto de la dosis de levadura para el control del moho azul en limón mexicano bajo condiciones de almacenamiento (13° C y 90% HR).....                      | 66 |
| 6.3. DISCUSIÓN.....  | 69 |
| 7. DISCUSIÓN GENERAL.....  | 71 |
| 8. CONCLUSIONES.....   | 75 |
| 9. LITERATURA CITADA.....  | 76 |
| 10. ANEXOS.....  | 99 |
| Artículos en revistas indexadas  |    |
| Secuencias depositadas en el GenBank del NCBI  |    |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Propuesta del mecanismo de acción de las toxinas <i>killer</i> hacia la pared celular de los hongos, ejemplo de una toxina producida por <i>Saccharomyces</i> .....             | 15     |
| Figura 2. Principales componentes de la pared celular de los hongos.....  | 16     |
| Figura 3. Prueba de patogenicidad en frutos de limón mexicano inoculados con <i>Penicillium italicum</i> .....  | 26     |
| Figura 4. Productos de PCR de la región intergénica ITS1-5.8s-ITS2 del ADN ribosomal de <i>Penicillium italicum</i> .....   | 27     |
| Figura 5. Secuencia genómica del segmento ITS1-5,8s-ITS-2 de <i>Penicillium italicum</i> aislado de frutos enfermos de limón mexicano (Banco de datos del NCBI, acceso No. DQ991463)..... | 27     |
| Figura 6. Elaboración del medio de cultivo a base de flavedo o albedo de limón mexicano.....  | 30     |
| Figura 7. Evaluación del crecimiento de <i>Debaryomyces hansenii</i> en distintos medios de cultivo.....  | 37     |
| Figura 8. Crecimiento de <i>Penicillium italicum</i> sobre medio agar flavedo de limón mexicano en presencia de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> .....                              | 39     |
| Figura 9. Dinámicas de crecimiento de levaduras antagónicas.....  | 40     |
| Figura 10. Porcentaje de germinación de esporas de <i>Penicillium italicum</i> .....  | 44     |
| Figura 11. Detección de la producción de enzimas mediante el sistema API-ZYM para la levadura DhhBCS001 de <i>Debaryomyces hansenii</i> .....   | 46     |
| Figura 12. Actividad $\beta$ -1,3 glucanasa (A), quitinasa (B) y proteasa (C) de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> cultivadas con el hongo <i>Penicillium italicum</i> .....         | 47     |
| Figura 13. Inhibición del crecimiento de <i>Penicillium italicum</i> en presencia de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> en medio YMB ajustado a un pH de 4.6.....                     | 49     |
| Figura 14. Niveles de protección de distintas <i>Debaryomyces hansenii</i> hacia la pudrición del moho azul ocasionada por el hongo patógeno <i>Penicillium italicum</i> . ....           | 58     |

|  |    |
|--|----|
| Figura 15. Incidencia de la pudrición ocasionada por <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón mexicano protegidos por levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> .....                                       | 59 |
| Figura 16. Tamaño de lesión en limones inoculados con <i>Penicillium italicum</i> y protegidos por <i>Debaryomyces hansenii</i> .....  | 60 |
| Figura 17. Incidencia de la pudrición ocasionada por <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón mexicano protegidos por levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> bajo condiciones de almacenamiento.....     | 61 |
| Figura 18. Tamaño de lesión en limones inoculados con <i>Penicillium italicum</i> y <i>Debaryomyces hansenii</i> en almacenamiento.....  | 62 |
| Figura 19. Incidencia de la pudrición ocasionada por <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de <i>Debaryomyces hansenii</i> .....                                   | 64 |
| Figura 20. Diámetro de lesión ocasionado por <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de <i>Debaryomyces hansenii</i> ..  | 65 |
| Figura 21. Incidencia de la pudrición ocasionada por <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de <i>Debaryomyces hansenii</i> bajo condiciones de almacenamiento..... | 67 |
| Figura 22. Diámetro de lesión ocasionado por <i>Penicillium italicum</i> en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de <i>Debaryomyces hansenii</i> bajo condiciones de almacenamiento.....         | 68 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|           |  | Página |
|-----------|--|--------|
| Tabla 1.  | Hongos patógenos de poscosecha identificados en limón mexicano.....  | 8      |
| Tabla 2.  | Características de algunas toxinas <i>killer</i> producidas por levaduras de importancia biotecnológica.....   | 13     |
| Tabla 3.  | Colección de levaduras aisladas del Golfo de California y de frutos de limón mexicano.....   | 29     |
| Tabla 4.  | Determinación de enzimas producidas por <i>Debaryomyces hansenii</i> mediante el sistema API-ZYM.....  | 33     |
| Tabla 5.  | Crecimiento de <i>Debaryomyces hansenii</i> en diferentes medios de cultivo.....   | 36     |
| Tabla 6.  | Crecimiento micelial de <i>Penicillium italicum</i> en presencia de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                                       | 38     |
| Tabla 7.  | Asimilación de carbohidratos en el medio flavedo limón inoculado con levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> y el hongo <i>Penicillium italicum</i> .....                                 | 42     |
| Tabla 8.  | Asimilación de carbohidratos en el medio albedo limón inoculado con levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> y el hongo <i>Penicillium italicum</i> .....                                  | 43     |
| Tabla 9.  | Actividad enzimática de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> determinada mediante el sistema APY-ZYM, parte I.....   | 44     |
| Tabla 10. | Actividad enzimática de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> determinada mediante el sistema APY-ZYM, parte II.....  | 45     |
| Tabla 11. | Actividad enzimática de levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> determinada mediante el sistema APY-ZYM, parte III.....   | 45     |
| Tabla 12. | Inhibición del hongo <i>Penicillium italicum</i> por levaduras <i>Debaryomyces hansenii</i> bajo diferentes pHs del medio de cultivo.....  | 48     |
| Tabla 13. | Tratamientos de limón mexicano con <i>Debaryomyces hansenii</i> y <i>Penicillium italicum</i> bajo dos condiciones ambientales diferentes: temperatura ambiente y de almacenamiento..... | 55     |
| Tabla 14. | Dosis de aplicación de <i>Debaryomyces hansenii</i> en frutos de limón mexicano para su protección poscosecha contra <i>Penicillium italicum</i> ...                                     | 56     |

## Prefacio

Este documento de tesis originó las siguientes publicaciones:

1. **L.G. Hernández-Montiel** and J.L. Ochoa. 2007. Fruit rot caused by *Penicillium italicum* on lemon (*Citrus aurantifolia*) in Colima, México. *Plant Disease* 91: 767. **F.I. 1.795**
2. **Hernández-Montiel, L.G.**, Larralde-Corona, C.P., Vero, S., López-Aburto, M.G., Ochoa, J.L.† y Ascencio-Valle, F. 2009. Caracterización de levaduras *Debaryomyces hansenii* para el control biológico de la podredumbre azul del limón mexicano. *CYTA-Journal of Food*. (Aceptado). **F.I. 0.941**
3. **Luis Guillermo Hernández-Montiel**, José Luis Ochoa†, Enrique Troyo-Diéguez and Claudia Patricia Larralde-Corona. 2009. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology*. (En correcciones menores). **F.I. 1.59**
4. **Hernández-Montiel, L.G.**, Ochoa, J.L.† Troyo-Diéguez, E. and Larralde-Corona, C.P. 2009. Effects of temperature, relative humidity, inoculum density and biological control agents on postharvest mold blue rot of Mexican lime. (En preparación).

## Resumen

Se identificó a nivel molecular a *Penicillium italicum* como el agente causal del moho azul en frutos de limón mexicano provenientes del Estado de Colima, México. Para el control biológico de dicho hongo patógeno en poscosecha, se utilizó una colección de doce levaduras *Debaryomyces hansenii*, las cuales fueron caracterizadas *in vitro* para determinar su capacidad de competencia por espacio y nutrimentos, producción de enzimas hidrolíticas y toxinas *killer*, finalmente se evaluó su protección sobre frutos de limón. Las levaduras LL1, LL2 y LL3 fueron las más efectivas para el control *in vitro* del moho azul en medios elaborados a base de limón mexicano y PDA. En la competencia por nutrimentos provenientes del limón, estas levaduras epífitas fueron las que asimilaron rápidamente las fuentes de sacarosa, fructosa y glucosa del medio flavedo y albedo de frutos de limón, inhibiendo los niveles de germinación de las esporas de *P. italicum* hasta en más de un 80%. Se determinó que todas las levaduras *Debaryomyces hansenii* produjeron enzimas ( $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y proteasa) capaces de degradar paredes celulares del hongo patógeno. El intervalo de actividad para  $\beta$ -1,3 glucanasa se determinó entre los 9 y 13 días de evaluación, alcanzando el máximo nivel las levaduras DhfBCS002, DhhBCS004 y DhhBCS006. Para la actividad quitinasa, el intervalo de actividad se determinó entre los 9 y 11 días y las levaduras con mayor actividad fueron la DhhBSC006 y DhhBCS003. En la determinación de proteasa, la actividad inicial se detectó a los 9 días de evaluación, donde las levaduras DhhBCS003 y DhhBCS007 mostraron su nivel más alto dentro de su cinética. Por la producción de toxinas *killer* se observó antagonismo *in vitro* de las levaduras *Debaryomyces hansenii* hacia *P. italicum* en los pHs probados, perdiendo todas las levaduras su actividad antagonista en el pH 5.4. En frutos de limón mexicano se cuantificaron diversos niveles de protección con las distintas levaduras de *Debaryomyces hansenii* en tres dosis de aplicación  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  células mL<sup>-1</sup> hacia la pudrición ocasionada por *P. italicum*. Bajo condiciones ambientales (25° C y 85% HR), los frutos inoculados con la dosis mas baja no fueron protegidos al 100% contra la pudrición del moho azul, sin embargo, con la dosis intermedia no existieron pudriciones por el hongo patógeno en los frutos inoculados con las levaduras DhhBCS006, LL1 y LL2. Con la dosis más alta de levadura, los frutos inoculados con todas las cepas *D. hansenii* seleccionadas (DhhBCS003, DhhBCS005, DhhBCS006, LL1 y LL2), no presentaron signos de pudrición,

protegiéndolos en un 100%. En cambio los frutos tratados con el fungicida imazalil (usado para combatir el moho azul en las empacadoras de México), presentaron un 40% de incidencia de la enfermedad. Bajo condiciones de almacenamiento (13° C y 90% HR), la máxima protección (100%) se alcanzo con la dosis más alta de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de DhhBCS003, DhhBCS006, LL1 y LL2. El tratamiento de los limones con el fungicida imazalil presentaron un incidencia del 60% del moho azul, es decir, la protección por parte del agroquímico no fue del 100%.

**Palabras clave:** *Penicillium italicum*, limón mexicano, levaduras, control biológico.



## Abstract

*Penicillium italicum* was identified at molecular level as the causal agent of the blue mold decay of Mexican lemon fruits from Colima's state, Mexico. For the biological control of postharvest blue mold decay, was used a collection of twelve *Debaryomyces hansenii* yeast, which were characterized *in vitro* to determine their capacity of competition for space and nutriment, production of lytic enzymes, killer toxins and their effect on the protection Mexican lemon fruits. The LL1, LL2 and LL3 yeasts were the most effective for the *in vitro* control of the blue mold decay in elaborated medium based on Mexican lemon fruits and PDA. At the competition for lemon's nutriment, these epiphytes yeast were those who quickly assimilated the sources of sucrose, fructose and glucose from the flavedo and albedo agars from Mexican lemon fruits, disabling the levels of germination of the spores of *P. italicum* up to, even more than 80%. It was determined that all the *D. hansenii* yeast produced enzymes ( $\beta$ -1.3-glucanase, chitinase and protease) capable of degrading cellular walls of the pathogenic fungi. The interval of activity for  $\beta$ -1.3-glucanase was determinate between the 9 and 13 days of evaluation, reaching the maximum level the DhfBCS002, DhhBCS004 and DhhBCS006 yeasts. For the chitinase activity, the range enzymatic activity was determinate between the 9 and 11 days and the yeasts with major activity were DhhBSC006 and DhhBCS003. In the protease determination, the initial activity was detected at the 9 days of evaluation, where the DhhBCS003 and DhhBCS007 yeasts showed the higher level inside their kinetic. By the production of killer toxins was observed *in vitro* antagonism of the *D. hansenii* yeasts towards *P. italicum* at the proved pHs, losing the yeasts all their antagonist activity in the pH 5.4. In Mexican lemon fruits diverse levels of protection were quantified with the different *D. hansenii* in three doses of application  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  cells mL<sup>-1</sup> towards the blue mold decay caused by *P. italicum*. Under environmental conditions (25° C and 85% HR), the inoculated fruits with the lowest dose were not 100% protected against the blue mold decay, however, with the intermediate dose did not exist blue mold decay in the inoculated fruits with the DhhBCS00, LL1 and LL2 yeasts. With the highest yeast dose, the inoculated fruits with all *D. hansenii* selected (DhhBCS003, DhhBCS005, DhhBCS006, LL1 and LL2) did not present signs of decay, protecting them in 100%. The fruits treated with the imazalil fungicide (used by the balers of Mexico to attack the blue mold), they presented

40% of incident of the disease. Under storage conditions (13° C and 90% HR) the maximum protection (100%) was reached with the highest doses of  $10^8$  cells mL<sup>-1</sup> of DhhBCS003, DhhBCS006, LL1 and LL2. The Mexican lemons treatment with imazalil fungicide presented an incidence of 60% of the postharvest blue mold decay, the protection with the agrochemical was not at 100%.

**Keywords:** *Penicillium italicum*, Mexican lemon, yeast, biological control.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La citricultura es una de las actividades agronómicas más importantes a nivel mundial debido a la derrama económica que se genera por la comercialización de los frutos. Los cítricos se desarrollan en climas tropicales y subtropicales, siendo los países del Hemisferio Norte los que mayor aportan a la producción de esta fruta, destacando a: Estados Unidos, México, España, Italia y China con una participación del 70 al 80%, el resto proviene de países del Hemisferio Sur, incluyendo Argentina, Australia y Brasil. De acuerdo a las estadísticas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la producción de cítricos en fresco representó cerca de 73 millones de toneladas durante la temporada 2005-2006, distribuyéndose la fruta de la siguiente manera: naranja con un volumen de 47.1 millones de toneladas, mandarina 15 millones, limón 4.3 millones, toronja 4 millones y otros cítricos 2.4 millones de toneladas (USDA, 2006).

El consumo de cítricos dentro de los principales países productores tiende a superar los 65.6 millones de toneladas, lo que incluye 38.5 millones de cítricos en fresco y 27.1 millones de procesados. Estados Unidos y Brasil destinan la mayor parte de su producción para el consumo en jugo. En particular, Estados Unidos procesa el 68% de la producción citrícola para ese fin, en el caso particular del Estado de Florida entre el 90 y 95% de la cosecha de naranjas frescas se convierten en jugo. Por su parte, Brasil destina más del 72% de la producción de naranjas al sector industrial. China consume prácticamente el total de su cosecha anual de cítricos. Para el caso de México, el 75% del total de la producción citrícola se destina para su consumo en fresco, el 15% a la industria y 10% a la exportación en fresco, en jugo y otros procesados (NASS, 2006).

### **1.1. Producción de cítricos en México**

La citricultura comercial en nuestro país tiene raíces recientes, fue a partir de la década de los cincuentas cuando comenzó a representar una opción importante para un número significativo de productores, principalmente de la zona Sureste y Golfo de México. Los cítricos cultivados en el país aportan el 15% de la producción mundial y se encuentran localizados en 23 Estados, cubriendo una superficie aproximada de 512 mil hectáreas y

generando una producción de más de 6 millones de toneladas de fruta. Por hectárea, el rendimiento oscila de 11 a 19 toneladas para los diferentes cítricos. Del total de la producción, la naranja ocupa el primer lugar con el 63%, seguida por el limón mexicano y el limón persa con 23%, y el resto distribuido entre la toronja y la mandarina. En el ámbito mundial México en producción de naranja ocupa el cuarto lugar después de Brasil, Estados Unidos y China, y es el productor número uno de limón mexicano y persa (FAO, 2008).

Dentro de la naranja, la variedad Valencia es la más común, produciéndose en todas las regiones productoras del país, por su parte, el limón mexicano en su mayoría se produce en el Pacífico y el limón persa en el Golfo de México. La producción de mandarinas y toronjas son poco significativas con respecto a los cítricos anteriores, predominando las variedades Dancy y Mónica para la primera y Ruby Red para la segunda. En la parte norte del país predomina el cultivo de la naranja Valencia, seguida por Hamlin, Parson Brown, Pineapple y las conocidas como ombligonas o Navels, siendo la principal variedad de este grupo la Washington. Dentro de los limones verdaderos conocidos como limones italianos de las variedades Eureka, Rosenberg, Lisbon y 8-A, se cultivan solo en los Estados de Tamaulipas, Yucatán y San Luis Potosí. Las únicas limas que se cultivan en México y que son los cítricos más importantes del país después de la naranja, son las que se conocen como limón mexicano y limón persa, siendo los principales Estados productores de limón mexicano: Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca y para el limón persa: Veracruz, Tabasco, Puebla y Yucatán (Ramos-Novelo, 2003; Heinen, 2006).

### **1.1.2. Limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle)**

#### **1.1.2.1. Generalidades del cultivo**

Según Swingle y Reece (1967), el limón mexicano se originó en el Este del Archipiélago Indio, de donde se dispersó a otras regiones a través de la acción del hombre, específicamente por las incursiones de los españoles y portugueses hacia el nuevo mundo. En México, las primeras huertas de limón se establecieron en el Estado de Michoacán hacia el año de 1912, anteriormente el abasto de este cítrico era a través de la recolecta de fruta de árboles silvestres en el Estado de Colima (principal productor de limón mexicano en

México y el Mundo) se estableció de manera comercial en el año de 1920. Otros nombres con los cuales se conoce al limón son: Mexican lime, west indian lime, limón gallego, key lime, limón criollo, limón sutil, entre otros. El limón mexicano en realidad es una lima ácida de frutos literalmente pequeños y representa a la especie *aurantifolia* del género *Citrus*. Se ubica taxonómicamente de la siguiente manera:

**Familia:** *Rutacea*

**Sub-familia:** Aurantioideae

**Tribu:** *Citreas*

**Sub-tribu:** *Citricas*

**Género:** *Citrus*

**Sub-género:** *Eucitrus*

**Especie:** *aurantifolia*

Según Tanaka, *Citrus aurantifolia* fue la primera especie en evolucionar del subgénero *Eucitrus*, estableciendo que este cítrico es un trihíbrido resultado del entrecruzamiento de *Citrus medica*, *C. maxima* y *Microcitrus*. Estas dos últimas especies junto con *C. reticulata*, están consideradas como las únicas especies verdaderas comestibles de *Citrus*, siendo el resto de los cítricos solo híbridos interespecíficos (Scora, 1988). El limón mexicano, al igual que otros frutales, puede ser propagado por semilla o en forma vegetativa. Los árboles originados por semilla presentan el inconveniente de ser muy susceptibles a la pudrición de la raíz comúnmente conocida como Gomosis y que es originada por el hongo *Phytophthora parasitica*, el cual causa la muerte de los árboles, ocasionando perdidas en rendimiento hasta del 30% al año (Colburn y Graham, 2007; Gusmao-Araújo *et al.*, 2008), además suelen producir bajos rendimientos con calidad de fruta baja.

La propagación vegetativa es una forma de generar nuevas plantas a partir de segmentos de tejido de un árbol seleccionado, el cual originará árboles uniformes precoces en rendimiento y calidad de fruta, buscando un árbol que funcione como portainjerto y que dentro de sus características sea capaz de tolerar la Gomosis así como algunos otros factores adversos como el suelo (Medina *et al.*, 2001). Dentro de los principales portainjertos para limón mexicano destacan: Volkameriana (*Citrus volkameriana*, Pasq.), Macrofila (*Citrus*

*macrophylla*, Wester), Naranja Agrio (*Citrus aurantifolia*, L.), Amblycarpa (*Citrus amblycarpa*, Ochse), Cleopatra (*Citrus reshni*, Hort ex. Tan.), Citrange Troyer y Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *P. trifoliata*), entre otros. En México, la producción de limón se basa fundamentalmente en una variedad comercial conocida como Mexicano con espinas (MCE) o criollo, aunque en la actualidad existe otra variedad clonal denominada Mexicano sin espinas (MSE), la cual se originó de la primera por medio de una mutación natural (Becerra-Rodríguez *et al.*, 1979; Pérez-García y Meave, 2005), sin embargo, su rendimiento es menor al MCE. La superficie destinada al cultivo de este cítrico es de aproximadamente 150,000 hectáreas, con un rendimiento que oscila de 7 a 12 toneladas por hectárea, aunque en zonas tecnificadas alcanza las 30 toneladas.

### **1.1.2.2. Comercialización**

El limón mexicano tiene características especiales en aroma, color y alto contenido de jugo ácido haciéndolo particularmente atractivo para los mercados nacional e internacional. Este cítrico se comercializa principalmente para el mercado nacional y aunque se han realizado diversos intentos para su exportación, esta ha sido aun limitada por problemas de calidad en la fruta. Las exportaciones anuales se estiman en 380,000 toneladas y los principales países importadores son Estados Unidos y Canadá, aunque actualmente se encuentran abiertos los mercados de Japón y la Comunidad Europea (SAGARPA, 2007). Sin embargo, estos países son cada vez más exigentes en los estándares de calidad de la fruta, en gran medida por la demanda de parte del consumidor por adquirir productos alimenticios que no estén tratados con sustancias químicas que puedan dañar su salud o bien alterar algunas propiedades organolépticas de los frutos y por la conciencia de que la aplicación de estos productos sintéticos repercuten de manera negativa en el medio ambiente. Debido a lo anterior, han implantado importantes normas de calidad y sanitarias que prohíben el uso de plaguicidas y fungicidas para la conservación y almacenamiento de los frutos, inclusive han limitado el recubrimiento de los cítricos con ceras por afectar su aroma (FAO, 2007). Por lo tanto, la entrada del producto a estos mercados internacionales, está condicionada a que la fruta no lleve estos elementos químicos usados para su conservación, aunque sin ellos, es casi imposible que la fruta llegue a su destino en buen estado para su consumo en el mercado internacional actual y futuro.

### 1.1.2.3. Manejo poscosecha

Desde el punto de vista fisiológico, el limón mexicano presenta un comportamiento no climatérico en poscosecha, por lo que la calidad organoléptica y nutricional sólo se alcanza durante su desarrollo en el árbol. Una vez cosechado, experimenta un metabolismo relacionado con el fenómeno de senescencia, caracterizado por la pérdida en el contenido de clorofila (responsable del color verde), elevada transpiración que conduce al marchitamiento y endurecimiento de la piel, reacciones de fermentación (producción de etanol), pérdidas del valor nutricional (principalmente vitamina C) y aumento en su sensibilidad al ataque de microorganismos causantes de pudriciones (Saucedo, 2006).

Entre las técnicas poscosecha que se han venido aplicando para mantener la calidad y extender la vida de los frutos destaca el uso de recubrimientos a base de ceras, fungicidas y el empleo de temperaturas de refrigeración. Los tratamientos con ceras están formulados para lograr una máxima reducción de la pérdida de humedad a través de la cáscara, al mismo tiempo que permite el intercambio de oxígeno por dióxido de carbono. Mediante la aplicación de las ceras, se puede evitar la pérdida de peso de un 30 a un 40% del fruto, sin embargo, se han realizando aplicaciones con emulsiones cuya composición y contenido de sólidos no cumple con los objetivos requeridos para su aplicación (reducción de pérdidas de agua, prolongación de la vida de anaquel del producto y mejorar la presentación del mismo) (Materano *et al.*, 2007; Pérez-Gago *et al.*, 2008). En lo que se refiere al uso de la refrigeración, resulta factible su aplicación en combinación con el manejo de temperaturas y atmósferas controladas o modificadas ya sea con el objetivo de conseguir mayor tiempo de almacenamiento y/o transporte y reducción de daños por frío (Del-Valle *et al.*, 2009).

En el caso de los fungicidas, estos son empleados para el combate principalmente de hongos causantes del moho azul (*Penicillium italicum* Wehmer) y moho verde (*P. digitatum* Sacc.) (Smilanick *et al.*, 2008), los cuales constituyen el mayor factor limitante en el almacenamiento a largo plazo de los cítricos, siendo responsables de pérdidas en la producción de fruta (Ochoa *et al.*, 2007). Los principales productos químicos para el control de estos hongos que se ocupan de manera tradicional en las empacadoras de México son el tiabendazol e imazalil (Medina *et al.*, 2001; Kanetis *et al.*, 2008a). El primero de ellos actúa

sobre la polimerización de los microtubulos de la beta-tubulina (la cual es una proteína globular responsable de uno de los principales componentes del citoesqueleto, los microtubulos del hongo). El segundo actúa sobre la bio-síntesis de esteroides, interfiriendo dentro de la membrana celular la inhibición del paso de la demetilación del C-14, ocasionándoles la muerte (Schmidt *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006).

La forma de aplicación de ambos fungicidas es mediante un rociador con una solución acuosa o mezclándolo con alguna cera, la cual impedirá la pérdida de agua de la fruta y mejorará su apariencia. La aplicación de fungicidas en esta etapa del cultivo es de importancia, ya que con ello se consigue que la fruta llegue en buenas condiciones a los mercados. La selección del fungicida y la dosis de cada producto dependerán de las regulaciones nacionales, las cuales difieren de un país a otro (Johnson, 2001). Sin embargo, el uso de estos productos químicos ha empezado a llamar la atención debido a la aparición de hongos resistentes a dichos productos (Zheng *et al.*, 2004; Kanetis *et al.*, 2008b), tornándose cada vez más difícil su control y además por sus posibles efectos nocivos hacia el medio ambiente y la salud de los consumidores, los cuales revisten un rol importante al demandar productos libres de productos químicos (Fan *et al.*, 2000), así, en consecuencia, es necesario reducir al mínimo el uso de agroquímicos, especialmente después de la cosecha (Sugar y Spotts, 1999; Karabulut y Baykal, 2003).

Otras de las técnicas utilizadas para la conservación de los cítricos son:

- a) Radiación UV, la cual afecta a los patógenos poscosecha e induce un sistema de resistencia en los frutos (Xiang *et al.*, 2008),
- b) La temperatura (T) y humedad relativa (HR) son otras variables que se utilizan para controlar los patógenos. Normalmente para cítricos se utilizan entre 5 y 15° C de T y 90 a 96% de HR para controlar de manera efectiva algunos mohos (Smilanick *et al.*, 2003) y,
- c) El uso de otros desinfectantes como el cloro, es utilizado para el lavado de la fruta, sin embargo, el uso de dichas sustancias químicas cada vez es menor, debido a su peligrosidad, ya que han estado vinculadas a sustancias cancerígenas (Brumos *et al.*, 2009).



#### 1.1.2.4. Perdidas poscosecha

Los cítricos, por sus características de producción sobre árboles con espinas y cáscara delgada, enfrentan diversos y serios problemas que afectan significativamente su calidad y vida anaquel. Al no contar con mano especializada para su colecta, es muy común que la fruta sufra daños cuando es cosechada, transportada a las empacadoras o bien en su trayecto hacia su venta a los mercados. Este daño generalmente se da en pequeñas heridas sobre el flavedo (cáscara) de la fruta, la cual generalmente se empieza a pudrir por consecuencia de la infección iniciada principalmente por hongos y bacterias patógenas (Prusky y Lichter, 2008).

La susceptibilidad del fruto a las enfermedades tiende a incrementarse a medida que el producto madura. El deterioro provocado principalmente por hongos es considerable y pone en riesgo la comercialización de las frutas. Se estima que a pesar de ser tratada la fruta para su conservación con fungicidas y ceras, solo el 70% de las frutas pueden ser comercializables al final de este período, es decir durante su transporte se pierde cerca del 30% de la producción (Ismail y Zhang, 2004). El empacado de los frutos utilizando condiciones de temperatura moderada (13° C) y alta humedad (>90%) incrementa los riesgos del deterioro total del fruto, al ser un ambiente propicio para el desarrollo de este tipo de hongos causantes de moho (Smilanick y Mansour, 2007). En los Estados Unidos, las pérdidas por descomposición se estiman entre un 25 y 30% y para México son cercanas al 40% de la producción (Ochoa *et al.*, 2007).

#### 1.1.2.5. Principales hongos patógenos poscosecha de cítricos

Dentro de las 17 especies de hongos descritas en el ámbito mundial (Tabla 1), diez son considerados patógenos muy importantes en áreas citrícolas, pero de esas especies, únicamente *Alternaria citri*, *A. limicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum* y *Phoma exigua* han sido detectadas en México, causando enfermedades al limón mexicano y a otros cítricos (Álvarez, 1981; Besoain *et al.*, 1994; Brown y Miller, 1999; Timmer *et al.*, 2000).

**Tabla 1.** Hongos patógenos de poscosecha identificados en limón mexicano.

| Patógeno   | Enfermedad           | Importancia mundial | Limón mexicano |
|--|----------------------|---------------------|----------------|
| <i>Alternaria citri</i> , <i>A. limicola</i>                           | Pudrición            | +++                 | +              |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>                                  | Antracnosis          | +++                 | +              |
| Especies de <i>Aspergillus</i>   | Pudrición            | +                   | –              |
| Especies de <i>Phytophthora</i>  | Pudrición café       | +++                 | –              |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>  | Pudrición algodonosa | +                   | –              |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i>   | Pudrición            | +                   | –              |
| Especies de <i>Fusarium</i>  | Pudrición            | +                   | –              |
| <i>Botrytis cinerea</i>  | Moho gris            | +++                 | –              |
| <i>Penicillium italicum</i>  | Moho azul            | +++                 | –              |
| <i>Penicillium digitatum</i>   | Moho verde           | +++                 | +              |
| <i>Penicillium ulaiense</i>  | Moho veloso          | +                   | –              |
| <i>Pleospora herbarum</i>  | Pudrición            | +                   | –              |
| <i>Galactomyces citri-aurantii</i>                                     | Pudrición agria      | +++                 | –              |
| <i>Lasiodiplodia theobromae</i><br>( <i>sin. Diplodia natalensis</i> ) | Pudrición            | +++                 | –              |
| <i>Phomopsis citri</i>   | Pudrición            | +++                 | –              |
| <i>Trichoderma viride</i>  | Pudrición            | +++                 | –              |
| <i>Phoma exigua</i> Desm.  | Cancrosis            |                     | +              |

– Ausente, + Poco importante, +++ Muy importante

A nivel mundial es escasa la investigación que se realiza en este cultivo sobre enfermedades poscosecha. Después de México, la India y Perú son los más importantes productores de limón mexicano, sin embargo, en los últimos quince años son muy reducidas las aportaciones de investigación originadas en la India, en tanto que Perú no se realiza investigación sobre este tema, por lo anterior se hace necesario diseñar estrategias de investigación para generar información de trascendental importancia para el país y con la cual México pueda seguir siendo considerado como líder en investigación de este cultivo (Medina *et al.*, 2001).

## **1.2. Control biológico de hongos en poscosecha de cítricos**

El auge de la biotecnología en la última década, ha hecho que el control biológico sea una de las alternativas más estudiadas para el control de enfermedades en poscosecha al utilizar microorganismos antagonistas a patógenos, siendo considerada una alternativa viable al uso de los productos químicos (Tian *et al.*, 2002). Estos agentes de control deben tener ciertas características como; estabilidad genética, eficacia a bajas concentraciones, control contra un amplio rango de patógenos, requerimientos nutricionales simples, sobrevivencia bajo condiciones ambientales adversas, resistencia a fungicidas, compatibilidad con otros tratamientos químicos y físicos, ausencia de patogenicidad y no producir metabolitos potencialmente tóxicos a humanos (Zhang *et al.*, 2007).

Durante los últimos años, varios agentes de control biológico han sido ampliamente investigados y aplicados contra diferentes hongos patógenos poscosecha, destacando por su capacidad antagonista las bacterias, levaduras y hongos (Fan y Tian, 2001; Droby *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de sus efectos supresores, no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos debido a que se puede presentar más de uno a la vez (Fernández-Larrea, 2001). El uso de bacterias con capacidad de producir antibióticos, ha ido disminuyendo debido a que estos organismos pueden llegar a generar patógenos resistentes a sus metabolitos antifúngicos (Hof, 2008), por su parte el uso de levaduras parece ir en aumento, aunque sus mecanismos antagónicos aun no han sido del todo elucidados (Mari y Guizzardi, 1998). Las levaduras presentan ventajas respecto a otros antagonistas debido a que: a) rápidamente colonizan y sobreviven por periodos largos en la superficie de las frutas y b) limitan el crecimiento de otros organismos a través de diversos modos de acción (Lahlali *et al.*, 2008).

### **1.2.1. Uso de levaduras como agentes de control biológico en cítricos**

Diferentes especies de levaduras han sido utilizadas con éxito como agentes de control biológico, destacando *Rhodotorula glutinis*, *Candida oleophila*, *C. sake*, *Kloeckera apiculata*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens*, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *Cryptococcus albidus*, entre otros. La eficiencia de la levadura *K. apiculata*, quedó evaluada

cuando protegió por 90 días bajo condiciones de almacenamiento a 5° C a frutos de naranja contra las pudriciones del moho azul y verde ocasionadas por *Penicillium digitatum* y *P. italicum* respectivamente (Long *et al.*, 2007), por su parte Karabulut y Baykal (2003), observaron que esta levadura reduce el 50% de las pudriciones ocasionadas por *P. expansum* sobre naranjas. También las levaduras *Metschnikowia pulcherrima* y *Pichia guilliermondii*, controlaron de manera eficiente a los mohos azul y verde en frutos de mandarina y toronja (Kinay y Yildiz, 2008).

Con la aplicación de la levadura *Pichia guilliermondii* sobre frutos de toronja Droby *et al.* (1997), encontraron una disminución del 50% en el índice de la severidad ocasionada por *Penicillium digitatum*. El-Ghaouth *et al.* (2000), reportaron una eficiencia en el control de *P. expansum* y *P. digitatum*, sobre naranjas y limones inoculados con la levadura *Candida saitoana*, la cual ejerció un eficiencia igual a la de los frutos tratados con el fungicida Imazalil. Taqarort *et al.* (2008), evaluaron el control biológico de *P. digitatum* en naranjas inoculadas con *Pichia anomala*, *Debaryomyces hansenii* y *Hanseniaspora guilliermondii*, las cuales disminuyeron la incidencia del moho verde entre un 65 a 80%. Droby *et al.* (2002), cuantificaron niveles importantes de enzimas hidrolíticas (quitinasas y  $\beta$ -1,3-endoglucanasa) en frutos de naranja en respuesta a la inducción de resistencia promovida por la levadura *Candida oleophila*, disminuyendo las pudriciones ocasionadas por *P. digitatum*. Zhang *et al.* (2005), cuantificaron una disminución del moho azul ocasionado por *P. italicum* sobre naranjas inoculadas con la levadura *Cryptococcus laurentii*.

En el caso particular de *C. oleophila*, existe un producto comercial elaborado a base de esta levadura denominado Aspire®, utilizado para el control de hongos en poscosecha de cítricos (Long *et al.*, 2005; Droby *et al.*, 2009), sin embargo, uno de los mayores problemas que tiene este producto biológico, es la inconsistencia en la protección de la fruta (Droby *et al.*, 1999). A pesar del desarrollo de varios productos comerciales, la búsqueda de microorganismos para el control biológico de patógenos poscosecha continúa (Glushakova *et al.*, 2007). El hallazgo de nuevos antagonistas, darán la oportunidad de desarrollar productos de control biológico, los cuales incentivarán la industria local y disminuirán la dependencia tecnológica con países desarrollados.

### 1.2.1.1. Mecanismos antagónicos de levaduras

Hasta la fecha aún no se tienen del todo elucidados cuáles son los mecanismos de acción de las diferentes especies de levaduras hacia los patógenos. Algunos autores mencionan que pueden estar involucrados más de dos en esta acción, siendo los más importantes la competencia por espacio (Leibinger *et al.*, 1997) y nutrientes (Droby y Chalutz, 1994), toxinas *killer* (Wang *et al.*, 2007), la producción de enzimas hidrolíticas (Friel *et al.*, 2007), el micoparasitismo y la inducción de resistencia en los frutos (Yu *et al.*, 2007).

#### 1.2.1.1.1. Competencia por espacio y nutrientes en el hospedero

Las levaduras antagónicas que ejercen este mecanismo de acción por competencia de espacio y nutrientes inhiben el crecimiento de los hongos, pero no los elimina. Las levaduras generalmente se encuentran mejor adaptadas a las condiciones ambientales y del hospedero que el patógeno, absorbiendo de los frutos los nutrientes necesarios para su crecimiento, el cual al ser más rápido que el del hongo, este se ve desplazado por la disponibilidad de las fuentes de carbono necesarias para la germinación de sus esporas, disminuyendo su crecimiento (Kanan, 2008) y por consecuencia el nivel de infección hacia los frutos, logrando de esta manera el control biológico.

La habilidad de la levadura *Pichia anomala* para inhibir el crecimiento del moho ocasionado por *Penicillium roqueforti* mediante la competencia por fuentes de carbono, quedó demostrada cuando esta ejerció una mayor inhibición de la germinación de las esporas del patógeno cuando al medio de cultivo se le adicionó glucosa, maltosa, entre otros carbohidratos (Druvefors, 2004). Generalmente las adiciones de componentes de carbono favorecen el crecimiento y la producción de biomasa del antagonista al tener este una tasa de crecimiento mayor que los patógenos (Bencheqroun *et al.*, 2007). Por competencia de nutrientes también hubo una inhibición del crecimiento en los patógenos *Alternaria alternata* y *Monilia fructicola*, disminuyendo el tamaño de su lesión hasta en un 77 y 93% respectivamente en frutas de jujube inoculadas con la levadura *Cryptococcus laurentii* (Zheng *et al.*, 2004). En frutos como manzana y pera se han encontrado reducciones similares cercanas al 80% en el diámetro de lesión ocasionada por *Penicillium expansum*

cuando las frutas fueron protegidas con *Candida sake* (Nunes *et al.*, 2001a), encontrando que la colonización de esta levadura en las heridas de las frutas, produjo polisacáridos extracelulares que le sirvió para su sobrevivencia pero que también cumplieron una la función de control biológico al restringir posibles sitios de infección para los hongos. Lima *et al.* (1999), mencionan que es de suma importancia el estudio en particular de cada levadura para conocer sus necesidades nutricionales y de adaptación al hospedero (sobrevivencia, modos de acción, colonización, entre otros), para poder determinar su capacidad como antagonista. El conocimiento de estas características son de suma importancia en el éxito del control de enfermedades poscosecha (El-Ghaouth, 1997).

#### **1.2.1.1.2. Toxinas *killer***

Las toxinas *killer* son producidas por levaduras de distintas especies, las cuales necesitan unirse a receptores específicos de la pared celular de sus células blanco para ejercer su acción biológica: muerte o detención del ciclo celular de la población sensible (Coelho *et al.*, 2009). Las toxinas están caracterizadas como compuestos extracelulares de naturaleza proteica, presentando una actividad contra un gran número de patógenos oportunistas para los humanos tanto de origen fúngico como bacteriano (Buzzini *et al.*, 2004). Otra posible aplicación del fenómeno *killer* puede ser en los procesos de fermentación del vino (Kapsopoulou *et al.*, 2008), donde la levadura productora de la toxina *killer* mata a células denominadas sensibles, las cuales pueden ser del mismo o diferente género, la levadura *killer* es inmune al contacto con esta proteína.

Estudios genéticos en *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que la capacidad de producir micotoxinas (o toxinas *killer*) es heredada citoplasmáticamente y está relacionada con la presencia de plásmidos de doble cadena lineal de ARN (dsRNA), encapsulados, formando partículas tipo virus (VLP) no infecciosas dentro del citoplasma de las células (Wickner *et al.*, 1996; Nally *et al.*, 2005). Existen diversas toxinas *killer* producidas por muchas especies de levaduras (Tabla 2), inclusive algunas de ellas llegan a producir hasta dos tipos de toxina con diferentes niveles de acción. De muchas micotoxinas se desconocen sus mecanismos, faltando por determinar la producción de esta proteína en muchas levaduras que hasta el momento no han sido estudiadas (Marquina *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Características de algunas toxinas *killer* producidas por levaduras de importancia biotecnológica (Marquina *et al.*, 2002).

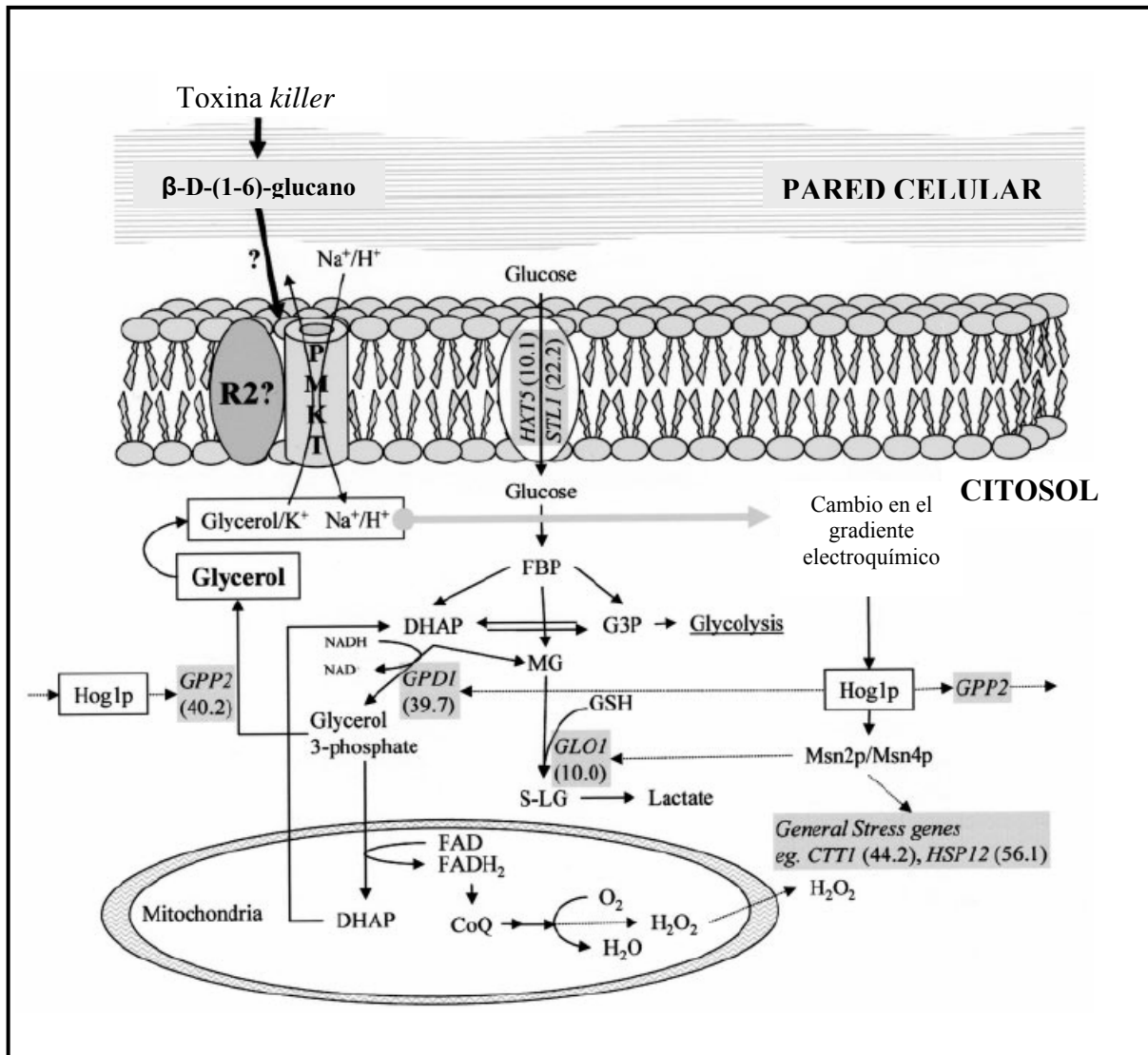
| Levadura                        | Toxina <i>killer</i> | Sub-unidad                        | Base genética          | Receptor primario      | Mecanismo de acción  | Aplicación                       |
|---------------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|--|----------------------------------|
| <i>Bullera sinensis</i>         | ?                    | ?                                 | Cromosoma              | ?                      | ?  | ?                                |
| <i>Candida krusei</i>           | ?                    | ?                                 | ?                      | ?                      | ?  | ?                                |
| <i>C. glabrata</i>              | ?                    | ?                                 | Cromosoma              | ?                      | Membrana plasmática  | ?                                |
| <i>Cryptococcus humicola</i>    | ?                    | < 1 kDa                           | Cromosoma              | ?                      | ?  | ?                                |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>    | ?                    | 23 kDa                            | Cromosoma              | $\beta$ -(1,6)-glucano | ?  | ?                                |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i>   | K6                   | 42 kDa                            | ?                      | ?                      | ?  | ?                                |
| <i>Pichia anomala</i>           | ?                    | 83 kDa                            | ?                      | ?                      | ?  | Control de hongos filamentosos   |
| <i>P. farinosa</i>              | SMKT                 | 6.3 kDa                           | Cromosoma              | ?                      | Incrementa la permeabilidad de los iones hacia la membrana | ?                                |
| <i>P. membranifaciens</i>       | ?                    | 18 kDa                            | Cromosoma              | $\beta$ -(1,6)-glucano | Canales iónicos  | ?                                |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | K1                   | $\alpha$ 9.5 kDa<br>$\beta$ 9 kDa | M <sub>1</sub> -dsRNA  | $\beta$ -(1,6)-glucano | Activación del canal de K <sup>+</sup>                     | Vino, cerveza, sake, entre otros |
| <i>S. cerevisiae</i>            | K2                   | $\alpha$ $\beta$ 21.5 kDa         | M <sub>2</sub> -dsRNA  | $\beta$ -(1,6)-glucano | Incrementa la permeabilidad de los iones hacia la membrana | Fermentación de vino             |
| <i>S. cerevisiae</i>            | KT28                 | $\alpha$ 10 kDa<br>$\beta$ 11 kDa | M <sub>28</sub> -dsRNA | Proteínas              | Inhibición del ciclo celular                               | ?                                |
| <i>Tilletiopsis albescens</i>   | ?                    | 10 kDa                            | Cromosoma              | ?                      | ?  | ?                                |
| <i>Williopsis mrakii</i>        | HM-1                 | 9.543 Da                          | Cromosoma              | ?                      | ?  | ?                                |
| <i>Zygosacch bailii</i>         | KT412                | 10 kDa                            | dsRNA                  | Proteínas              | ?  | ?                                |

Todas las toxinas *killer* son producidas bajo condiciones ácidas y su actividad se puede ver disminuida con el incremento del pH y temperatura del medio donde se encuentren (da Silva *et al.*, 2008), basta un aumento en estas variables, para que simplemente las levaduras dejen de producirlas (Druvefors, 2004). El efecto de levaduras productoras de toxinas *killer* sobre hongos patógenos en plantas ha sido evaluado en los últimos años, obteniendo efectos positivos en su control (Santos *et al.*, 2009). Por ejemplo, algunas especies de *Candida fennica*, *C. silvicultrix*, *Pichia anomala*, y *P. membranifaciens* jugaron un rol importante en la disminución de *Penicillium roqueforti* por la producción de estas micotoxinas (Druvefors y Schnürer, 2006). Por su parte Santos y Marquina (2004), observaron que la toxina CYC-1106 de la levadura *P. membranifaciens* ejerció un efecto en la disminución del moho verde causado por *Botrytis cinerea* en plantas de uva. El efecto de estas toxinas *killer* esta sobre la pared celular del hongo (Santos *et al.*, 2002), identificándose a (1-6)- $\beta$ -D-glucano, como el principal receptor de la toxina (Conti *et al.*, 2008), la cual se fija sobre estos receptores glucídicos de la pared celular interfiriendo en el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, lo que implica la muerte celular (Fig. 1) (Rodríguez *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2005).

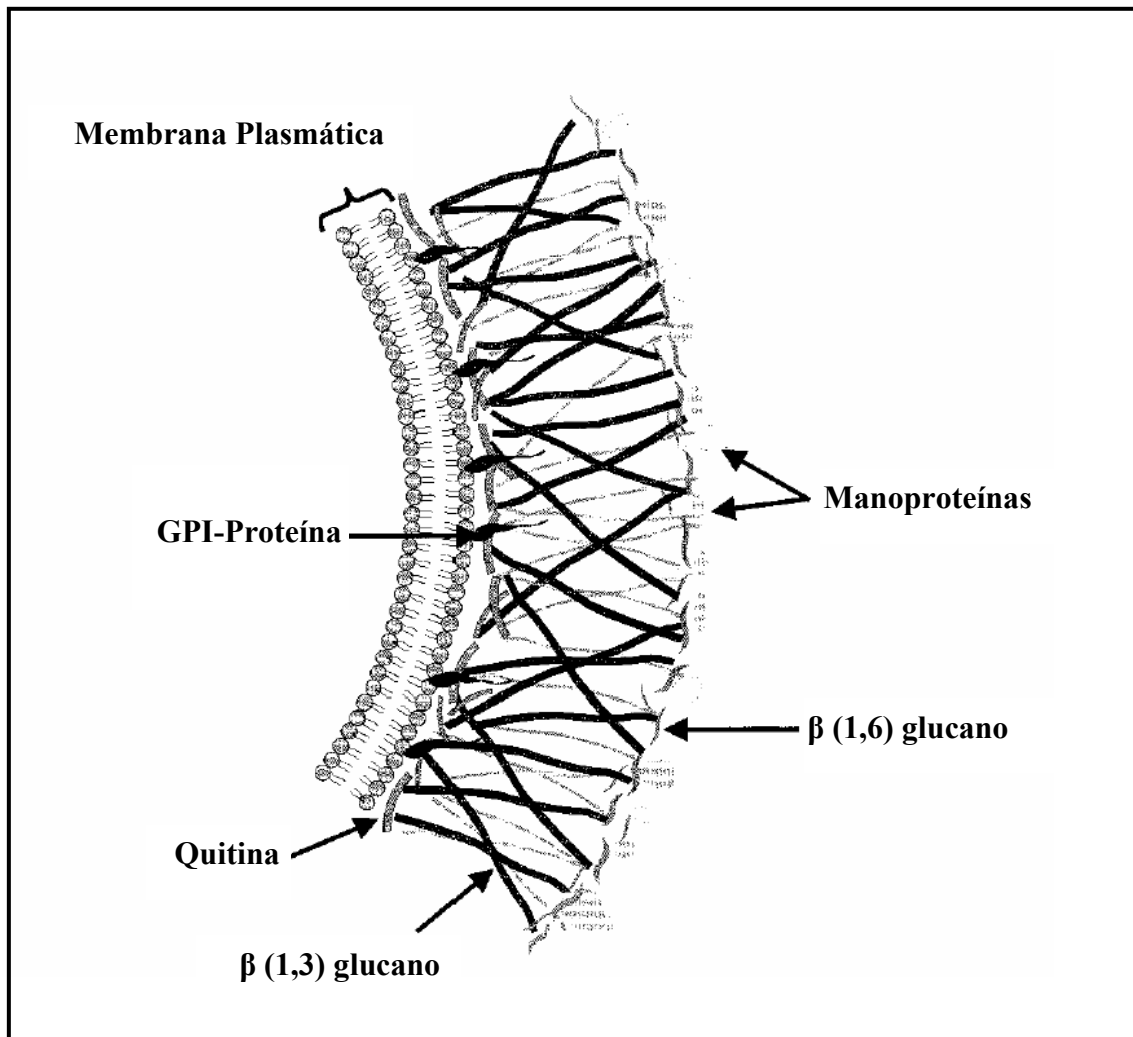
#### **1.2.1.1.3. Producción de enzimas que degradan pared celular en hongos**

Las levaduras producen enzimas como las proteasas, quitinasas y glucanasas, las cuales actúan sobre diferentes sitios de la pared celular de los hongos, específicamente rompen los enlaces de las manoproteínas, quitina y el glucano (Fig. 2), ocasionándoles lisis celular y muerte, al romper el esqueleto rígido formado por estos compuestos (Selitrennikoff, 2001; Santos *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la interacción entre levaduras y hongos, trae como resultado una desintegración y colapso de las hifas del patógeno, debido al micoparasitismo ejercido por las levaduras (Carsolio *et al.*, 1999). Las  $\beta$ -glucanasas son enzimas que se encargan de hidrolizar específicamente el enlace  $\beta$ -glucosídico de los  $\beta$ -glucanos, en función del punto de ruptura en la cadena de glucano, existen dos tipos de glucanasas; las que hidrolizan aleatoriamente enlaces intracadena dando lugar a oligosacáridos (endoglucanasas) y las que liberan moléculas de glucosa hidrolizando enlaces del extremo no reductor de la cadena (exoglucanasa), hay levaduras que pueden producir ambos tipos de enzimas (Nuero, 1995).





**Figura 1.** Propuesta del mecanismo de acción de las toxinas *killer* hacia la pared celular de los hongos, ejemplo de una toxina producida por *Saccharomyces*. El proceso empieza cuando la toxina se pega a su receptor primario (β-D-(1-6)-glucano) de la pared del hongo, interactuando directamente con la membrana plasmática causando la ruptura de la homeostasis celular, debido a la inducción del paso de los iones fisiológicos (H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>) y de pequeños metabolitos (como el glicerol) hacia la membrana plasmática. Estos eventos son detectados por células sensibles que de manera indefinida activan la respuesta transcripcional de la fosforilación de Hog1p. Genes de estrés (como el CTT1, HSP12, entre otros) y genes como el GPD1 y GPP2 que inducen la síntesis de glicerol son activados para contrarrestar los efectos de la toxina, en este sentido, las células sensibles pierden glicerol y iones intracelulares, lo que les ocasiona muerte celular (Santos *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Principales componentes de la pared celular de los hongos.

Se han sugerido diferentes mecanismos de síntesis y secreción de estas enzimas, pero el más importante supone una síntesis regulada por la represión en glucosa cuando no se encuentra en suficientes cantidades en el medio, Santos *et al.* (1978a y b), encontraron que la producción de esta enzima una vez que la glucosa fue consumida, esta vinculada a una síntesis activa de proteínas, sin embargo estos mismos autores encontraron, que la adición de glucosa nuevamente al medio no interfiere en el aumento de la producción de esta enzima en un tiempo determinado, debido a que el mRNA, responsable de la síntesis de esta enzima, acumulado en las células, no se ve afectado ni por la concentración de glucosa ni por inhibidores de su síntesis.

Para el caso de la producción de quitinasas por parte de levaduras, estas hidrolizan las uniones  $\beta$ -1,4 de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamida de quitina, la cual es uno de sus principales componentes celulares de los hongos (Fleuri y Harumi-Sato, 2005), rompiéndola en oligómeros y monómeros de N-acetil- $\beta$ -D-glicosa, ocasionándoles muerte celular (Sastoque *et al.*, 2007). Dentro de las quitinasas sean identificado cinco tipos distintos (Collinge *et al.*, 1993), siendo las más comunes: las tipo I, que tienen un peso molecular de alrededor de 30 kDa y tienen en su secuencia un dominio heveína N-terminal y las del tipo II, que tienen un peso molecular inferior de 25 kDa y no poseen sin embargo el dominio heveína N-terminal. Finalmente las proteasas, hidrolizan a las proteínas, específicamente las manoproteínas que componen la pared celular de los hongos (Fleuri *et al.*, 2008).

El-Ghaouth *et al.* (2003), encontraron que la levadura productora de enzimas *Candida saitoana* tuvo un efecto lítico sobre las hifas de *Botrytis cinerea* restringiendo su proliferación sobre el hospedero. Wisniewski *et al.* (1991), observaron el mismo mecanismo de acción sobre este patógeno con la levadura *Pichia guilliermondii*. Por su parte Ippolito *et al.* (2000), encontraron que *Aureobasidium pullulans* era capaz de producir quitinasas y  $\beta$ -1,3 glucanasas, las cuales controlaron ha *B. cinerea* y *Penicillium expansum* en frutos de manzana. De la misma manera Jijakli y Lepoivre (1998), reportan un disminución *in vitro* de *B. cinerea* por efecto de la exo- $\beta$ -1,3 glucanasa producida por *Pichia anomala*. Bar-Shimon *et al.* (2004), reportan un control eficiente de *P. digitatum* en toronjas mediante la producción de exo- $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas y proteasas en las heridas de las frutas.

#### **1.2.1.1.4. Inducción de resistencia**

La inducción de resistencia ocurre de manera natural como resultado de la infección de hongos patógenos hacia los frutos empezando por una reacción de hipersensibilidad (RH), en la cual, la planta o fruto necrosa su tejido invadido por el hongo patógeno para aislar la infección y que esta no pueda avanzar hacia las demás células sanas (Van-Loon *et al.*, 1998; Lakimova *et al.*, 2007). Esta muerte celular puede estar ligada a un aumento en la actividad respiratoria, una alteración en el flujo de iones de la membrana plasmática, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), un cambio en la fosforilación de las proteínas o la

activación de los sistemas de defensa de la planta. La RH puede ser activada por un gran número de agentes denominados inductores (como un producto químico, patógeno, un organismo no patógeno como levaduras, hongos y bacterias benéficas, luz ultravioleta, estrés biótico o abiótico), una vez que entran en contacto con cualquier parte de planta. Esta reacción puede ser sistémica, debido a esta característica, la inducción es definida como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Tian *et al.*, 2006; Amzalek y Cohen, 2007).

En respuesta a este inductor, la planta o fruto produce una señal que es enviada a cualquier parte de la planta, la cual aumentan la producción de sustancias como las proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas-RP, las cuales de acuerdo a su secuenciación, están clasificadas en 14 familias), fitoalexinas (las cuales se han caracterizado alrededor de 300, que incluyen a algunas cumarinas, flavonoides, diterpenos, benzofurano, entre otras) o enzimas (destacando a las proteasas, glucanasas y quitinasas que degradan a la pared celular del hongo) (Cardoso, 2003). Estas últimas han sido estudiadas en algunas levaduras que presentan ese mecanismo de inducción de resistencia en frutos para la disminución de pudriciones ocasionadas por hongos. Al respecto De-Capdeville *et al.* (2002), mencionan que la aplicación de la levadura *Candida oleophila* junto con quitosano, aumento el contenido de quitinasa,  $\beta$ -glucanasas, ácido salicílico y algunas fitoalexinas, involucradas en la disminución de las pudriciones ocasionadas por *Penicillium expansum* en manzanas. El-Ghaouth *et al.* (2003), encontraron una concentración elevada de quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasas en frutos inoculados con *Candida saitoana*, presentando un nivel bajo de pudriciones ocasionadas por *Botrytis cinerea*. Por su parte Droby *et al.* (2002), observaron que la aplicación de *C. oleophila* sobre frutos de toronja aumentaron la acumulación de fitoalexinas, quitinasa y  $\beta$ -1,3-endoglucanasas, las cuales tuvieron un efecto directo en la disminución del moho verde ocasionado por *P. digitatum*.

#### **1.2.1.2. Levadura *Debaryomyces hansenii***

Esta levadura puede considerarse cosmopolita; se encuentra tanto en ambientes marinos como terrestres. Su principal ventaja frente a otras levaduras, es su alta halotolerancia (Prista y Loureiro-Dias, 2007), permitiéndole sobrevivir y reproducirse en ambientes marinos, aún en sistemas de salinidad extrema (Clipson y Jennings, 1992). Es una levadura

que pertenece a los ascomicetos, presenta un estado asexual o imperfecto, que han dado lugar a que se llame con otro nombre, *Candida famata* (Breuer y Harms, 2006). Sus usos y aplicaciones incluyen la preparación de emulsiones alimenticias (Muys *et al.*, 1976), el procesamiento y transformación de compuestos orgánicos aromatizantes (Cardillo *et al.*, 1994) y de productos de interés farmacéutico como el xilitol (Sampaio *et al.*, 2007), etc. Sus aplicaciones como agente de control biológico han sido descritas por varios autores (Leroy y Guerinéau, 1992), los cuales mencionan su actividad anti-microbiana sobre organismos como *Mucor circinelloides* o *Mucor plumbeus*, *Eurotium echinulatum*, *E. herbaborium*, *E. amstelodami*, o *E. chevalieri*, así como contra *Aspergillus niger*, *Chladosporium herbarum*, *Fusarium, culmorum*, *Glicocladium roseum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. corylophilum*, *P. cyclopium*, *P. decumbens*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. janthinellum*, *Phoma glomerata*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma koningii*, *Trichotecium roseum* y *Wallemia sebi*.

A pesar de que esta levadura no produce antibióticos, es capaz de inhibir el crecimiento de los patógenos. Wilson y Chalutz (1989), reportan uno de los primeros trabajos con *D. hansenii* en frutos de cítricos, encontrando que esta levadura junto con otros microorganismos, fueron los más efectivos de 100 antagonistas probados hacia el control de *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, más tarde estos mismo autores, corroboraron estos resultados con los mismo patógenos sobre frutos de toronja Chalutz y Wilson (1990) y Droby *et al.* (1999), con el mismo cítrico y *P. digitatum*, sin describir aun sus mecanismos de acción.

Strano *et al.* (2003), encontraron que *D. hansenii* incremento el contenido de cumarinas (scoparone) en frutos de limón. Sin embargo aunque esta levadura fue la de mayor inducción de esta fitoalexina en los frutos, no existió una relación directa con su capacidad de inhibir al patógeno *P. digitatum*. Taqarort *et al.* (2008), encontraron una disminución entre 65 a 80% en la pudrición ocasionada por este hongo en frutos de naranja, debido quizás a su rápida dinámica de crecimiento, resultando ser un excelente colonizador de las heridas de naranja. Santos *et al.* (2004), reportan una inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea*, por levaduras *D. hansenii*, por efecto posiblemente de la producción de toxina *killer*, la cual solo fue observada en el medio YMA-MB usado solo para la producción de

esta proteína. Santos *et al.* (2002), mencionan que quizás esta actividad esté relacionada con una molécula proteica de 24kDa capaz de desestabilizar la membrana del organismo blanco a través del reconociendo de un receptor de la pared celular del tipo (1-6)- $\beta$ -D-glucano. Sin embargo, hasta el momento no están del todo claros cuales son y que función tienen sus mecanismos antagónicos y cual podría ser su efecto en el control de hongos patógenos poscosecha de frutas como el limón mexicano.

## Justificación

México ocupa el primer lugar en la producción de limón mexicano, sin embargo, existen problemas ligados al uso de fungicidas a nivel de poscosecha (los cuales tienen como objetivo controlar y reducir la acción de patógenos, particularmente a los hongos que originan daños por moho azul ocasionado por *Penicillium italicum*), ya que su aplicación sobre los frutos para consumo inmediato es un riesgo para la salud humana, además de presentar un impacto negativo al medio ambiente e influir sobre la generación de cepas patogénicas de hongos resistentes hacia estos productos químicos. México a través de sus Normas Fitosanitarias y de Buenas Prácticas Agrícolas para el manejo poscosecha de los cítricos, controla la aplicación y uso de estos fungicidas sintéticos, sin embargo, el uso de estos productos es limitado ya que son pocos los químicos que se pueden utilizar en esta etapa del cultivo. Cuando la fruta para consumo en fresco es destinada para el mercado nacional, existen pérdidas ocasionadas por este hongo de alrededor del 40% de la producción total, ya que el tratamiento de los frutos en la mayoría de los casos es nulo o son solo tratados con ceras y/o fungicidas químicos de baja eficiencia. El almacenamiento recomendado para la fruta además juega un papel importante ya que las condiciones a las cuales se someten (baja temperatura y alta humedad relativa) son ideales para el desarrollo de *P. italicum*, lo que puede llegar a incrementar el porcentaje de pérdidas en poscosecha. En el caso de la fruta para exportación, el manejo poscosecha está regulado por las normas de calidad impuestas por países como Japón y la Unión Europea, donde especifican que no podrán ser utilizados dentro de los tratamientos de las frutas los fungicidas sintéticos que presenten algún riesgo para la salud humana. Por lo que la búsqueda de métodos alternativos para el control poscosecha de fitopatógenos, está siendo una prioridad para muchos países productores de cítricos y otras frutas y verduras. En los últimos años el control biológico de enfermedades poscosecha ha contemplado el uso de diversos microorganismos antagónicos, destacando diversos tipos de levaduras como *Debaryomyces hansenii*, la cual tiene la capacidad de reducir los niveles de infección ocasionadas por los hongos, sin embargo, sus mecanismos de acción no han sido del todo descritos hasta el momento. El conocimiento de ellos será crucial para su selección como agente de control biológico, además que su eficiencia como antagonista, dará la oportunidad de desarrollar productos locales, los cuales incentivarán la industria y disminuirá la dependencia

tecnológica con países desarrollados. La aplicación de esta levadura sobre frutos de limón podrá reducir los niveles de pérdidas de fruta, lo que contribuiría económicamente sobre las regiones cítricas al incrementar las ganancias económicas. Su implementación en poscosecha podrá bajar los costos del cultivo al disminuir el uso de productos químicos en esta etapa, otra ventaja con su aplicación es la aceptación del consumidor por la adquisición de frutas no tratadas con algún químico. En el mercado internacional, este tratamiento podría disminuir las pérdidas en las exportaciones, además de abrir nuevos mercados al ser una fruta no tratada con fungicidas.



## 2. HIPÓTESIS

*Debaryomyces hansenii* presenta al menos un mecanismo antagonista hacia el hongo patógeno en poscosecha *Penicillium italicum* del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle), a través de la competencia por espacio y/o nutrientes, factor *killer* o producción de enzimas hidrolíticas.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Conocer los principales mecanismos antagónicos de la levadura *Debaryomyces hansenii* hacia el hongo patógeno *Penicillium italicum* para su control en poscosecha del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle).

### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1. Identificación a través de técnicas moleculares de *Penicillium italicum* aislado de limón mexicano.

3.1.2. Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de distintas levaduras de *Debaryomyces hansenii* hacia el hongo *Penicillium italicum* mediante la competencia por espacio y/o nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas y toxinas *killer*.

3.1.3. Cuantificación de la protección poscosecha de frutos de limón mexicano inoculados con levaduras *Debaryomyces hansenii* hacia la pudrición del moho azul ocasionada por *Penicillium italicum* bajo condiciones ambientales y de almacenamiento.

#### **4. CAPÍTULO: Identificación a través de técnicas moleculares de *Penicillium italicum* aislado de limón mexicano.**

##### **4.1. MATERIALES Y MÉTODOS**

###### **Procedencia de *Penicillium italicum***

El hongo *P. italicum* originalmente fue aislado de frutos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) provenientes de la empacadora AGROMEGA S.P.R. de R.L. establecida en la Ciudad de Tecomán, Colima, los cuales presentaron pudriciones con una abundante masa micelial y esporas de color azul. Sus características morfológicas *in vitro* lo llevaron a identificar hasta nivel de género (*Penicillium* sp.).

###### **Postulados de Koch**

Con la finalidad de corroborar que *P. italicum* es el agente causal del moho azul en limón mexicano, se realizaron los postulados de Koch, los cuales indican que para demostrar que un determinado organismo causa una enfermedad específica, es esencial que después de su aislamiento en cultivo puro, se re-inocule al mismo hospedero y sea capaz de iniciar la misma enfermedad por la que fue aislado, finalmente se tendrá que recuperar íntegro del hospedero enfermo.

###### **Patógeno**

*P. italicum* fue cultivado *in vitro* en medio Agar Papa-Dextrosa ( $39\text{g/L}^{-1}$ , PDA, Difco®) durante siete días a  $25^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las esporas fueron colectadas en una solución salina estéril (al 0.9% de  $\text{NaCl}_2$ ). La concentración se ajustó a  $10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  utilizando un hematocitómetro.

###### **Prueba de patogenicidad**

Frutos de limón mexicano (provenientes del Estado de Colima, México) fueron lavados con agua estéril y desinfectados con hipoclorito de sodio a una concentración del 1% durante 2 min, dejándolos secar por 1 h (Yao *et al.*, 2004). Posteriormente con un escarpelo estéril, se les realizaron cuatro heridas equidistantes de un tamaño de  $3\times 3\times 3$  mm, depositando dentro de estas 15  $\mu\text{L}$  de la suspensión de *P. italicum*, se utilizó un tratamiento con frutos

inoculados solo con agua destilada estéril. Cinco contenedores de plástico con seis frutos cada uno fueron almacenados a 12° C y 90% de humedad relativa (HR) en una cámara ambiental (Binder®). Después de diez días se observó la incidencia de la enfermedad causada por el moho azul, re-aislando el hongo en medio PDA. El experimento fue realizado dos veces.

### **Crecimiento del hongo y extracción de ADN**

Se cultivo *P. italicum* en caldo de papa dextrosa a 30° C durante siete días. La masa micelial fue cosechada por filtración y el DNA fue extraído usando el método de Raeder y Broda (1985).

### **Identificación molecular**

La región ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA, fue obtenida mediante los iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (Cano *et al.*, 2004), sintetizados por Sigma-Genosys (EUA). Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en un termociclador (System 9700 GeneAmp®) con un periodo de desnaturalización de 2 min a 95° C, seguido de 30 ciclos (los cuales comprendían una desnaturalización a 95° C durante 1 min, alineación por 30 s a 50° C y una extensión de 2 min a 72° C), con una extensión final de 10 min a 72° C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA®), se tiñeron con bromuro de etidio (0.2 µg/mL), se visualizaron en un transiluminador (BioDoc-IT imagen system, UVP®) y fueron secuenciados por la compañía MACROGEN (Seúl, Korea). La identificación molecular se realizó comparando la secuencia obtenida contra todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 4.2. RESULTADOS

### Patogenicidad de *Penicillium italicum* en frutos de limón mexicano

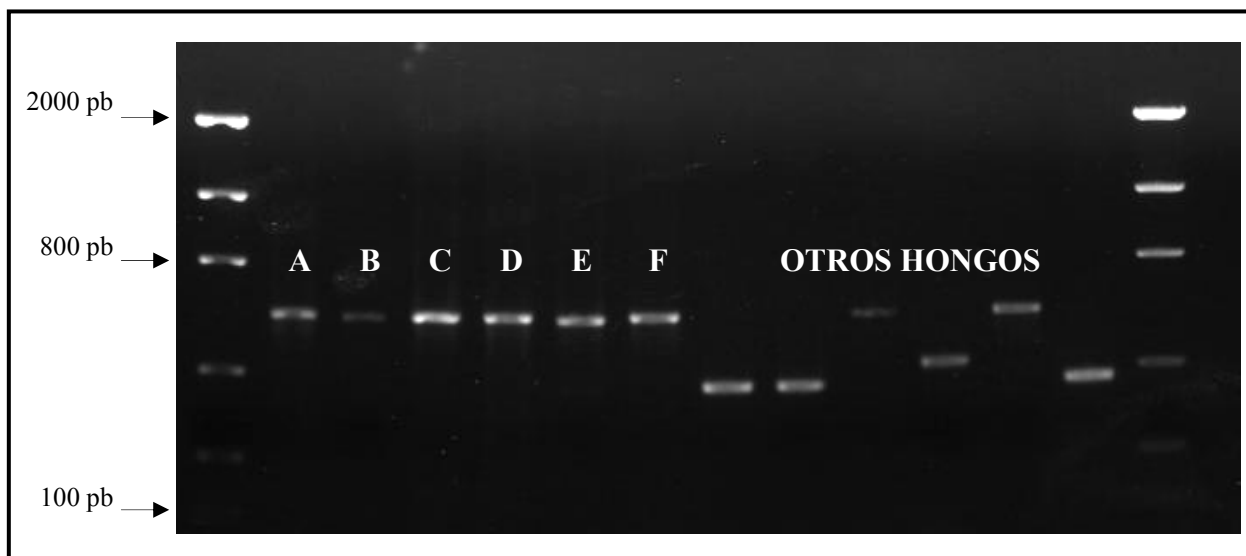
Se observaron después de diez días de almacenados los frutos de limón mexicano a 12° C y 90% HR, la presencia del moho azul ocasionado por *P. italicum* en el 100% de los frutos inoculados con el hongo, se re-aisló *in vitro* nuevamente al patógeno (Fig. 3), presentando las mismas características morfológicas y de microscopia, confirmando los postulados de Koch.



**Figura 3.** Prueba de patogenicidad en frutos de limón mexicano inoculados con *Penicillium italicum*. Donde: **A** y **B**= Frutos de limón con presencia de moho azul, **C**= Re-aislamiento de *Penicillium italicum* en medio PDA.

### Identificación molecular de *Penicillium italicum*

Se obtuvo un producto de PCR proveniente del ADN ribosomal (región ITS1-5.8s-ITS2) del hongo *P. italicum* de un tamaño de 544 pb (Fig. 4). El análisis comparativo de la secuencia obtenida con la base de datos del banco genómico del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information-NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de los Estados Unidos Americanos, permitió la identificación de la especie *Penicillium italicum* Wehmer al presentar una similitud del 98% con otras secuencia ya reportadas dentro de la base de datos del NCBI (Fig. 5), lo que corrobora a la identificación previa a nivel de género de este hongo realizada a través de técnicas tradicionales morfológicas y de microscopia.



**Figura 4.** Productos de PCR de la región intergénica ITS1-5.8s-ITS2 del ADN ribosomal de *Penicillium italicum*. Donde: **A, B, C, D, E** y **F**, son repeticiones de ADN provenientes de placas diferentes del mismo hongo.

```

1 tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta ccgagtgagg gccctctggg tccaacctcc
61 caccctgttt tatttaccac gttgcttcgg cgggcccggc ttaactggcc gccggggggc
121 tcacgcccc gggcccgcgc ccgccgaaga ccccccgaa ctctgcctga agattgtcgt
181 ctgagtgaat atataaatta tttaaaactt tcaacaacgg atctcttggg tccggcatcg
241 atgaagaacg cagcgaatg cgatacgtaa tgtgaattgc aaattcagtg aatcatcgag
301 tctttgaacg cacattgcgc cccctggtat tccggggggc atgcctgtcc gagcgtcatt
361 getgceetca agcccggctt gtgtggttgg ccccgctctc cgattccggg ggacggggcc
421 gaaaggcagc ggcggcaccg cgtccgggtc tcgagcgtat ggggctttgt caccgcgtct
481 gtagggcccg ccggcgcttg ccgatcaacc caaattttta tccaggtgac ctccgatcag
541 gtag

```

**Figura 5.** Secuencia genómica del segmento ITS1-5.8s-ITS2 de *Penicillium italicum* aislado de frutos enfermos de limón mexicano (Banco de datos del NCBI, acceso No. DQ991463).

### 4.3. DISCUSIÓN

El aislamiento e identificación del hongo *Penicillium italicum* causante del moho azul en poscosecha de cítricos, ya ha sido reportado en otros frutos como; naranjas (Porat *et al.*, 2000; Valencia-Chamorro *et al.*, 2008), toronjas (Palou *et al.*, 2002), mandarinas (Palou *et al.*, 2001), limón (Montesinos-Herrero *et al.*, 2009), entre otros. En México, *P. italicum* Wehmer (agente causal del moho azul) es el responsable de pérdidas poscosecha de hasta un 40% de la producción total de cítricos (Ochoa *et al.*, 2007). Este hongo oportunista, comienza su infección con la penetración de las hifas de sus esporas en las heridas de los frutos en el árbol, durante la cosecha o el transporte (Spotts *et al.*, 1998). Los síntomas aparecen como cambios en la coloración del fruto (Snowdon, 1990), debido al desarrollo del micelio sobre la superficie, seguida por la aparición de una masa de esporas de color azul como manifestación clara de una infección. *P. italicum* presenta un ciclo de vida corto de entre 3 y 5 días, llegando a producir entre 1 y 2 billones de esporas que pueden ser dispersadas por vía aérea, llegando a infectar a otros frutos (Holmes y Eckert, 1999 y 1995), siendo capaz de crecer y desarrollarse en una gran variedad de sustratos y bajo diversas condiciones de pH y temperatura (Digrak y Özcelik, 2001; Dao *et al.*, 2008). Su manejo agronómico en el ciclo del cultivo de los cítricos, es de importancia debido a que siempre se presentan biotipos resistentes a los funguicidas sintéticos comúnmente utilizados para su control como lo son el imazalil y tiabendazol (Harding, 1972; Eckert *et al.*, 1994; Kanetis *et al.*, 2008c). La identificación de *P. italicum* reviste importancia debido a que hasta el momento no se tenían reportes de este hongo patógeno causante del moho azul en frutos de limón mexicano (Álvarez, 1981; Besoain *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 2000) en México y a nivel mundial (Hernández-Montiel y Ochoa, 2007).

**5. CAPÍTULO: Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de distintas levaduras de *Debaryomyces hansenii* hacia el hongo *Penicillium italicum* mediante la competencia de espacio y/o nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas y toxinas *killer*.**

**5.1. MATERIALES Y MÉTODOS**

**Procedencia de levaduras *Debaryomyces hansenii***

Los distintos aislamientos que se evaluaron de *Debaryomyces hansenii* provinieron de la colección de levaduras aisladas de ambientes marinos y epífitas de frutos de limón mexicano (Tabla 3), pertenecientes al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Las levaduras fueron mantenidas en medio de cultivo YPD (Conteniendo: extracto de levadura 10g, dextrosa 20g, peptona 20g y agar 20g, disueltos en 1 L de agua destilada).

**Tabla 3.** Colección de levaduras aisladas del Golfo de California y de frutos de limón mexicano.

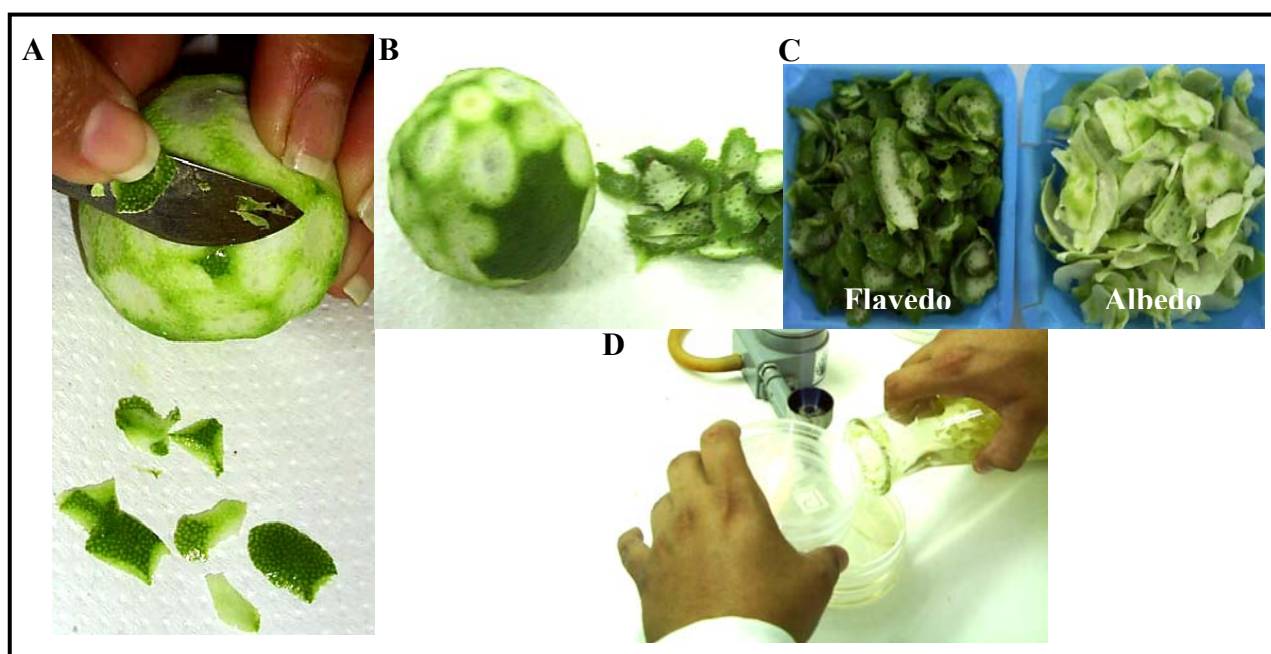
| Levadura  | Clave     | Origen  | Estación de muestreo | Profundidad de colecta |
|---|-----------|---------|----------------------|------------------------|
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> | DhhBCS001 | Marino  | 125.40               | 0 m                    |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> | DhhBCS002 | Marino  | 125.40               | 100 m                  |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> | DhhBCS003 | Marino  | 125.40               | 100 m                  |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> | DhhBCS004 | Marino  | 130.30               | 0 m                    |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> | DhhBCS005 | Marino  | 138.50               | 0 m                    |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> | DhhBCS006 | Marino  | 127.45               | 50 m                   |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> | DhhBCS007 | Marino  | 135.30               | 50 m                   |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabriyi</i>  | DhfBCS001 | Marino  | 131.50               | 100 m                  |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabriyi</i>  | DhfBCS002 | Marino  | Bahía de la Paz      | 0 m                    |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>                      | LL1       | Nativo* | -                    | -                      |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>                      | LL2       | Nativo  | -                    | -                      |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>                      | LL3       | Nativo  | -                    | -                      |

\*Aislamientos obtenidos de frutos de limón mexicano

## Competencia de carbono entre levaduras antagónicas y *Penicillium italicum*

### Cultivo *in vitro* de levaduras *D. hansenii* en medio de limón mexicano

Se realizó un screening, utilizando un medio elaborado con 28g de cáscara de flavedo (exocarpio) o albedo (endocarpio) de limón (Fig. 6) y 8g de agar disueltos en 400 mL de agua destilada, esterilizando los medios a 121° C por 15 min, incorporando posteriormente solo la fase líquida a cajas de petri estériles (Eayre *et al.*, 2003; Cardoso, 2003). Se utilizaron los medios de cultivo YPD y Agar Naranja (42g/L<sup>-1</sup>, Fluka®) como referencia. Las levaduras se mantuvieron en solución fisiológica de Sorensen (Walt *et al.*, 1983; Barnett *et al.*, 1990), ajustando con ayuda de un hematocitómetro su concentración a 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>, se sembraron por estría cruzada y se utilizaron tres repeticiones por cada levadura. Las placas fueron incubadas a 25° C, evaluando el crecimiento de las levaduras a las 24 y 48 h. Se determinó crecimiento: positivo (+ bajo, ++ moderado y +++ alto) y negativo (-) (Vanderzant *et al.*, 1992). Se utilizó como levadura control a *Saccharomyces cerevisiae*. El experimento fue repetido dos veces.



**Figura 6.** Elaboración del medio de cultivo a base de flavedo o albedo de limón mexicano. **A, B** y **C**= Separación del tejido del limón, **D**= Llenado de cajas petri con el medio previamente esterilizado a 121° C por 15 min.



### **Antagonismo *in vitro* de *Debaryomyces hansenii* sobre *Penicillium italicum***

Se emplearon los medios de cultivo sólidos de flavedo y albedo de limón mexicano y se utilizó PDA como medio de referencia. Cada levadura fue sembrada en toda una caja petri a una concentración de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , incubándola por 24 h a  $25^\circ\text{C}$ , posteriormente se colocó en el centro un taquete de 0.5 cm de diámetro proveniente de un cultivo en PDA *in vitro* de *P. italicum* de siete días. El diámetro del crecimiento del hongo fue cuantificado a los siete días de incubados ambos organismos (Özkoc y Deliveli, 2001; Jaiswal *et al.*, 2003). Se utilizó una levadura de *S. cerevisiae* como control. Se realizaron tres repeticiones por cada una levadura y el experimento fue repetido dos veces.

### **Dinámica poblacional de levaduras**

Se inoculó cada levadura a una concentración de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  en 100 mL del medio líquido de flavedo o albedo de limón mexicano, incubándolos a  $25^\circ\text{C}$  a 100 rpm. Se tomaron alícuotas de ambos medios cada 4 h por dos días, tomando lectura a una absorbancia de 580 nm en un espectrofotómetro (DU-640 UV-Vis Beckman Coulter). Un incremento de 0.1 en la absorbancia bajo estas condiciones equivale a  $3 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Se utilizó el medio de cultivo Caldo de Papa-Dextrosa (CPD) como control. Se usaron tres repeticiones por cada levadura y el experimento fue realizado dos veces.

### **Competencia por nutrientes *in vitro***

Se utilizaron los medios elaborados a base de flavedo y albedo de limón mexicano (sin agar), inoculándolos solo con las levaduras que tuvieron la mayor capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Penicillium italicum* (experimento anterior). Se inoculó en matraz Erlenmeyer estéril (conteniendo 50 mL de cada medio), 100  $\mu\text{L}$  de levadura a una concentración de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  y/o 100  $\mu\text{L}$  del hongo a una concentración de  $10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  (He *et al.*, 2003; Fan y Tian, 2001). Se colocaron en agitación oscilatoria a 100 rpm durante 48 h a  $25^\circ\text{C}$ , tomando una alícuota cada 12 h para cuantificar a través de técnicas espectrofotométricas la concentración de sacarosa (Bruner, 1964), fructosa (Taylor, 1995) y glucosa (Barham y Trinder, 1972). Por cada tratamiento se realizaron tres repeticiones y el ensayo fue llevado a cabo dos veces.

### **Inhibición de la germinación de esporas de *Penicillium italicum***

El efecto de las levaduras sobre la germinación de esporas del hongo fue cuantificado en los medios líquidos de flavedo y albedo limón anteriormente descritos. De cada medio inoculado con ambos organismos se tomaron alícuotas para cuantificar en 200 esporas de *P. italicum* el grado de germinación. Se consideró una espora germinada cuando el tubo germinal fue igual de largo que el diámetro de la espora (Yao *et al.*, 2004). Por cada tratamiento se realizaron tres repeticiones y el experimento fue realizado dos veces.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron procesados en un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se utilizó el paquete estadístico STADISTICA (Versión 6.0, StatSoft, Tulsa, OK). Para la separación de medias se utilizó la prueba de Fisher de la diferencia mínima significativa (LSD) con un nivel de significancia al 5% ( $P < 0.05$ ).

### **Evaluación de la producción de enzimas por *Debaryomyces hansenii***

#### **Prueba API-ZYM**

Las levaduras fueron cultivadas en matraz Erlenmeyer con 25 mL del medio de cultivo NYDB (Nutrient Yeast Dextrose Broth, Difco®) en agitación oscilatoria a 100 rpm a 26° C durante 48 h. Posteriormente las células fueron cosechadas, resuspendiéndolas en una solución salina al 0.9% de NaCl<sub>2</sub>. Se ajustó el inoculó a una absorbancia de 0.1 a 580 nm en un espectrofotómetro (DU-640 UV-Vis Beckman Coulter), depositando 65 µL de cada levadura en cada microtubo de las galeras del sistema API-ZYM (BioMérieux®), se incubaron a 37° C por 4 h y posteriormente se aplicó el reactivo ZYM A y ZYM B. Se esperaron 5 min y se leyeron las galeras (conteniendo las enzimas, Tabla 4), asignándoles valores de acuerdo a la escala colorimétrica del API-ZYM que va de 0 (Sin actividad) a 5 (Máximo). Los valores de la escala son; 0 (reacción sin cambio de color), 1 (correspondiente a 5 nmol), 2 (10 nmol), 3 (20 nmol), 4 (30 nmol) y 5 (40 nmol o mas) (Leone *et al.*, 1998). El experimento fue realizado dos veces.

**Tabla 4.** Determinación de enzimas producidas por *Debaryomyces hansenii* mediante el sistema API-ZYM.

| <b>Enzimas</b>       |                     |                             |                                    |
|----------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Fosfatasa alcalina   | Valine arylamidasa  | Naftol-AS-BI-Fosfohidrolasa | B-glucosidasa                      |
| Esterasa (C4)        | Cistina arylamidasa | $\alpha$ -Galactosidasa     | N-Acetil- $\beta$ -glucosaminidasa |
| Esterasa lipasa (C8) | Tripsina            | $\beta$ -Galactosidasa      | $\alpha$ -manosidasa               |
| Lipasa (C14)         | Chymotripsina       | $\beta$ -Glucuronidasa      | $\alpha$ -Fucosidasa               |
| Leucine arylamidasa  | Fosfatasa ácida     | $\alpha$ -glucosidasa       |                                    |

### Enzimas hidrolíticas

#### Extracción de pared celular de *Penicillium italicum*

El hongo se cultivó en medio YES (Yeast Extract Sacarose, conteniendo por litro: 2% de extracto de levadura, 15% de sucrosa y 2% de agar), a 25° C durante quince días. Posteriormente, el micelio se retiró y se secó con papel filtro, se colocó en un mortero estéril, se agregó nitrógeno líquido y se maceró para romper las estructuras del micelio. Las paredes del hongo obtenidas se resuspendieron en una solución de NaCl 5M y se sonicaron (Ultrasonic homogenizer, ColeParmer) durante 3 min, inmediatamente después se centrifugaron durante 20 min a 8000 rpm, el sobrenadante se descartó, las paredes fueron lavadas con agua destilada estéril y se pusieron a secar durante 3 h a 60° C (Rey, 1998).

#### Cultivo *in vitro* de *Debaryomyces hansenii* con paredes de *P. italicum*

Las levaduras de *D. hansenii* fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio mínimo YNB (conteniendo: 0,67% Base Levadura-Nitrógeno), suplementado con 1 mg de pared del hongo/mL de medio. Se incubaron a 25° C en agitación (100 rpm) durante 15 días. En este lapso de tiempo, se cuantificó del sobrenadante, el contenido de  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasas y proteasas (Garmendia *et al.*, 2005). El experimento fue repetido dos veces.

#### Actividad $\beta$ -1,3 glucanasa

Se determinó la actividad de esta enzima empleando como sustrato laminarina (de *Laminaria digitata*, Sigma® L-9634; St. Louis, MO). Se mezclaron 62.5  $\mu$ L del

sobrenadante con 62.5  $\mu\text{L}$  del sustrato al 1%, incubando a 25° C durante 4 h. Posteriormente a cada muestra se le agregó 130  $\mu\text{L}$  de 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se calentó en baño María hasta la ebullición durante 5 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 492 nm. Una unidad (U) de  $\beta$ -1,3 glucanasa se definió como los micromoles de azúcares reductores liberados por mg de proteína (Castoria *et al.*, 2001; Jijakli y Lepoivre, 1998). El contenido total de proteína fue cuantificada utilizando el método descrito por Lowry *et al.* (1951).

### **Actividad quitinasa**

La actividad de esta enzima se determinó mezclando 10  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil-N-acetil  $\beta$ -D-glucosamina (Sigma®, St. Louis, MO) con 90  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, incubando a 25° C durante 24 h. Posteriormente se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a 540 nm. Se definió una unidad (U) de quitinasa como la capacidad de la enzima para liberar un micromol de p-nitrofenol por miligramo de proteína (Gacto *et al.*, 2000; Castoria *et al.*, 2001).

### **Determinación de proteasas**

Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de azocaseína al 1% y buffer acetato pH 5.0, se incubó a 40° C durante 30 min. Posteriormente se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido tricloroacético 10% y se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 min. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se les agregó 500  $\mu\text{L}$  de NaOH (525 Mm). Se midieron las muestras en un espectrofotómetro a una absorbancia de 442 nm. Se definió 10 unidades (U) de actividad proteasa como la cantidad que produce una absorbancia (0,1) en las condiciones de reacción (Gacto *et al.*, 2000; Benitez *et al.*, 2001).

### **Evaluación de las toxinas *killer***

Para determinar si las levaduras *D. hansenii* tenían la capacidad de producir sustancias antifúngicas difusibles en el agar, se sembraron en forma puntual en el medio de cultivo YMB (Conteniendo: 0.3% de extracto de levadura, 0.3% de extracto de malta, 1% de glucosa, 0.5% de peptona y 2% de agar) incorporando al medio de cultivo una concentración de  $10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de *P. italicum*. De acuerdo a que los posibles agentes de control biológico se aplicaran en frutos de limón mexicano el pH del medio se ajustó a 4.2,

4.6, 5.0 y 5.4, utilizando buffer citrato-fosfato. Las placas se incubaron a 25° C durante 48 h y se determinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento del patógeno alrededor de las colonias del antagonista (Vero, 2006).

## 5.2. RESULTADOS

### Competencia de nutrimentos entre levaduras y *P. italicum*

#### Crecimiento de levaduras antagonicas en diferentes medios de cultivo

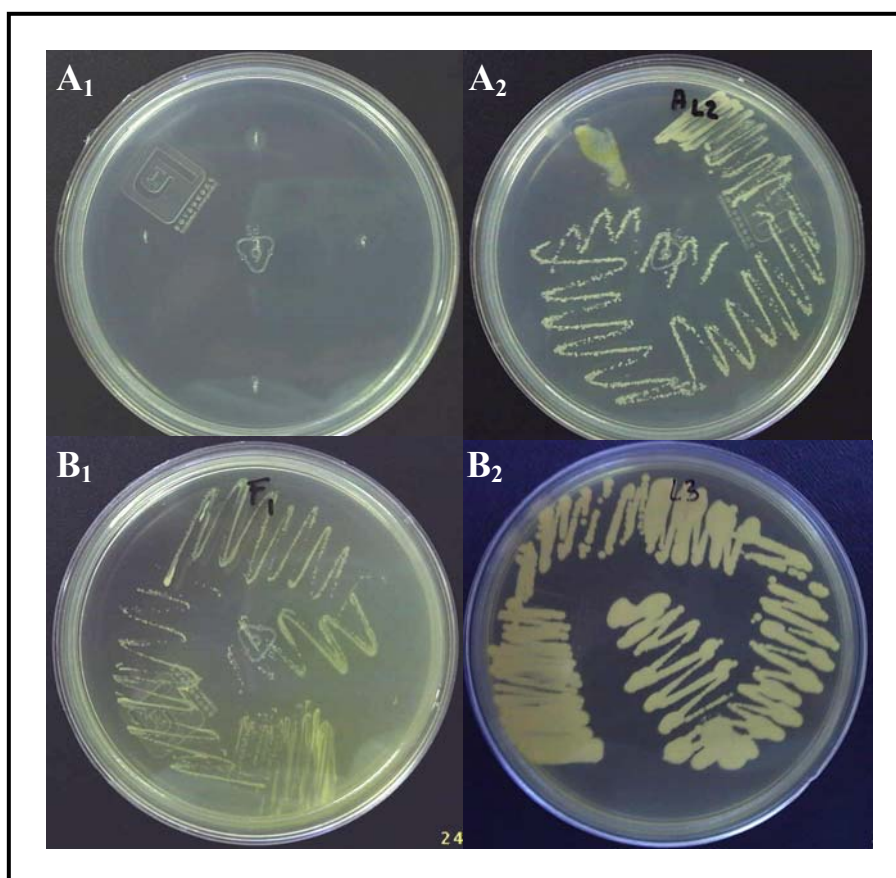
Las levaduras *Debaryomyces hansenii* se comportaron de manera diferente en cada uno de los medios de cultivos probados (Tabla 5), a las 48 h de la evaluación, las levaduras que crecieron en todos los medios fueron DhhBCS003, DhhBCS005, DhhBCS006, LL1, LL2 y LL3. Todas las levaduras estuvieron presentes en el medio YPD (usado de referencia). *Penicillium italicum* creció en todos los medios probados. La levadura de referencia *Saccharomyces cerevisiae* y las levaduras DhhBCS001, DhhBCS007, DhfBCS001 y DhfBCS002 (Fig. 7), no crecieron en los medios elaborados a base de limón mexicano, pero si se observaron en los medios YPD y Agar Naranja. La única levadura que no creció en el flavedo pero si en el albedo limón fue DhhBCS002.

**Tabla 5.** Crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en diferentes medios de cultivo.

| Levadura             | Medios de cultivo          |     |                           |     |                           |     |                  |     |
|----------------------|----------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|-----|------------------|-----|
|                      | Medio flavedo <sup>1</sup> |     | Medio albedo <sup>1</sup> |     | Agar Naranja <sup>2</sup> |     | YPD <sup>2</sup> |     |
|                      | Tiempo de evaluación (h)   |     |                           |     |                           |     |                  |     |
|                      | 24                         | 48  | 24                        | 48  | 24                        | 48  | 24               | 48  |
| DhhBCS001            | -                          | +   | -                         | +   | +                         | +   | ++               | +++ |
| DhhBCS002            | -                          | +   | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |
| DhhBCS003            | ++                         | +++ | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |
| DhhBCS004            | -                          | +   | -                         | ++  | +                         | +   | ++               | +++ |
| DhhBCS005            | ++                         | +++ | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |
| DhhBCS006            | ++                         | +++ | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |
| DhhBCS007            | -                          | +   | -                         | +   | +                         | +   | ++               | +++ |
| DhfBCS001            | -                          | +   | -                         | +   | +                         | +   | ++               | +++ |
| DhfBCS002            | -                          | +   | -                         | ++  | +                         | +   | ++               | +++ |
| LL1                  | ++                         | +++ | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |
| LL2                  | ++                         | +++ | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |
| LL3                  | ++                         | +++ | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |
| <i>S. cerevisiae</i> | -                          | -   | -                         | -   | +                         | ++  | ++               | +++ |
| <i>P. italicum</i>   | ++                         | +++ | ++                        | +++ | ++                        | +++ | ++               | +++ |

<sup>1</sup>Medios elaborados a base de limón mexicano. <sup>2</sup>Medios de referencia.

Levaduras con crecimiento: lento (+), moderado (++) , alto (+++) y sin crecimiento (-).



**Figura 7.** Evaluación del crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en distintos medios de cultivo. Levadura DhhBCS002, en medio flavedo (**A<sub>1</sub>**) sin crecimiento a las 24h y (**A<sub>2</sub>**) con crecimiento lento (+) a las 48h. Medio albedo (**B<sub>1</sub>**) crecimiento moderado (++) a las 24h y (**B<sub>2</sub>**) crecimiento alto (+++) a las 48h.

#### **Eficiencia del antagonismo *in vitro* de levaduras hacia *Penicillium italicum***

Existió una variación en el grado de inhibición de las doce levaduras *Debaryomyces hansenii* hacia *P. italicum* en los medios PDA, flavedo y albedo limón (Tabla 6). Las levaduras LL1, LL2 y LL3 fueron las más efectivas en la inhibición *in vitro*, les siguieron las *D. hansenii* DhhBCS005 y DhhBCS006. El porcentaje de inhibición más bajo en todos los medios de cultivo se cuantificó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada como referencia (Fig. 8). Aunque las levaduras DhhBCS003 y DhfBCS002 inhibieron el crecimiento de manera significativa del hongo *P. italicum* en el medio PDA, no lograron hacerlo en los medio flavedo y albedo limón.

**Tabla 6.** Crecimiento micelial de *Penicillium italicum* en presencia de levaduras *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

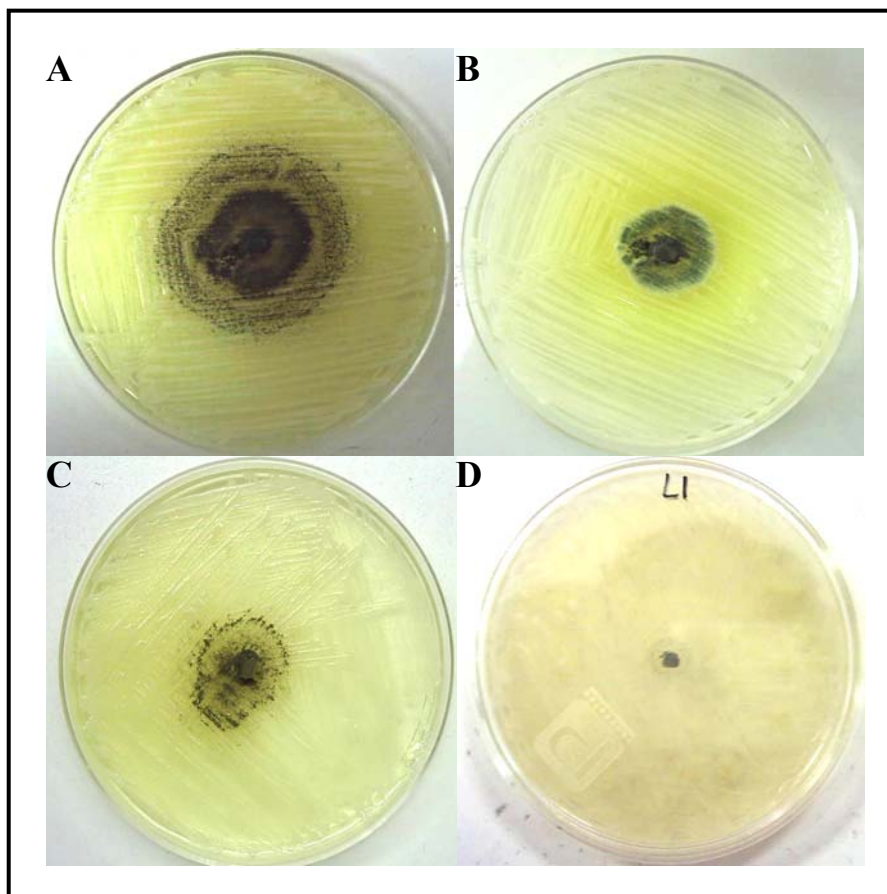
| Organismo            | Medios de cultivo       |               |              |
|----------------------|-------------------------|---------------|--------------|
|                      | PDA                     | Medio flavado | Medio albedo |
|                      | Diámetro del hongo (mm) |               |              |
| <i>P. italicum</i>   | 65 ± 0.05 a*            | 53 ± 0.11 a   | 51 ± 0.05 a  |
| <i>S. cerevisiae</i> | 64 ± 0.10 a             | 52 ± 0.05 a   | 48 ± 0.05 a  |
| DhhBCS001            | 40 ± 0.10 b             | 23 ± 0.05 d   | 20 ± 0.05 c  |
| DhhBCS002            | 19 ± 0.05 e             | 13 ± 0.05 f   | 15 ± 0.17 e  |
| DhhBCS003            | 7 ± 0.10 g              | 20 ± 0.05 e   | 15 ± 0.05 e  |
| DhhBCS004            | 16 ± 0.10 f             | 27 ± 0.20 b   | 17 ± 0.05 d  |
| DhhBCS005            | 2 ± 0.20 i              | 10 ± 0.15 g   | 10 ± 0.05 f  |
| DhhBCS006            | 1 ± 0.15 i              | 9 ± 0.05 g    | 10 ± 0.05 f  |
| DhhBCS007            | 37 ± 0.11 c             | 24 ± 0.05 cd  | 20 ± 0.05 c  |
| DhfBCS001            | 26 ± 0.05 d             | 26 ± 0.20 bc  | 20 ± 0.07 c  |
| DhfBCS002            | 5 ± 0.10 h              | 25 ± 0.05 c   | 23 ± 0.05 b  |
| LL1                  | 1 ± 0.11 i              | 5 ± 0.05 h    | 8 ± 0.10 g   |
| LL2                  | 2 ± 0.2 i               | 5 ± 0.05 h    | 6 ± 0.05 h   |
| LL3                  | 2 ± 0.2 i               | 6 ± 0.15 h    | 6 ± 0.05 h   |

Los valores de cada columna con la misma letra no son diferentes significativamente según la prueba de Fisher de la diferencia mínima significativa (LSD) con un nivel de significancia al 5% ( $P < 0.05$ ). \*Los datos representan la desviación estándar de la media.

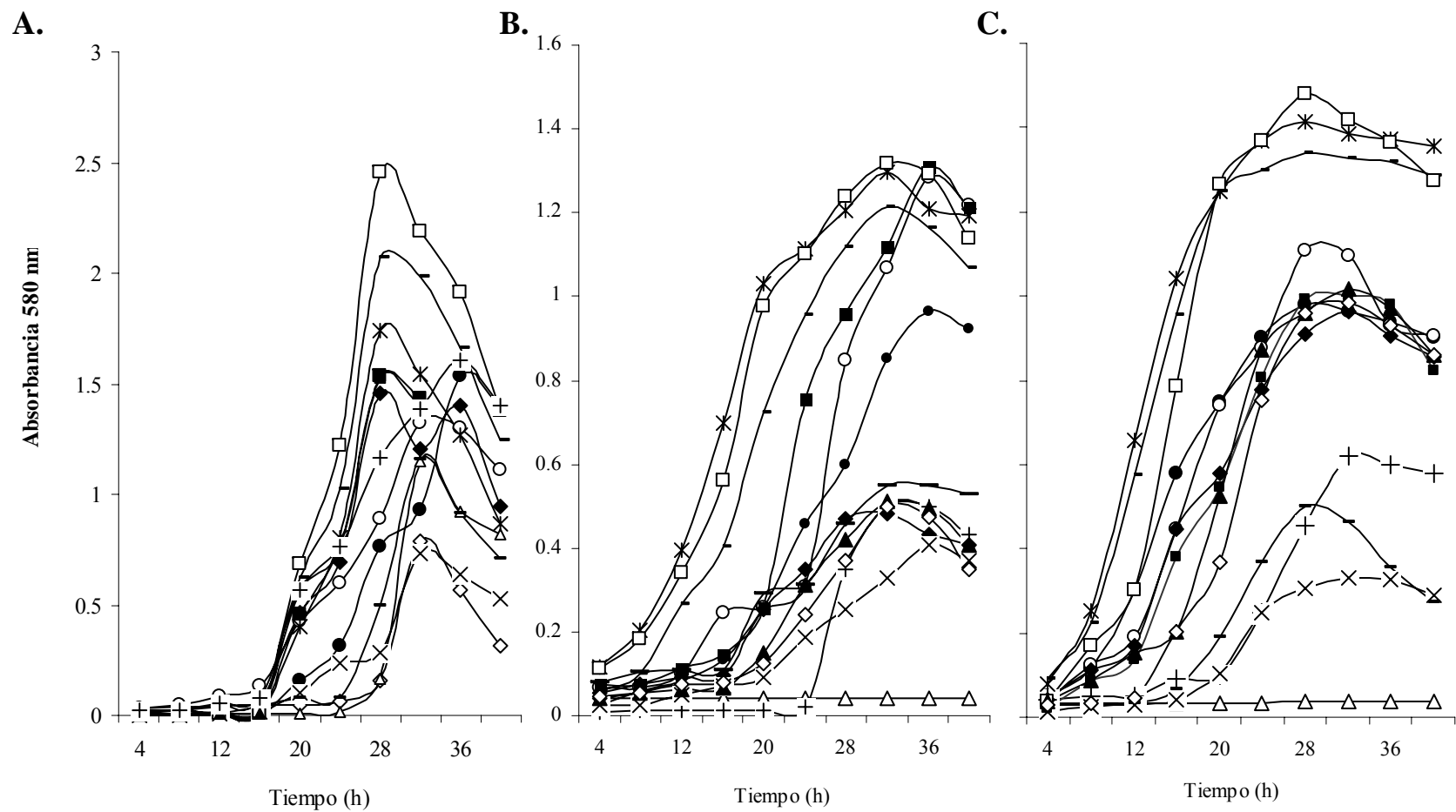
### Dinámicas de crecimiento de levaduras en medio albedo y flavado limón

Todas las levaduras *Debaryomyces hansenii* crecieron en los medios hechos a base de limón mexicano y en medio Caldo de Papa-Dextrosa (CPD). Para el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no creció en los medios de limón solo en el medio CPD usado como medio de referencia (Fig. 9). Las levaduras epífitas de limón mexicano LL1, LL2 y LL3, fueron las que registraron los mayores picos de absorbancia en los tres medios de cultivo. Todas las levaduras empezaron a crecer de manera exponencial a las 16 h después de inoculado el medio CPD, en el medio flavado y albedo limón el crecimiento se empezó a cuantificar a las 8 h después de su inoculación. Los picos máximos de absorbancia en todos los medios de cultivos se cuantificaron entre las 28 h y 32 h después de la incorporación de las levaduras *D. hansenii*.





**Figura 8.** Crecimiento de *Penicillium italicum* sobre medio agar flavado de limón mexicano en presencia de levaduras *Debaryomyces hansenii*. Donde: **A**= *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de referencia), **B**= DhhBCS005, **C**= DhhBCS002 y **D**= LL1.



**Figura 9.** Dinámicas de crecimiento de levaduras antagonicas. Donde: *Saccharomyces cerevisiae* ( $\Delta$ ), DhhBCS001 (+), DhhBCS002 ( $\blacklozenge$ ), DhhBCS003 ( $\blacksquare$ ), DhhBCS004 ( $\blacktriangle$ ), DhhBCS005 ( $\bullet$ ), DhhBCS006 ( $\circ$ ), DhhBCS007 (x), DhFBCS001 ( $\blacksquare$ ), DhfBCS002 ( $\diamond$ ), LL1 ( $\square$ ), LL2 (-) y LL3 ( $\times$ ). Medio (A) Caldo Papa-Dextrosa, (B) Medio flavado y (C) Medio albedo.

### **Competencia por nutrimentos**

Las levaduras DhhBCS005, DhhBCS006, LL1, LL2 y LL3, se comportaron de manera diferente en la asimilación de carbohidratos provenientes de los medios líquidos de flavedo y albedo limón inoculados con el hongo *Penicillium italicum* (Tabla 7 y Tabla 8). Las levaduras epífitas de limón mexicano LL1, LL2 y LL3 fueron las que asimilaron rápidamente las fuentes de sacarosa, fructosa y glucosa en el medio flavedo y albedo limón. En los tratamientos con levadura y el hongo *P. italicum*, se cuantificaron los valores más bajos de carbohidratos en relación a los medios inoculados solo con cada *Debaryomyces hansenii*. Estadísticamente ( $P < 0.05$ ) los mejores tratamientos a las 48 h de evaluación para el medio flavedo limón en el consumo de sacarosa fue LL3+hongo, para fructosa LL3+hongo y finalmente para glucosa fueron las levaduras DhhBCS005, LL1 y LL3 con *P. italicum*. Para el medio albedo limón los tratamientos estadísticamente mejores evaluados a las 48 h fueron para sacarosa LL3+hongo, para fructosa las levaduras LL1 y LL3 con hongo y para glucosa fue DhhBCS005 y DhhBCS006 más *P. italicum*. En los medios líquidos flavedo y albedo limón, la mayor concentración (mg/g) de carbohidratos fue de sacarosa, seguida de la fructosa y en menor grado de glucosa.

### **Inhibición de esporas de *Penicillium italicum* por levaduras antagónicas**

La germinación de esporas de *Penicillium italicum* en los medios de cultivo líquidos flavedo y albedo limón fue altamente inhibida por la presencia de las levaduras *Debaryomyces hansenii* DhhBCS005, DhhBCS006, LL1, LL2 y LL3 (Fig. 10). Los niveles más bajos de germinación del hongo patógeno fueron en presencia de las levaduras epífitas de limón mexicano LL1, LL2 y LL3. El hongo *P. italicum* alcanzó su máximo grado de germinación (100%) antes de las 48 h de inoculados ambos medios.

### **Determinación de enzimas por parte de *Debaryomyces hansenii***

De acuerdo al sistema API-ZYM, las 12 levaduras *D. hansenii* mostraron distinta actividad enzimática para Fosfatasa alcalina (40 nmol), Esterasa (C4) (entre 30-40 nmol), Esterasa lipasa (C8) (entre 30-40 nmol), Leucine arymidasa (entre 30-40 nmol), Valine arymidasa (5 nmol), Fosfatasa ácida (entre 30-40 nmol), Naftol-AS-BI-Fosfohidrolasa (entre 20-30 nmol) y  $\beta$ -Glucosidasa (entre 20-30 nmol) (Tabla 9, 10 y 11), para el resto de las enzimas no se detectó actividad alguna (Fig. 11).

**Tabla 7.** Asimilación de carbohidratos en el medio flavedo limón inoculado con levaduras *Debaryomyces hansenii* y el hongo *Penicillium italicum*.

| Tratamiento                 | Carbohidratos (mg/g) |               |               |              |               |               |
|-----------------------------|----------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
|                             | Sacarosa             |               | Fructosa      |              | Glucosa       |               |
|                             | 24h                  | 48h           | 24h           | 48h          | 24h           | 48h           |
| Sin organismo               | 33.83 ± 0.28*a       | 32.68 ± 0.28a | 15.97 ± 0.03a | 14 ± 0.02a   | 6.58 ± 0.04a  | 6.18 ± 0.04a  |
| <i>Penicillium italicum</i> | 23.78 ± 0.15b        | 19.83 ± 0.15b | 7.63 ± 0.45b  | 7.4 ± 0.10b  | 5.75 ± 0.07b  | 5.22 ± 0.04b  |
| DhhBCS005                   | 22.53 ± 0.20c        | 19.48 ± 0.20b | 7.3 ± 0.01bc  | 6.45 ± 0.06c | 3.86 ± 0.07d  | 2.15 ± 0.04c  |
| DhhBCS006                   | 21.74 ± 0.22d        | 19.55 ± 0.22b | 7.09 ± 0.06c  | 6.36 ± 0.06c | 4.87 ± 0.09c  | 1.15 ± 0.04d  |
| LL1                         | 16.84 ± 0.19g        | 11.46 ± 0.19d | 5.96 ± 0.04de | 3.94 ± 0.06g | 1.36 ± 0.15hi | 1.18 ± 0.01d  |
| LL2                         | 19.58 ± 0.10e        | 13.09 ± 0.10c | 6.17 ± 0.04d  | 4.19 ± 0.02f | 3.37 ± 0.12e  | 1.16 ± 0.01d  |
| LL3                         | 18.06 ± 0.13f        | 10.62 ± 0.13e | 4.84 ± 0.07f  | 2.10 ± 0.03h | 1.23 ± 0.11j  | 1.03 ± 0.01e  |
| DhhBCS005 + hongo           | 10.59 ± 0.17i        | 7.30 ± 0.17g  | 6.32 ± 0.39d  | 6.12 ± 0.17d | 2.52 ± 0.03g  | 0.16 ± 0.04fg |
| DhhBCS006 + hongo           | 13.82 ± 0.11h        | 6.99 ± 0.11g  | 6.15 ± 0.07d  | 5.40 ± 0.09e | 3.06 ± 0.05f  | 0.19 ± 0.02f  |
| LL1 + hongo                 | 9.87 ± 0.18j         | 6.36 ± 0.18h  | 3.36 ± 0.21g  | 0.31 ± 0.06i | 0.56 ± 0.05k  | 0.12 ± 0.02g  |
| LL2 + hongo                 | 8.72 ± 0.50k         | 9.01 ± 0.50f  | 5.54 ± 0.39e  | 2.15 ± 0.16h | 1.47 ± 0.08h  | 0.19 ± 0.01f  |
| LL3 + hongo                 | 8.78 ± 0.56k         | 6.16 ± 0.56h  | 2.66 ± 0.36h  | 0.12 ± 0.04j | 0.26 ± 0.01k  | 0.12 ± 0.05g  |

De acuerdo con la prueba de Fisher (LSD), valores en las columnas con la misma letra no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

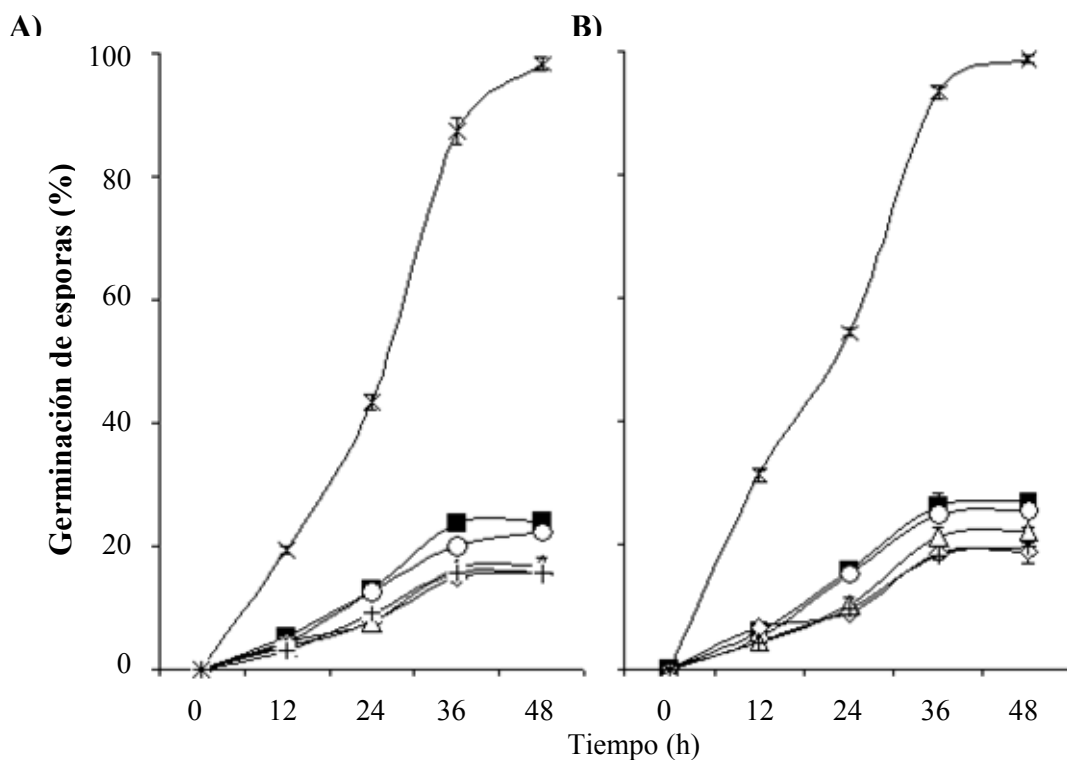
\*Los datos representan la desviación estándar de las medias.

**Tabla 8.** Asimilación de carbohidratos en el medio albedo limón inoculado con levaduras *Debaryomyces hansenii* y el hongo *Penicillium italicum*.

| Tratamiento                 | Carbohidratos (mg/g) |               |                |               |               |               |
|-----------------------------|----------------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|                             | Sacarosa             |               | Fructosa       |               | Glucosa       |               |
|                             | 24h                  | 48h           | 24h            | 48h           | 24h           | 48h           |
| Sin organismo               | 29.27 ± 0.05*a       | 28.48 ± 0.12a | 14.30 ± 0.43a  | 13.64 ± 0.05a | 12.85 ± 0.10a | 12.67 ± 0.07a |
| <i>Penicillium italicum</i> | 22.15 ± 0.05b        | 20.39 ± 0.26b | 10.86 ± 0.49b  | 9.37 ± 0.13b  | 12.10 ± 0.4b  | 11.24 ± 0.03b |
| DhhBCS005                   | 19.66 ± 0.08c        | 10.17 ± 0.03e | 10.84 ± 0.08cd | 7.78 ± 0.07d  | 8.10 ± 0.03d  | 3.18 ± 0.02d  |
| DhhBCS006                   | 18.55 ± 0.12d        | 12.48 ± 0.09c | 10.44 ± 0.10d  | 8.83 ± 0.05c  | 9.70 ± 0.03c  | 4.18 ± 0.01c  |
| LL1                         | 14.04 ± 0.06i        | 10.14 ± 0.06e | 7.61 ± 0.05g   | 2.21 ± 0.03i  | 4.28 ± 0.06f  | 2.08 ± 0.03f  |
| LL2                         | 16.86 ± 0.11e        | 11.29 ± 0.07d | 8.38 ± 0.02f   | 5.63 ± 0.05f  | 4.96 ± 0.04e  | 2.25 ± 0.08e  |
| LL3                         | 15.59 ± 0.08f        | 9.75 ± 0.23ef | 5.76 ± 0.04i   | 3.06 ± 0.08h  | 3.18 ± 0.01g  | 1.34 ± 0.04g  |
| DhhBCS005 + hongo           | 15.47 ± 0.15f        | 6.51 ± 0.15g  | 9.90 ± 0.17e   | 6.69 ± 0.17e  | 2.80 ± 0.26i  | 0.08 ± 0.01i  |
| DhhBCS006 + hongo           | 14.51 ± 0.11h        | 9.61 ± 0.12f  | 9.84 ± 0.34e   | 7.84 ± 0.22d  | 3.05 ± 0.24hi | 0.06 ± 0.01i  |
| LL1 + hongo                 | 9.86 ± 0.07j         | 6.50 ± 0.36g  | 5.03 ± 0.04j   | 1.76 ± 0.07j  | 0.65 ± 0.1k   | 0.24 ± 0.02h  |
| LL2 + hongo                 | 14.89 ± 0.16g        | 9.57 ± 0.51f  | 6.68 ± 0.32h   | 3.34 ± 0.13g  | 1.66 ± 0.11j  | 0.18 ± 0.02h  |
| LL3 + hongo                 | 7.22 ± 0.08k         | 6.05 ± 0.48h  | 3.53 ± 0.08k   | 1.75 ± 0.11j  | 0.63 ± 0.05k  | 0.20 ± 0.01h  |

De acuerdo con la prueba de Fisher (LSD), valores en las columnas con la misma letra no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

\*Los datos representan la desviación estándar de las medias



**Figura 10.** Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium italicum*. Sin levaduras (×) y en presencia de *Debaryomyces hansenii* levadura DhhBCS005 (■), DhhBCS006 (○), LL1 (◇), LL2 (△) y LL3 (+), inoculados en: A) Medio líquido de flavedo y B) Albedo limón. Las barras representan la desviación estándar de las medias.

**Tabla 9.** Actividad enzimática de levaduras *Debaryomyces hansenii* determinada mediante el sistema APY-ZYM, parte I.

| Levadura   | Fosfatasa alcalina | Esterasa (C4) | Esterasa lipasa (C8) | Lipasa (C14) | Leucine arimidasa | Valine arimidasa | Cistina arylamidasa |
|------------|--------------------|---------------|----------------------|--------------|-------------------|------------------|---------------------|
| DhhBCS001* | 40 nmol            | 30 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhhBCS002  | 40 nmol            | 30 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhhBCS003  | 40 nmol            | 40 nmol       | 40 nmol              | -            | 30 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhhBCS004  | 40 nmol            | 40 nmol       | 30 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhhBCS005  | 40 nmol            | 30 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhhBCS006  | 40 nmol            | 30 nmol       | 40 nmol              | -            | 30 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhhBCS007  | 40 nmol            | 40 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhfBCS001  | 40 nmol            | 30 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| DhfBCS002  | 40 nmol            | 40 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| LL1        | 40 nmol            | 30 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| LL2        | 40 nmol            | 40 nmol       | 40 nmol              | -            | 30 nmol           | 5 nmol           | -                   |
| LL3        | 40 nmol            | 40 nmol       | 40 nmol              | -            | 40 nmol           | 5 nmol           | -                   |

\* Se realizaron dos repeticiones por cada levadura

**Tabla 10.** Actividad enzimática de levaduras *Debaryomyces hansenii* determinada mediante el sistema APY-ZYM, parte II.

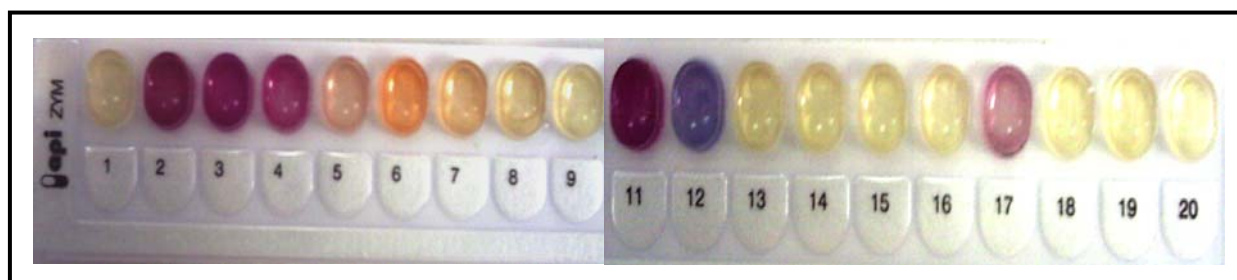
| Levadura   | Tripsina | Chymotripsina | Fosfatasa<br>ácida | Naftol-AS-BI-<br>Fosfohidrolasa | $\alpha$ -Galactosidasa | $\beta$ -Galactosidasa |
|------------|----------|---------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| DhhBCS001* | -        | -             | 30 nmol            | 30 nmol                         | -                       | -                      |
| DhhBCS002  | -        | -             | 40 nmol            | 20 nmol                         | -                       | -                      |
| DhhBCS003  | -        | -             | 40 nmol            | 20 nmol                         | -                       | -                      |
| DhhBCS004  | -        | -             | 40 nmol            | 20 nmol                         | -                       | -                      |
| DhhBCS005  | -        | -             | 30 nmol            | 30 nmol                         | -                       | -                      |
| DhhBCS006  | -        | -             | 40 nmol            | 20 nmol                         | -                       | -                      |
| DhhBCS007  | -        | -             | 40 nmol            | 30 nmol                         | -                       | -                      |
| DhfBCS001  | -        | -             | 40 nmol            | 20 nmol                         | -                       | -                      |
| DhfBCS002  | -        | -             | 40 nmol            | 30 nmol                         | -                       | -                      |
| LL1        | -        | -             | 40 nmol            | 20 nmol                         | -                       | -                      |
| LL2        | -        | -             | 30 nmol            | 20 nmol                         | -                       | -                      |
| LL3        | -        | -             | 40 nmol            | 30 nmol                         | -                       | -                      |

\* Se realizaron dos repeticiones por cada levadura

**Tabla 11.** Actividad enzimática de levaduras *Debaryomyces hansenii* determinada mediante el sistema APY-ZYM, parte III.

| Levaduras | $\beta$ -Glucuronidasε | $\alpha$ -Glucosidasa | $\beta$ -Glucosidasa | N-Acetil- $\beta$ -<br>Glucosaminidasa | $\alpha$ -Manosidasa | $\alpha$ -Fucosidasa |
|-----------|------------------------|-----------------------|----------------------|--|----------------------|----------------------|
| DhhBCS001 | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhhBCS002 | -                      | -                     | 20 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhhBCS003 | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhhBCS004 | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhhBCS005 | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhhBCS006 | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhhBCS007 | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhfBCS001 | -                      | -                     | 20 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| DhfBCS002 | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| LL1       | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| LL2       | -                      | -                     | 20 nmol              | -                                      | -                    | -                    |
| LL3       | -                      | -                     | 30 nmol              | -                                      | -                    | -                    |

\* Se realizaron dos repeticiones por cada levadura

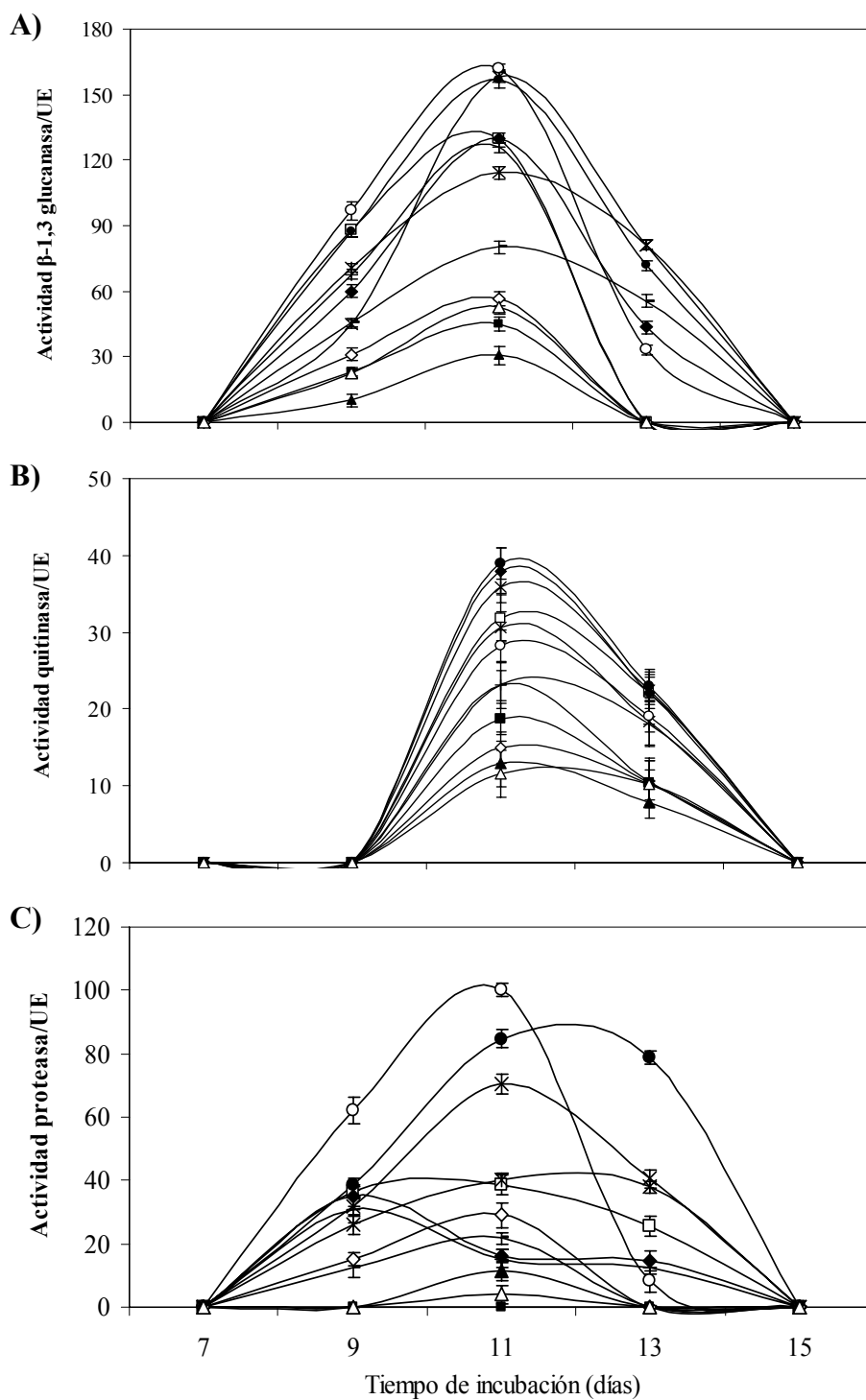


**Figura 11.** Detección de la producción de enzimas mediante el sistema API-ZYM, para la levadura DhhBCS001 de *Debaryomyces hansenii*. Donde: (1) Control  $-$ , (2) Fosfatasa alcalina  $+$ , (3) Esterasa C4  $+$ , (4) E. lipasa C8  $+$ , (5) Lipasa C14  $-$ , (6) L. arymidasa  $+$ , (7) Valine arylamidasa  $+$ , (8) Cistina arymidasa  $-$ , (9) Tripsina  $-$ , (10) Chymotripsina  $-$ , (11) Fosfatasa ácida  $+$ , (12) Naftol-AS-BI-Fosfohidrolasa  $+$ , (13)  $\alpha$ -Galactosidasa  $-$ , (14)  $\beta$ -Galactosidasa  $-$ , (15)  $\beta$ -Glucuronidasa  $-$ , (16)  $\alpha$ -glucosidasa  $-$ , (17)  $\beta$ -glucosidasa  $+$ , (18) N-Acetil- $\beta$ -glucosaminidasa  $-$ , (19)  $\alpha$ -manosidasa  $-$  y (20)  $\alpha$ -Fucosidasa  $-$ . Con actividad  $+$ . Sin actividad  $-$ .

### **Producción de enzimas hidrolíticas por parte de levaduras antagónicas**

Se pudo determinar que todas las levaduras *D. hansenii* produjeron enzimas ( $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y proteasa) capaces de degradar paredes celulares del hongo patógeno *Penicillium italicum* (Fig. 12). En función del tiempo, los niveles de actividad enzimática fueron diferentes para cada una de las levaduras crecidas en medio mínimo con paredes del hongo patógeno como única fuente de carbono. El intervalo de actividad para  $\beta$ -1,3 glucanasa se determinó entre los 9 y 13 días de evaluación, alcanzando el máximo nivel de producción las levaduras DhfBCS002, DhhBCS004 y DhhBCS006. A su vez, la levadura con más baja producción en todo el intervalo de actividad fue DhhBCS001. Para la actividad quitinasa, el intervalo de actividad enzimática se determinó entre los 9 y 11 días de evaluación, las levaduras con mayor actividad fueron la DhhBSC006 y DhhBCS003, presentando el nivel más bajo para los 11 días la levadura LL3 y para los 13 días la DhhBCS001. En la determinación de proteasa, la actividad inicial se detectó a los 9 días de evaluación, donde las levaduras DhhBCS003 y DhhBCS007 mostraron su nivel más alto dentro de su cinética. La levadura DhfBCS002 presentó la mayor actividad a los 9 y 11 días, y DhhBCS006 a los 13 días de evaluación. La levadura con menor actividad proteasa fue LL3, siendo la levadura LL2 la única que no produjo esta enzima en las condiciones del ensayo.





**Figura 12.** Actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa (A), quitinasa (B) y proteasa (C) de levaduras *Debaryomyces hansenii* cultivadas con el hongo *Penicillium italicum*. Donde: DhhBCS001 ( $\blacktriangle$ ), DhhBCS002 ( $\square$ ), DhhBCS003 ( $\blacklozenge$ ), DhhBCS004 ( $\times$ ), DhhBCS005 ( $*$ ), DhhBCS006 ( $\bullet$ ), DhhBCS007 ( $|$ ), DhfBCS001 ( $-$ ), DhfBCS002 ( $\circ$ ), LL1 ( $\diamond$ ), LL2 ( $\blacksquare$ ) y LL3 ( $\triangle$ ). La actividad específica fue expresada en unidades por mL de proteína (UE=Unidades Específicas). Las barras verticales indican el error estándar de la media.

### Antibiosis *in vitro* por efecto del factor *killer*

Se observó antagonismo *in vitro* de las levaduras *Debaryomyces hansenii* hacia el hongo *Penicillium italicum* en los diferentes pHs probados en el medio YMB (Tabla 12). Todas las levaduras mostraron actividad antagónica, en algunos de los pHs evaluados (Fig. 13). En el caso particular de la levadura DhhBCS001 su intervalo de actividad se observó entre el pH 4.6-5.0, para DhhBCS006 sólo en el pH 4.2 y para las levaduras epífitas de limón LL2 y LL3 en el pH 4.6. Todas las levaduras pierden su actividad antagonista en el pH 5.4. Sin la presencia de levaduras el hongo *P. italicum* tuvo crecimiento en todos los pHs probados en este ensayo.

**Tabla 12.** Inhibición del hongo *Penicillium italicum* por levaduras *Debaryomyces hansenii* bajo diferentes pHs del medio de cultivo.

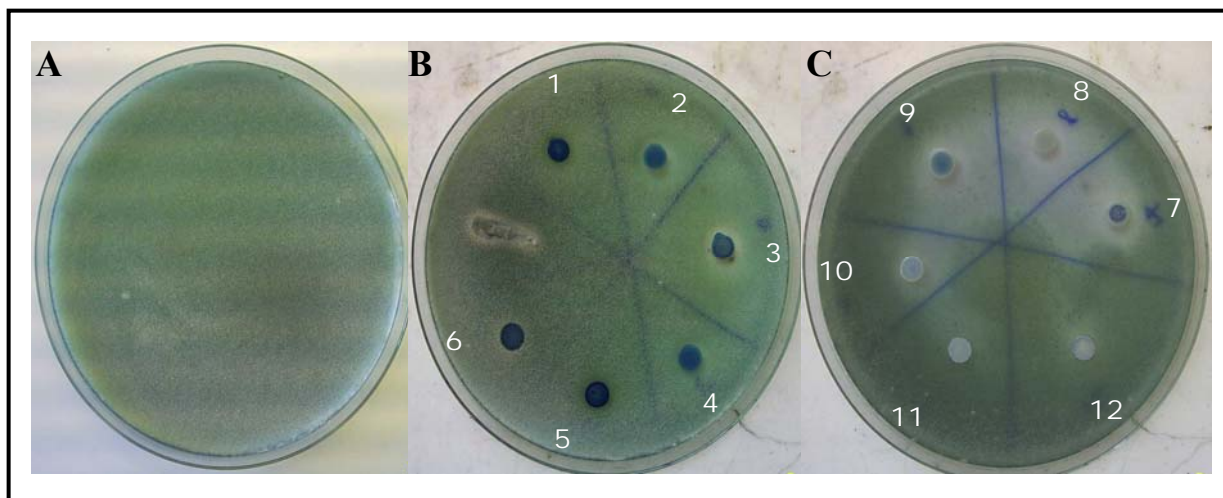
| Microorganismo                  | pH en YMB <sup>1</sup> |     |     |     |
|---------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                                 | 4.2                    | 4.6 | 5.0 | 5.4 |
| <i>P. italicum</i> <sup>2</sup> | +                      | +   | +   | +   |
| DhhBCS001                       | -                      | +   | +   | -   |
| DhhBCS002                       | +                      | +   | +   | -   |
| DhhBCS003                       | +                      | +   | +   | -   |
| DhhBCS004                       | +                      | +   | +   | -   |
| DhhBCS005                       | +                      | +   | +   | -   |
| DhhBCS006                       | +                      | -   | -   | -   |
| DhhBCS007                       | +                      | +   | -   | -   |
| DhfBCS001                       | +                      | +   | +   | -   |
| DhfBCS002                       | +                      | +   | +   | -   |
| LL1                             | +                      | +   | +   | -   |
| LL2                             | -                      | +   | -   | -   |
| LL3                             | -                      | +   | -   | -   |

<sup>1</sup> Medio de cultivo YMB (Conteniendo: 0,3% extracto de levadura, 0,3% extracto de malta, 1% glucosa, 0,5% peptona y 2% agar), incubado a 25° C por 48 h.

<sup>2</sup> *P. italicum* incorporado al medio de cultivo a una concentración de 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>.

+ Presencia de inhibición.

- Ausencia de inhibición.



**Figura 13.** Inhibición del crecimiento de *Penicillium italicum* en presencia de levaduras *Debaryomyces hansenii* en medio YMB ajustado a un pH de 4.6. Donde: **A)** *P. italicum* (control), **B)** 1= DhhBCS001, 2= DhhBCS002, 3= DhhBCS003, 4= DhhBCS004, 5= DhhBCS005, 6= DhhBCS006, y **C)** 7= DhhBCS007, 8= DhfBCS001, 9= DhfBCS002, 10= LL1, 11= LL2 y 12= LL3.

### 5.3. DISCUSIÓN

#### **Crecimiento de *Debaryomyces hansenii* en un medio elaborado a base de limón mexicano**

La variación en la respuesta del crecimiento de las levaduras pudo estar condicionada a la composición química de los medios de cultivo utilizados. Para el caso de los medios flavedo y albedo elaborados con limón mexicano, estos contienen carbohidratos como sacarosa, fructosa y glucosa (Tabla 6 y 7) que utilizaron las levaduras como fuentes de carbono para su crecimiento. Sin embargo, dentro de los componentes de los cítricos existen compuestos antimicrobianos (Gavimath *et al.*, 2008) como los aceites esenciales; limonene, terminen, neral, nerol, geraniol, geranial, otros monoterpenos (Caccioni *et al.*, 1998; Papanikolaou *et al.*, 2008) y compuestos volátiles (Plaza *et al.*, 2004; Serkan, 2007), que han demostrado tener un efecto negativo sobre el crecimiento en general de los microorganismos (Droby *et al.*, 2008). Estos compuestos se encuentran localizados en los tricomas o glándulas presentes en el flavedo (Bouwmeester *et al.*, 1998). La variación en respuesta de cada levadura estuvo condicionada a su capacidad de adaptación para cada sustrato que se utilizó como medio de cultivo. Para el caso de los medios usados de referencia (YPD y Agar Naranja), estos son empleados de manera general para el aislamiento y cultivo de microorganismos (Witthuhn *et al.*, 2007; Goddard, 2008), en ambos casos todas las levaduras *D. hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* crecieron sin verse afectadas en su crecimiento.

#### **Antagonismo de levaduras hacia *Penicillium italicum* por competencia de nutrientes**

Las levaduras *D. hansenii* que mejor crecieron en los medios de cultivo (sólidos y líquidos) presentaron una mayor capacidad *in vitro* de inhibir a *Penicillium italicum*, su capacidad de adaptación al sustrato de los medios flavedo y albedo de limón, les permitió tener una tasa de crecimiento más rápida que la del hongo (Fig. 9), presentando un exponencial a partir de las 16 h de inoculados ambos medios. Esto originó que las levaduras agotaran rápidamente las fuentes de carbono disponibles en estos sustratos, limitando y desplazando a *P. italicum* en su crecimiento micelial. El uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (de referencia), fue de suma importancia, ya que a pesar de haber crecido en el medio líquido de PDA (Fig. 9), no logró inhibir al hongo patógeno en comparación con las demás levaduras en los otros medios de cultivos (Tabla 6), lo que indica que no cualquier levadura tiene la capacidad de controlar

a los hongos aun en la competencia por espacio y nutrimentos, donde quizás la levadura tenga mayor ventaja debido a su capacidad de multiplicación más rápida en comparación con la de *P. italicum* (Chand-Goyal y Spotts, 1996; Zhao *et al.*, 2008). Esta capacidad es tomada en cuenta, para elegir aquellas levaduras con tasas de crecimiento altas alcanzadas en poco tiempo, debido a que se tendrá una mayor cobertura en la colonización de las heridas de las frutas, protegiéndolas mediante la restricción de los posibles sitios de colonización para los hongos patógenos (Nunes *et al.*, 2001b), disminuyendo las infecciones en los frutos (Droby *et al.*, 1997). Por otra parte, *P. italicum* necesita de fuentes de energía para la germinación de sus esporas y así iniciar sus procesos patogénicos hacia los frutos de limón, sin embargo, se vio limitado en estos compuestos por la presencia de *D. hansenii* en los medios de cultivo (Tabla 7 y 8), ejerciendo las levaduras un control biológico del hongo mediante el mecanismo de competencia por espacio y nutrimentos (Lima *et al.*, 1999; Janisiewicz *et al.*, 2000; Bencheqroun *et al.*, 2007), disminuyendo el crecimiento de *P. italicum* mediante la limitación de la disponibilidad de las fuentes carbonadas necesarias para la germinación de sus esporas (Fig.8) (Digrak y Ozcelik, 2001) y para la producción de enzimas líticas como la  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanasa fundamentales para la infección de los frutos (Santos *et al.*, 1977; Miedes y Lorences, 2006; Qin *et al.*, 2007). Esto se corrobora con el tratamiento donde solo se encontraba *P. italicum*, el cual presento una germinación del 100% de las esporas, es decir, cuando no existió la presencia de alguna levadura *D. hansenii*, el hongo asimilo los nutrimentos necesarios para sus procesos germinativos, existiendo una relación entre la germinación y producción de biomasa del hongo con la disponibilidad de fuentes de carbono como la glucosa y fructosa (Stinson *et al.*, 1981). Finalmente se concluye que la competencia por nutrimentos es un factor determinante en la infección de los frutos por los hongos patógenos poscosecha. Seleccionar un microorganismo altamente eficiente en la asimilación de nutrimentos puede limitar el crecimiento de estos, coadyuvando a la protección de los frutos, al disminuir su crecimiento y su capacidad infectiva hacia tejidos heridos (Janisiewicz y Tworkoski, 1998).

### **Efecto de la producción de enzimas en el antagonismo de *Penicillium italicum***

La detección de enzimas juega un papel importante sobre la selección de microorganismos antagonistas debido a que pueden tener un efecto inhibitorio sobre hongos patógenos. Actualmente la detección de bio-moléculas sigue siendo un camino importante en la

biotecnología para detectar microorganismos que pueden ser aprovechados en la agricultura, medicina, industria, entre otros (Buzzini y Martín, 2002). La mayoría de las enzimas detectadas por el sistema API-ZYM (Tabla 9, 10 y 11), son producidas por levaduras y hongos filamentosos, cada enzima tiene una función específica, por ejemplo, las esterasas son enzimas extracelulares que rompen enlaces ésteres, atravesando polisacáridos de la pared celular y la lignina, haciendo más eficiente la acción de las hidrolasas (Christov y Prior, 1993; Panda y Gowrishankar, 2005). Por su parte, las lipasas son enzimas lipolíticas producidas por algunos microorganismos cuya función es la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, los cuales utilizan como energía para su crecimiento celular. A nivel industrial, las lipasas son utilizadas para elaborar sabores y fragancias (Talon *et al.*, 1996; Basaran y Hang, 2000). La  $\beta$ -Glucosidasa, es utilizada para transformar celulosa a glucosa, esta enzima es un complejo formado por endo y exoglucanasas, las cuales son importantes para la hidrólisis de la celulosa, esta enzima también juega un papel importante en el proceso de vinificación, particularmente sobre el incremento de algunos compuestos volátiles (Dass *et al.*, 1997; Strauss *et al.*, 2001). En cuanto a la producción *in vitro* de  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y proteasa (Fig. 12) por las distintas levaduras *D. hansenii* en presencia de las paredes del hongo patógeno, nos indican que juegan un papel importante en el control biológico *in vivo* de *P. italicum*. Estas enzimas ya han sido reportadas como las principales enzimas hidrolíticas producidas por levaduras (Pedro *et al.*, 1999; Ganiger *et al.*, 2008), demostrando que su interacción con hongos patógenos trae como resultado una desintegración y colapso de sus hifas (Carsolio *et al.*, 1999; Oelofse *et al.*, 2008). Entre levaduras, las diferencias en la producción y diversidad de estas enzimas *in vitro*, puede estar relacionado con su capacidad de adaptación y asimilación de las fuentes de carbono utilizadas para su crecimiento (Castoria *et al.*, 2001), como lo fueron las paredes de *P. italicum*, usadas como inductores para estas enzimas. De manera específica, la  $\beta$ -1,3 glucanasa (también denominada glucana-1,3- $\beta$ -D glicosidasa), hidroliza las uniones  $\beta$ -D-glicosídicas de  $\beta$ -1,3 glucano (componente de la pared celular de los hongos). En el caso de las quitinasas, estas hidrolizan las uniones  $\beta$ -1,4 de N-acetil- $\beta$ -D-glicosamida de quitina y finalmente las proteasas, hidrolizan las proteínas, específicamente las manoproteínas que componen la pared celular de los hongos (Fleuri y Harumi-Sato, 2005; Pimenta *et al.*, 2008). Aunque muchos microorganismos son capaces de producir este tipo de enzimas, en el caso particular de las levaduras, su determinación, es uno de los criterios de selección de nuevos agentes de control biológico (Castoria *et al.*, 1997).

Las investigaciones sobre estos compuestos extracelulares producidos por levaduras, han demostrado que su producción y acumulación reducen el crecimiento de los patógenos y la infección de estos hacia el hospedero (Punja y Utkhede, 2003).

### **Efecto del factor *killer* sobre el hongo *Penicillium italicum***

La inhibición del hongo *P. italicum* estuvo relacionado con la producción de toxinas *killer*, las cuales son péptidos con actividad antimicrobiana cuya acción y producción es sumamente dependiente del pH del medio. Las levaduras que no tuvieron la capacidad de inhibir al hongo en todos los pHs analizados (Tabla 12), no significa que no tenga un potencial como agente de control biológico, ya que producen algunas otras sustancias extracelulares como las enzimas hidrolíticas (Fig. 12), las cuales también juegan un papel importante dentro de la inhibición de hongos. La mayoría de las toxinas *killer* descritas hasta el momento han demostrado actividad dentro de los pHs ajustados en nuestro experimento (Llorente *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2009), siendo el medio YMB, uno de los más comúnmente utilizados para la detección de la actividad *killer* en levaduras (Santos y Marquina, 2004). La variación en la respuesta de las distintas *D. hansenii* hacia la inhibición de *P. italicum* estuvo relacionada con el medio de cultivo y las condiciones óptimas necesarias (como la temperatura y pH) para la producción de la toxina *killer* de cada levadura, presentando diferentes capacidades de inhibición hacia el hongo (Fig. 13). Este efecto antagónico también se encuentra vinculado con el número de sitios activos (receptores) presentes en la pared celular del hongo *P. italicum* (Buzzini y Martini, 2000), identificándose a (1-6)- $\beta$ -D-Glucano, como el principal receptor de la toxina (Al-Aidroos y Bussey, 1978; Conti *et al.*, 2008), la cual se fija sobre los receptores glucídicos de la pared celular interfiriendo en el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, lo que implica la muerte celular (Rodríguez *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2007). En el control biológico de mohos (ocasionados principalmente por *P. italicum* y *P. digitatum*), se ha limitado la aplicación de levaduras con capacidad de producir esta toxina, debido a que estas proteínas pierden su actividad en pH por arriba de 5.5 (Magliani *et al.*, 1997; Sangorrín *et al.*, 2008), resultado muy similar a lo obtenido en nuestro experimento donde ninguna levadura tuvo actividad de inhibición hacia el hongo patógeno en el pH 5.4 (Tabla 12).

## **6. CAPÍTULO: Cuantificación de la protección poscosecha de frutos de limón mexicano inoculados con levaduras *Debaryomyces hansenii* hacia la pudrición del moho azul ocasionada por *Penicillium italicum* bajo condiciones ambientales y de almacenamiento.**

### **6.1. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Inoculación de frutos de limón mexicano con *Debaryomyces hansenii* y *Penicillium italicum***

##### **Levaduras antagónicas**

Se utilizaron doce levaduras *D. hansenii* y una levadura de referencia de *Pichia guilliermondii* (perteneciente a la colección de levaduras del Centro de Biotecnología Genómica del IPN). Los microorganismos fueron cultivados en matraz erlenmeyer con 50 mL de medio YMB (Conteniendo: 0.3% extracto de levadura, 0.3% extracto de malta, 1% glucosa, 0.5% peptona y 2% agar) durante 24 h a 25° C y 100 rpm. Las levaduras fueron cosechadas por centrifugación y ajustada su concentración utilizando un hematocitómetro (He *et al.*, 2003).

##### **Hongo patógeno**

*Penicillium italicum* fue sembrado en placas con medio Agar Papa-Dextrosa (39g/L<sup>-1</sup>, PDA, Difco®) durante siete días a 25° C. Las esporas fueron cosechadas suspendiéndolas en agua destilada estéril conteniendo 0.05% (v/v) de Tween 80, ajustando su concentración a 10<sup>4</sup> esporas mL<sup>-1</sup>, mediante un hematocitómetro (Tian *et al.*, 2002).

##### **Inoculación de frutos**

Los frutos de limón mexicano provinieron de huertas en producción del municipio de Llera, Tamaulipas, los cuales fueron lavados con agua corriente y desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min (Yao *et al.*, 2004), posteriormente se dejaron secar por 1 h antes de ser heridos e inoculados. Los frutos fueron inmersos en cada solución de levadura (a una concentración de 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>), durante 5 min, se dejaron secar y se les realizó una herida de aproximadamente 2 mm de ancho por 1 mm de profundidad con la ayuda de un escarpelo estéril, depositando en cada herida 20 µl de la suspensión del hongo (a una concentración de 10<sup>4</sup> esporas mL<sup>-1</sup>). Un grupo de frutos fue tratado con una solución de fungicida imazalil (enilconazol) a una concentración de 500 mg L<sup>-1</sup> (dosis comúnmente aplicada en las



empacadoras cítricas de México) durante 2 min, se les realizó la misma herida e inoculó a la misma dosis con *P. italicum*. Los frutos fueron colocados dentro de contenedores de plástico estéril. Se realizaron dos lotes de frutos con todos los tratamientos para su posterior almacenamiento.

### **Protección *in vivo* de limón mexicano a temperatura ambiente y almacenamiento**

Un lote de frutos de limón mexicano fue conservado a 25° C y 85% de HR (humedad relativa) y otro fue almacenado a 13° C y 90% de HR en una cámara ambiental (KBF 720, Binder®). La incidencia de la enfermedad y el tamaño de lesión fueron cuantificados después de quince días. Se realizaron diez repeticiones por tratamiento (Tabla 13) y el experimento fue conducido dos veces.

**Tabla 13.** Tratamientos de limón mexicano con *Debaryomyces hansenii* y *Penicillium italicum* bajo dos condiciones ambientales diferentes: temperatura ambiente y de almacenamiento.

| <b>Clave</b> | <b>Tratamiento</b>                                |
|--------------|---|
| Hongo        | <i>Penicillium italicum</i>                       |
| HL001        | <i>D. hansenii</i> DhhBCS001 + <i>P. italicum</i> |
| HL002        | <i>D. hansenii</i> DhhBCS002 + <i>P. italicum</i> |
| HL003        | <i>D. hansenii</i> DhhBCS003 + <i>P. italicum</i> |
| HL004        | <i>D. hansenii</i> DhhBCS004 + <i>P. italicum</i> |
| HL005        | <i>D. hansenii</i> DhhBCS005 + <i>P. italicum</i> |
| HL006        | <i>D. hansenii</i> DhhBCS006 + <i>P. italicum</i> |
| HL007        | <i>D. hansenii</i> DhhBCS007 + <i>P. italicum</i> |
| HLf001       | <i>D. hansenii</i> DhfBCS001 + <i>P. italicum</i> |
| HLf002       | <i>D. hansenii</i> DhfBCS002 + <i>P. italicum</i> |
| HL1          | <i>D. hansenii</i> LL1 + <i>P. italicum</i>       |
| HL2          | <i>D. hansenii</i> LL2 + <i>P. italicum</i>       |
| HL3          | <i>D. hansenii</i> LL3 + <i>P. italicum</i>       |
| HPg          | <i>P. guillermondii</i> CBG + <i>P. italicum</i>  |
| Ima          | Fungicida imazalil + <i>P. italicum</i>           |

### Evaluación *in vivo* de diferentes dosis de levaduras para controlar a *Penicillium italicum*

Frutos de limón mexicano fueron desinfectados, heridos e inoculados (tratamientos descritos anteriormente) con las mejores levaduras antagonicas (levaduras DhhBCS005, DhhBCS006, LL1, LL2 y CBG, seleccionadas del experimento anterior) y *P. italicum*, para conocer la dosis mínima requerida de cada levadura para control al hongo sobre los frutos de limón. Se utilizo la misma dosis del patógeno, variando la concentración de levadura en los frutos, aplicándoles  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de cada levadura *D. hansenii*. Un lote de frutos fue conservado a 25° C y 85% HR (humedad relativa) y otro a 13° C y 90% HR en una cámara ambiental (KBF 720, Binder®). La incidencia de la enfermedad y el tamaño de lesión fueron cuantificados a los quince días y se realizaron diez repeticiones por tratamiento (Tabla 14) y el experimento fue llevado a cabo dos veces.

**Tabla 14.** Dosis de aplicación de *Debaryomyces hansenii* en frutos de limón mexicano para su protección poscosecha contra *Penicillium italicum*.

| Clave  | Tratamiento  | Dosis                           |
|--------|--|---------------------------------|
| Hongo  | <i>Penicillium italicum</i>                          | $10^4$ conidas $\text{mL}^{-1}$ |
| HL003a | <i>D. hansenii</i> DhhBCS003 + <i>P. italicum</i>    | $10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL003b | <i>D. hansenii</i> DhhBCS003 + <i>P. italicum</i>    | $10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL003c | <i>D. hansenii</i> DhhBCS003 + <i>P. italicum</i>    | $10^8$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL005a | <i>D. hansenii</i> DhhBCS005 + <i>P. italicum</i>    | $10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL005b | <i>D. hansenii</i> DhhBCS005 + <i>P. italicum</i>    | $10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL005c | <i>D. hansenii</i> DhhBCS005 + <i>P. italicum</i>    | $10^8$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL006a | <i>D. hansenii</i> DhhBCS006 + <i>P. italicum</i>    | $10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL006b | <i>D. hansenii</i> DhhBCS006 + <i>P. italicum</i>    | $10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL006c | <i>D. hansenii</i> DhhBCS006 + <i>P. italicum</i>    | $10^8$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL1a   | <i>D. hansenii</i> LL1 + <i>P. italicum</i>          | $10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL1b   | <i>D. hansenii</i> LL1 + <i>P. italicum</i>          | $10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL1c   | <i>D. hansenii</i> LL1 + <i>P. italicum</i>          | $10^8$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL2a   | <i>D. hansenii</i> LL2 + <i>P. italicum</i>          | $10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL2b   | <i>D. hansenii</i> LL2 + <i>P. italicum</i>          | $10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HL2c   | <i>D. hansenii</i> LL2 + <i>P. italicum</i>          | $10^8$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HPga   | <i>P. guillermondii</i> CBG + <i>P. italicum</i>     | $10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HPgb   | <i>P. guillermondii</i> CBG + <i>P. italicum</i>     | $10^6$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| HPgc   | <i>P. guillermondii</i> CBG + <i>P. italicum</i>     | $10^8$ células $\text{mL}^{-1}$ |
| Ima    | Fungicida imazalil <sup>c</sup> + <i>P. italicum</i> | 500 mg $\text{L}^{-1}$          |

**Análisis estadístico**

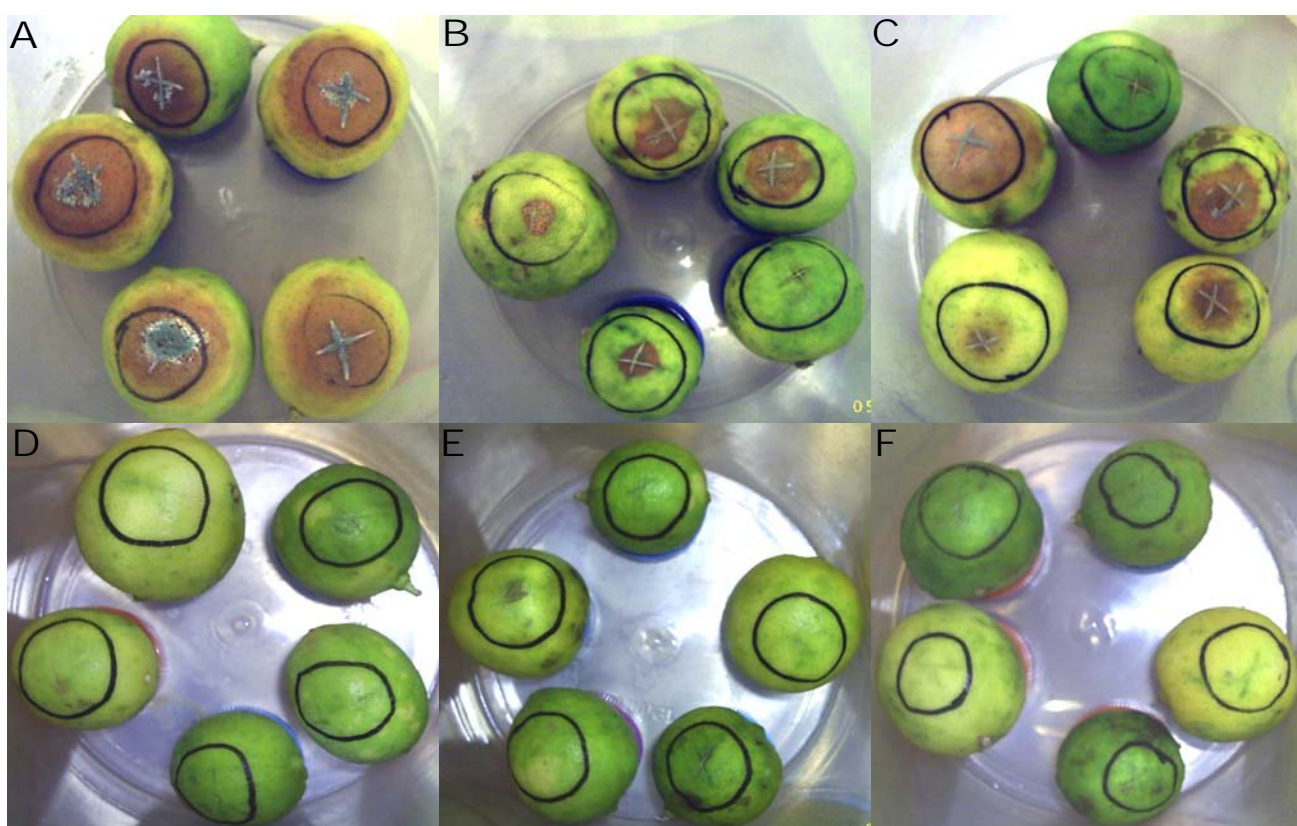
Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, mediante el paquete estadístico STADISTICA (Versión 6.0, StatSoft, Tulsa, OK). Se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) para separar las medias de los tratamientos. Las diferencias entre los tratamientos fueron consideradas estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

## 6.2. RESULTADOS

### Protección de levaduras *Debaryomyces hansenii* en limón mexicano para disminuir el daño del moho azul ocasionado por *Penicillium italicum*

#### Temperatura ambiente (25° C y 85% de humedad relativa-HR)

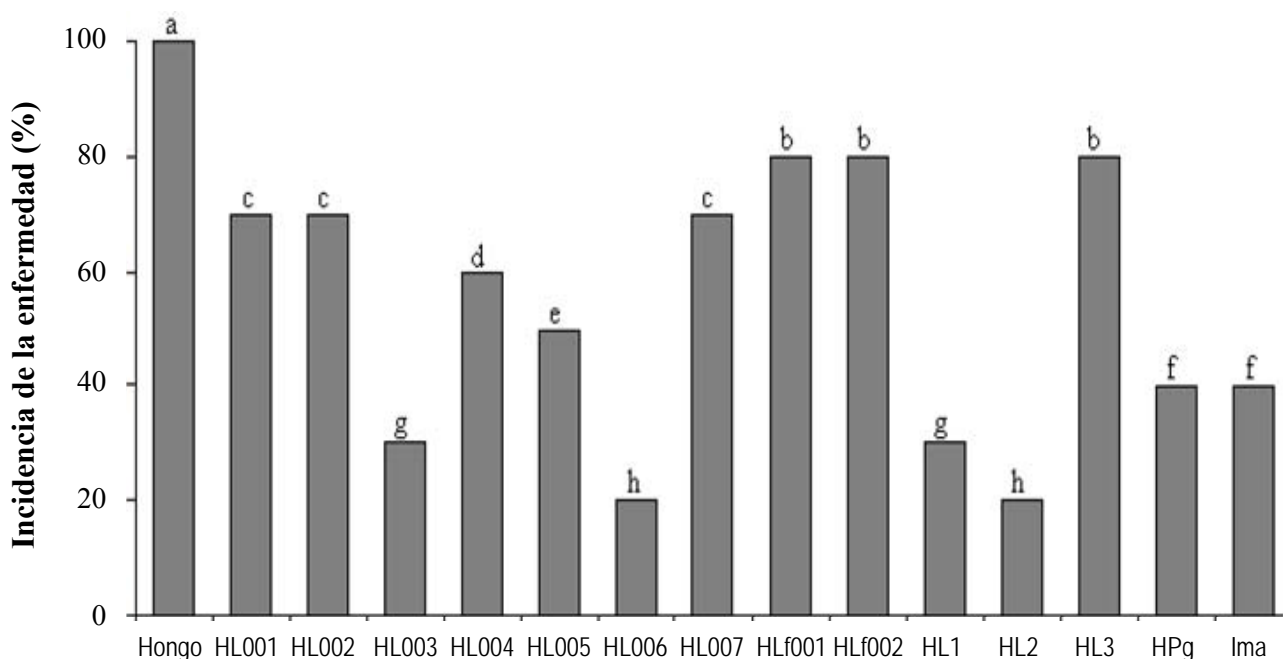
Se cuantificaron diversos niveles de protección de los frutos de limón mexicano inoculados con las distintas levaduras de *Debaryomyces hansenii* hacia la pudrición ocasionada por el hongo patógeno en poscosecha *Penicillium italicum* (Fig. 14).



**Figura 14.** Niveles de protección de distintas *Debaryomyces hansenii* hacia la pudrición del moho azul ocasionada por el hongo patógeno *Penicillium italicum* (A) inoculado en frutos de limón mexicano y (B) DhhBCS001, (C) LL3, (D) DhhBCS005, (E) DhhBCS006 y (F) LL2. Los frutos fueron almacenados durante dos semanas a 25° C y 85% HR

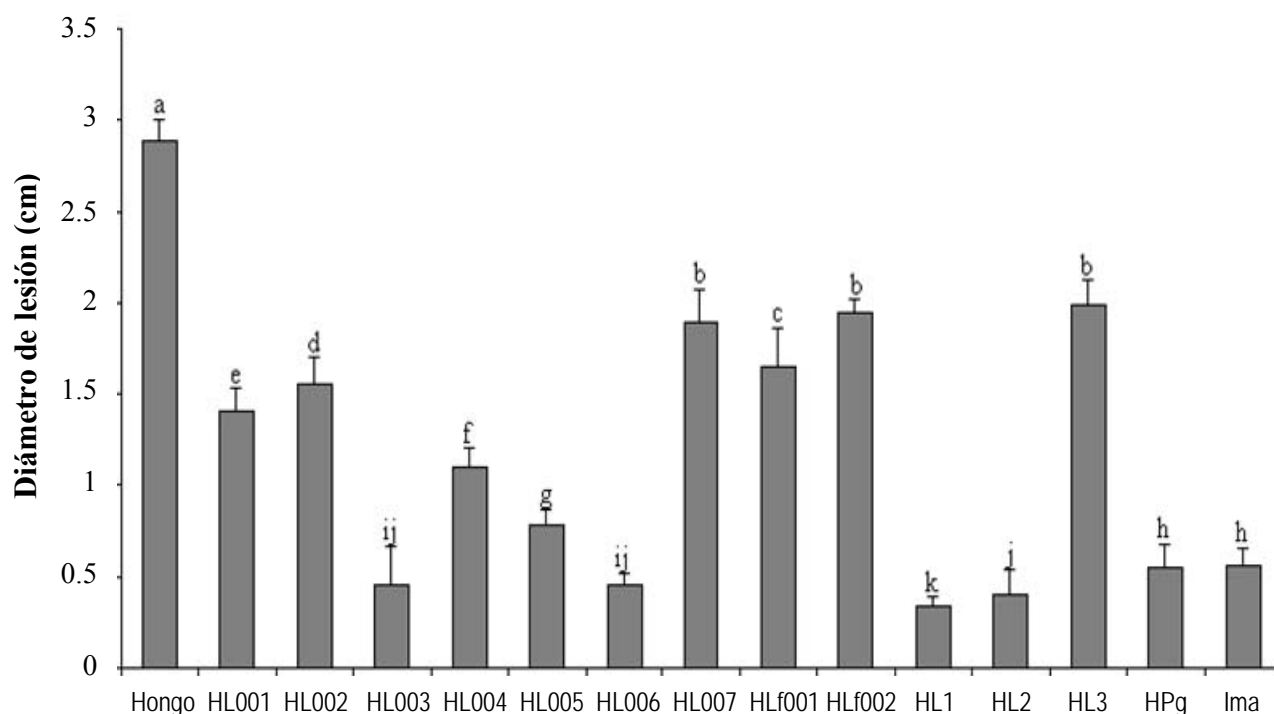
En los frutos de limón inoculados con las distintas levaduras *D. hansenii* y *P. italicum*, se cuantificaron diversos niveles de incidencia de la enfermedad (Fig 15). Con todas las levaduras se disminuyó significativamente el número de heridas infectadas por moho azul

ocasionado por el hongo *P. italicum*. Estadísticamente ( $P < 0.05$ ) la mayor protección de heridas fueron los frutos inoculados con las levaduras DhhBCS006 (HL006) y LL2 (HL2), las cuales junto con las levaduras DhhBCS003 (HL003) y LL1 (HL1), superaron la protección ejercida por el fungicida imazalil (Ima). Aunque el tratamiento de los limones con las distintas levaduras no lograron inhibir en su totalidad a la pudrición ocasionada el hongo patógeno, se verificó que la magnitud de la misma (determinada como el diámetro de la zona afectada) fue significativamente menor que en el tratamiento control (Hongo). Con la levadura *Pichia guilliermondii* (HPg) se cuantificó la misma incidencia que el tratamiento con el fungicida Imazalil (Ima). Los frutos inoculados solo con el hongo presentaron el 100% de pudrición de moho azul.



**Figura 15.** Incidencia de la pudrición ocasionada por *Penicillium italicum* en frutos de limón mexicano protegidos por levaduras *Debaryomyces hansenii*. Donde: (HL001) DhhBSC001, (HL002) DhhBCS002, (HL003) DhhBCS003, (HL004) DhhBCS004, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL007) DhhBCS007, (Hlf001) DhfBCS001, (Hlf002) DhfBCS002, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HL3) LL3, (Hpg) *Pichia guilliermondii* e (Ima) Fungicida imazalil. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P < 0.05$ ). Evaluación a los quince días de inoculados los frutos con levadura ( $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y hongo ( $10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ), almacenados a  $25^\circ \text{C}$  y 85% HR.

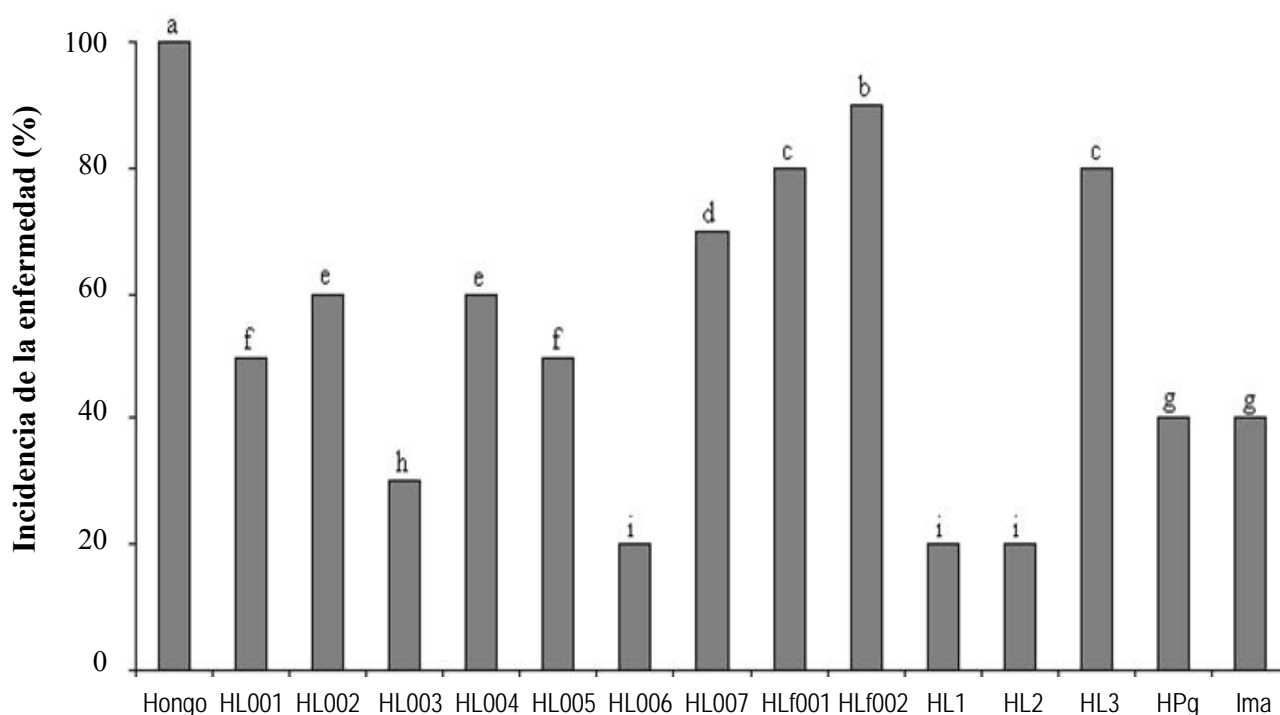
Para el caso del diámetro de lesión, se cuantificaron diversos tamaños sobre los frutos de limón mexicano inoculados con levadura *D. hansenii* y el hongo *P. italicum* (Fig. 16). La levadura LL1 (HL1), fue la que disminuyó significativamente ( $P<0.05$ ) las lesiones ocasionadas por el hongo, esta levadura junto con la DhhBCS003 (HL003), DhhBCS006 (HL006) y LL2 (HL2) fueron mejores que el tratamiento con el fungicida imazalil (Ima) utilizado comúnmente en las empacadoras para el control de las pudriciones del moho azul en limón mexicano. La levadura *Pichia guillermondii* (HPg) tuvo el mismo nivel de protección que el fungicida imazalil aplicado a los frutos. El nivel más alto en el diámetro de lesión fueron los frutos inoculados solo con el hongo *P. italicum*.



**Figura 16.** Tamaño de lesión en limones inoculados con *Penicillium italicum* y protegidos por *Debaryomyces hansenii*. Donde: (HL001) DhhBSC001, (HL002) DhhBCS002, (HL003) DhhBCS003, (HL004) DhhBCS004, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL007) DhhBCS007, (HLf001) DhfBCS001, (HLf002) DhfBCS002, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HL3) LL3, (Hpg) *Pichia guillermondii* e (Ima) Fungicida imazalil. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P<0.05$ ). Evaluación a los quince días de inoculados los frutos con levadura ( $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y hongo ( $10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ), almacenados a  $25^\circ\text{C}$  y 85% HR.

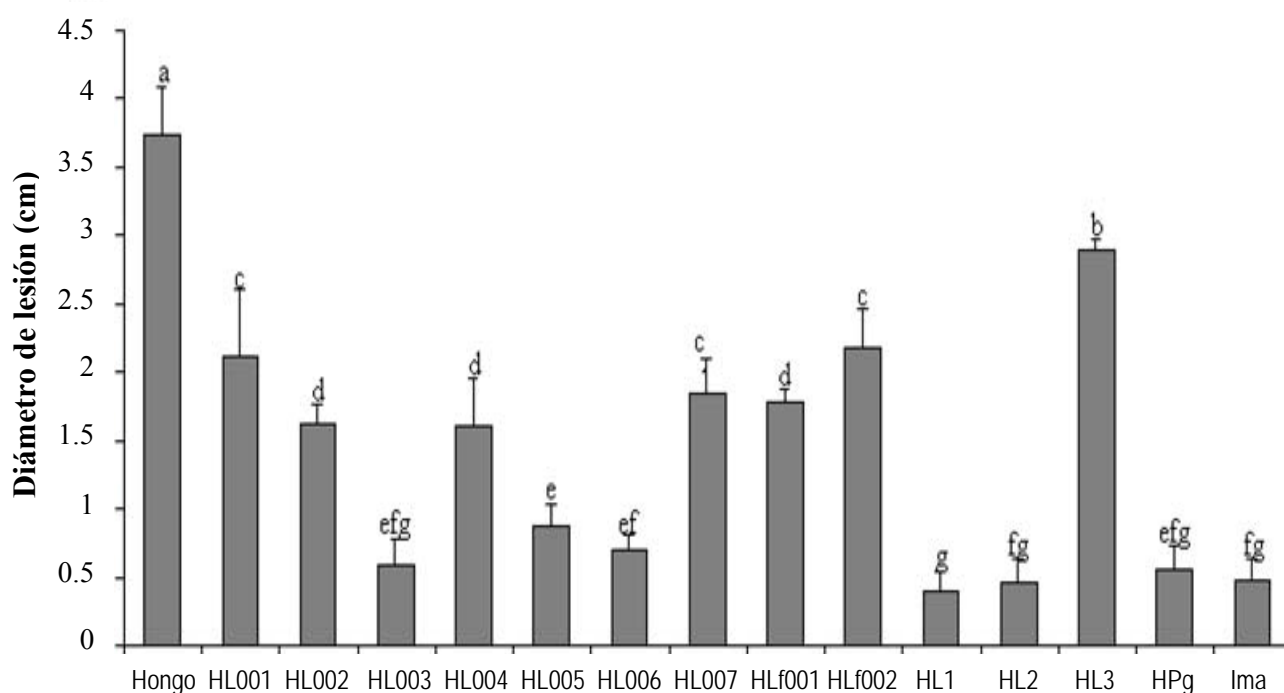
### Temperatura de almacenamiento (13° C y 90% de humedad relativa-HR)

Bajo las condiciones de almacenamiento los frutos de limón mexicano inoculados con las levaduras *D. hansenii* y *P. italicum*, presentaron diferentes niveles de incidencia del moho azul (Fig. 17). Estadísticamente ( $P < 0.05$ ) los mejores tratamientos fueron las levaduras DhhBCS006 (HL006), LL1 (HL1) y LL2 (HL2), las cuales junto con DhhBCS003 (HL3), disminuyeron a las pudriciones ocasionadas por el hongo patógeno en comparación con los frutos tratados con el fungicida imazalil (Ima). El porcentaje de heridas infectadas en los frutos inoculados solo con *P. italicum* (Hongo) presentaron el 100% de pudriciones por moho azul.



**Figura 17.** Incidencia de la pudrición ocasionada por *Penicillium italicum* en frutos de limón mexicano protegidos por levaduras *Debaryomyces hansenii* bajo condiciones de almacenamiento. Donde: (HL001) DhhBSC001, (HL002) DhhBCS002, (HL003) DhhBCS003, (HL004) DhhBCS004, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL007) DhhBCS007, (HLf001) DhfBCS001, (HLf002) DhfBCS002, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HL3) LL3, (Hpg) *Pichia guillermondii* e (Ima) Fungicida imazalil. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P < 0.05$ ). Evaluación a los quince días de inoculados los frutos con levadura ( $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y hongo ( $10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). Los limones fueron almacenados a 13° C y 90% HR.

En el diámetro de lesión cuantificado en los frutos de limón inoculados con las levaduras *D. hansenii* y el hongo *P. italicum* se presentaron variaciones en el tamaño de lesión (Fig. 18). Estadísticamente ( $P < 0.05$ ) el mejor tratamiento fueron los frutos inoculados con la levadura LL1 (HL1), la cual tuvo los niveles más bajos en diámetro de lesión comparado con los frutos tratados con el fungicida imazalil (Ima), el cual su protección es similar al obtenido con la aplicación de la levadura LL2 (HL2). La levadura *Pichia guilliermondii* (HPg) tuvo el mismo nivel de protección en los frutos que DhhBCS003 (HL003), seguida de la levadura DhhBCS006 (HL006). El máximo valor alcanzado en tamaño de lesión fue donde solo se inoculo el hongo *P. italicum* (Hongo) en comparación con los demás tratamientos.

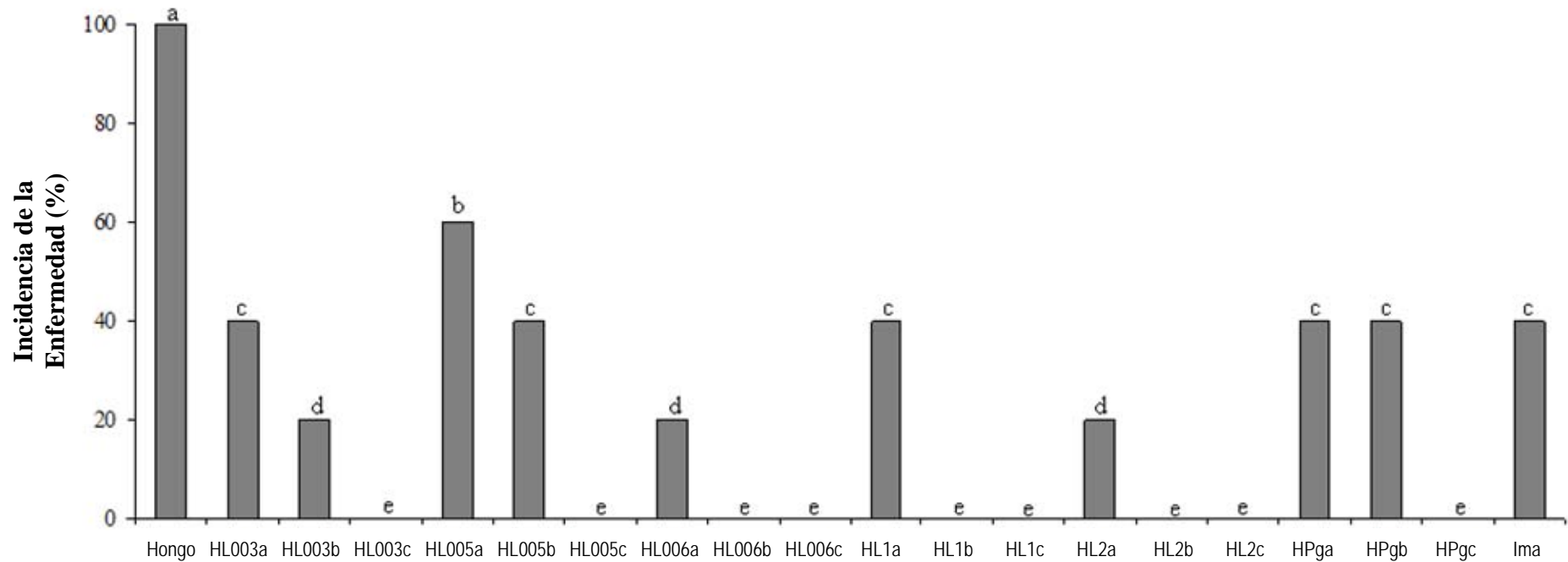


**Figura 18.** Tamaño de lesión en limones inoculados con *Penicillium italicum* y *Debaryomyces hansenii* en almacenamiento. Donde: (HL001) DhhBSC001, (HL002) DhhBCS002, (HL003) DhhBCS003, (HL004) DhhBCS004, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL007) DhhBCS007, (HLf001) DhfBCS001, (HLf002) DhfBCS002, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HL3) LL3, (Hpg) *Pichia guilliermondii* e (Ima) Fungicida imazalil. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P < 0.05$ ). Evaluación a los quince días de inoculados los frutos con levadura ( $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y hongo ( $10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). Los limones fueron almacenados a  $13^\circ \text{C}$  y 90% HR.

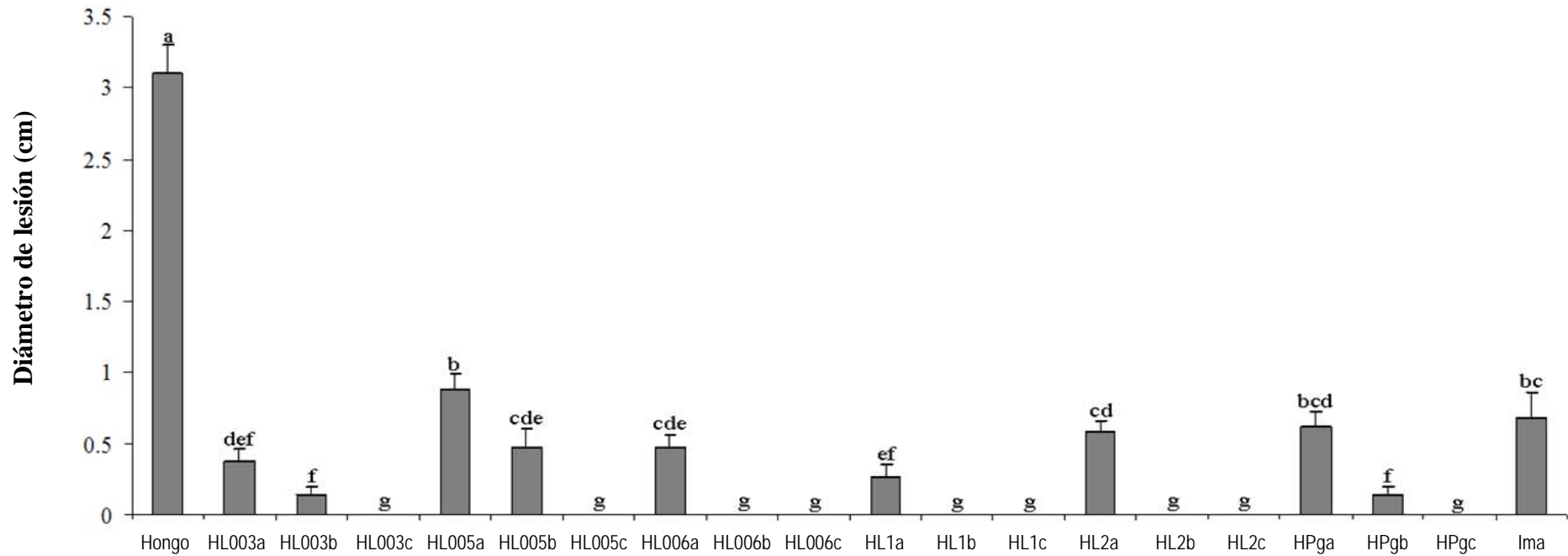


### **Efecto de la dosis de levadura para el control del moho azul en limón mexicano bajo condiciones ambientales (25° C y 85% HR)**

Con base a los resultados anteriores se aplicaron las mejores levaduras antagónicas (DhhBCS003, DhhBCS005, DhhBCS006, LL1, LL2 y *Pichia guillermondii* (levadura de referencia) en tres dosis de aplicación  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , disminuyendo en diferentes niveles la incidencia de la enfermedad ocasionada por *Penicillium italicum* en los frutos de limón mexicano (Fig. 19). Los limones inoculados con la dosis más baja de cada levadura (referencia con la letra “a”), no fueron protegidos al 100% contra la pudrición del moho azul, sin embargo con la dosis intermedia (referencia con la letra “b”), no existieron pudriciones por el hongo patógeno en los frutos tratados con las levaduras DhhBCS006 (HL006b), LL1 (HL1b) y LL2 (HL2b), con la dosis más alta de levadura (referencia con la letra “c”), los frutos inoculados con todas las *D. hansenii* seleccionadas no presentaron signos de pudrición, protegiéndolos en un 100%, aunque la protección de los frutos fue variable según la levadura y la dosis de aplicación, en todos los casos estadísticamente ( $P < 0.05$ ) la presencia del moho azul en frutos inoculados con levaduras fue menor al tratamiento solo con el hongo patógeno (Hongo). Los frutos de limón mexicano tratados con el fungicida imazalil (Ima) presentaron un 40% de incidencia de la enfermedad, siendo el mayor porcentaje de heridas infectadas (100%) los frutos inoculados solo con *P. italicum*. En cuanto al diámetro de lesión de los limones inoculados con *D. hansenii* y el hongo patógeno se cuantificaron diversos tamaños de lesión (Fig. 20). Todas las levaduras estadísticamente ( $P < 0.05$ ) protegieron a los limones en comparación al daño ocasionado solo con el hongo patógeno. Los frutos inoculados con la dosis más baja de levadura ( $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), no logro inhibir la lesión ocasionado por el moho azul, sin embargo con la dosis de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  las levaduras que protegieron al 100% los limones fueron las DhhBCS006 (HL006b), LL1 (HL1b) y LL2 (HL2b) y con la dosis más alta de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de cada *D. hansenii* no existió diámetro de lesión de los frutos al no presentar heridas infectadas por moho azul, por lo que las levaduras protegieron al 100% a los frutos de limón mexicano. El tratamiento de los frutos con el fungicida imazalil (Ima), solo supero a los limones inoculados con la levadura DhhBCS005 en la dosis más baja (HL005a).



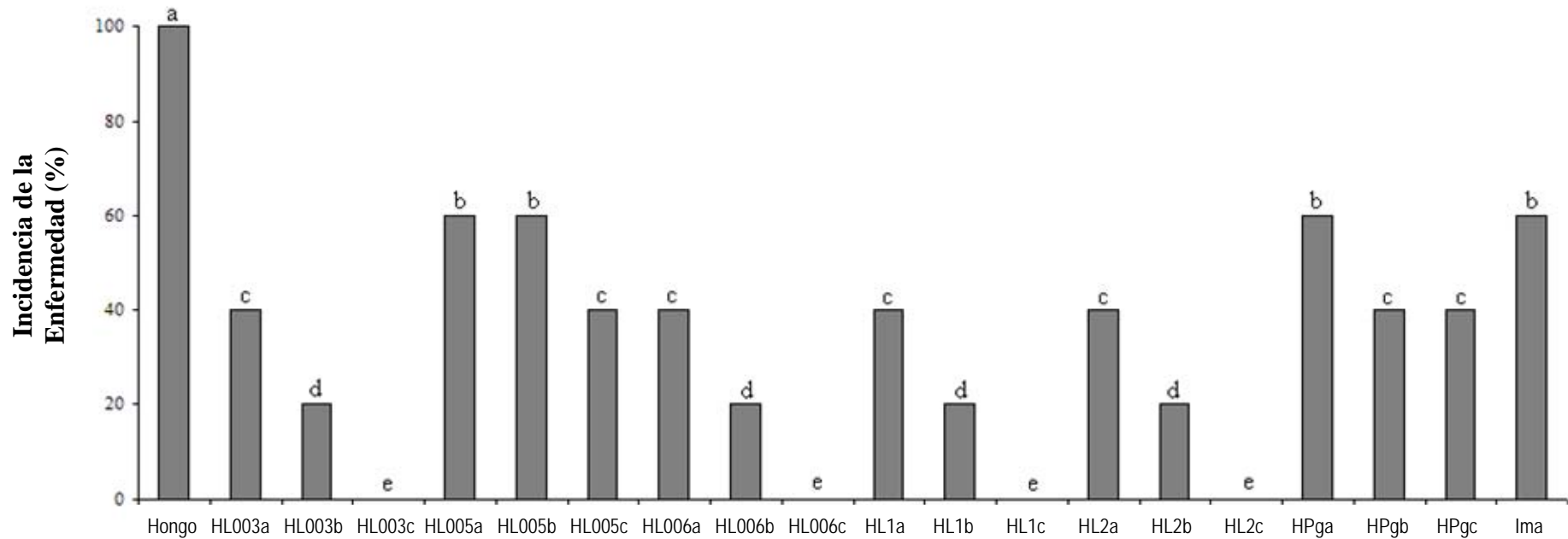
**Figura 19.** Incidencia de la pudrición ocasionada por *Penicillium italicum* en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de *Debaryomyces hansenii*. Las levaduras seleccionadas fueron: (HL003) DhhBCS003, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HPg) *Pichia guillermondii* y (Ima) Fungicida imazalil. Donde “a” es  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , “b” es  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  y “c” es  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de levadura. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P < 0.05$ ). Evaluación a los quince días de almacenados los frutos a  $25^\circ \text{C}$  y 85% HR.



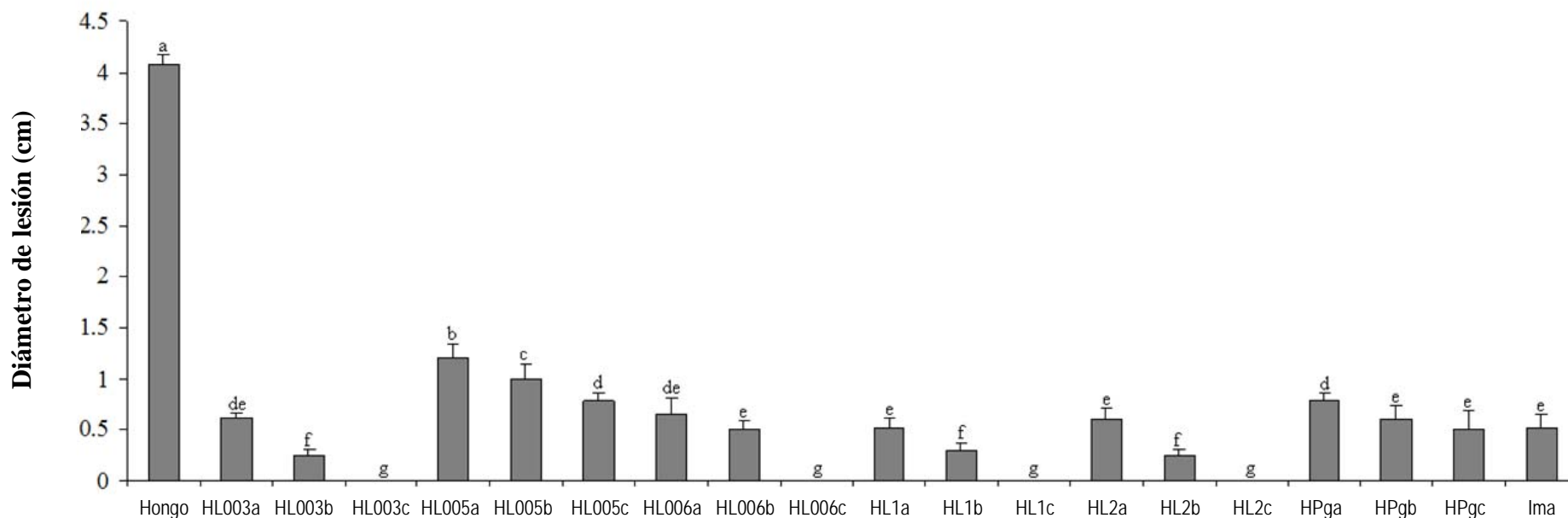
**Figura 20.** Diámetro de lesión ocasionado por *Penicillium italicum* en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de *Debaryomyces hansenii*. Las levaduras seleccionadas fueron: (HL003) DhhBCS003, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HPg) *Pichia guilliermondii* y (Ima) Fungicida imazalil. Donde “a” es  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , “b” es  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  y “c” es  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de levadura. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P < 0.05$ ). Evaluación a los quince días de almacenados los frutos a  $25^\circ \text{C}$  y 85% HR.

### **Efecto de la dosis de levadura para el control del moho azul en limón mexicano bajo condiciones de almacenamiento (13° C y 90% HR)**

En la incidencia de la enfermedad evaluada en frutos de limón mexicano inoculados con tres distintas dosis de levaduras *D. hansenii* para la protección contra el moho azul, se cuantificaron diversos niveles de protección (Fig. 21). La máxima protección (100%) se alcanzó con la dosis más alta de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de DhhBCS003 (HL003c), DhhBCS006 (HL006c), LL1 (HL1c) y LL2 (HL2c). La levadura *Pichia guillermondii* (HPg) en ninguna de sus dosis logró una protección del 100% sobre los frutos de limón inoculados con el hongo patógeno. El tratamiento de los limones con el fungicida imazalil (Ima) presentaron un incidencia del 60% del moho azul, es decir, la protección por parte del agroquímico no fue del 100%. En el diámetro de lesión solo los frutos de limón mexicano inoculados con las levaduras DhhBCS003 (HL003c), DhhBCS006 (HL006c), LL1 (HL1c) y LL2 (HL2c) tuvieron el 100% de protección al no presentar pudriciones en las heridas ocasionadas por *P. italicum* (Fig. 22). Los tratamientos con las levaduras DhhBCS006 (en su dosis de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), LL1 y LL2 (en la dosis alta de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y *P. guillermondii* (en la dosis  $10^6$  y  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) fueron estadísticamente ( $P < 0.05$ ) similares a los frutos tratados con el fungicida imazalil (Ima).



**Figura 21.** Incidencia de la pudrición ocasionada por *Penicillium italicum* en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de *Debaryomyces hansenii* bajo condiciones de almacenamiento. Las levaduras seleccionadas fueron: (HL003) DhhBCS003, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HPg) *Pichia guillermondii* y (Ima) Fungicida imazalil. Donde “a” es  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , “b” es  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  y “c” es  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de levadura. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P < 0.05$ ). Evaluación a los quince días de almacenados los frutos a  $13^\circ \text{C}$  y 90% HR.



**Figura 22.** Diámetro de lesión ocasionado por *Penicillium italicum* en frutos de limón mexicano inoculados con tres dosis de *Debaryomyces hansenii* bajo condiciones de almacenamiento. Las levaduras seleccionadas fueron: (HL003) DhhBCS003, (HL005) DhhBCS005, (HL006) DhhBCS006, (HL1) LL1, (HL2) LL2, (HPg) *Pichia guillermondii* y (Ima) Fungicida imazalil. Donde “a” es  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , “b” es  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  y “c” es  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de levadura. Letras diferentes en las columnas significan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos usando la prueba LSD ( $P < 0.05$ ). Evaluación a los quince días de almacenados los frutos a  $13^\circ \text{C}$  y 90% HR.

### 6.3. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se concluye que bajo condiciones ambientales (25° C y 85% HR) y de almacenamiento (13° C y 90% HR) existió una protección eficiente de frutos de limón mexicano inoculados con levaduras de *Debaryomyces hansenii* hacia la pudrición del moho azul ocasionada por el hongo *Penicillium italicum* (Fig. 19 y 20). Con todas las levaduras hubo una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el desarrollo del hongo patógeno, sin embargo, los niveles de protección fueron distintos. Las diferencias en la eficiencia para controlar al hongo entre las levaduras fue dado principalmente por su capacidad de crecer eficientemente en las heridas de limón (Torres *et al.*, 2006), limitando a *P. italicum* por fuentes de carbono que necesitaron para su crecimiento y multiplicación. Además la posible interacción entre levaduras con las hifas del hongo dentro de las heridas de los frutos, pudo estar relacionada con las enzimas detectadas *in vitro* (Fig. 12), las cuales jugaron un rol de importancia en el antagonismo de *P. italicum* en las heridas de los limones. Por otra parte, la efectividad de las levaduras antagónicas para el control del moho azul pudo estar condicionada también por la dosis de aplicación de las *D. hansenii* que se utilizó sobre los frutos, ya que se necesita de cierta cantidad celular de inóculo en las heridas para lograr una colonización eficiente que pueda desplazar de manera inmediata al hongo (Taqaarort *et al.*, 2008), por lo que la evaluación de la dosis de aplicación de cada levadura fue fundamental para poder encontrar la concentración ideal del antagonista que se requirió para lograr un control eficaz (Chand-Goyal y Spotts 1997; Viñas *et al.*, 1998) de *P. italicum*. Conocer la dosis fue de importancia si en un futuro se quiere implementar de manera comercial el uso de ellos en la agricultura (Janisiewicz, 1988; Kampp y Sass 1994), ya que el costo de producción del producto (inóculo de levadura), es uno de los principales factores que determinan la rentabilidad del uso y aplicación de microorganismos antagonistas en cualquier sistema agrícola (Nunes *et al.*, 2001; Kinay y Yildiz, 2008).

Cabe resaltar que los tratamientos de los frutos con algunas de las levaduras fueron estadísticamente ( $P < 0.05$ ) menores o similares a la protección ejercida por el fungicida imazalil para el control del moho azul, lo que permitió demostrar que las *D. hansenii* fueron organismos biológicos más eficientes en comparación al fungicida sintético, por lo que la aplicación de levaduras en poscosecha puede ser una opción ecológica y económica viable, ante la creciente demanda por parte del consumidor de productos agrícolas que provengan de

un manejo orgánico o bien de donde se apliquen al mínimo sustancias inorgánicas para controlar todo tipo de plagas (Nunes *et al.*, 2002; Castoria *et al.*, 2003). En el caso del fungicida imazalil, su aplicación no ejerció un control del 100% del moho azul ocasionado por *P. italicum* en los limones tratados con la dosis comercial (500 mg L<sup>-1</sup>) aplicada en las empacadoras en México, debido probablemente a que este hongo presentó un nivel de resistencia hacia el agroquímico, lo que cada vez hace más difícil su control ya que es muy común la aparición de cepas de este hongo resistentes a este fungicida (Cabañas *et al.*, 2009). La evaluación de las levaduras bajo dos condiciones ambientales controladas (temperatura ambiente y temperatura de almacenamiento), nos indicó la capacidad de nuestras levaduras para crecer y adaptarse a ambos ambientes y su efecto antagonista para el control de *P. italicum*, estas características adaptativas son de importancia para la selección de un antagonista eficaz, ya que su aplicación puede ser bajo una variedad de ambientes climáticos (Bouzerda *et al.*, 2003). Por otra parte, aunque en este trabajo no se evaluó el efecto de las levaduras sobre la posible inducción de resistencia en los limones para disminuir las pudriciones del moho azul por *P. italicum*, este pudo haber sido otro mecanismo indirecto de antagonismo promovido por las levaduras *Debaryomyces hansenii* sobre el hospedero (Jianga *et al.*, 2008), mediante la inducción de la expresión de enzimas hidrolíticas en los frutos (Xiangbin *et al.*, 2008). Finalmente, las levaduras DhhBCS003, DhhBCS006, LL1 y LL2 en sus dosis más altas, evidenciaron tener sobre los limones bajo condiciones ambientales y de almacenamiento, niveles de protección superiores al tratamiento con el fungicida imazalil, por lo que el uso de estas *D. hansenii* marinas y epífitas de limón mexicano, pueden ser consideradas como una alternativa al tratamiento poscosecha tradicional basado en la aplicación de fungicidas sintéticos (Janisiewicz y Kurtzman, 2008).



## 7. DISCUSIÓN GENERAL

La detección e identificación de *Penicillium italicum* como el agente causal del moho azul del limón mexicano, reviste importancia ya que es uno de los principales hongos patógenos responsables de pérdidas en poscosecha en alrededor del 40% de la producción total de los cítricos (Ochoa *et al.*, 2007). Aunque existe la presencia de dicho hongo en el Estado de Colima, líder en producción de limón mexicano, no había sido identificado anteriormente (Álvarez, 1981; Besoain *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 2000) en México (Hernández-Montiel y Ochoa, 2007). El control del moho azul se basa principalmente en la aplicación de fungicidas sintéticos como el imazalil y tiabendazol. Sin embargo, su aplicación ha tenido restricciones, debido principalmente a la aparición de cepas resistentes a estos fungicidas y a un posible efecto negativo sobre el ambiente y la salud humana (Eckert *et al.*, 1994), además, en la actualidad existe una demanda de los consumidores por productos agrícolas que provengan de un sistema de manejo agronómico donde la aplicación de químicos (como fungicidas, insecticidas, entre otros) sea poca o nula, por lo que la búsqueda de alternativas para el control de este tipo de enfermedades, es relevante en todo el mundo. En años recientes, el control biológico a base de microorganismos, ha sido una alternativa hacia la aplicación de fungicidas químicos (Zhang *et al.*, 2005). Las levaduras han mostrado tener un alto potencial como antagonistas hacia hongos patógenos en poscosecha, sus principales mecanismos de control biológico se basan en la competencia de espacio y nutrientes (Chang-Goyal y Spotts, 1996), producción de enzimas líticas (Bar-Shimon *et al.*, 2004) y toxinas *killer* (Santos y Marquina, 2004). El conocimiento de los mecanismos de acción ejercidos por las levaduras es crucial para la selección de nuevos agentes de control biológico, por lo que en nuestro estudio se caracterizó una colección de levaduras *Debaryomyces hansenii*, para determinar su capacidad de competencia por espacio y nutrientes, enzimas hidrolíticas, toxinas *killer* y su nivel de protección poscosecha de frutos de limón mexicano hacia el hongo *P. italicum*.

Las levaduras *D. hansenii* presentaron una capacidad *in vitro* para inhibir al hongo, mediante la competencia de fuentes de carbono provenientes del sustrato de los medios flavedo y albedo de limón, presentando las levaduras un exponencial en el crecimiento a partir de las 16 h de inoculados ambos medios. Lo anterior originó que se agotaran rápidamente las fuentes de carbono disponibles en dichos sustratos, limitando y desplazando a *P. italicum* en su crecimiento micelial. La dinámica poblacional es una variable importante para la selección de

microorganismos antagonistas, ya que un crecimiento exponencial sobre las heridas, permite una mayor cobertura en la colonización, protegiendo los posibles sitios de infección para los hongos patógenos (Nunes *et al.*, 2001b). Por otra parte, el hongo necesita de fuentes de energía para la germinación de sus esporas, sin embargo, se vio limitado en estos compuestos por la presencia de *D. hansenii* en los medios de cultivo, ejerciendo las levaduras un control biológico del hongo mediante el mecanismo de competencia por espacio y nutrientes (Bencheqroun *et al.*, 2007), limitando al patógeno en la producción de enzimas líticas como la  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanasa fundamentales para la infección de los frutos (Santos *et al.*, 1977; Miedes y Lorences, 2006; Qin *et al.*, 2007). La competencia por nutrientes es un factor determinante en la infección de los frutos, seleccionar un microorganismo altamente eficiente en la asimilación de fuentes de carbono, puede limitar el crecimiento de los hongos, coadyuvando a la protección de los frutos, al disminuir su desarrollo y capacidad infectiva hacia tejidos heridos (Janisiewicz y Tworkoski, 1998).

Existió producción de enzimas hidrolíticas  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y proteasa por las distintas levaduras *D. hansenii* en presencia de las paredes del hongo patógeno. Estos compuestos ya han sido reportados en levaduras (Ganiger *et al.*, 2008), demostrando que su presencia causa una desintegración y colapso de las hifas de los hongos (Oelofse *et al.*, 2008). Entre levaduras, las diferencias en la producción y diversidad de estas enzimas *in vitro*, puede estar relacionado con su capacidad de adaptación y asimilación de las fuentes de carbono utilizadas para su crecimiento (Castoria *et al.*, 2001), como lo fueron las paredes de *P. italicum*, usadas como inductores para estas enzimas. Aunque numerosos microorganismos son capaces de producir este tipo de enzimas, en el caso particular de las levaduras, su determinación es uno de los criterios de selección de nuevos agentes de control biológico (Castoria *et al.*, 1997). Las investigaciones sobre dichos compuestos extracelulares, han demostrado que reducen el crecimiento de los patógenos y la infección de los mismos hacia el hospedero (Punja y Utkhede, 2003).

Por otra parte, la inhibición *in vitro* de *D. hansenii* hacia *P. italicum* estuvo relacionada con la producción de toxinas *killer*, las cuales son péptidos con actividad antimicrobiana cuya acción y producción es sumamente dependiente del pH del medio. Las levaduras que no tuvieron la capacidad de inhibir al hongo en todos los pHs analizados, no significa que tengan poco potencial como agentes de control biológico, ya que producen algunas otras sustancias extracelulares como las enzimas hidrolíticas. La mayoría de las toxinas *killer* descritas hasta

el momento han demostrado actividad dentro de los pHs ajustados en la presente investigación (Santos *et al.*, 2009), siendo el medio YMB, uno de los más comúnmente utilizados para la detección de la actividad *killer* en levaduras (Santos y Marquina, 2004). La variación en la respuesta de las distintas cepas de *D. hansenii* hacia la inhibición de *P. italicum* estuvo relacionada con el medio de cultivo y las condiciones óptimas necesarias (como la temperatura y pH) para la producción de la toxina *killer* de cada levadura, presentando diferentes capacidades de inhibición hacia el hongo. El efecto antagónico también se encuentra vinculado con el número de sitios activos (receptores) presentes en la pared celular del hongo *P. italicum* (Buzzini y Martini, 2000), identificándose a (1-6)- $\beta$ -D-Glucano, como el principal receptor de la toxina (Conti *et al.*, 2008). Mediante dicho mecanismo, la toxina se fija sobre los receptores glucídicos de la pared celular interfiriendo en el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, lo que implica la muerte celular (Santos *et al.*, 2007).

Finalmente, cuando las levaduras fueron probadas sobre frutos de limón mexicano, para cuantificar los niveles de protección hacia *P. italicum* bajo condiciones ambientales (25° C y 85% HR) y de almacenamiento (13° C y 90% HR), se observó que todas las *D. hansenii* disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) el desarrollo del hongo patógeno, sin embargo, los niveles de protección fueron distintos. Las diferencias en la eficiencia para controlar al hongo entre las levaduras se debieron principalmente a la variabilidad en su capacidad de crecer eficientemente en las heridas de limón (Torres *et al.*, 2006), limitando a *P. italicum* por fuentes de carbono que necesitaron para su crecimiento y multiplicación. La evaluación de distintas dosis de aplicación de las levaduras antagónicas para el control del moho azul fue de suma importancia, ya que se necesita conocer la cantidad celular de inóculo de cada levadura necesaria para lograr una colonización eficiente que pueda desplazar de manera inmediata al hongo (Taqaarort *et al.*, 2008). La evaluación de las dosis de aplicación fue fundamental para poder encontrar la concentración ideal del antagonista que se requiere para lograr un control eficaz (Viñas *et al.*, 1998) de *P. italicum*. Es de resaltar que los tratamientos de los frutos con algunas de las levaduras fueron estadísticamente ( $P < 0.05$ ) mayores o similares a la protección ejercida por el fungicida imazalil utilizado de manera comercial para el control del moho azul. Al realizar las comparaciones pertinentes, se logró demostrar que las *D. hansenii* (DhhBCS003, DhhBCS006, LL1 y LL2) fueron organismos biológicos más eficientes en comparación al fungicida sintético, por lo que la aplicación de levaduras marinas y epífitas de

limón mexicano en poscosecha, es una opción económica viable y compatible con el ambiente, ante la creciente demanda por parte del consumidor de productos agrícolas que provengan de un manejo orgánico o bien de donde se apliquen al mínimo sustancias inorgánicas para controlar todo tipo de plagas (Janisiewicz y Kurtzman, 2008).

## 8. CONCLUSIONES

- a) El moho azul del limón mexicano es ocasionado por *Penicillium italicum*, reportando por primera vez el aislamiento de este patógeno en poscosecha para el Estado de Colima, México, debido a que no se tenía información de su presencia a nivel nacional.
- b) Existe una eficiencia en la inhibición *in vitro* del crecimiento del hongo *Penicillium italicum* por parte de las levaduras *Debaryomyces hansenii* debido a la competencia por fuentes de carbono (fructosa, glucosa y sacarosa) provenientes del flavedo y albedo del limón mexicano.
- c) Todas las levaduras *Debaryomyces hansenii* produjeron enzimas  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y proteasa capaces de degradar las paredes celulares del hongo *Penicillium italicum*.
- d) Existe un efecto inhibitorio sobre *Penicillium italicum* debido probablemente a la producción de toxinas *killer* provenientes de las levaduras *Debaryomyces hansenii*.
- e) Durante quince días existió protección *in vivo* de frutos de limón mexicano inoculados con levaduras *Debaryomyces hansenii* hacia la pudrición del moho azul ocasionada por *Penicillium italicum* bajo condiciones ambientales (25° C y 85% HR) y de almacenamiento (13° C y 90% HR).
- f) La aplicación de distintas dosis de levadura, esta correlacionada con el nivel de protección de los limones hacia la pudrición del moho azul, existiendo una protección del 100% con la dosis intermedia y más alta de aplicación de acuerdo a cada levadura.
- g) La protección de los limones con las levaduras *Debaryomyces hansenii* fue más eficiente en comparación con los frutos tratados con imazalil, el cual se aplica de manera tradicional en las empacadoras de México y otros países productores de cítricos.

## 9. LITERATURA CITADA

Al-Aidroos, K., Bussey, H. 1978. Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Canadian Journal of Microbiology* 24: 228-237.

Álvarez, G.M. 1981. Enfermedades de las Plantas en la República Mexicana. Editorial Limusa, México.

Amzalek, E., Cohen, Y. 2007. Comparative efficacy of systemic acquired resistance-inducing compounds against rust infection in sunflower plants. *Phytopathology* 97: 179-186.

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

Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 1990. Yeasts: Characteristics and identification. 2<sup>nd</sup>. Edn. Cambridge Press Oxford. 1002p.

Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus, A., Goldway, M., Wisniewski, M., Droby, S. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics* 45: 140-148.

Basaran, P., Hang, Y.D. 2000. Purification and characterization of acetyl esterase from *Candida guilliermondii*. *Letters in Applied Microbiology* 30: 167-171.

Becerra-Rodríguez, S., Valdez-Verduzco, J., Medina-Urrutia, V.M. 1979. Comportamiento de los limones Mexicanos, Persa y Eureka en el valle de Tecomán, Colima. *Tropical Region* 23: 92-94.

Bencheqroun, S.K., Bajji, M., Massart, S., Labhilili, M., El-Jaafari, S., Jijakli, M.H. 2007. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*:

evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology* 46: 128-135.

Benitez, J.A., Silva, A.J., Finkelstein, R.A. 2001. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* 69: 6549-6553.

Besoain, C.X., Gardiazabal, I.F., Opazao, M., Pablo, G. 1994. Limonero (*Citrus limon* L.) cv. Eureka, Genova. *Boletín Micrológico* 9: 109-113.

Bouwmeester, H., Gershenzon, J.J., Konings, M.C., Croteau, R. 1998. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. I. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. *Plant Physiology* 117: 901-912.

Bouzerda, L., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Akhayat, O., Bin-Aoumar, A.A. 2003. Selection of antagonistic yeasts to green mold disease of citrus in Morocco. *Journal of Food Agriculture and Environment* 1: 215-218.

Breuer, U., Harms, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23: 415-437.

Brown, G.E., Miller, W.R. 1999. Maintaining fruit health after harvest. *In: Citrus Health Management*. Timmer, L.W., Duncan, L.W. (Eds.). The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA.

Brumos, J., Colmenero-Flores J.M., Conesa, A., Izquierdo, P., Sánchez, G., Iglesias, D.J., López-Climent, M.F., Gómez-Cadenas, A., Talón, M. 2009. Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive *Citrus* rootstocks. *Functional and Integrative Genomics*. On line: [http://bioinfo.cipf.es/docus/papers/pdfs/Colmenero\\_etal.pdf](http://bioinfo.cipf.es/docus/papers/pdfs/Colmenero_etal.pdf).doi:0.1007/s10142-008-0107-6).

Bruner, R.L., 1964. Determination of reducing value. In: Whistler, R.L. (Ed.), *Methods of Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York. 67-71pp.

Buzzini, P., Martini, A. 2000. Differential growth inhibition as a tool to increase the discriminating power of killer toxin sensitivity in fingerprinting of yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 193: 31-36.

Buzzini, P., Martini, A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology* 93: 1020-1025.

Buzzini, P., Corazzi, L., Turchetti, B., Buratta, M., Martín, A. 2004. Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 238: 359-65.

Cabañas, R., Abarca, M.L., Bragulata, M.R., Cabañas, F.J. 2009. *In vitro* activity of imazalil against *Penicillium expansum*: Comparison of the CLSI M38-A broth microdilution method with traditional techniques. *International Journal of Food Microbiology* 129: 26-29.

Caccioni, R.L., Guizzardi, M., Biondi, D., Renda, A., Ruberto, G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology* 43: 73-79.

Cardillo, R., Fungati, C., Barbeni, M., Allegrone, G. 1994. Process for the preparation of saturated delta lactones by bio-hydrogenation of the corresponding in saturated compounds by microorganisms. Pat. EP0577463.

Cardoso, F.J.A. 2003. Efeitos de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistencia ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllactia citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*). Tesis de Doctorado. Universidad de São Paulo, Brasil. 145p.



Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, A., Herrera-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 929-935.

Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., De Cicco, V., 1997.  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 12: 293-300.

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

Castoria, R., Caputo, L., Curtis, F., Cicco, V. 2003. Resistance to oxidative stress of postharvest biocontrol yeasts: a possible new mechanism of action. *Phytopathology* 93: 564-572.

Chalutz, A., Wilson, C.L. 1990. Post-harvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease* 74: 134-137.

Chand-Goyal, T., Spotts, R.A. 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonist and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Technology* 7: 51-64.

Clipson, N.J.W., Jennings D.H. 1992. *Dendryphiella salina* and *Debaryomyces hansenii*: models for ecophysiological adaptation to salinity by fungi which live in the sea. *Canadian Journal of Botanic* 70: 2097-2105.

Coelho, A.R., Tachi, M., Pagnocca, F.C., Nobrega, G.M.A., Hoffmann, F.L., Harada, K., Hirooka, E.Y. 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives and Contaminants* 26: 73-81.

Colburn, G.C., Graham, J.H. 2007. Biological control protection of Citrus rootstocks against *Phytophthora* spp. with a hypovirulent isolate of *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology* 97: 958-963.

Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, K. 1993. Plant chitinases. *Plant Journal* 3: 31-40.

Conti, S., Magliani, W., Giovati, L., Libri, I., Maffei, D.L., Salati, A., Polonelli, L. 2008. Screening of a *Saccharomyces cerevisiae* nonessential gene deletion collection for altered susceptibility to a killer peptide. *New Microbiologica* 31: 143-145.

Cristov, L.P., Prior, B.A. 1993. Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 460-475.

da Silva, S., Calado, S., Lucas, C., Aguiar, C. 2008. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiological Research* 163: 243-251.

Dao, T., Bensoussan, M., Gervais, P., Dantigny, P. 2008. Inactivation of conidia of *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum* and *P. italicum* by ethanol solutions and vapours. *International Journal of Food Microbiology* 122: 68-73.

Dass, M.K.L., Prasad, J.S., Ahmad, S.K. 1997. Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. *Letters in Applied Microbiology* 25: 313-315.

De-Capdeville, G., Beer, S.V., Wilson, C.L., Aist, J.R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. *Phytopathology* 92: 900-908.

Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Gavara, R. 2009. Optimization of an equilibrium modified atmosphere packaging (EMAP) for minimally processed mandarin segments. *Journal of Food Engineering* 91: 474-481.

Digrak, M., Özcelik, S. 2001. Determination of some fungal metabolite as influenced by temperature, time, pH and sugar by bioassay method. *Turkish Journal of Biology* 25: 197-203.

Droby, S., Chalutz, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents for postharvest disease. In: *Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables-Theory and practice*. Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 63-75pp.

Droby, S., Wisniewski, M.E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y., Chalutz, E. 1997. Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* 87: 310-315.

Droby, S., Lischinski, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Chand-Goyal, T., Eckert, T.W., Manulis, S. 1999. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Biological Control* 16: 27-34.

Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E.E., Porat, R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology* 92: 393-399.

Droby, S., Eicka, A., Macarisina, D., Cohen, L., Rafaela, G., Stangeb, R., McColumb, G., Dudaic, N., Nasser, A., Wisniewski, M., Shapira, R. 2008. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology* 49: 386-396.

Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology* (In Press). doi:10.1016/j.postharvbio.

Druvefors, U.A. 2004. Yeast biocontrol of grain spoilage moulds, mode of action of *Pichia anomala*. Tesis de doctorado. Universidad de Ciencias Agrícolas, Uppsala, Suecia. 44p.

- Druvefors, U.A., Schnürer, J. 2006. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Research* 5: 373-378.
- Eayre, C.G., Skaria, M., Bull, C.T., Mackey, B. 2003. An avirulent *Galactomyces* species that controls green mold of *Citrus* caused by *Penicillium digitatum*. *Subtropical Plant Science* 55: 46-50.
- Eckert, J.W., Sievert, J.R., Ratnayake, M. 1994. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouse by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant disease* 78: 971-974.
- El-Ghaouth, A. 1997. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 19: 160-162.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wisniewski, M., Wilson, C.L. 2000. Improved control of apple and *Citrus* fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucose. *Plant disease* 84: 249-253.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology* 93: 344-348.
- Fan, Q., Tian, S.P., Li, Y., Xu, Y., Wang, Y. 2000. Biological control of postharvest brown rot in peach and nectarine fruits by *Bacillus subtilis* (B-912). *Acta Botanica Sinica* 42: 1137-11473.
- Fan, Q., Tian, S.P. 2001. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology* 21: 341-353.
- FAO, 2007 y 2008. [http://www.fao.org/index\\_ES.htm](http://www.fao.org/index_ES.htm).

- Fernández-Larrea, O.V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62: 96-100.
- Fleuri, L. F., Harumi-Sato, H. 2005. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Química Nova* 28: 871-879.
- Fleuri, L.F., Sato, H.H. 2008. Beta-1,3 glucanases and chitinases: application in the yeast cell lysis and fungi inhibition. *Ciência e Agrotecnologia* 32: 1224-1231.
- Friel, D., Gómez-Pessoa, N.M., Vandenbol, M., Jijakli, M.H. 2007. Separate and combined disruptions of two exo- $\beta$ -1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (Strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 371-379.
- Gacto, M., Vicente-Soler, J., Cansado, J., Villa, T.G. 2000. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. *Journal of Applied Microbiology* 88: 961-967.
- Ganiger, M.C., Bhat, S., Chettri, P., Kuruvinashetti, M.S. 2008. Cloning and Expression of Endoglucanase genes from *Trichoderma* species in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Sciences Research* 11: 1546-1556.
- Garmendia, G., Garat, F., Silvera, E., de Aurrecochea, I., Vero, S. 2005. Levaduras nativas como controladores de enfermedades postcosecha de frutas en uruguay. *Agrociencia* 9: 327-335.
- Gavimath, C.C., Ramachandra, Y.L., Rai, S.P., Ganapathy, P.S.S., Sudeep, H.V. 2008. Antimicrobial screening of fruit rind oil of *Citrus reticulata* Blanco. *Environment and Ecology* 26: 533-535.
- Glushakova, M., Yurkov, A.M., Chernov, I.Y. 2007. Massive isolation of anamorphous ascomycete yeasts *Candida oleophila* from plant phyllosphere. *Microbiology* 76: 799-803.

- Goddard, M.R. 2008. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae's* ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 89: 2077-2082.
- Gusmao-Araújo, J.R., Broetto, F., Salibe, A.A., Feichtenberger, E. 2008. Alteração na atividade de peroxidase e concentração de fenóis em microtangerinas (*Citrus* spp.) infectadas por *Phytophthora parasítica*. *Brazilian Journal of Biosciences* 6: 1-5.
- Harding, P. 1972. Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Plant Disease Reports* 56: 256-260.
- He, D., Xiao-Dong, Z., Yuan-Ming, Y., Ping, S., Hong-Yin, Z. 2003. Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44: 211-216.
- Heinen, S. 2006. México citrus semi annual report. Servicio de Agricultura Exterior, Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USA.
- Hernández-Montiel, L.G., Ochoa, J.L. 2007. Fruit rot caused by *Penicillium italicum* on lemon (*Citrus aurantifolia*) in Colima, México. *Plant Disease* 91: 767.
- Hof, H. 2008. Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria?. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 27: 327-334.
- Holmes, G., Eckert, J. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89: 716-721.
- Ippolito, A., El-Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology* 19: 265-272.
- Ismail, M., Zhang, J.Z. 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Management* 15: 29-35.

Jaiswal, S., Sawhney, N., Sawhney, S. 2003. *In vitro* inhibition of growth and sporulation in *Aspergillus niger* by lidocaine – a local anaesthetic agent. *Current Science* 88: 152-154.

Janiesiewicz, W. 1988. Biological control of diseases in fruits. *In: Biocontrol of plant diseases*. Vol 2. Mukergii N.C., Garg K.L. (Eds.). CRC Press, Boca Raton Fla., USA. 153-166pp.

Janisiewicz, W.J., Tworkoski, T. 1998. Nutritional profiles enable selection of superior mixtures of antagonists to control blue mold of apples after harvest. *Absts. 2, 2.10.13*. In: *Int. Congr. Plant Pathol. 7th*.

Janisiewicz, J.W., Tworkoski, T.J., Sharer, C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90: 1196-1200.

Janisiewicz, W.J., Kurtzman, C. 2008. Yeast microflora of nectarines. *Phytopathology* 6: S74.

Jianga, F., Zhenga, X., Chen, J. 2008. Microarray analysis of gene expression profile induced by the biocontrol yeast *Cryptococcus laurentii* in cherry tomato fruit. *Gene* 430: 12-16.

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

Johnson, T.M. 2001. La producción de zumo de cítricos y la aplicación de tecnología al mercado de productos frescos. *China/FAO Simposio Sobre Cítricos*. 79-85pp.

Kampp, J., Sass, P. 1994. Biological control of postharvest diseases of apples and pears. *Acta Horticulturae* 368: 69–77.

Kanan, G.J.M. 2008. *In vitro* evaluation of *Penicillium digitatum* Sacc strains sensitivity to various fungicides from Jordan. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 1517-1529.

Kanetis, L., Förster, H., Adaskaveg, J.E. 2008a. Optimizing efficacy of new postharvest fungicides and evaluation of sanitizing agents for managing citrus green mold. *Plant Disease* 92: 261-269.

Kanetis, L., Förster, H., Jones, C.A., Borkovich, K.A., Adaskaveg, J.E. 2008b. Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 98: 205-214.

Kanetis, L., Förster, H., Adaskaveg, J.E. 2008c. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. *Plant Disease* 92: 301-310.

Kapsopoulou, K., Barouti, E., Makrioni, A., Kostaki, K. 2008. Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1967-1971.

Karabulut, O.A., Baykal, N. 2003. Biological control of postharvest diseases of peaches and nectarines by yeast. *Journal of Phytopathology* 151: 130-134.

Kinay, P., Yildiz, M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control* 45: 433-440.

Lahlali, R., Massart, S., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H. 2008. A box-behnken design for predicting the combined effects of relative humidity and temperature on antagonistic yeast population density at the surface of apples. *International Journal of Food Microbiology* 122: 100-108.

Lakimova, E.T., Woltering, E.J., Yordanova, Z.P. 2007. Toxin- and cadmium- induced cell death events in tomato suspensions cells resemble features of hypersensitive response. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15: 5-19.



Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110.

Leone, R., Buonomo, S., Nakamura, K., Auki, S., Vidotto, V. 1998. Enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* strains by using the API-ZYM system. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 136-140

Leroy, M.J., Guierineau, P. 1992. Novel microorganisms and their use in the production of meat products. Pat. EP0469952.

Lima, G., Arru, S., Curtis, F., Arras, G. 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 223-229.

Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, M., Spencer-Martins, I. 1997. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1165-1167.

Long, C., Wu, Z., Deng, B. 2005. Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by Strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*. *Europe Food Research and Technology* 221: 197-201.

Long, C.A., Deng, B.X., Deng, X.X. 2007. Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34-9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. *Annals of microbiology* 57: 203-207.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. 1997. Yeast killer system. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 369-400.

Mari, M., Guizzardi, M. 1998. The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica* 26: 59-66.

Marquina, D., Santos, A., Peinado, J.M. 2002. Biology of killer yeasts. *International Microbiology* 5: 65-71.

Materano, W., Valera, A., Zambrano, J., Maffei, M., Torres, C. 2007. Efecto de recubrimientos sobre la postcosecha y la evolución del color del zumo de la fruta del naranjo. *Agronomía Tropical* 57: 129-136.

Medina, U.V.M., Robles, M.M., Becerra S.R., Orozco, J.R., Orozco, M.S., Garza, J.G.L., Ovando M.E., Chavez, X.C., Felix, F.A. 2001. El cultivo del limón mexicano. Libro técnico No. 1. INIFAP, México. 188p.

Miedes, E., Lorences, E.P. 2006. Changes in cell wall pectin and pectinase activity in apple and tomato fruits during *Penicillium expansum* infection. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 1359-1364.

Montesinos-Herrero, C., del Río, M.A., Pastora, C., Brunetti, O., Palou, L. 2009. Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 52: 117-125.

Muys, G.T., Verrips, C.T, Sylvain Van Gorp RT. 1976. Yeast containing food emulsions. Pat No. US39995066

Nally, M.C., Maturano, Y.P., Vazquez, F. 2005. Comportamiento de una levadura salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 73-77.

NASS. 2006. Reporte de producción agrícola Julio-2006. Servicio Nacional de Estadística Agropecuaria. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. USA.

Nuero, G.O. 1995. Estudio bioquímico de  $\beta$ -1,3-glucanasas de *Aspergillus nidulans* para el control de biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* raza 2. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, España. 142p.

Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., Miro, M., Viñas, I. 2001a. Nutritional enhancement of biocontrol activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears. *European Journal of Plant Pathology* 107: 543-551.

Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., Vinas, I. 2001b. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* 70: 53-61.

Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., Fons, E., Vinas, I. 2002. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology* 92: 247-255.

Ochoa, J.L., Hernández-Montiel, L.G., Latisnere-Barragán, H., León de La Luz, J.L., Larralde-Corona, C.P. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5: 352-359.

Oelofse, D., Dubery, I., Berger, D.K. 2008. Exo- $\beta$ -1,3-Glucanase from yeast inhibits *Colletotrichum lupini* and *Botrytis cinerea* spore germination. *Journal of Phytopathology* 157: 1-6.

Olsen, M., Matheron, M., McClure, M., Xiong, Z. 2000. Diseases of *Citrus* in Arizona. College of Agriculture and Life Sciences. The University of Arizona. USA. 16p.

Özkoc, I., Deliveli, H. 2001. *In vitro* inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* isolates. *Turkish Journal of Biology* 25: 435-445.

Palou, L., Crisosto, C.H., Smilanick, J.L., Adaskaveg, J.E., Zoffoli, J.P. 2002. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 24: 39-3348.

Palou, L., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., Mansour, M. 2001. Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. *Plant Disease* 85: 632-638.

Panda, T., Gowrishankar, B.S. 2005. Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 160-169.

Papanikolaou, S., Gortzi, O., Margeli, E., Chinou, I., Galiotou-Panayotou, M., Lalas, S. 2008. Effect of *Citrus* essential oil addition upon growth and cellular lipids of *Yarrowia lipolytica* yeast. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110: 997-1006.

Pedro, F.E., Vazquez, C.R., de Aldana, C.R, Rey, F. 1999. Cloning and characterization of 1,3- $\beta$ -glucanase-encoding genes from non-conventional yeast. *Yeast* 15: 91-109.

Pérez-Gago, M.B., del Río, M.A., Rojas-Argudo, C. 2008. Recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas. Horticultura. Valencia, España. 1-5pp.

Pérez-García, E.A., Meave, J.A. 2005. Heterogeneity of xerophytic vegetation of limestone outcrops in a tropical deciduous forest region in southern México. *Plant Ecology* 175: 147-163.

Pimenta, R.S., Silva, F.L., Silva, J.F.M., Morais, P.B., Braga, D.T., Rosa, C.A., Correa, A. 2008. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 85-90.

- Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N., Viñas, I. 2004. Evaluation of the potential of comercial post-harvest application of essential Oil to control citrus decay. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 935-940.
- Porat, R., Daus, A., Weiss, B., Cohen, L., Fallik, E., Droby, S. 2000. Reduction of post-harvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. *Postharvest Biology and Technology* 18: 151-157.
- Prista, C., Loureiro-Dias, M.C. 2007. *Debaryomyces hansenii*, a salt loving spoilage yeast. In: A portrait of state-of-the-art research at the technical University of Lisbon. Pereira, M.S. (Ed.). Springer. Holanda. 457-464pp.
- Prusky, D., Lichter, A. 2008. Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control. *European Journal of Plant Pathology* 121: 281-289.
- Punja, Z.K., Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *TRENDS in Biotechnology* 9: 400-407.
- Qin, G., Tian, S., Chan, Z., Li, B. 2007. Crucial role of antioxidant proteins and hydrolytic enzymes in pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 425-438.
- Raeder, U., Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letter in Applied Microbiology* 1: 17-20.
- Ramos-Novelo, J.A. 2003. Riesgos y oportunidades de la red de valor naranja. Subdirección de análisis de cadenas productivas. *Boletín informativo* 34, Núm.319. Marzo. FIRA.
- Rey, M. 1998. Mejoramiento de cepas de *Trichoderma* para su utilización como agente de control biológico. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, España.

Rodríguez, L. A., Abad, D., Gómez, J., Casanova, J.B., Lema, C. 1998. Fenotipo killer: distribución en la comarca de la ribeira Sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 1: 33-37.

SAGARPA, 2007. <http://www.sagarpa.gob.mx/>.

Sampaio, F.C., Torre, P., Lopes-Passos, F.M., de Moraes, C.A., Perego, P., Converti, A. 2007. Influence of inhibitory compounds and minor sugars on xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136: 165-181.

Sangorrín, M.P., Lopes, C.A., Jofré, V., Querol, A., Caballero, A.C. 2008. Spoilage yeasts from Patagonian cellars: characterization and potential biocontrol based on killer interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 945-953.

Santos, T., Villanueva, J.R., Nombela, C. 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* glucanases. *Journal of Bacteriology* 129: 52-58.

Santos, A., Marquina D., Leal J.A., Peinado J.M. 2000.  $\beta$ -D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 5: 1809-1813.

Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., Peinado, J.M. 2002.  $\beta$ -D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Letters in Applied Microbiology* 34: 95-99.

Santos, A., Marquina, D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150: 2527-2534

Santos, A., Sánchez, A., Marquina, D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159: 331-338.

Santos, A., del Mar, A., Mauro, S.M., Abrusci, C., Marquina, D. 2005. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *The journal of biological chemistry* 280: 41881-41892.

Santos, A., Mauro, S.M., Abrusci, C., Marquina, D. 2007. Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Molecular Microbiology* 64: 831-843.

Santos, A., Mauro, M.S., Bravo, E., Marquina, D. 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155: 624-634.

Sastoque, C.L., Mercado-Reyes, M., Martinez-Salgado, M.M., Quevedo-Hidalgo, B., Pedroza-Rodríguez, A.M. 2007. Producción de quitinasas extracelulares con una cepa de alcalofila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6: 137-146.

Saucedo, C.V. 2006. Perspectivas del manejo postcosecha de limas ácidas en México. Informe. Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 10p.

Schmidt, L.S., Ghosop, J.M., Margosan, D.A., Smilanick, J.L. 2006. Mutation at  $\beta$ -tubulin codon 200 indicated thiabendazole resistance in *Penicillium digitatum* collected from California citrus packinghouses. *Plant Disease* 90: 765-770.

Scora, R.W. 1988. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. In: Citriculture. Goren R., Mendel, K. (Eds.). Proc Intl Soc Citricult. 227-289pp.

Selitrennikoff, 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2883-2894.

Serkan, S. 2007. Volatile constituents of orange wine obtained from oranges (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). *Journal of Food Quality* 30: 330-341.

Smilanick, J., Sorenson, D., Mansour, M., Aieyabei, J., Plaza, P. 2003. Impact of a brief post-harvest hot water drench treatment on decay, fruit appearance, and microbial populations of California lemons and oranges. *HortTechnology* 13: 333-338.

Smilanick, J.L., Mansour, M.F. 2008. Influence of temperature and humidity on survival of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. *Plant Disease* 91: 990-996.

Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Mlikot, F.G., Sorenson, D. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology* 47: 226-238.

Snowdon, A.L. 1990. Color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. En: General introduction and fruits. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 718p.

Spotts, R., Sanderson, P.G., Lennox, C.L., Sugar, D., Cervantes, L.A. 1998. Wounding, wound healing, and staining of mature pear fruit. *Postharvest Biology and Technology* 13: 27-36.

Stinson, E.E., Osman, S.F., Heisler, E.G., Sciliano, J., Bills, D.D. 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 790-792.

Strano, L., Campisano, A., Renda, A., Di Silvestro, S., Ruberto, G. 2003. Elicitation of coumarins in lemon fruits after yeast inoculation. *Journal of Plant Pathology* 85: 298.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., Van-Resemburg, P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91: 182-190.

Sugar, D., Spotts, R.A. 1999. Control of postharvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. *Plant Disease* 83: 155-158.

Swingle, W.T., Reece, P.C. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: The Citrus Industry. Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L.D. (Eds.). University of California, Berkeley. 190–430pp.



Talon, R., Montel, M.C., Berdague, J.L. 1996. Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 620-622.

Taqarort, N., Echairi, A., Chaussod, R., Nouaim, R., Boubaker, H., Benaoumar, A.A., Boudyach, E. 2008. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 3031-3038.

Taylor, K.A.C.C., 1995. A colorimetric fructose assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 53: 215-227.

Tian S., Wan, Y., Qin, G., Xu. Y. 2006. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 729-734.

Tian, S., Fan, Q., Yong, X., Haibo, L. 2002. Biocontrol efficacy of antagonist yeast to gray mold and blue mold on apples and pears in controlled atmospheres. *Plant Disease* 86: 848-853.

Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J. 2000. Compendium of *Citrus* Diseases. 2nd Edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 92p.

Torres, R., Teixidó, N., Viñas, I., Mari, M., Casalini, L., Giraud, M., Usall, J. 2006. Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean Regions. *Journal of Food Protection* 69: 2703- 2711.

USDA. 2006. *Citrus* Situation. Servicio de Agricultura Exterior del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). USA.

Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., del Rosário, M.A., Perez-Gago, M.B. 2008. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose–lipid

edible composite films containing food additives with antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23: 11270-11278.

Vanderzant, F., Carland, S., Don, F. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. Washington, D.C.

Van-Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483.

Vero, S. 2006. Mecanismos de biocontrol. En: Control biológico de patógenos de plantas. Mondino, P.; Vero, S. (Eds.). Facultad de Agronomía-Unidad de Educación Permanente. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay. 49-78pp.

Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* 40: 9-16.

Walt, J.P., Yarrow, D. 1983. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In: The yeast, a taxonomic study, 3<sup>rd</sup>. Edn. Kreger-Van Rij, N.J.W. (Ed.). Elsevier Science Publishing. Amsterdam. 1-104pp.

Wang, X., Chi, Z., Yue, L., Li, J. Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Current Microbiology* 55: 396-401.

Wickner, R.B. 1996. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Review* 60: 250-265.

Wilson, C.L., Chalutz, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae* 40: 105-112.

Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. y Chalutz, E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii*: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiology Molecular Plant Pathology* 39: 245-258.

Witthuhn, R.C., Duvenage, W., Gouws, P.A. 2007. Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. *Letter in Applied Microbiology* 45: 224-229.

Xiang, J.Y., Deng, B.X., Liu, Y.J., Liu, H.M., Zu, Y.X., Yu, H. 2008. Ultraviolet mutation breeding aspect of the biological control of postharvest diseases by *Kloeckera apiculata* in citrus fruit. *Microbiology* 35: 82-86.

Xiangbin, X., Zhulong, C., Yong, X., Shiping, T. 2008. Effect of *Pichia membranaefaciens* combined with salicylic acid on controlling brown rot in peach fruit and the mechanisms involved. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 1786-1793.

Yao, H., S. Tian, Wang, Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeast on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology* 93: 297-304.

Yu, T., Chen, J., Chen, R., Huang, B., Liu, D., Zheng, X, 2007. Biocontrol of blue and gray mould diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. *International Journal of Food Microbiology* 116: 339-345.

Zhang, H.Y., Zheng, X.D., Xi, Y.F. 2005. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. *BioControl* 50: 331-342.

Zhang, H., Zheng, X., Yu, T. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control* 18: 287-291.

Zhao, Y., Tu, K., Shao, X., Jing, W., Sua, Z. 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 49: 113-120.

Zheng X., Zhang, H., Xi, Y. 2004. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbutus berries. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 55-60.

Zhu, J.W., Xie, Q.Y., Li, H.Y. 2006. Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism. *Journal of Zhejiang University* 7: 362-365.