

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE  
HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A SUPERFICIE DE  
MANZANA ‘GOLDEN DELICIOUS’ DURANTE EL DESARROLLO  
DEL FRUTO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**JUAN PABLO OROZCO MARTÍNEZ**

**DIRIGIDA POR**

**DR. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR**

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
PATOGENICA DE HONGOS FILAMENTOSOS  
ASOCIADOS A SUPERFICIE DE MANZANA 'GOLDEN  
DELICIOUS' DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JUAN PABLO OROZCO MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR

DR. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR

SINODALES

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR  
DIRECTOR

Dr. RAMÓN ALVAR MARTÍNEZ PENICHE  
SINODAL

Dra. ELVIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ  
SINODAL

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. El manzano	1
1.1.1 Origen	1
1.1.2. Importancia económica	2
1.1.2.1. Mundial	2
1.1.2.2. Nacional	2
1.1.2.3. Regional	2
1.1.3. Taxonomía	3
1.1.4. Descripción botánica	4
1.1.5. Fisiología	6
1.1.5.1. Ciclo anual del manzano	6
1.1.5.2. Desarrollo y maduración del fruto	7
1.1.6. Calidad del fruto para su consumo	8
1.2. Factores que afectan la calidad del fruto	8
1.2.1. Labores culturales	8
1.2.2. Factores agroecológicos	9
1.2.3. Portainjertos	10
1.2.4. Enfermedades	10
1.2.4.1. Generalidades	10
1.2.4.2. Enfermedades del manzano	11
1.2.4.3. Control químico de enfermedades	14
1.2.4.4. Control biológico	15
1.2.4.5. Control botánico	16
1.2.4.6. Manejo integrado de plagas	17
1.3. Ecología microbiana	17

2. OBJETIVOS	21
2.1. General	21
2.2. Específicos	21
3. METODOLOGÍA	22
3.1. Materiales	22
3.1.1. Material biológico y sitio experimental	22
3.2. Métodos	23
3.2.1 Nomenclatura usada para los aislados	23
3.2.2. Identificación de hongos filamentosos a nivel de género	23
3.2.2.1. Identificación mediante microcultivos	24
3.2.2.2. Cálculo de abundancia relativa de géneros fúngicos	24
3.2.3. Determinación de capacidad patogénica de los hongos en fruto	24
3.2.4. Caracterización cualitativa de enzimas involucradas en patogenicidad de los hongos	25
3.2.4.1. Determinación de actividad amilolítica	25
3.2.4.2. Determinación de actividad pectinolítica	25
3.2.4.3. Determinación de actividad celulolítica	26
3.2.5. Disposición de residuos	26
3.4. Diseño experimental	26
3.4.1. Ensayos de capacidad patogénica de los hongos en fruto	26
3.4.2. Ensayos de determinación de actividad amilolítica	27
3.4.3. Ensayos de determinación de actividad pectinolítica	27
3.4.4. Ensayos de determinación de actividad celulolítica	27
3.4.5. Análisis estadístico	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Nomenclatura empleada para los morfotipos aislados	29
4.2. Identificación de los hongos a nivel de género	29
4.3. Patogenicidad de los aislados	35
5. DISCUSIÓN	44

5.1. Identificación de los hongos a nivel de género	44
5.2. Actividad fitopatógena de los aislados	49
5.2.1. Capacidad patogénica de los hongos en fruto	49
5.2.2. Actividad enzimática de los aislados	55
5.2.3. Agrupamiento jerárquico de hongos antagonistas	56
6. CONCLUSIONES	58
7. BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	68
ANEXO I. Medios de cultivo	68
ANEXO II. Diámetros de lesión producidos en fruto por los aislados y por el control positivo <i>P. expansum</i>	70

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación taxonómica del manzano	3
2	Condiciones óptimas para cultivo del manzano	9
3	Nomenclatura usada para los morfotipos en estudio	29
4	Morfología macroscópica y microscópica de los aislados	31
5	Patogenicidad de cepas de hongos de Etapa 1 en fruto y actividad enzimática.	36
6	Patogenicidad de cepas de hongos de Etapa 2 en fruto y actividad enzimática.	37
7	Patogenicidad de cepas de hongos de Etapa 3 en fruto y actividad enzimática.	38
8	Rangos de porcentajes de daño causados en fruto	38
9	Diámetros de lesión en fruto de hongos de Etapa 1	70
10	Diámetros de lesión en fruto de hongos de Etapa 2	70
11	Diámetros de lesión en fruto de hongos de Etapa 3	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cultivares de manzana	3
2	Árboles de manzano	4
3	Estructuras de tejidos del manzano	5
4	Fruto del manzano	5
5	Enfermedades de precosecha del manzano en fruto	11
6	Enfermedades de poscosecha del manzano en fruto	13
7	Enfermedades emergentes en manzano	14
8	Organismos patógenos de las plantas	18
9	Abundancia relativa de los géneros fúngicos	30
10	Agrupamiento jerárquico de hongos antagonistas	39
11	Lesiones provocadas por los aislados en fruto	41
12	Ensayos de actividades enzimáticas	43

## RESUMEN

Los principales patógenos de la manzana durante poscosecha son los hongos, destacando géneros como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Botrytis*. Algunos de éstos pueden presentarse desde épocas tempranas del desarrollo del fruto, afectando considerablemente los rendimientos y ganancias de los agricultores. Resulta de vital importancia la identificación y caracterización de la comunidad microbiana asociada a la manzana a lo largo de su desarrollo, especialmente los hongos; así como determinar organismos que pueden comportarse como patógenos emergentes o reemergentes. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo identificar poblaciones de hongos epífitos, asociados de manera natural a la manzana durante su desarrollo y caracterizar su capacidad infectiva. Se aislaron 36 hongos epífitos de distintas etapas de maduración de manzana variedad 'Golden Delicious', cultivada en el estado de Querétaro. Se identificaron a nivel de género 26 de los aislados mediante comparación con claves taxonómicas, clasificándose en siete géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Además, se determinó la capacidad patogénica de todos los aislados sobre frutos de manzana variedad 'Golden Delicious', encontrándose que 97.2 % de los aislados fueron capaces de generar lesión en fruto maduro. Los aislados de la etapa madura fueron los que mostraron mayor capacidad de infección, además de que los aislados que causaron más daño que el resto fueron los pertenecientes al género *Penicillium*. Finalmente, se caracterizaron los aislados en cuanto a la producción de enzimas amilasas, celulasas y pectinasas, identificadas en otros hongos con capacidad de infectar frutos, resultando la mayoría de los aislados positivos al menos para alguna de dichas actividades enzimáticas.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. El manzano

#### 1.1.1. Origen

El cultivo de la manzana (*Malus domestica* Borkh) es muy antiguo. Se piensa que la especie *M. domestica* se originó en Asia Central, pues su antecesor más cercano, *Malus siervesii*, también es nativo de la zona, más específicamente de la frontera entre China occidental y Kazajistán. *M. siervesii* es una especie que comparte características morfológicas de árbol y de fruto con *M. domestica*; los frutos de *M. siervesii* tienen alto grado de variabilidad, al punto de que en ellos puede encontrarse todo el rango de colores, formas y sabores que hay en los distintos cultivares de manzana alrededor del mundo (Wang y col., 2018).

Debido a la existencia de antiguas rutas de comercio que conectaban China con Medio Oriente y Europa, se piensa que éstas contribuyeron a la dispersión de *M. siervesii* al oriente y occidente de Asia Central, su lugar de origen. Como resultado de este movimiento, es posible que en oriente haya ocurrido la hibridación natural de esta especie con otras oriundas de China, por ejemplo *M. baccata*, *M. mandshurica* y *M. prunifolia*. En cambio, en occidente *M. siervesii* pudo haberse hibridado con especies originarias de Europa, como *M. orientalis* y *M. sylvestris*. La especie *M. domestica* pudo haberse originado de dichas hibridaciones (CFIA, 2014).

Se tienen registros de cultivo de manzana en lo que hoy es Turquía, Siria e Irak desde el 3000 a.C. En Persia se cultivó desde el 500 a.C., desde donde se introdujo a Grecia aproximadamente en el 300 a.C. Posteriormente, el cultivo pasó de los griegos a los romanos, quienes lo dispersaron por gran parte de Europa. Fue a partir del siglo XVI que los colonizadores europeos introdujeron la manzana en América, África, Oceanía y el sudeste asiático. Cabe mencionar que en América se obtuvieron numerosas variedades, producto de la hibridación de cultivares traídos de Europa con especies nativas.

## 1.1.2. Importancia económica

### 1.1.2.1. Mundial

En la temporada 2017-2018, se produjeron en el mundo 76.2 millones de toneladas (t) de manzana, siendo China el principal país productor con 44.5 millones t, es decir, aproximadamente 57 % de la manzana cultivada en el mundo. Le siguen la Unión Europea con 10 millones t, Estados Unidos con 4.7 millones t, Turquía con 2.8 millones t, e India con 2.3 millones t. Otros países con importante producción de manzana son Irán, Chile, Rusia, Ucrania y Brasil. 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Gala', 'Granny Smith', 'Fuji' y 'McIntosh' son algunos de los cultivares mayormente producidos alrededor del mundo. 'Golden Delicious' es el más producido en la Unión Europea, representando 21.3 % de la producción en 2014. En Estados Unidos ocupa el tercer lugar tras 'Red Delicious' y 'Gala'. En Sudáfrica es el segundo cultivar detrás de 'Granny Smith' (Toranzo, 2016; Dansa, 2018).

### 1.1.2.2. Nacional

En 2016, México fue el 13er productor de manzana en el mundo con una producción de 716, 300 t, de las cuales, 409, 579 t correspondieron a 'Golden Delicious'. Chihuahua aportó 81.8% del volumen recolectado, seguido de Durango con 5.9% y Puebla con 5.2%. Ese mismo año, el cultivo de manzana en México representó el 0.68% del PIB agrícola nacional (SIAP, 2019).

Para 2018 se había proyectado una producción de 757,565 t de manzana, sin embargo, solamente se alcanzó la cantidad de 659,451 t, de las cuales 376,463 t correspondieron a 'Golden Delicious' (SIAP, 2019).

### 1.1.2.3. Regional

Querétaro, Hidalgo, Estado de México y Tlaxcala forman la región 8 productora de manzana en México, generando 0.23% de la producción nacional en 2016, siendo considerada esta región como una zona con potencial para la producción de este cultivo (SAGARPA, 2016).

En 2018, Querétaro fue el 18° estado productor de manzana en México con 659.66 t. Los principales cultivares de manzana en Querétaro son 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', los cuales pueden apreciarse en la Figura 1 (SIAP, 2019).

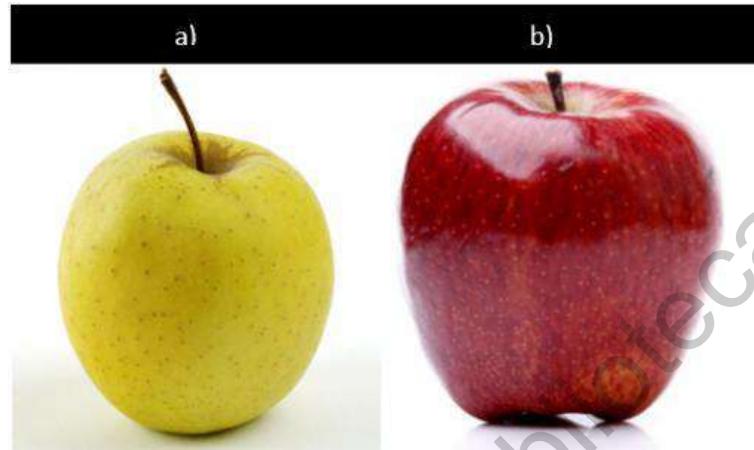


Figura 1. Cultivares de manzana. a) 'Golden Delicious' (Marsden, 2019), b) 'Red Delicious' (Halal Direct Scotland, 2014).

### 1.1.3. Taxonomía

El manzano (*Malus domestica* Borkh) pertenece al género *Malus*, del orden de los *Rosales*. Su clasificación taxonómica se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del manzano. (CFIA, 2014).

Taxa	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Rosaceae</i>
Subfamilia	<i>Amygdaloideae</i>
Tribu	<i>Maleae</i>
Subtribu	<i>Malinae</i>
Género	<i>Malus</i>
Especie	<i>Malus domestica</i> Borkh.

A lo largo del tiempo se ha clasificado a la manzana de distintas maneras y con distintos nombres. Algunos sinónimos de *Malus domestica* Borkh son *M. malus* (L.) Britton, nom. inval., *M. pumila* auct., *M. pumila* Mill. var. *domestica* (Borkh.) C. K. Schneid., *M. sylvestris* auct., *M. sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf., y *Pyrus malus* L (CFIA, 2014).

#### 1.1.4. Descripción botánica

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es un árbol de clima templado, de importancia económica debido al extenso consumo de su fruto; la manzana. Se trata de una especie caducifolia, con altura de entre 5 y 12 m y ancho en la base de entre 1.0 a 4.5 m. Su tronco es de corteza agrietada y se desprende en placas. Su copa es de redonda a piramidal, como puede observarse en la Figura 2 (Castroviejo, 2005).



Figura 2. Árboles de manzano (The Tree Center, 2019).

Sus hojas, con medidas de 28-75 x 18-49 mm, pueden ser ovaladas, elípticas, lanceoladas, oblongas, lobuladas o aserradas, con base cuneada o redondeada y pelosas en el envés. El peciolo mide de 10 a 30 mm. Las yemas, de 4-5 x 3-4 mm, son ovoides con pequeñas escamas que sobresalen. Las flores tienen color de blanco a rosa o carmín y se organizan en cimas de cuatro a seis flores. Una flor cuenta con cinco sépalos de 8-9 x 3-4 mm, cinco pétalos de 13-29 x 10-14 mm,

cinco carpelos con dos óvulos cada uno y estilos de 7 a 8 mm, y aproximadamente 20 estambres con filamentos de 6 a 9 mm. El hipanto y el gineceo se mantienen fusionados formando un ovario ínfero. (Castroviejo, 2005). Estas estructuras pueden observarse en la Figura 3.

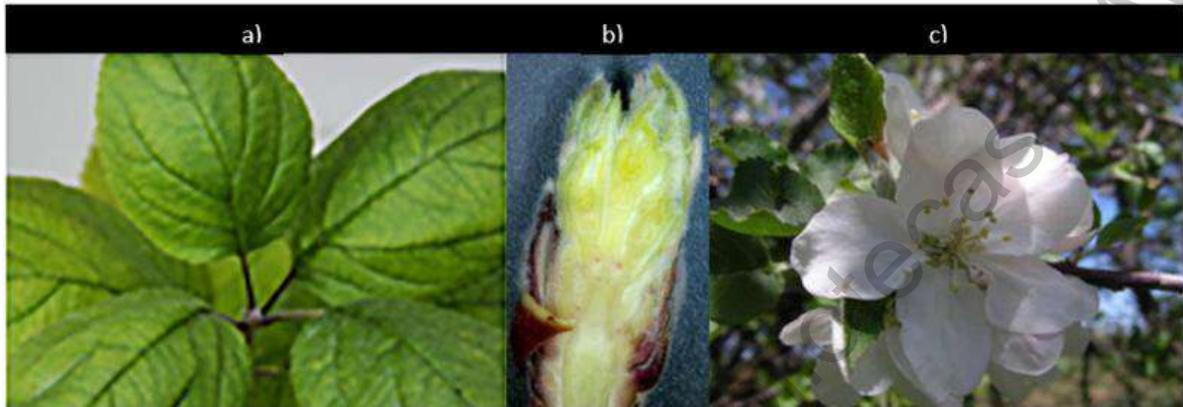


Figura 3. Estructuras de tejidos del manzano. a) Hojas (Yamane y col., 2019), b) yema (Salazar y col., 2016), c) flor (Allison y Wilson, 2014).

El fruto, 30-100 x 35-110 mm, es un pomo, como se ve en la Figura 4. Tiene un ovario ínfero con endocarpio lignificado y las semillas nacen en cinco carpelos formados de tejidos del mesocarpio y receptáculo. El fruto es oblongo, cónico u oblicuo, con diámetro de entre 2 a 13 cm. Su color varía entre el verde, rojo y amarillo. En algunas variedades, el fruto madura en 70 días, mientras en otros lo hace hasta en 180 días (Cárdenas y Fischer, 2013).



Figura 4. Fruto del manzano (Neo, 2017).

### 1.1.5. Fisiología

La fisiología vegetal es la ciencia que estudia las respuestas de los organismos vegetales o partes vivas de los mismos, frente a agentes externos o internos variables. En otras palabras, es el estudio de las actividades bioquímicas y funcionales de las plantas (Ortuño y col., 2015). Algunos aspectos importantes de la fisiología del manzano son su ciclo anual y el desarrollo y maduración del fruto.

#### 1.1.5.1. Ciclo anual del manzano

El desarrollo de las flores en el manzano abarca un periodo aproximado de diez meses, iniciando cuando el árbol pasa de una fase de desarrollo vegetativo a otra de desarrollo reproductivo a finales junio y finalizando con la antesis entre finales de abril e inicios de mayo del año siguiente. Durante el invierno existe un requerimiento de horas frío, que dependiendo del cultivar varía aproximadamente entre 1000 y 1500 horas de temperatura menor a 7 °C, lo que permite el restablecimiento del potencial de crecimiento de yemas en la siguiente estación. Así, la floración ocurre a inicios de la primavera. El periodo de la floración en el que se produce polen viable varía de acuerdo a las condiciones climáticas, siendo de siete a treinta días. El olor de los pétalos y el néctar atraen a polinizadores hacia las flores. El periodo de polinización efectiva, que es el periodo en que el óvulo puede ser polinizado con éxito menos el tiempo que requiere el tubo polínico para crecer desde el estigma hasta el óvulo, es de dos a nueve días. Dependiendo del cultivar, el fruto alcanza la madurez entre 120 y 150 días tras la floración. Solamente entre el 1 y el 5 % de las flores llevan a ser frutos maduros, pues el resto cae debido a falta de polinización, competencia entre frutos o prácticas culturales. El momento en que se cosechan los frutos depende del cultivar, pues hay algunos (cultivares de maduración temprana) que maduran entre inicios y finales de verano, como 'Anna', 'Early Gold' y 'Lodi'; otros (de maduración intermedia) maduran entre finales de verano e inicios de otoño, como 'Honeycrisp', 'Macintosh' y 'Sweet Sixteen'; por último, hay algunos (de maduración tardía) que maduran entre mediados de otoño

e inicios de invierno, como 'Newtown Pippin', 'Fuji', 'Rhode Island Greening' (CFIA, 2014; Barth, 2015; Rai y col., 2015).

#### 1.1.5.2. Desarrollo y maduración del fruto

Pueden distinguirse distintos estados fenológicos a lo largo del desarrollo del fruto, definiéndose la fenología como el estudio de los fenómenos biológicos acomodados a cierto ritmo periódico como la brotación, la maduración de los frutos y otros. Como es natural, estos fenómenos se relacionan con el clima de la localidad en que ocurre. De esta manera, en el desarrollo de la manzana se distinguen tres estados fenológicos principales (Vigil, 2018):

- Cuajado del fruto: Después de realizada la fecundación, en esta fase el ovario se transforma en el fruto y el óvulo en la semilla. Esto variará según las variedades y las condiciones ambientales.
- Fruto verde o desarrollo del fruto. Para un desarrollo óptimo se necesita de la luz, que influye en sus características de sabor, aroma y color, humedad, calor y aireación. Igualmente, el desarrollo puede verse influenciado por la cantidad de semillas que contiene el fruto, ya que puede influenciar en el volumen, forma, maduración y constitución química del fruto.
- Fruto maduro. Es la última etapa del ciclo vegetativo, influenciada por la variedad, la cantidad de calor efectivo que ha recibido desde la floración, y por las prácticas agrícolas que ha recibido el cultivo.

A partir del cuajado de fruto los niveles de almidón incrementan, coordinándose con el desarrollo del fruto. Cien días tras la fecundación, los niveles de almidón empiezan a decrecer, incrementándose la cantidad de azúcares como sacarosa, fructosa y glucosa en el fruto maduro. Este cambio en el contenido de azúcares puede influir en la patogenicidad de mohos fitopatógenos, los cuales podrían preferir azúcares más sencillos sobre polímeros como el almidón (Mangas y Díaz, 2015).

### 1.1.6. Calidad del fruto para su consumo en fresco

Los requerimientos de calidad de frutos para su consumo en México están dictados en el Diario Oficial de la Federación, existiendo normas específicas referentes a determinados frutos. De esta manera, se encuentra la NMX-FF-061-2003. PRODUCTOS AGRÍCOLAS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - FRUTA FRESCA - MANZANA (*Malus pumila* Mill). (*Malus domestica* Borkh)-Especificaciones. Esta es la Norma Mexicana vigente que establece las características de calidad que debe cumplir la manzana para su comercialización y consumo fresco a nivel nacional, excluyendo el producto destinado a procesamiento industrial.

Los requisitos mínimos que debe cumplir la manzana son (NMX-FF-061-2003):

- Ser de una sola variedad;
- Estar enteras, de consistencia firme y aspecto fresco;
- Sanas, exentas de podredumbre o deterioro, que les permita ser aptas para el consumo humano;
- Exentas de coloración café en la pulpa y daño por congelamiento;
- Exenta de daños por frío y mancha amarga;
- Estar exentas de magulladuras pronunciadas;
- Estar exentas de daños por plagas;
- Estar limpias y prácticamente exentas de materia extraña visible;
- Exentas de humedad anormal, salvo la condensación consiguiente a su remoción de una cámara frigorífica, y
- Estar exentas de cualquier olor y/o sabor extraño.

## 1.2. Factores que afectan la calidad y sanidad del fruto

### 1.2.1. Labores culturales

El manejo agronómico del manzano en el campo requiere de labores culturales como desyemar, ralea y podar. Sin embargo, cuando dichas labores son mal empleadas o ejecutadas pueden afectar la sanidad del fruto, pues las heridas

provocadas en la planta pueden facilitar la entrada de organismos fitopatógenos. Otra manera en que las labores culturales afectan los cultivos es la dispersión de patógenos por la manipulación sucesiva de plantas sanas y contaminadas. También repercute el uso de herramientas contaminadas, el transporte de tierra con patógenos en la suela de los zapatos o en equipo, así como usar semillas, trasplantes, cepas de viveros o yemas infectados (Agrios, 2005).

Igualmente, cabe mencionar que el desarrollo y cultivo extensivo de variedades de alto rendimiento aumentó la vulnerabilidad de cultivos ante patógenos. Cuando patógenos virulentos entran en contacto con grandes extensiones de cultivo genéticamente uniformes, los resultados pueden ser devastadores, pues no existe variabilidad y por lo tanto no hay posibilidad de que existan plantas que puedan resistir la enfermedad. Además de la variabilidad de los cultivos, existen diferentes razas fisiológicas de fitopatógenos que son morfológicamente iguales pero cuya capacidad de infectar a una serie distinta de variedades de un mismo hospedante es diferente (Blanco y col., 2017).

### 1.2.2. Factores agroecológicos

Las condiciones óptimas de temperatura, acumulación de horas frío y características del suelo para el cultivo del manzano pueden observarse en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones óptimas para cultivo del manzano. (Rai y col., 2015; Leiva, 2017).

Factor	Condiciones óptimas
Temperatura	18 – 24 °C
Horas frío (T≤7°C)	1000 – 1500 h
pH del suelo	5.5 – 7
Salinidad del suelo	≤1.7 dS/m
Textura del suelo	Franca, sin límite
Profundidad del suelo	Subsuelo suelto > 80 cm

El manzano es un árbol medianamente sensible a heladas, deteniéndose su crecimiento por debajo de 10 °C y por encima de 35 °C. Las temperaturas menores a 2 °C pueden dañar frutos pequeños, mientras temperaturas por debajo de -10 °C pueden dañar la corteza y ocasionar pérdida de yemas florales. En cuanto a las condiciones del suelo, el manzano tolera un pH mínimo de 4.6 y máximo de 8.9, mientras que el valor crítico de conductividad eléctrica que tolera es de 4.8 dS/m (Leiva, 2017).

### 1.2.3. Portainjertos

El portainjerto en manzano controla características como vigor, precocidad, eficiencia en el transporte de nutrientes, tamaño y calidad de fruto del cultivar injertado. La habilidad de absorción y traslocación de nutrientes varía entre cultivares y portainjertos, y por lo tanto hay respuesta diferencial en crecimiento de la planta, rendimiento y calidad del fruto. Asimismo, el portainjerto puede tolerar distintos factores adversos del suelo, como la presencia de patógenos (Palacio y Sánchez, 2017; Romero y col., 2017).

### 1.2.4. Enfermedades

#### 1.2.4.1. Generalidades

La enfermedad en plantas consiste en la alteración de una o varias de sus funciones por organismos patógenos. Para que ocurra alguna enfermedad en una planta, deben interactuar tres componentes: la planta hospedera, el patógeno y determinadas condiciones ambientales dentro de límites favorables (Agrios, 2005).

Las enfermedades pueden presentarse en cualquiera de los órganos de la planta, tales como raíz, tallo, hojas y fruto. En el caso del fruto, existen enfermedades que se presentan tanto durante el cultivo como en poscosecha. Algunas de las más relevantes son las siguientes.

#### 1.2.4.2. Enfermedades del manzano

La sarna o venturia de la manzana es causada por el hongo *Venturia inaequalis* en hojas, sépalos y frutos en crecimiento, sobre los cuales provoca lesiones sarnosas como se aprecia en la Figura 5. Se propaga mediante ascosporas y debido a que el fitopatógeno siempre se encuentra en los huertos de manzano y en lugares aledaños, el factor que determina una alta o baja prevalencia de la enfermedad son las condiciones ambientales, sobre todo la lluvia y la humedad (Lolas y Díaz, 2016).

La enfermedad conocida como pudrición negra es provocada por el hongo *Diplodia seriata*, presentándose síntomas que incluyen lesiones irregulares de color pardo claro a oscuro, inicialmente firmes pero que con el tiempo se ablandan. Los frutos con síntomas severos se vuelven extremadamente blandos, perdiendo su contenido al ser oprimidos. Este hongo se ve favorecido por temperaturas medias, humedad libre y heridas en el fruto causadas principalmente por insectos. Los síntomas de la enfermedad pueden observarse en la Figura 5.



Figura 5. Enfermedades de precosecha del manzano en fruto. a) Infección por *Venturia inaequalis* (Ebrahimi y col., 2016), b) infección por *Diplodia seriata* (Grabowski, 2020).

La pudrición gris o pudrición calicinal es provocada por *Botrytis cinerea*, produciéndose la infestación en el huerto durante la etapa de floración, favorecida por la humedad. El hongo permanece latente en restos florales adheridos al fruto. Los síntomas generalmente se manifiestan después de dos meses de

almacenamiento en frío. La pudrición inicia en el cáliz, desde donde avanza al interior del fruto, como puede verse en la Figura 6. La pulpa presenta una mancha marrón con descomposición de tejidos. *B. cinerea* también puede infectar el fruto después de la cosecha penetrando por heridas en la epidermis (Jurick y col., 2017).

El hongo *Penicillium expansum* causa la enfermedad conocida como moho azul, siendo el patógeno más común en los distintos cultivares de manzana debido a que abunda en huertos, elementos de transporte, de embalaje y en cámaras de almacenaje. La pudrición suele aparecer poco tiempo tras el almacenamiento y se distingue por lesiones deprimidas, blandas y de color claro, con presencia visible de micelio que tiene una coloración verde azulada, como se observa en la Figura 6 (Hermosillo y col., 2015; Wallace y col., 2017).

El corazón mohoso de la manzana es provocado por un complejo de hongos donde el principal es *Alternaria alternata*. Éste hongo inicia la colonización en huerto y se aloja en las flores, aunque los síntomas se hacen presentes en poscosecha. Se presentan hongos de coloración negra en la cavidad carpelar y en las semillas. Hay pudrición en la pulpa alrededor del corazón de la manzana (Figura 6) (Elfar, 2018).

Pudrición “ojo de buey”. Causada por *Neofabraea* spp. La infección por este hongo ocurre en el huerto, previo a la cosecha, aunque se manifiesta después de tres meses de almacenamiento a 0 °C. Genera una pudrición lenta, como se ve en la Figura 6. En condiciones húmedas aparecen fructificaciones (acérvulos) en una matriz cerosa desde donde se generan las conidias (Correa, 2019).

Por otra parte, cabe mencionar a los fitopatógenos emergentes y reemergentes. Los fitopatógenos emergentes son aquellos de nueva aparición o que han incrementado su incidencia, distribución geográfica o rango de hospedantes, o que han cambiado su patogénesis. La emergencia de patógenos o sus vectores tiene diversas causas, como el intercambio de germoplasma, turismo, importación de semillas, intensificación de sistemas agrícolas, incremento en el uso de plaguicidas, cambio en cultivares y los efectos de cambio climático. En cambio, los patógenos reemergentes son aquellos patógenos ya conocidos que, aunque se encuentren o

se hayan encontrado bajo control, pueden provocar epidemias en determinados momentos (Thynne y col., 2015). Algunos patógenos emergentes son los siguientes.

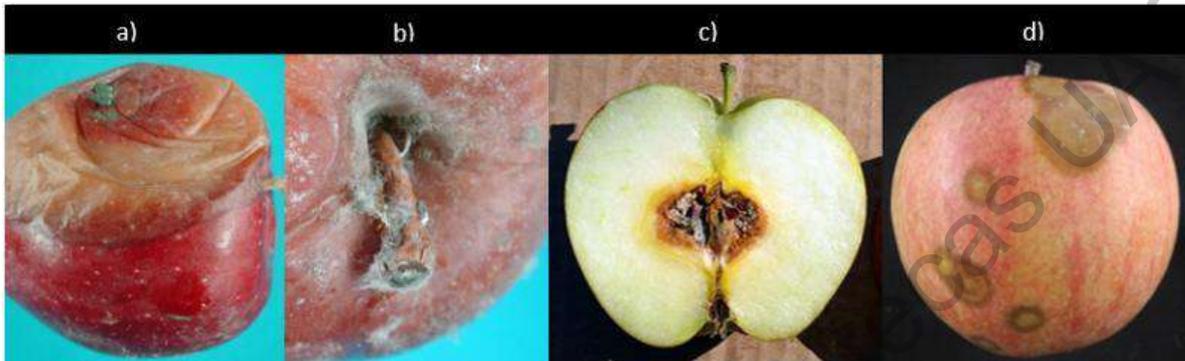


Figura 6. Enfermedades de poscosecha del manzano en fruto. a) Infección por *Botrytis cinerea* (Pace Internacional, 2019), b) infección por *Penicillium expansum*, c) infección por *Alternaria alternata* (Levy, 2018) y d) infección por *Neofabraea alba* (Garton y col., 2016).

El hongo *Phacidium lacerum* recientemente ha sido reportado como causante de pudrición en poscosecha de manzanas y peras en Washington, Estados Unidos. Este hongo se ha encontrado desde la etapa de cultivo, provocando síntomas en los frutos como lesiones de color pardo que se van oscureciendo, con un patrón de anillos concéntricos que se alternan, con presencia de picnidios, tal como se observa en la Figura 7. La pudrición es firme en un inicio, pero luego se ablanda. Las lesiones internas en la fruta presentan color pardo oscuro (Wiseman, 2016; Díaz y col., 2018).

De igual manera, la pudrición esponjosa de la manzana, provocada por *Phacidiopycnis washingtonensis*, es una enfermedad de poscosecha descrita inicialmente en Estados Unidos en 2005. A nivel de campo se detecta en muy baja frecuencia, pero durante almacenaje en frío su presencia aumenta y es visible. La pulpa adquiere una consistencia esponjosa y coloración negra (Figura 7) (Sikdar y col., 2018).



Figura 7. Enfermedades emergentes en manzano. a) Infección por *Phacidium lacerum* (Lolas y Díaz, 2016), b) infección por *Phacidiopycnis washingtonensis*.

Puede notarse que los hongos son los patógenos más importantes del fruto de manzano, de hecho, las enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos afectan el rendimiento de numerosos cultivos, resultando en la pérdida anual de aproximadamente el 13% de las cosechas globales (Moore y col., 2019).

#### 1.2.4.3. Control químico de enfermedades

La mayor parte de enfermedades que afectan al manzano son causadas por hongos, por lo que los productos de control químico comúnmente usados en manzano son fungicidas. No obstante, las enormes cantidades de agroquímicos utilizadas sobre cultivos dañan el ambiente y representan un severo riesgo para la salud humana (Villa y col., 2015).

Se han utilizado distintos productos para tratar y prevenir las enfermedades anteriormente mencionadas. De esta manera, para el control de *Venturia inaequalis* se ha reportado el uso de fungicidas preventivos como captan, ditianona, dodine y mezcla de Burdeos (sulfato de cobre y cal apagada) evitando la germinación de esporas, mientras fungicidas sistémicos como dodina, difenoconazol, piraclostrobin y ciprodinil se usan para afectar el crecimiento del hongo. La administración de fungicidas contra la sarna de la manzana consiste regularmente en un mínimo de 12 aplicaciones con intervalos de 5 a 8 días en cada temporada (Chatzidimopoulos y col., 2020). Para *Diplodia seriata* se aplica captan o fungicidas sulfurados en precosecha (Grabowski, 2020). En el caso de *Botrytis cinerea*, se usan para su

control fungicidas sistémicos del grupo de los bencimidazoles, como benomil, carbendazim y tiofanato en precosecha; así como tiabendazol y fludioxonil en poscosecha (Jurick y col., 2017). El producto más usado en poscosecha para *Penicillium expansum* es el tiabendazol. Para el control de *Alternaria alternata* puede aplicarse en precosecha difenoconzol, ciprodinilo o kresoxim-metil (Lolas y Díaz, 2016). En el caso de *Neofabraea* spp, se ha logrado controlar aplicando hidróxido de cobre y fosfito de potasio en precosecha (Soto y col., 2017).

#### 1.2.4.4. Control biológico

Otro método de control usado para contrarrestar las enfermedades del manzano es el control biológico, que consiste en el uso organismos benéficos, sus genes o sus productos derivados como metabolitos para combatir los efectos negativos de los fitopatógenos y promover respuestas positivas en las plantas (Zhang y col., 2017).

Para el control biológico de *V. inaequalis* se ha propuesto el uso de distintos organismos. Por ejemplo, la aplicación de *Microsphaeropsis ochracea* y *Athelia bombacina* en manzano durante el otoño reduce entre un 81 % a una 85 % la producción de ascosporas de *V. inaequalis* en primavera; con la aplicación de otro agente, *Chaetomium globosum*, se ha observado reducción en el número y tamaño de lesiones, así como en la densidad y la germinación de conidios; otros hongos como *Auerobasidium botrytis*, *Cladosporium* spp y levaduras epífitas de la filósfera del manzano inhiben la germinación y crecimiento del micelio de *V. inaequalis*; incluso se considera a las lombrices (*Lumbricus terrestris*) como agentes naturales de control biológico, pues entierran la mayor parte de las hojas que caen en otoño y que funcionan como reservorio de la enfermedad (Belete y Boyraz, 2017).

En el caso de *Diplodia seriata*, se usan para su control productos a base de *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum*, *T. virens* y *T. parceramosum*) y también a base de *Streptomyces lydicus*. Estos productos inhiben el crecimiento y acción del patógeno (Tabilo, 2014). Además, se ha propuesto el uso de *A. pullulans*, pues inhibe el crecimiento de micelio e induce respuestas de defensa en la planta (Pinto y col., 2018).

Por su parte, para el control poscosecha de *Botrytis cinerea* en manzana se utiliza *Pseudomonas syringae*, que compite contra el patógeno por nutrientes y espacio. La bacteria *Pseudomonas fluorescens* ha sido propuesta para el mismo fin, pues compite por espacio y nutrientes, produce metabolitos tóxicos y forma un biofilm sobre las heridas en el fruto. Otros organismos propuestos para controlar la enfermedad en pomáceas son *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *A. pullulans*, *Rahnella aquatilis* y *Bacillus licheniformis* (Wallace y col., 2018). De manera similar, para el control de *Penicillium expansum* en poscosecha también se ha propuesto el uso de *P. fluorescens* que compite por espacio y nutrientes y produce metabolitos que inhiben la germinación de conidios y el crecimiento de micelio. Otros agentes de control biológico que se han propuesto para *P. expansum* son levaduras como *Pichia caribbica*, *A. pullulans*, *Metschnikowia fructicola* y *Cryptococcus laurentii*, además de bacterias como *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas cepacia*, *P. syringae* y *Burkholderia gladioli* (Wallace y col., 2017).

En cambio, para contrarrestar a *Alternaria alternata* se han propuesto como agentes de control biológico bacterias del género *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. megaterium*, además de *T. harzianum* y *C. laurentii* (Zhang y col, 2015; Tozlu y col., 2018).

A diferencia de los patógenos anteriormente mencionados, las investigaciones respecto a *Neofabraea* spp no se han centrado en la búsqueda de agentes de control biológico, sino en proponer tratamientos con extractos vegetales y tratamientos físicos, por ejemplo el uso de extracto de ajo, de aceite de clavo y tratamientos con agua caliente (Daniel y col., 2015).

#### 1.2.4.5. Control botánico

También denominado control biológico botánico, incluye el uso de productos derivados de plantas, como extractos vegetales y aceites esenciales. Los extractos vegetales se han utilizado en el control de plagas debido a que los compuestos encontrados en plantas pueden afectar a patógenos diferencialmente, ya sea de

manera individual o por las mezclas en determinadas concentraciones. Por su parte, los aceites esenciales de plantas también se han usado con el mismo fin porque en su mayoría son químicamente complejos, aumentándose su eficacia contra patógenos debido a la sinergia entre los componentes (Villa y col., 2015). Por ejemplo, se ha reportado el uso correctivo de extracto de ajo para tratar la pudrición poscosecha provocada por *B. cinerea* y *P. expansum* en manzana (Daniel y col., 2015).

#### 1.2.4.6. Manejo integrado de plagas

Es la aplicación de control de plagas que combina e integra todos los aspectos de la protección de plantas, tales como el control químico, el control biológico, métodos físicos, el uso de extractos vegetales y de aceites esenciales (Barzman y col., 2015).

Los métodos físicos se emplean principalmente en frutos y vegetales cosechados antes de almacenarlos, clasificándose en dos principales grupos: tratamientos térmicos (uso de microondas, inmersión en agua caliente, enjuague con agua caliente, vapor y aire caliente) y tratamientos no térmicos (sistemas innovadores de embalaje, radiación ionizante, radiación ultravioleta, luz pulsada, ultrasonido, entre otros). Un ejemplo reportado de manejo integrado de plagas usando métodos físicos y control biológico es un estudio en el que se enjuagaron cerezas con agua caliente y se aplicó la levadura *C. laurentii*, inhibiéndose la pudrición causada por *B. cinerea* y *P. expansum* (Zhang y col., 2017).

#### 1.3. Ecología microbiana

Se ha resaltado la importancia de incluir a los microorganismos como un componente fundamental de los estudios ecológicos. Esto debido a que la actividad de los microorganismos tiene una gran influencia sobre los niveles tróficos de los ecosistemas, los ciclos biogeoquímicos y las interacciones con otros seres vivos (Alcántara y col., 2018).

Las asociaciones de microorganismos con las plantas pueden ser endófitas (dentro de la planta) o epífitas (en la superficie de la planta), así como benéficas, neutrales o desfavorables para la planta, traduciéndose en una influencia directa sobre su crecimiento, salud y desarrollo. De esta manera, mientras algunos microorganismos tienen actividad fitopatógena, tal como se observa en la Figura 8, otros pueden tener efectos aprovechables sobre las plantas. Dentro estos últimos se encuentran ciertas comunidades microbianas que aportan resistencia a estrés e incremento de producción en cultivos (Coleman y Tringe, 2014; Imam, 2016).

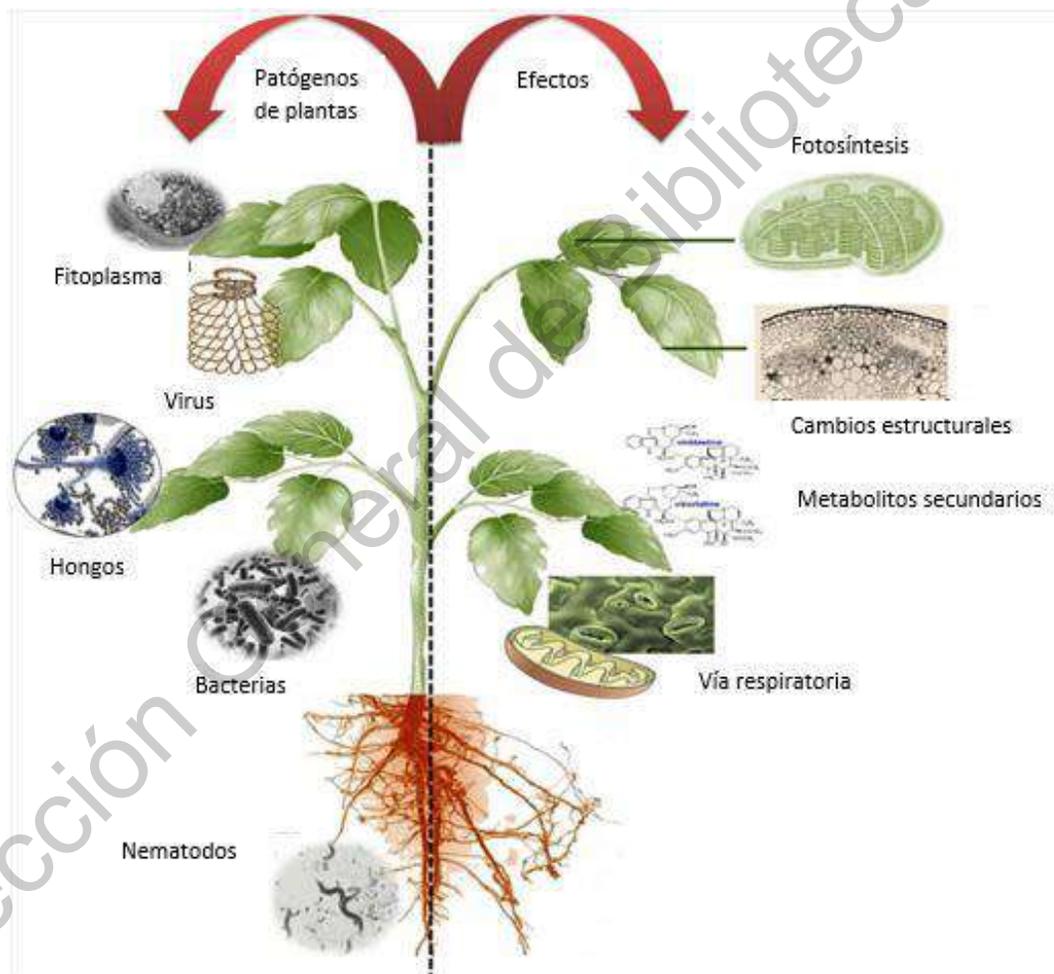


Figura 8. Organismos patógenos de las plantas. Procesos que pueden afectar en las mismas (Singh y col., 2016).

Por lo que respecta a las asociaciones desfavorables para la planta, los hongos filamentosos son los principales organismos fitopatógenos, representando una pérdida económica importante en la agricultura (Moore y col., 2019).

En el caso del manzano, la microbiota puede estar constituida por diferentes grupos de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos. En la superficie de manzana se han identificado distintas especies de levaduras, siendo las más comunes *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus flavescens*, *Pichia guilliermondii* y *Pichia kluyveri* (Wei y col., 2017).

Las bacterias colonizan mayoritariamente la pulpa y semillas más que otros órganos. Los filos de bacterias más comunes en el manzano son: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* (Wassermann y col., 2019).

Respecto a hongos filamentosos, se ha reportado la presencia de los géneros *Acremonium*, *Monascus*, *Archaeorhizomyces* y *Yarrowia* en la superficie de manzanas recién cosechadas. En cambio, los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Botrytis*, *Mycosphaerella*, *Rhodotorula* y *Wallemia* son más comunes en la superficie de manzana almacenada en refrigeración, indicando que en almacenamiento incrementa la presencia de hongos fitopatógenos. De manera similar, la superficie de manzana recolectada de huertos rurales es colonizada por diversas comunidades fúngicas, como los géneros *Coniothyrium*, *Paraphaeosphaeria* y *Periconia*. Sin embargo, en la superficie de manzana recolectada de huertos periurbanos se incrementan los hongos fitopatógenos como los pertenecientes a los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Tilletiposis* (Shen y col., 2018a; Shen y col., 2018b).

Con base en lo mencionado anteriormente, es notoria la diversidad de hongos que pueden estar presentes en el fruto de la manzana y es posible que algunos hongos pertenecientes a estas poblaciones puedan desarrollar interacciones negativas, entre ellas de patogenicidad, lo que hace necesario estudiar los hongos asociados

naturalmente a la manzana producida localmente (en el Estado de Querétaro) durante su desarrollo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. General

Identificar las poblaciones de hongos obtenidas de la superficie de manzana de la variedad 'Golden Delicious' durante su desarrollo y evaluar su potencial patogénico en el fruto.

### 2.2 Específicos

- Identificar poblaciones fúngicas de superficie de manzana 'Golden Delicious' en tres etapas de desarrollo mediante métodos morfológicos.
- Evaluar la patogenicidad de los hongos filamentosos aislados mediante la realización de ensayos de infección en fruto de manzano.
- Determinar actividad bioquímica de enzimas amilasas, celulasas y pectinasas de los hongos, relacionadas con la actividad patogénica mediante la inoculación de los hongos filamentosos en medios de cultivo específicos.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Material biológico y sitio experimental

El material biológico empleado en la experimentación consistió en 36 morfotipos de hongos filamentosos del cepario del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Tales morfotipos fueron obtenidos de tres etapas de crecimiento del fruto (cuajado de fruto, fruto verde y fruto maduro) de la variedad de manzano 'Golden Delicious' cultivada en una huerta experimental del municipio de Amealco, Querétaro (20°09'LN, 100°07'LO y 2279 msnm) en el año de 2018. Los aislados de hongos fueron obtenidos mediante dilución y siembra en placa en medio Agar Papa Dextrosa (APD, Dibco, México) con eritromicina (PiSA, Mexico) para limitar el crecimiento de bacterias. Las diferentes colonias observadas se transfirieron a una nueva caja con APD, hasta obtener cepas puras. Las cepas puras fueron clasificadas en morfotipos con base en la morfología colonial (forma, color y borde).

En cuanto a las manzanas utilizadas en experimentación, fueron frutos maduros del cultivar 'Golden Delicious' obtenidos en distribuidoras comerciales. Este cultivar es uno de los más consumidos en el mundo. Es originario de Virginia Occidental, Estados Unidos, donde surgió aproximadamente en 1890. No se sabe con seguridad a partir de qué cultivares se originó, pues en Estados Unidos se obtuvieron gran cantidad de cultivares resultantes de la hibridación entre las manzanas traídas de Europa y especies nativas de América como *M. ionesis* y *M. fusca*. El fruto de manzana 'Golden Delicious' es tronco-cónico, regular y alargado, con un peso aproximado de 190 a 210 gramos y 75 a 85 mm de calibre. Su pedúnculo es largo. La epidermis tiene color de verde amarillento a amarillo dorado, a veces con una cara rosada, sobre todo en los frutos de plantas jóvenes; tiene lenticelas visibles. La pulpa es amarillenta, fina, consistente, jugosa, crocante, perfumada y de sabor dulce-ácido equilibrado (CFIA, 2014).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1 Nomenclatura usada para los aislados

Para establecer una nomenclatura que permitiera distinguir a cada uno de los treinta y seis morfotipos en estudio, a cada uno se le asignó una clave consistente en la letra H (hongo), seguida de un número indicando el orden en que fue aislado, a continuación se añadieron las siglas GD por 'Golden Delicious', seguidas de las siglas E1, E2 o E3, dependiendo de si el aislado provenía de la etapa de cuajado de fruto, de fruto verde o de fruto maduro respectivamente, por último, se añadió el año 2018 en que fueron aislados. Por ejemplo, el morfotipo H5GDE1 2018 corresponde al quinto hongo aislado de manzana 'Golden Delicious' en etapa de cuajado de fruto, del año 2018.

### 3.2.2. Identificación de hongos filamentosos a nivel de género

Con el objetivo de obtener esporas de los aislados para identificarlos taxonómicamente a nivel de género, los hongos se inocularon en los siguientes medios: agar nutritivo de levadura glucosa (NYDA), agar papa dextrosa al 10% (APD 10%), agar de exudado de manzana, agar levadura-peptona-dextrosa 10% (YPD 10%) y agar V8. La composición de los medios de cultivo se muestra en el Anexo 1.

Se prepararon muestras para observación de esporas al microscopio. Para ello, se tomó muestra del crecimiento activo del hongo en el medio de cultivo de aproximadamente 15 días y se extendieron micelio y esporas en 25  $\mu$ L de ácido láctico (Meyer, México) sobre un portaobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio de campo claro (Zeiss, México) con aumento de 40X para apreciar las estructuras de micelio y esporas. Posteriormente, se compararon con claves taxonómicas para la identificación de los géneros *Fusarium* (Domsch y col., 2007), *Aspergillus* (Klich, 1988), *Penicillium* (Pitt, 1991), *Colletotrichum* (Damm y col., 2010), *Alternaria*, *Cladosporium* y *Rhizopus* (Denman y col., 2003; Bensch y col., 2010).

### 3.2.2.1. Identificación mediante microcultivos

Para aquellos hongos en los cuales no fue posible la apreciación de estructuras propagativas en microscopio por el tipo de crecimiento que tuvieron en el medio de cultivo, se realizaron microcultivos. Para cada microcultivo, se colocó en una caja de Petri una varilla triangular y sobre ésta un portaobjetos. A continuación, se cortaron cuadros de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de medio APD y se colocó un cuadro en el portaobjetos. Se tomó una muestra del hongo correspondiente y se inoculó en el medio de APD en sus cuatro lados por la parte transversal. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre el APD inoculado y se incubó a temperatura ambiente durante siete días. Tras el tiempo de incubación, el cubreobjetos, con crecimiento del hongo, se tomó con pinzas y se colocó sobre un nuevo portaobjetos con 25 µL de ácido láctico. Las muestras se observaron a microscopio con aumento de 40X y se compararon con las claves taxonómicas descritas previamente (León y Romero, 2017).

### 3.2.2.2. Cálculo de abundancia relativa de géneros fúngicos

Para obtener la abundancia relativa de los géneros identificados, en cada etapa se dividió el número de aislados pertenecientes a cada género encontrado (y también el número de aislados clasificados como micelio estéril) entre el número total de aislados en la etapa y se multiplicó por cien para expresarlo como porcentaje. Se elaboró un gráfico con los resultados.

### 3.2.3. Determinación de capacidad patogénica de los hongos en fruto

Los frutos empleados para el ensayo de patogenicidad se desinfectaron de la siguiente manera: se lavaron 5 min en etanol al 90 % v/v, 60 s en hipoclorito de sodio al 5 % v/v, 60 s en etanol al 70 % v/v y por último se enjuagaron con agua destilada estéril. Con un horador se realizaron 4 orificios en cada fruto (con dimensiones de 5 x 5 mm) en el diámetro ecuatorial (Calvo y col., 2014; Silva y col., 2015).

Los cultivos de los hongos correspondientes con 15 días de crecimiento se perforaron para obtener discos de 5 x 5 mm, los cuales se inocularon con el micelio hacia adentro en los orificios realizados en el fruto. Cada hongo se inoculó por triplicado. Como control positivo se empleó el hongo *Penicillium expansum* CFNL2016 (previamente caracterizado como fitopatógeno de manzana) y como control negativo se dejaron orificios sin inocular. Los frutos inoculados se colocaron en una cámara húmeda, consistente en una caja de plástico con sanitas humedecidas con agua estéril, la cual se selló con tiras de plástico y se cerró para mantener los frutos aislados (Sánchez y col., 2008).

Diez días tras la inoculación, se evaluó el diámetro del daño provocado por el hongo en mm y el porcentaje de daño, definido como el porcentaje del diámetro promedio del daño provocado por un hongo respecto al diámetro del daño provocado por el control positivo (*P. expansum*). Además, se describieron las características de las lesiones provocadas en fruto por los aislados.

#### 3.2.4. Caracterización cualitativa de enzimas involucradas en patogenicidad de los hongos

##### 3.2.4.1. Determinación de actividad amilolítica

Los hongos se inocularon por triplicado en agar almidón, incubándose a 30 °C por 15 días. La composición del medio de se muestra en el Anexo 1. Posteriormente, se agregó a las cajas una solución de lugol (Karal, México) al 0.5 % y se dejó actuar por 5 min. Se determinó la presencia de halos por degradación de almidón en el medio de cultivo. Como control positivo se utilizó *P. expansum* CFNL2016 (Sujeeta y col., 2017).

##### 3.2.4.2. Determinación de actividad pectinolítica

Los hongos se inocularon por triplicado en agar pectina, incubándose a 30 °C por 15 días. La composición del medio de cultivo se muestra en el Anexo 1. Tras el tiempo establecido para incubación, se agregó a cada caja una solución de lugol al 0.5 % y se dejó actuar por 5 minutos. Se determinó la presencia de halos por

degradación de pectina. Como control positivo se utilizó *P. expansum* CFNL2016 (Poveda y col., 2018).

#### 3.2.4.3. Determinación de actividad celulolítica

Para la determinación de actividad celulolítica se seleccionaron los hongos que generaron más del 50 % de daño en fruto debido a la limitación en la disponibilidad de carboximetilcelulosa. Los hongos se inocularon por triplicado en agar carboximetilcelulosa, incubándose a 30 °C por 15 días. La composición del medio de cultivo se muestra en el Anexo 1. Posteriormente, se agregó a las cajas rojo Congo (Karal, México) al 1 % por 15 min, se lavó dos veces con NaCl (Meyer, México) 2M y se dejó reposar por 15 min. Se determinó la presencia de halos por degradación de celulosa. Como control positivo se utilizó *P. expansum* CFNL2016 (Guzmán y col., 2014).

#### 3.2.5. Disposición de residuos

Para hacer una adecuada disposición de los residuos generados, los hongos en medios de cultivo que ya no se utilizaran, así como las manzanas infectadas tras los ensayos, se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm por 20 minutos para inactivar a los microorganismos y evitar futuras infecciones a plantas o frutos. Posteriormente, los residuos se desecharon en bolsas de plástico.

### 3.4. Diseño experimental

#### 3.4.1. Ensayos de capacidad patogénica de los hongos en fruto

Diseño experimental: Completamente al azar con tres repeticiones.

Factores de estudio: Aislados de hongos filamentosos. Cada uno de los 36 mohos obtenidos de tres etapas de crecimiento del fruto (cuajado de fruto, fruto verde y fruto maduro) de la variedad de manzano 'Golden Delicious'.

Variables evaluadas: Severidad del patógeno a 10 días de incubación, expresada como:

- Diámetro del daño provocado por el moho (mm).

- Porcentaje de daño.

Unidad experimental: Una manzana con cuatro heridas en el diámetro ecuatorial del fruto.

#### 3.4.2. Ensayos de determinación de actividad amilolítica

Diseño experimental: Completamente al azar con tres repeticiones.

Factores de estudio: Aislados de hongos filamentosos. Cada uno de los 36 mohos obtenidos de tres etapas de crecimiento del fruto (cuajado de fruto, fruto verde y fruto maduro) de la variedad de manzano 'Golden Delicious'.

Variables evaluadas: Presencia de halo de degradación de almidón.

Unidad experimental: Una caja de Petri con agar almidón.

#### 3.4.3. Ensayos de determinación de actividad pectinolítica

Diseño experimental: Completamente al azar con tres repeticiones.

Factores de estudio: Aislados de hongos filamentosos. Cada uno de los 36 mohos obtenidos de tres etapas de crecimiento del fruto (cuajado de fruto, fruto verde y fruto maduro) de la variedad de manzano 'Golden Delicious'.

Variables evaluadas: Presencia de halo de degradación de pectina.

Unidad experimental: Una caja de Petri con agar pectina.

#### 3.4.4. Ensayos de determinación de actividad celulolítica

Diseño experimental: Completamente al azar con tres repeticiones.

Factores de estudio: Aislados de hongos filamentosos. Cada uno de los 36 mohos obtenidos de tres etapas de crecimiento del fruto (cuajado de fruto, fruto verde y fruto maduro) de la variedad de manzano 'Golden Delicious'.

Variables evaluadas: Presencia de halo de degradación de carboximetilcelulosa.

Unidad experimental: Una caja de Petri con agar carboximetilcelulosa.

#### 3.4.5. Análisis estadístico

Con los resultados de los ensayos de capacidad patogénica de los aislados en fruto se realizó (para los aislados en las tres etapas) análisis de varianza y comparación de medias por prueba de Tukey. Además, para los aislados en los que se ensayaron las tres actividades enzimáticas se realizó un agrupamiento jerárquico representado mediante un dendograma tomando en cuenta el porcentaje de daño provocado en fruto y los resultados de las actividades enzimáticas. Todos los análisis estadísticos mencionados se llevaron a cabo en el software RStudio versión 1.2.5003.0.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Nomenclatura empleada para los morfotipos aislados

En el Cuadro 3 se muestran las claves usadas para los morfotipos. La colección de hongos de la etapa 1 estuvo compuesta por catorce aislados, mientras las colecciones de las etapas 2 y 3 estuvieron conformadas por once aislados cada una.

Cuadro 3. Nomenclatura usada para identificación de los morfotipos en estudio.

Etapa 1 – Cuajado de fruto	Etapa 2 – Fruto verde	Etapa 3 – Fruto maduro
H1GDE1 2018	H1GDE2 2018	H2GDE3 2018
H2GDE1 2018	H2GDE2 2018	H3GDE3 2018
H3GDE1 2018	H3GDE2 2018	H4GDE3 2018
H4GDE1 2018	H4GDE2 2018	H5GDE3 2018
H5GDE1 2018	H5GDE2 2018	H6GDE3 2018
H6GDE1 2018	H6GDE2 2018	H7GDE3 2018
H7GDE1 2018	H7GDE2 2018	H8GDE3 2018
H8GDE1 2018	H8GDE2 2018	H9GDE3 2018
H9GDE1 2018	H9GDE2 2018	H10GDE3 2018
H10GDE1 2018	H10GDE2 2018	H11GDE3 2018
H11GDE1 2018	H11GDE2 2018	H12GDE3 2018
H12GDE1 2018	-	-
H13GDE1 2018	-	-
H14GDE1 2018	-	-

### 4.2. Identificación de los hongos a nivel de género

De un total de 36 hongos aislados de las etapas de cuajado de fruto, fruto verde y fruto maduro de la variedad de 'Golden Delicious', fue posible identificar veintiséis (72.22 %) a nivel de género. No fue posible identificar al resto, diez aislados, debido a la ausencia de esporas en los cultivos. El medio de cultivo que mejor funcionó para la generación de esporas fue el NYDA. De los 26 hongos identificados, ocho

correspondieron al género *Cladosporium* (22.22 %); seis al género *Alternaria* (16.66 %); cinco al género *Aspergillus* (13.88 %); cuatro al género *Penicillium* (11.11 %) y por último, para los géneros *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* se identificó un aislado de cada uno (2.77 %). Todos los géneros identificados pertenecen a la división *Ascomycota*, excepto *Rhizopus*, que pertenece a la *Mucoromycota*. La abundancia relativa de los géneros a través de las tres etapas de desarrollo del fruto de la variedad 'Golden Delicious' se muestra en la Figura 9.

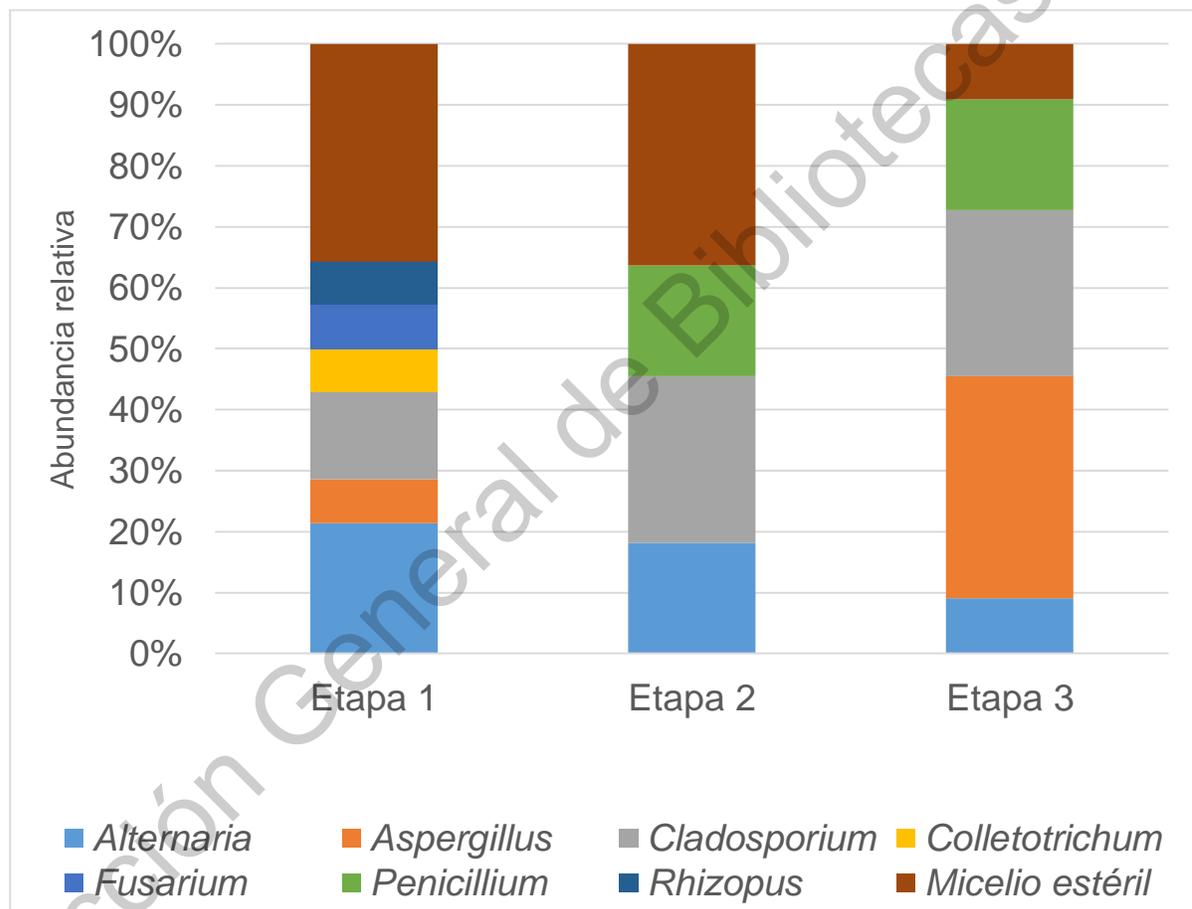


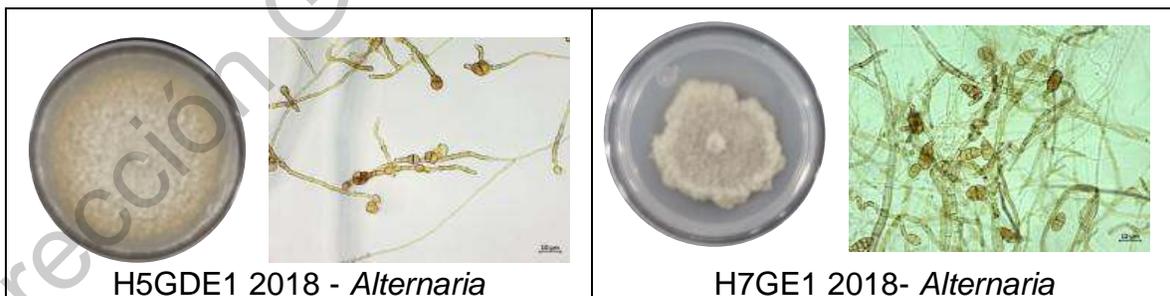
Figura 9. Abundancia relativa de los géneros fúngicos. Se muestra la abundancia relativa en las tres etapas de desarrollo de fruto de var. 'Golden Delicious'.

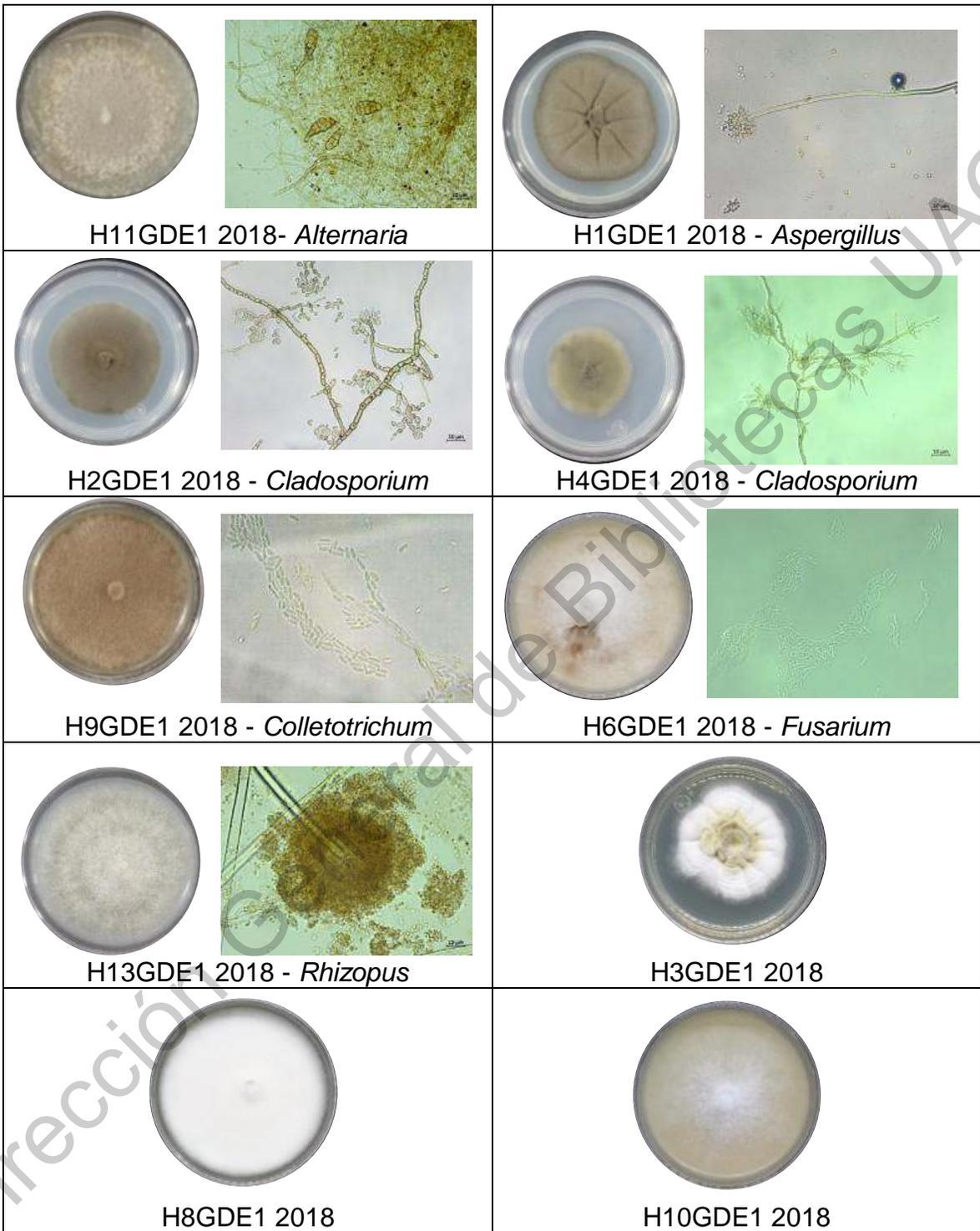
*Alternaria* tuvo una abundancia relativa del 21.43 % en la etapa 1, 18.18 % en la etapa 2 y 9.09 % en la última etapa; *Aspergillus* estuvo presente en las etapas 1 y 3 con abundancia relativa de 7.14 y 36.36 % respectivamente; *Cladosporium* se

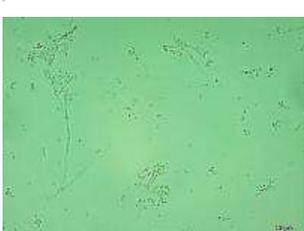
encontró en las tres etapas con valores de 14.29 % en la primera y de 27.27 % en la segunda y tercera; los géneros *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* tuvieron todos una abundancia relativa del 7.14 % únicamente en la etapa 1; el género *Penicillium* se encontró en las etapas 2 y 3, con abundancia relativa de 18.18 % en ambas; por último, los hongos que fueron clasificados como micelio estéril representaron el 35.71 % en la etapa 1, el 36.36 % en etapa 2 y el 9.09 % en la etapa 3.

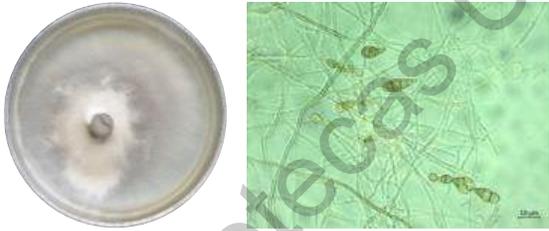
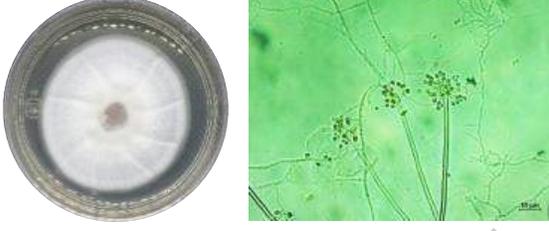
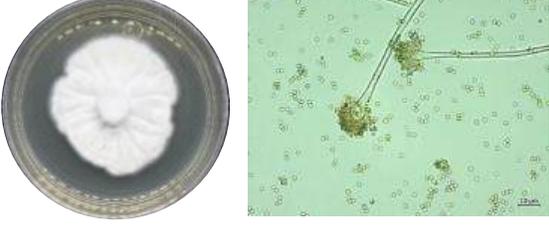
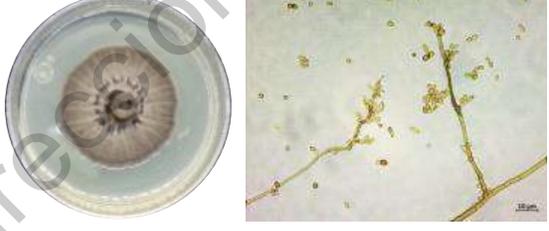
Por su parte, la morfología microscópica y macroscópica de los hongos se muestra en el Cuadro 4. La morfología macroscópica se registró fotografiando los hongos tal como crecieron en los medios de cultivo. Por otro lado, las fotografías de las estructuras reproductivas de los hongos tomadas con aumento de 40X permitieron la identificación de los aislados a nivel de género. En el caso de los hongos que únicamente produjeron micelio estéril, solamente se tomaron fotografías de su morfología en placa de Petri.

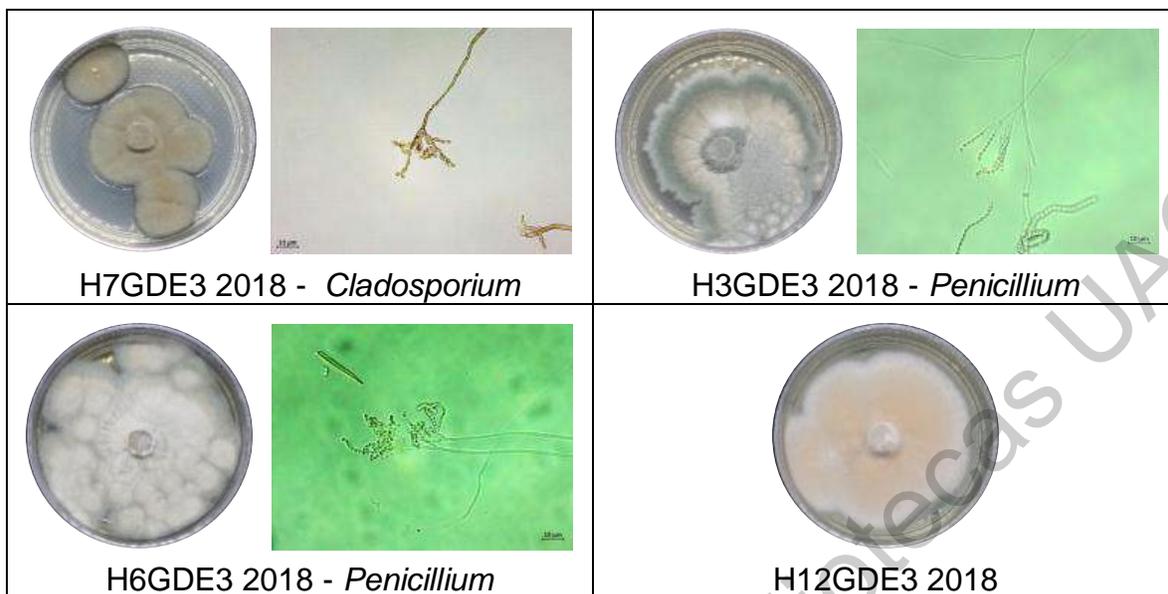
Cuadro 4. Morfología macroscópica y microscópica de los aislados. Las imágenes se ordenaron en primer lugar por etapa de desarrollo de fruto y en segundo lugar por el orden alfabético de los géneros en cada etapa. Al final de cada etapa se muestran los hongos de los cuales no se obtuvieron estructuras reproductivas (micelio estéril).





 <p>H12GDE1 2018</p>	 <p>H14GDE1 2018</p>
  <p>H5GDE2 2018 - <i>Alternaria</i></p>	  <p>H11GDE2 2018 - <i>Alternaria</i></p>
  <p>H2GDE2 2018 - <i>Cladosporium</i></p>	  <p>H3GDE2 2018 - <i>Cladosporium</i></p>
  <p>H6GDE2 2018 - <i>Cladosporium</i></p>	  <p>H8GDE2 2018 - <i>Penicillium</i></p>
  <p>H9GDE2 2018 - <i>Penicillium</i></p>	 <p>H1GDE2 2018</p>

 <p>H4GDE2 2018</p>	 <p>H7GDE2 2018</p>
 <p>H10GDE2 2018</p>	 <p>H8GDE3 2018 - <i>Alternaria</i></p>
 <p>H4GDE3 2018 - <i>Aspergillus</i></p>	 <p>H9GDE3 2018 - <i>Aspergillus</i></p>
 <p>H10GDE3 2018 - <i>Aspergillus</i></p>	 <p>H11GDE3 2018 - <i>Aspergillus</i></p>
 <p>H2GDE3 2018 - <i>Cladosporium</i></p>	 <p>H5GDE3 2018 - <i>Cladosporium</i></p>



#### 4.3. Patogenicidad de los aislados

La evaluación de la potencial actividad fitopatógena de los hongos filamentosos comprendió dos etapas: en la primera se determinó el daño provocado en fruto por los aislados, en la segunda se determinaron las actividades amilolítica, pectinolítica y celulolítica de los hongos, pudiendo aportar evidencia de si los hongos serían capaces de infectar fruto por su cuenta. Los resultados de estos ensayos se muestran en los Cuadros 5, 6 y 7, donde se observa que el daño provocado por los hongos en fruto abarca un amplio rango, que va desde la ausencia de daño por *Cladosporium* H4GDE1 2018 hasta más del 100 % de daño por parte de *Penicillium* H6GDE3 2018 en comparación al control positivo *P. expansum*.

Los resultados de los análisis de varianza para los porcentajes de daño y los diámetros de daño indicaron que no existe diferencia estadística entre las etapas pero sí entre cepas. Los resultados de la comparación de medias por prueba de Tukey se indican con letras en los porcentajes de daño de los aislados en los Cuadros 5, 6 y 7. Fue posible determinar que de los aislados de Etapa 1, el porcentaje de daño causado por el aislado *Cladosporium* H4GDE1 2018 es estadísticamente diferente al de los aislados *Fusarium* H6GDE1 2018 y *Alternaria* H11GDE1 2018. En los aislados de Etapa 2, el porcentaje de daño de *Penicillium*

H9GDE2 2018 es diferente a los de los aislados H1GDE2 2018, *Cladosporium* H2GDE2 2018, H7GDE2 2018, *Penicillium* H8GDE2 2018 y *Alternaria* H11GDE2 2018; en cambio, el del aislado *Alternaria* H5GDE2 2018 es diferente a los de *Cladosporium* H2GDE2 2018 y *Alternaria* H11GDE2 2018. Por último, en los aislados de Etapa 3, el porcentaje de daño de *Penicillium* H6GDE3 2018 fue diferente de los provocados por *Cladosporium* H2GDE3 2018 y *Cladosporium* H5GDE3 2018.

Cuadro 5. Patogenicidad de cepas de hongos de Etapa 1 en fruto y actividad enzimática. Se muestra el porcentaje de daño respecto al producido por *P. expansum*.

Clave	Género	Porcentaje de daño (%)	Act.	Act.	Act.
			AL	PL	CL
H5GDE1 2018	<i>Alternaria</i>	35.89 ± 37.23 <sup>ab</sup>	+	+	N
H7GDE1 2018	<i>Alternaria</i>	38.00 ± 3.19 <sup>ab</sup>	+	+	N
H11GDE1 2018	<i>Alternaria</i>	57.38 ± 32.34 <sup>a</sup>	+	+	-
H1GDE1 2018	<i>Aspergillus</i>	42.87 ± 6.30 <sup>ab</sup>	+	+	N
H2GDE1 2018	<i>Cladosporium</i>	25.36 ± 23.35 <sup>ab</sup>	+	+	N
H4GDE1 2018	<i>Cladosporium</i>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	-	+	N
H9GDE1 2018	<i>Colletotrichum</i>	24.09 ± 21.25 <sup>ab</sup>	+	-	N
H6GDE1 2018	<i>Fusarium</i>	55.26 ± 2.84 <sup>a</sup>	-	+	-
H13GDE1 2018	<i>Rhizopus</i>	52.37 ± 17.49 <sup>a</sup>	+	+	+
H3GDE1 2018	*	27.12 ± 0.77 <sup>ab</sup>	+	+	N
H8GDE1 2018	*	32.43 ± 5.43 <sup>ab</sup>	+	+	N
H10GDE1 2018	*	25.11 ± 25.33 <sup>ab</sup>	+	+	N
H12GDE1 2018	*	28.24 ± 3.30 <sup>ab</sup>	+	+	N
H14GDE1 2018	*	22.37 ± 2.20 <sup>ab</sup>	+	+	N

\*: micelio estéril; Act. AL: actividad amilolítica; Act. PL: actividad pectinolítica; Act. CL: actividad celulolítica; N: no se realizó ensayo. Valores seguidos por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey (P = 0.05).

Cuadro 6. Patogenicidad de cepas de hongos de Etapa 2 en fruto y actividad enzimática. Se muestra el porcentaje de daño respecto al producido por *P. expansum*.

Clave	Género	Porcentaje de daño (%)	Act. AL	Act. PL	Act. CL
H5GDE2 2018	<i>Alternaria</i>	82.70 ± 28.28 <sup>ab</sup>	+	-	-
H11GDE2 2018	<i>Alternaria</i>	24.75 ± 21.54 <sup>c</sup>	+	+	N
H2GDE2 2018	<i>Cladosporium</i>	10.64 ± 18.42 <sup>c</sup>	-	+	N
H3GDE2 2018	<i>Cladosporium</i>	32.64 ± 5.64 <sup>abc</sup>	+	+	N
H6GDE2 2018	<i>Cladosporium</i>	34.71 ± 23.55 <sup>abc</sup>	-	+	N
H8GDE2 2018	<i>Penicillium</i>	25.05 ± 2.49 <sup>bc</sup>	+	+	N
H9GDE2 2018	<i>Penicillium</i>	89.40 ± 33.89 <sup>a</sup>	+	+	+
H1GDE2 2018	*	27.84 ± 0.89 <sup>bc</sup>	+	+	N
H4GDE2 2018	*	30.68 ± 7.99 <sup>abc</sup>	+	-	N
H7GDE2 2018	*	29.06 ± 3.60 <sup>bc</sup>	+	+	N
H10GDE2 2018	*	56.06 ± 6.22 <sup>abc</sup>	+	+	+

\*: micelio estéril; Act. AL: actividad amilolítica; Act. PL: actividad pectinolítica; Act. CL: actividad celulolítica; N: no se realizó ensayo. Valores seguidos por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey (P = 0.05).

Cuadro 7. Patogenicidad de cepas de hongos de Etapa 3 en fruto y actividad enzimática. Se muestra el porcentaje de daño respecto al producido por *P. expansum*.

Clave	Género	Porcentaje de daño (%)	Act. AL	Act. PL	Act. CL
H8GDE3 2018	<i>Alternaria</i>	67.27 ± 59.58 <sup>ab</sup>	+	+	+
H4GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	29.22 ± 1.50 <sup>ab</sup>	+	+	N
H9GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	35.45 ± 2.39 <sup>ab</sup>	+	+	N
H10GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	48.06 ± 5.46 <sup>ab</sup>	+	+	N
H11GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	33.49 ± 4.97 <sup>ab</sup>	+	+	N
H2GDE3 2018	<i>Cladosporium</i>	22.63 ± 19.65 <sup>b</sup>	-	+	N
H5GDE3 2018	<i>Cladosporium</i>	12.33 ± 21.35 <sup>b</sup>	+	+	N

H7GDE3 2018	<i>Cladosporium</i>	60.48 ± 39.99 <sup>ab</sup>	+	+	-
H3GDE3 2018	<i>Penicillium</i>	59.13 ± 8.42 <sup>ab</sup>	+	+	+
H6GDE3 2018	<i>Penicillium</i>	100.00 ± 4.02 <sup>a</sup>	+	+	+
H12GDE3 2018	*	30.34 ± 6.06 <sup>ab</sup>	-	+	N

\*: micelio estéril; Act. AL: actividad amilolítica; Act. PL: actividad pectinolítica; Act. CL: actividad celulolítica; N: no se realizó ensayo. Valores seguidos por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey (P = 0.05).

Cuadro 8. Rangos de porcentajes de daño causados en fruto. Se muestran los daños causados por los géneros de hongos identificados y por micelio estéril aislados de las tres etapas de desarrollo de fruto.

Género	Etapas 1	Etapas 2	Etapas 3
<i>Alternaria</i>	35.89 % - 57.37 %	24.75 % - 82.70 %	67.27 %
<i>Aspergillus</i>	42.87 %	-	29.22 % - 48.06 %
<i>Cladosporium</i>	0.0 % - 25.36 %	10.64 % - 34.71 %	12.33 % - 60.48 %
<i>Colletotrichum</i>	24.09 %	-	-
<i>Fusarium</i>	55.26 %	-	-
<i>Penicillium</i>	-	25.05 % - 89.40 %	59.13 % - 100.95 %
<i>Rhizopus</i>	52.36 %	-	-
Micelio estéril	22.37 % - 32.43 %	27.84 % - 56.06 %	30.34 %
Media por etapa	33.32 %	40.32 %	45.40 %

En el Cuadro 8 pueden observarse los rangos de porcentajes de daño generados por los distintos géneros y micelio estéril en las tres etapas de desarrollo de fruto. La etapa 1 es en la que se encontraron los porcentajes de daño más bajos, que van desde la ausencia de daño por el género *Cladosporium* a un 57.37 % causado por *Alternaria* y una media de la etapa de 33.32 %, mientras en la etapa 2 el rango van desde un 12.75 % provocado por *Cladosporium* a un 89.40 % provocado por *Penicillium* y una media de etapa de 40.32 %, por último, en la etapa 3 van desde un 12.33 % generado por *Cladosporium* hasta un 100 % generado por *Penicillium*, con una media de la etapa de 45.40 %. Podemos afirmar que el daño causado por los aislados incrementó de acuerdo a las etapas de desarrollo en fruto, siendo

ciertos aislados del género *Cladosporium* los que generaron menor daño y los aislados de *Penicillium* los que generaron mayor daño respecto a los demás.

Si bien, de acuerdo a la comparación de medias por la prueba de Tukey no existen diferencias estadísticas suficientes para afirmar que existen aislados cuyo porcentaje de daño sea completamente diferente al del resto, el dendograma de agrupamiento jerárquico realizado (Figura 10) permitió identificar cuáles aislados (de aquellos para los que se realizaron las tres pruebas enzimáticas) son más parecidos entre sí de acuerdo a porcentaje de daño y los resultados de los ensayos de actividad enzimática.

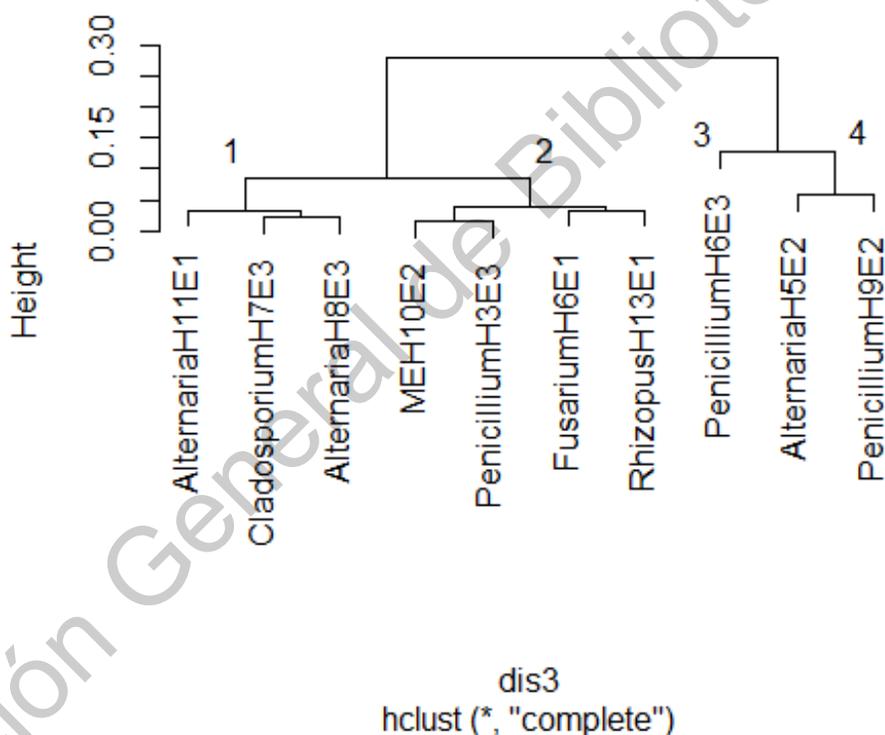


Figura 10. Agrupamiento jerárquico de hongos antagonistas.

Los distintos géneros de hongos provocaron diferentes tipos de lesiones en fruto como puede apreciarse en la Figura 11. Los aislados del género *Alternaria* provocaron lesiones de color marrón alrededor del sitio de inoculación, sobre las cuales se observó crecimiento de micelio en la mayoría de los casos, mientras que en otros aislados como el H8GDE3 2018 no se observó una lesión marrón pero sí

crecimiento de micelio alrededor del sitio de inoculación. El daño provocado por los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* fue similar: lesiones marrones sobre las que había crecimiento de micelio. En los géneros *Cladosporium* y *Colletotrichum*, las lesiones perceptibles correspondieron a crecimiento de micelio alrededor del sitio de inoculación. La lesión provocada por el género *Penicillium* es característica y particularmente severa: consiste en amplias zonas de pudrición de color marrón, ablandamiento del fruto y crecimiento de micelio verde azulado. En el género *Rhizopus*, la lesión consistió únicamente en pudrición color marrón alrededor del sitio de inoculación.

 <p>H7GDE1 2018 <i>Alternaria</i></p>	 <p>H5GDE1 2018 <i>Alternaria</i></p>	 <p>H5GDE2 2018 <i>Alternaria</i></p>
 <p>H8GDE3 2018 <i>Alternaria</i></p>	 <p>H1GDE1 2018 <i>Aspergillus</i></p>	 <p>H4GDE3 2018 <i>Aspergillus</i></p>
 <p>H10GDE3 2018 <i>Aspergillus</i></p>	 <p>H3GDE2 2018 <i>Cladosporium</i></p>	 <p>H7GDE3 2018 <i>Cladosporium</i></p>

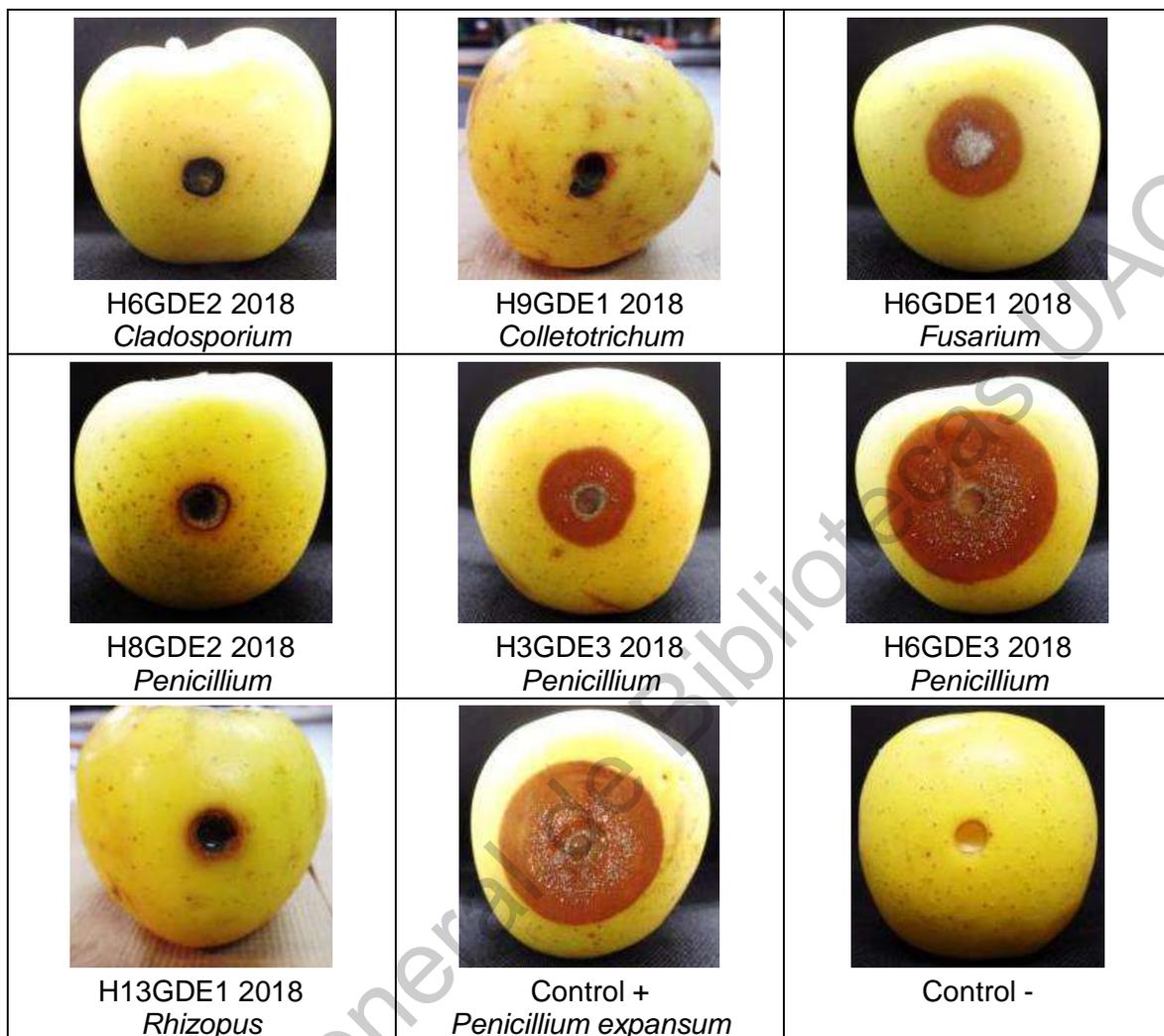
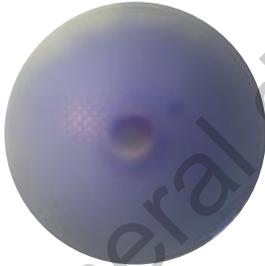
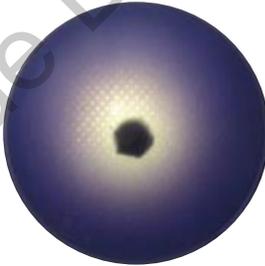


Figura 11. Lesiones provocadas por los aislados en fruto. Se muestran los distintos tipos de lesiones causadas por los géneros de hongos filamentosos en estudio.

Respecto a los ensayos de actividades enzimáticas, la mayoría de los aislados dieron resultados positivos, encontrándose que el 83.33 % de los hongos en estudio presentó actividad amilolítica, mientras el 96.51 % presentó actividad pectinolítica y por su parte el 66.67 % de los hongos para los que se ensayó actividad celulolítica dieron resultado positivo.

A pesar de que las pruebas realizadas para determinar las actividades enzimáticas fueron meramente cualitativas, fue posible apreciar distintas intensidades de actividad enzimática por la intensidad de los halos observados en los medios de cultivo. Estos resultados pueden observarse en la Figura 12.

Debido a que las actividades amilolítica, pectinolítica y celulolítica en hongos son indicadores de su potencial capacidad fitopatógena, es posible que aquellos aislados que resultaron positivos para las tres actividades enzimáticas sean los hongos que tienen mayor probabilidad de comportarse como fitopatógenos de fruto de manzana Golden Delicious en campo. Estos aislados fueron cinco: *Rhizopus* H13GDE1, *Penicillium* H9GDE2, *Penicillium* H3GDE3, *Penicillium* H6GDE3 y *Alternaria* H8GDE3.

Actividad enzimática			
Actividad amilolítica	 <p data-bbox="574 1220 773 1283">H6GDE1 2018 <i>Fusarium</i></p>	 <p data-bbox="876 1220 1075 1283">H8GDE3 2018 <i>Alternaria</i></p>	 <p data-bbox="1180 1220 1378 1251">H10GDE1 2018</p>
	 <p data-bbox="574 1566 773 1629">H11GDE2 2018 <i>Alternaria</i></p>	 <p data-bbox="876 1566 1075 1629">H6GDE3 2018 <i>Penicillium</i></p>	 <p data-bbox="1208 1566 1349 1629"><i>Penicillium expansum</i></p>

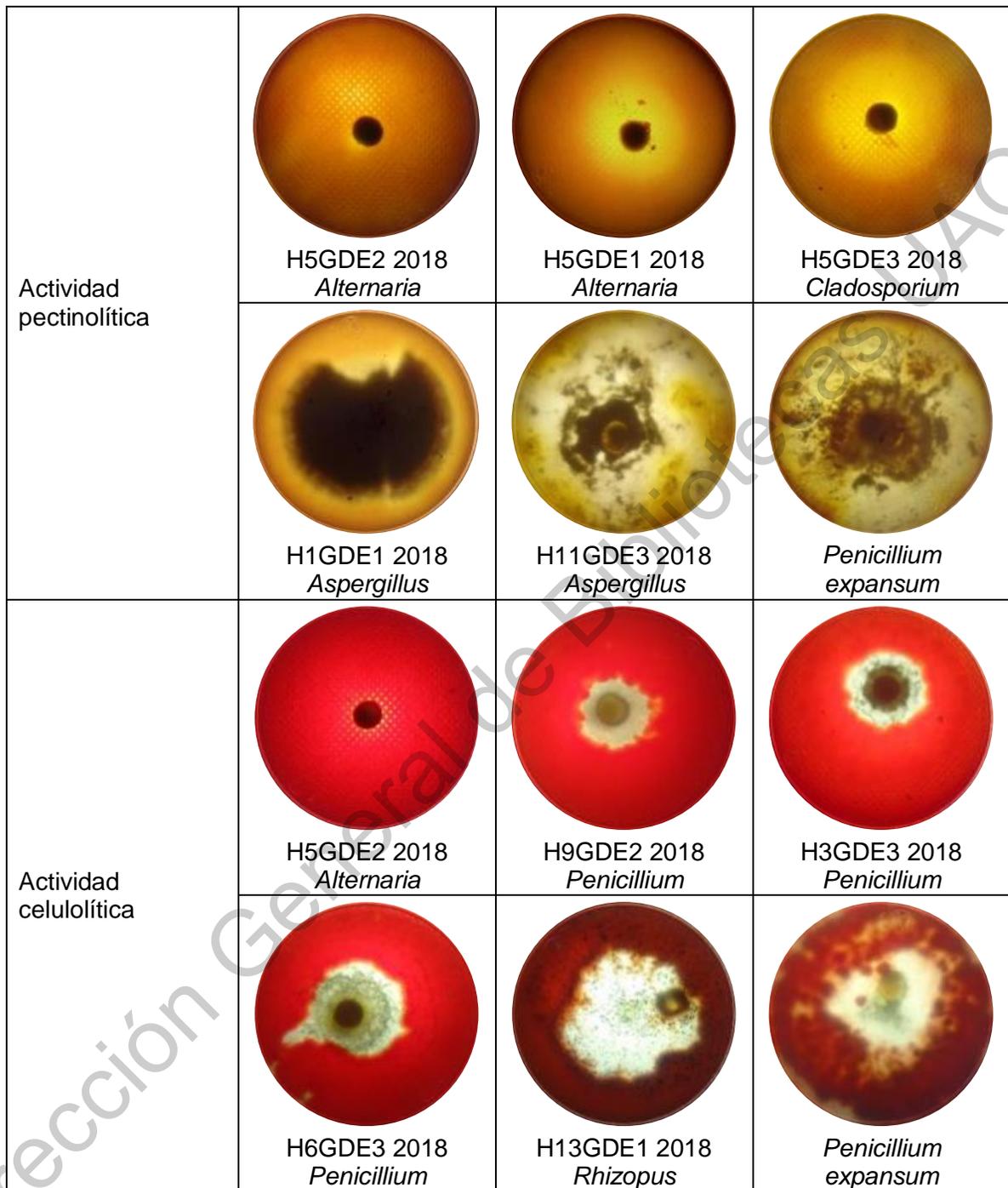


Figura 12. Ensayos de actividades enzimáticas.

Los resultados de los ensayos de patogenicidad en fruto expresados como diámetro de lesión se presentan en el Anexo II.

## 5. Discusión

### 5.1. Identificación de los hongos a nivel de género

Los resultados obtenidos revelan la complejidad de la composición de las comunidades fúngicas epífitas en las tres etapas de desarrollo del fruto de manzana cv. 'Golden Delicious'. Actualmente, se sabe que existen diversos hongos asociados al fruto de la manzana, los cuales pueden variar con base en la variedad, la forma de cultivo y el tipo de almacenamiento del fruto (Abdelfattah y col., 2016).

Respecto a los siete distintos géneros de hongos identificados en el estudio: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus*; la presencia de todos ellos ha sido previamente reportada en fruto de manzana. Especialmente, los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium* son los géneros más comunes encontrados en superficie de manzana cuando se realiza una identificación a partir de técnicas basadas en medios de cultivo como lo fue la metodología empleada en el presente trabajo (Lee y col., 2017; Shen y col., 2018b; Khokhar y col., 2019; Oo y col., 2019).

Sin embargo, existen reportes previos en los que se ha llevado a cabo la identificación de comunidades fúngicas en superficie de manzana empleando técnicas basadas en secuenciación, obteniéndose resultados que varían en comparación a los presentados. En un estudio realizado por Abdelfattah y col. (2016) se identificaron los géneros presentes en tejidos del fruto de manzana, se encontraron 24 géneros predominantes, incluyendo *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*, siendo el género *Penicillium* el predominante en la piel y heridas del fruto, mientras el género *Alternaria* fue el predominante en el cáliz y en el extremo del tallo. En otro estudio en que se determinó la comunidad fúngica en superficie de manzana recién cosechada y en superficie de manzana almacenada en frío, identificándose 261 especies de hongos pertenecientes a 134 géneros, incluyendo *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Los géneros *Acremonium*, *Monascus*, *Archaeorhizomyces* y *Yarrowia* fueron característicos en fruto recién cosechado, mientras los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*,

*Botrytis*, *Mycosphaerella*, *Rhodotorulla* y *Wallemia* fueron característicos de fruto refrigerado, indicando un enriquecimiento de géneros potencialmente fitopatógenos en fruto refrigerado (Shen y col., 2018a). Un caso más es el de un estudio donde se determinó la comunidad fúngica epífita de frutos de manzana provenientes de huerto rurales y de huertos periurbanos, identificándose 360 especies pertenecientes a 111 géneros, siendo *Coniothyrium*, *Paraphaeosphaeria* y *Periconia* característicos de en los frutos provenientes de huertos rurales, mientras los frutos provenientes de huertos periurbanos se caracterizaron por la presencia de géneros como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Tilletiposis*. De forma similar al estudio mencionado anteriormente, se observó un enriquecimiento de géneros potencialmente fitopatógenos en los frutos provenientes de huertos periurbanos (Shen y col., 2018b).

Con base en las investigaciones mencionadas, es posible decir que la determinación de comunidades fúngicas por medio de secuenciación permite una identificación más específica, pudiendo llegar a nivel de especie y además permite identificar un alto número de individuos en comparación a las técnicas basadas en medios de cultivo. De los siete distintos géneros identificados en este estudio el más abundante fue *Cladosporium*, el cual junto a *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Rhizopus* no fueron géneros representativos en los reportes mencionados, no obstante, los géneros *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*, que fueron aquellos que siguieron a *Cladosporium* en abundancia, sí fueron reportados como géneros representativos en las comunidades fúngicas estudiadas previamente, recalándose su posible actividad fitopatógena.

Respecto a la composición de la comunidad fúngica a través de las tres etapas de desarrollo del fruto de manzana, ésta puede compararse en ciertos aspectos a los resultados obtenidos en un estudio que determinó los cambios en la comunidad fúngica de la superficie de uva de mesa a través de tres etapas de desarrollo: plena floración, “tamaño de chícharo” y uva madura. Se encontró un total de 251 géneros, de los cuales *Alternaria* y *Cladosporium* fueron los géneros de hongos filamentosos más abundantes que se compartieron entre las tres etapas de desarrollo de la uva.

La etapa de “tamaño de chícharo” fue la que presentó una mayor variedad, teniendo las otras dos etapas una variedad similar entre sí. El género *Alternaria* fue el dominante en etapa de plena floración con una abundancia relativa de 43.3 %, en etapa de “tamaño de chícharo” tuvo un valor de 30.9 % y en la etapa de fruto maduro disminuyó a 18.3 %. Por su parte, el género *Cladosporium* tuvo una abundancia relativa de 33.5 % en etapa de “tamaño de chícharo” y de aproximadamente 23 % en las otras dos. (Carmichael y col., 2017).

En nuestro estudio no se consideró la etapa de floración, pero la etapa de cuajado de fruto de manzana fue la que presentó mayor variedad de géneros (seis) de manera similar a la etapa de “tamaño de chícharo” de uva que fue la etapa más temprana de fruto en el estudio mencionado anteriormente, por lo que probablemente las etapas más tempranas de desarrollo de fruto sean las que presentan una mayor variedad de individuos. Si se sigue este razonamiento, debe tomarse en cuenta que en la etapa de fruto verde únicamente se encontraron tres géneros, mientras en la etapa de fruto maduro se identificaron cuatro, lo que podría deberse a los cuatro aislados que no pudieron identificarse en fruto verde. Al igual que en las etapas de maduración de la uva, el género *Alternaria* es el predominante en la primera etapa y su abundancia relativa disminuye a través de las siguientes etapas. Por el contrario, el género *Cladosporium* es menos abundante en la primera etapa de maduración de manzana y se mantiene constante en las siguientes.

Las razones por las que la variedad de géneros y la abundancia relativa de éstos fueron diferentes en las tres etapas de muestreo pueden ser varias, incluyendo condiciones ambientales, características de la planta y de los microorganismos. En primer lugar, son varios los procesos por los que microorganismos llegan y se establecen en superficies de las plantas (como los frutos), tales como deposición aérea, colonización desde otras partes de la planta, colonización desde el suelo, por riego o incluso la introducción intencional. Por otra parte, se sabe que las condiciones ambientales que influyen en la composición de comunidades microscópicas epífitas ya establecidas incluyen la lluvia, humedad, temperatura y radiación solar. En cambio, las características de la planta que repercuten en

dichas comunidades son el genotipo y fenotipo de la plantas, pues determinan características como la cantidad y distribución de metabolitos, agua, nutrientes y humedad en tejidos. También los microorganismos influyen en su propia composición en superficies vegetales, pues aquellos que son más tolerantes al estrés recibido en tales estructuras (como la radiación UV y estrés oxidativo), además de capaces de aprovechar los recursos presentes en las superficies, son los que con mayor probabilidad sean colonizadores exitosos; otro factor que influye es la interacción entre microorganismos, pues la presencia de algunos puede favorecer o dificultar el establecimiento de otros, sugiriéndose que el cambio en la composición de microorganismos a través del tiempo ocurre bajo condiciones naturales, reportándose por ejemplo que en las hojas de *Camellia japonica* hay una sucesión de especies fúngicas colonizadoras a través del desarrollo, caracterizándose el último grupo colonizador por su capacidad fitopatógena (López y col., 2017; Leveau, 2019).

El hecho de que la etapa 1 presentara una mayor variedad de mohos en comparación a las otras pudo deberse, por una parte, a que hay partes de la flor que permanecen en el fruto, conservándose la microbiota epífita de la flor, o al menos parte de ésta, especialmente en el cáliz donde se encuentran los restos de sépalos, estambres y estilo. Deben tomarse en cuenta también los procesos por los cuales los microorganismos pueden colonizar la superficie de las plantas y que se mencionaron anteriormente, procesos que pudieron haber enriquecido la variedad de mohos en el cuajado de fruto además de los que pudieran haberse establecido desde la etapa de flor. Otro factor que pudo haber influido es el clima en las distintas etapas de muestreo. En abril de 2018, cuando se recolectó la manzana en cuajado de fruto, la temperatura promedio mensual fue de 16.9 °C y la humedad promedio de 46.2 %; mientras la manzana verde se recolectó en junio de 2018, con temperatura y humedad promedio mensuales de 15.8 °C y 74.9 % respectivamente; por último, la manzana madura se recolectó en agosto del mismo año, con temperatura y humedad promedio mensuales de 13.3 °C y 46.8 %. El mes en que se muestreó la etapa 1 fue el que presentó una mayor temperatura promedio, lo

que pudo haber favorecido la permanencia de distintos hongos, mientras las menores temperaturas registradas para los meses de muestreo de las etapas 2 y 3 coinciden con una menor variedad de géneros fúngicos. La humedad parece no haber desempeñado un papel decisivo, pues en los meses en que se recolectaron manzanas de la etapa 1 y 3 la humedad fue similar y hubo una menor variedad de géneros de hongos filamentosos en la etapa 3 en comparación a la 1, en cambio, la humedad más alta se reportó en el mes de colecta de la etapa 2, la cual tuvo la menor variedad de géneros de las tres. De esta manera, la mayor variedad de géneros en la etapa 1 pudo deberse a la permanencia de hongos desde la flor, el enriquecimiento de mohos en el cuajado de fruto por distintos procesos y una temperatura que favoreció las condiciones para mantener esta variedad (Abdelfattah y col., 2016; Leveau, 2019).

Algunos de los géneros identificados tuvieron cambios interesantes a través de las tres etapas. Por ejemplo, en la etapa 1 se identificó un aislado perteneciente al género *Aspergillus*, en la etapa 2 este género estuvo ausente y en la tercera etapa *Aspergillus* tuvo la mayor abundancia relativa con cuatro aislados. El género *Penicillium* estuvo ausente en la primera etapa, pero las etapas 2 y 3 contaron con dos aislados de dicho género cada una. Como se subrayó anteriormente, es posible que los tejidos vegetales maduros se caractericen por la presencia de microorganismos fitopatógenos (López y col., 2017). Esto coincide con el reporte de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* como patógenos poscosecha de la manzana (Shen y col., 2018b). Es probable que la disminución del contenido de almidón y el incremento de azúcares como glucosa, sacarosa y fructosa en el fruto maduro favorezcan la colonización de estos patógenos de poscosecha (Mangas y Díaz, 2015). La presencia de un aislado de *Aspergillus* en la etapa 1 podría deberse a que se estableció por alguno de los procesos de colonización del fruto y logró permanecer por características que le permitieron soportar el estrés y aprovechar los recursos presentes en esa etapa; posteriormente la interacción con otros microorganismos, los cambios en el fruto o las condiciones ambientales hicieron que desapareciera para la etapa 2, por ejemplo, se ha observado que el género

*Aureobasidium* es competitivo en superficie de manzana con *Aspergillus* (Shen y col., 2018b; Leveau, 2019). Por otro lado, la presencia de *Penicillium* en la etapa 2, que al contrario de la etapa 3 tiene un mayor contenido de almidón y menor de azúcares más simples, puede deberse a la presencia de heridas en las manzanas recolectadas en el muestreo, pues se sabe que los hongos del género *Penicillium* colonizan sobre todo la piel y heridas del fruto (Abdelfattah y col., 2016). Incluso si el fruto recolectado no hubiera tenido heridas, los aislados de *Penicillium* de la segunda etapa fueron positivos para las pruebas enzimáticas realizadas, siendo potencialmente capaces de degradar la pared celular y el almidón.

Otro comportamiento interesante fue el del género *Alternaria*, cuya abundancia disminuyó conforme a la maduración del fruto. *Alternaria* coloniza las flores del manzano y usa el tubo calicinal para establecerse en el corazón del fruto, por lo que la mayor abundancia del género en la etapa 1 puede explicarse por la presencia de aislados que se establecieron desde la flor y no pudieron establecerse en el corazón de la manzana o que no pertenecían a las especies o ecotipos que colonizan dicha parte del fruto. La disminución de aislados de *Alternaria* en las siguientes etapas pudo deberse a que al ser un género que típicamente coloniza el corazón de la manzana, las condiciones de la superficie del fruto no fueron favorables para su permanencia, encontrándose en la etapa 3 un único aislado de *Alternaria* que probablemente fue el más adaptado a la superficie (Abdelfattah y col., 2016).

## 5.2. Actividad fitopatógena de los aislados

### 5.2.1. Capacidad patogénica de los hongos en fruto

Todos los géneros de hongos identificados presentaron actividad fitopatógena en menor o mayor medida. El género *Alternaria*, además de provocar la enfermedad conocida como corazón mohoso de la manzana que se manifiesta como pudrición en el corazón y el cáliz, puede causar una enfermedad conocida como mancha foliar de *Alternaria*, la cual también puede afectar al fruto. Al contrario del corazón mohoso, la mancha de *Alternaria* causa en fruto de manzana lesiones oscuras que

pueden presentar ligera pudrición, especialmente si la piel ha sufrido daño mecánico o por insectos. Tal descripción es similar a las lesiones observadas en los ensayos de patogenicidad en fruto. Se sabe que especies como *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. tenuissima* pueden causar esta enfermedad en manzana. De los aislados en estudio destaca el H8GDE3, pues además de causar un porcentaje de daño del 67.27 % también resultó positivo para las actividades amilolítica, pectinolítica y amilolítica, pero no es estadísticamente diferente al resto de los aislados de su misma etapa (Elfar, 2018; Gur y col., 2020).

En el caso del género *Aspergillus*, éste estuvo ausente en la etapa de fruto verde y en las demás etapas provocó porcentajes de daño menores al 50 %. *Aspergillus* es un género ampliamente distribuido en especies vegetales, pudiendo colonizar frutos como manzana, naranja, plátano, mango y uva con distintas incidencias. Se ha descrito que *Aspergillus* provoca en manzana zonas de pudrición marrones y ablandamiento de la pulpa, siendo uno de los principales agentes causales de enfermedades en frutos, sobre todo cuando los tiempos de almacenamiento son largos y la humedad es alta. A pesar de que la descripción de los síntomas es similar a las lesiones causadas por *Aspergillus* en este estudio, los porcentajes de daño obtenidos fueron considerablemente menores a otros géneros y al control positivo (menores al 50 %), lo que parece diferir con su descripción como uno de los principales agentes causales de enfermedades en frutos. No obstante, los resultados observados podrían deberse a las especies a las que podrían pertenecer los aislados en estudio, pues aunque se sabe que *A. niger* es la especie que suele causar síntomas más severos de pudrición en fruto, en manzana también se ha reportado la colonización de varias especies como *A. aculeatus*, *A. candidus*, *A. clavatus* y *A. flavus*, por lo que es posible que los aislados pertenezcan a alguna de estas especies que, si bien se sabe que pueden causar pudrición en fruto, su severidad es menor a la de *A. niger* (Kumpoun y col., 2003; Qais y col., 2016).

El género *Cladosporium* fue aquel que en general produjo los rangos de daño más bajos (presentándose incluso ausencia de daño), alcanzando los aislados de la primera etapa un porcentaje de daño máximo de 25.36 % y los de la segunda etapa

un máximo de 34.71 %, sin embargo, de la etapa de fruto maduro destacó el aislado H7GDE3, que provocó un porcentaje de daño del 60.48 %. Los bajos porcentajes de daño provocados en fruto coinciden con la descripción del género *Cladosporium* como un patógeno débil y agente secundario de infección en manzana, que provoca un daño conocido como “pudrición de *Cladosporium*” generalmente por *C. herbarum* consistente en pequeñas zonas de pudrición superficiales de color negro (Grantina, 2015). La proporción de pudrición poscosecha en manzana debida a *Cladosporium* es baja en comparación a otros patógenos, por ejemplo, en el año 2005 se registró que únicamente el 4.1 % de la pudrición poscosecha en la variedad ‘Golden Delicious’ se debió a fitopatógenos de baja incidencia como *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Potebniomyces* y otros (Kim y Xiao, 2008). Por otra parte, se ha observado que el género *Cladosporium*, de forma similar a *Alternaria*, es capaz de provocar pudrición del corazón de la manzana (Gao y col., 2013). Respecto al aislado H7GDE3, pareciera que se trata de un hongo con una severidad superior a la comúnmente causada por el género, pero no es diferente estadísticamente a los otros aislados de su etapa.

Respecto al género *Colletotrichum*, es conocido por causar la enfermedad conocida como podredumbre amarga de la manzana, que es una de las más comunes y de importancia económica. La podredumbre amarga se debe a especies como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. godetiae*, *C. fiorinae* y *C. siamense* y se caracteriza por la aparición de pequeñas manchas de color gris o marrón oscuro que con el tiempo se van expandiendo, provocando lesiones hundidas de un color marrón claro. El aislado H9GDE1 fue el único identificado como *Colletotrichum*, que presentó un porcentaje de daño relativamente bajo (24.09 %) y a diferencia de los síntomas descritos comúnmente para la infección de la podredumbre amarga, en el ensayo de patogenicidad en fruto únicamente se observó crecimiento de micelio en el sitio de inoculación, por lo que probablemente se trata de un aislado con baja capacidad fitopatógena en comparación a otros. Nuestros resultados son similares a un estudio donde se identificaron y se evaluó el daño en manzana de aislados del género *Colletotrichum*, encontrándose que un aislado de *C. siamense* fue el que

produjo menor diámetro de lesión (< 10.00 mm), de forma similar a nuestro aislado H9GDE1, con un diámetro de daño de 5.99 mm (ver Anexo II) (Munir y col., 2016; Grammen y col., 2019; Abid y col., 2019).

En lo concerniente al género *Fusarium*, éste es capaz de producir en manzana la enfermedad llamada “pudrición de *Fusarium*”, que se caracteriza por la presencia de manchas circulares de color marrón, blandas y sobre las cuales se observa crecimiento de micelio blanquecino, descripción que concuerda con las lesiones causadas por *Fusarium* en nuestro estudio. Algunas de las especies que causan pudrición en manzana son *F. avenaceum* y *F. decemcellulare*, los cuales son catalogados como patógenos emergentes en Pennsylvania y en Corea del Sur respectivamente (Kou y col., 2014; Lee y col., 2017). También se sabe que *F. avenaceum* puede causar pudrición del corazón de la manzana (Wenneker y col., 2016). Otras especies, como *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. equiseti* se han identificado en raíces de manzano, siendo asociadas a la pudrición de raíz (Sharma y col., 2016). A pesar de que el aislado de *Fusarium* H6GDE1 provocó un daño considerable en fruto (55.26 %), al ensayarse su actividad enzimática únicamente resultó positivo para actividad pectinolítica. Este resultado parece diferir del estudio realizado por Lee y col. en 2017, donde la inoculación de esporas de *F. decemcellulare* sobre manzana sin realizar ningún tipo de herida en el fruto bastó para provocar infección. Es posible que el aislado H6GDE1 aproveche las heridas en fruto, se sirva únicamente de pectinasas o que se asocie a otros microorganismos epífitos para poder infectar fruto.

El género *Penicillium* es uno de los más cosmopolitas en frutos y el cual causa la pudrición de los frutos en la etapa poscosecha, tal como pudimos constatarlo con las cepas de este género aisladas en este estudio. Las lesiones observadas en los ensayos coinciden con la descripción del daño por *Penicillium* en manzana como pudrición de color claro, causando zonas deprimidas y sobre la que se observa crecimiento de micelio. Además de *P. expansum*, que es el patógeno más común de la manzana dentro del género, otras especies que pueden causar enfermedad en este fruto son *P. brevicompactum*, *P. echinulatum* y *P. solitum*. Se sabe que *P.*

*expansum* puede crecer al interior del fruto, complicando la identificación de infección a simple vista. Fuera del aislado H8GDE2, que provocó un 25.05 % de daño, el resto de los aislados perteneciente al género *Penicillium* provocaron porcentajes de daño mayores al 50 %, destacándose el aislado H6GDE3 por causar daño mayor al control (>100 %). Otro indicio de la patogenicidad de los aislados del género *Penicillium* es que la mayoría resultaron positivos para las tres actividades enzimáticas ensayadas (Grantina, 2015; Hermosillo y col., 2015).

Respecto al género *Rhizopus*, éste es conocido por causar la enfermedad conocida como “pudrición suave” en frutos como manzana, plátano, melón y camote. La pudrición suave en manzana se caracteriza en etapas tempranas por la presencia de pequeñas lesiones empapadas en agua, las cuales posteriormente se expanden, toman una coloración marrón y se ablandan, pudiendo afectar a la totalidad de la superficie del fruto. Posteriormente, hay crecimiento de micelio en la superficie afectada. Aunque en manzana el patógeno más común del género es *Rhizopus oryzae*, se sabe que *R. delemar* también puede provocar daño. El aislado de *Rhizopus* H13GDE1 provocó un porcentaje de daño de 52.37 % y resultó positivo para las tres actividades enzimáticas ensayadas, por lo que podría comportarse como un patógeno de la manzana, sin embargo, el daño que causó en fruto es más parecido a la descripción de la pudrición suave en su etapa temprana. Es posible que H13GDE1 sea un aislado menos severo en comparación a otros del género, pues se ha reportado que *R. oryzae* tras siete días de haber sido inoculado en fruto de manzana es capaz de provocar la pudrición de la totalidad de la superficie del fruto (Ewekeye y col., 2016; Al-Dhabaan, 2018; Khokhar, 2019).

A pesar de que se ha reportado que los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Penicillium* son capaces de causar pudrición en el corazón de la manzana, en los ensayos de patogenicidad realizados no se observaron lesiones en dicha parte del fruto, probablemente debido a que la inoculación de aislados se realizó en el mesocarpio más próximo a la superficie de la manzana. Debido a que no se llevaron a cabo ensayos de patogenicidad en el corazón de la manzana, no

se cuenta con información que relacione a los hongos aislados con una posible patogenicidad en tal parte del fruto.

Por otra parte, es importante subrayar que la patogenicidad de los aislados incrementó respecto a las etapas de maduración de la manzana de las que fueron aislados, presentando la etapa de cuajado de fruto un porcentaje de daño promedio de 33.3 %, la etapa de fruto verde un 40.3 % y la etapa de fruto maduro 45.4 %. Este comportamiento puede deberse a que a lo largo del desarrollo de la manzana se va incrementando el contenido de azúcares como glucosa, sacarosa y fructosa, siendo la etapa de fruto maduro la que tiene un mayor contenido de éstas, mientras las etapas de cuajado de fruto y de fruto verde tienen un mayor contenido de almidón y menor de azúcares simples. De esta manera, puede existir una predilección de los hongos fitopatógenos por el fruto maduro (Mangas y Díaz, 2015).

Además de los cambios en el contenido de azúcares en la manzana, la actividad enzimática endógena del fruto puede repercutir en la patogenicidad de los mohos. Se ha reportado que en manzana inmadura (cosechada dos semanas antes de su fecha óptima) la actividad de peroxidasas promueve la lignificación al asociarse con  $H_2O_2$ , resultando en la resistencia del fruto ante patógenos como *P. expansum*. Este efecto se debe a que la lignina incrementa la resistencia mecánica de las paredes celulares, impidiendo la infección fúngica. En cambio, en manzanas cosechadas en su fecha óptima la actividad de peroxidasas disminuyó, reflejándose en una disminución de la resistencia ante *P. expansum* (Valentines y col., 2005).

Otro ejemplo es la relación del calcio con la actividad de enzimas como pectín metil esterases (PMEs) y poligalacturonasas. La pectina se encuentra sobre todo en la lámina media y en menor medida en paredes celulares. Las PMEs desesterifican los residuos de ácido galacturónico de la pectina, dando lugar a metanol y pectato. Los iones de calcio presentes en la lámina media y paredes celulares son capaces de enlazar moléculas de pectato entre sí mediante sus grupos carboxilo, formando pectato de calcio que mantiene a las células juntas, estabiliza las paredes celulares

y las hace resistentes a la degradación. Sin embargo, a lo largo del desarrollo del fruto es necesario deshacer periódicamente los enlaces de calcio con pectato, permitiendo el crecimiento y expansión celulares, pero también pudiendo incrementarse la susceptibilidad a patógenos.

Por otra parte, se ha reportado que el calcio puede inhibir la actividad de poligalacturonasas secretadas por patógenos, impidiendo así la degradación de pectina. También se sabe que la degradación de homogalacturonano de las pectinas por poligalacturonasas patógenas da lugar a oligogalacturónidos, moléculas de cadena corta implicadas en la activación de señalizaciones de defensa frente a patógenos (Hocking y col., 2016).

#### 5.2.2. Actividad enzimática de los aislados

La caracterización de las actividades amilolítica, pectinolítica y celulolítica de los aislados permitió obtener indicios de la posible capacidad fitopatogena de los hongos en su entorno natural. En general, la pared celular de las plantas está compuesta por microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectina, hemicelulosa, lignina y proteínas estructurales, por lo que la penetración de los patógenos requiere la producción y secreción de enzimas que degraden los polímeros de la pared celular. Otro componente importante en los organismos vegetales es el almidón, que es el principal polisacárido de reserva, presentándose regularmente en forma de gránulos. En la manzana existe almidón en las etapas de cuajado de fruto y en fruto verde, reduciéndose su presencia en la etapa de fruto maduro donde predominan azúcares más simples como glucosa, sacarosa y fructosa. De esta manera, es posible decir que las enzimas celulasas, pectinasas y amilasas desempeñan un papel importante en la patogénesis de manzana por parte de hongos, siendo la actividad amilolítica especialmente necesaria para la infección en las etapas de cuajado de fruto y fruto verde, mientras las actividades pectinolítica y celulolítica son necesarias para la patogénesis en cualquier etapa del fruto (Guzmán y col., 2014; Kubicek y col., 2014).

Todos los aislados resultaron positivos para al menos una de las actividades enzimáticas ensayadas, lo cual, aunado al hecho de que la gran mayoría de los aislados (97.27 %) causaron daño en fruto, concuerda con la estimación de que aproximadamente el 10 % de las especies fúngicas pueden causar algún tipo de enfermedad en plantas. Destacan en especial los aislados *Rhizopus* H13GDE1, *Penicillium* H9GDE2, *Penicillium* H3GDE3, *Penicillium* H6GDE3 y *Alternaria* H8GDE3, pues además de generar un considerable daño en fruto (porcentajes de daño mayores a 50 %) también resultaron positivos para las tres pruebas de actividad enzimática, lo cual podría ser un indicio de que podrían causar enfermedad en cualquiera de las etapas de desarrollo del fruto. No obstante, sería necesario realizar ensayos de patogenicidad inoculando los aislados en la superficie del fruto sin realizar ningún tipo de herida de por medio para determinar con seguridad cuáles aislados tienen la capacidad de infectar la manzana por su cuenta.

### 5.2.3. Agrupamiento jerárquico de hongos antagonistas

El dendograma de agrupamiento jerárquico realizado aportó información valiosa respecto a los hongos antagonistas que se eligieron para realizar las tres pruebas de actividad enzimática. El agrupamiento jerárquico (*Hierarchical Clustering* en inglés) es un método de data mining o “minería de datos”, en el que se usa un algoritmo para agrupar una serie de datos basándose en la distancia entre cada uno. En una representación gráfica (dendograma), los elementos quedan anidados en jerarquías con forma de árbol (Berzal, 2017).

En el caso de nuestro ensayo, la distancia entre los aislados que permitió agruparlos estuvo definida por el porcentaje de daño y los resultados de las pruebas enzimáticas. Así, los aislados del primer grupo comprendieron un rango de porcentaje de daño de 57.38 % a 67.27 %; los del segundo grupo comprendieron un rango de 52.37 % a 59.13 %; el tercer grupo estuvo conformado únicamente por *Penicillium* H6GDE3, con un porcentaje de daño del 100 %; por su parte, el cuarto

grupo tuvo un rango de 82.70 % a 89.40 %. Dentro de cada grupo, los resultados de las pruebas enzimáticas fueron similares entre los aislados.

Los grupos 3 y 4 se agruparon a su vez entre sí, conteniendo a los aislados que causaron mayor porcentaje de daño en fruto, es decir, *Penicillium* H6GDE3, *Alternaria* H5GDE2 y *Penicillium* H9GDE2. Los grupos 1 y 2 también se agruparon entre sí. El grupo 1 contiene a los aislados restantes de *Alternaria* (H11GDE1 y H8GDE3), mientras el grupo 2 contiene a *Penicillium* H3GDE3. Como los aislados en los grupos 1 y 2 provocaron porcentajes de daño menores a los de los grupos 3 y 4, puede afirmarse que aunque los aislados más patogénicos pertenecieron a *Penicillium* y *Alternaria*, no todos los aislados de estos géneros fueron los más patogénicos; por otra parte, se demuestra que además de las cepas pertenecientes a *Penicillium*, el género patógeno típico de la manzana, otros géneros como en este caso *Alternaria* pueden presentar una patogenicidad similar, por lo que es necesario conocer estas cepas.

En definitiva, independientemente de los mayores o menores porcentajes de daño provocados por los mohos en este estudio, es un hecho que en todas las etapas de desarrollo de fruto se encuentran hongos filamentosos que pueden ser patógenos en etapa madura, es decir, hay un reservorio de hongos capaces de causar daño.

## 6. Conclusiones

- Existe una comunidad de hongos epífitos asociada de forma natural al fruto de manzana 'Golden Delicious' en la región durante su desarrollo, siendo los principales géneros fúngicos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus*.
- Los géneros fúngicos identificados mostraron distintos rangos de patogenicidad, siendo algunos aislados de los géneros *Penicillium* y *Alternaria* los más agresivos.
- Los hongos aislados de fruto maduro causaron en promedio los rangos más altos de pudrición en manzana, probablemente debido a que el fruto maduro contiene azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, pudiendo secretar exudaos que atraen a los hongos fitopatógenos.
- La mayor parte de los hongos dieron resultados positivos a los ensayos de actividad amilolítica, celulolítica y amilolítica. Los hongos que presentaron mayor capacidad de infección en fruto, también mostraron la mayoría de las actividades bioquímicas relacionadas con degradación de la pared celular y de tejidos como mecanismo de infección.
- El presente trabajo podría facilitar a los productores locales información que les permita tener un control de enfermedades enfocado a los mohos fitopatógenos que se encuentran de forma natural en la manzana producida en la región.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Abdelfattah** A, Wisniewski M, Droby S, Schena L. Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Hortic Res* **2016**;3:1-12.

**Abid** M, Chohan S, Perveen R, Anees M. First report of bitter rot of apple caused by *Colletotrichum siamense* in Pakistan. *Plant Dis* **2019**;103:583.

**Agrios** GN. *Plant Pathology*. 5a edición. Nueva York: Academic Press, **2005**:27-31.

**Alcántara** GK, Corlay L, Hernández A. La ecología microbiana como herramienta indispensable en estudios agroecológicos. *Cad Agroecol* **2018**;13:1-5.

**Al-Dhabaan** F. First record of *Rhizopus oryzae* from stored apple fruits in Saudi Arabia. *PI Pathol Quarant* **2018**;8:116-121.

**Allison** K, **Wilson** C. *The biology of Malus domestica* Borkh (apple). Ottawa: Canadian Food Inspection Agency, **2014**:1.

**Barth** B. The modern farmer guide to types of apples [monografía en internet]. Hudson: The Modern Farmer Media Inc., **2015** [consultado 2020 abril 12]:1-5. Disponible en: <https://modernfarmer.com/2015/10/types-of-apples/>

**Barzman** M, Bàrberi P, Birch A, Boonekamp P, Dachbrodt-Saaydeh S, Graf B, Hommel B, Jensen J, Kiss J, Kudsk P, Lamichhane J, Messéan A, Moonen A, Ratnadass A, Ricci P, Sarah J, Sattin M. Eight principles of integrated pest management. *Agron Sustain Dev* **2015**;35:1199–1215.

**Belete** T, Boyraz N. Critical review on apple scab (*Venturia inaequalis*) biology, epidemiology, economic importance, management and defense mechanisms to the causal agent. *J Plant Physiol Pathol* **2017**;5:1-11.

**Bensch** K, Groenewald J, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell B, Shin H, Schroers H, Braun U, Crous P. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporoides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *STUD MYCOL* **2010**;67:1-94.

**Berzal** F. *Clustering jerárquico*. Granada: Universidad de Granada, **2017**:1-35.

**Blanco** R, Díaz JL, Arrieta C, Araque B. *Genética de la resistencia de las plantas a factores bióticos: un informe*. Córdoba: Universidad de Córdoba, **2017**:1-3.

**Calvo C**, Elmer P, Parry FJ, Vinas I, Usall J, Torres R, Agnew R, Teixidó N. Mode of action of a fatty acid-based natural product to control *Botrytis cinerea* in grapes. J Appl Microbiol **2014**;116:967-979.

**Canadian Food Inspection Agency CFIA**. The biology of *Malus domestica* Borkh (apple). Ottawa: Canadian Food Inspection Agency, **2014**:1-24.

**Cárdenas J**, Fischer G. Clasificación botánica y morfología de manzano, peral, duraznero y ciruelo. En: Miranda D, Fischer G, Carranza C, Ed. Los frutales caducifolios en Colombia - Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, **2013**:21-30.

**Carmichael P**, Siyoum N, Chidamba L, Korsten L. Characterization of fungal communities of developmental stages in table grape grown in the northern region of South Africa. J App Microbiol **2017**;123:1251–1262.

**Castroviejo S**. Flora ibérica. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, **2005**;vol.6:439-442.

**Chatzidimopoulos M**, Lioliopoulou F, Sotiropoulos T, Vellios Evangelos. Efficient control of apple scab with targeted spray applications. Agronomy **2020**;10:217-225.

**Coleman D**, Tringe SG. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. Front Microbiol **2014**;5:1-6.

**Correa JM**. Caracterización del crecimiento *in vitro* del hongo *Neofabraea vagabunda*, agente causal de la enfermedad 'ojo de buey' en manzanas. Talca: Universidad de Talca, **2019**:5-7.

**Damm C**, Cannon PF, Woudenberg JH, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG, Crous PW. The *Colletotrichum boninense* species complex. STUD MYCOL **2010**;73:1-36.

**Dansa AM**. Perfil de mercados de manzana y pera 2018 [monografía en internet]. Buenos Aires: Ministerio de Agroindustria, **2018** [consultado 2019 septiembre 3]:1-14.

Disponible en:  
[https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss\\_mercados\\_agropecuarios/areas/frutas/\\_archivos/000030\\_Informes/100007\\_Perfil%20de%20Mercado/000006\\_Perfil%20de%20Manzanas%20y%20Peras.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/frutas/_archivos/000030_Informes/100007_Perfil%20de%20Mercado/000006_Perfil%20de%20Manzanas%20y%20Peras.pdf)

**Daniel** C, Lennox C, Vries F. In vivo application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. Postharvest Biol Technol **2015**;99:88-92.

**Denman** S, Crous P, Groenewald J, Slippers B, Wingfield B, Wingfield M. Circumscription of Botryosphaeria species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. Mycologia **2003**;95:294-307.

**Díaz** G, Latorre B, Ferrada E, Lolas M. Identification and characterization of *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Phacidiopycnis washingtonensis* and *Phacidium lacerum* obtained from apple (*Malus x domestica*) fruit rot in Maule Region, Chile. Eur J Plant Pathol **2018**;153:1259-1273.

**Domsch** KH, Gams W, Anderson TH. Compendium of Soil Fungi. Alemania: IHW-Verlag, **2007**.

**Ebrahimi** L, Fotouhifar KB, Javan M, Naghavi MR, Baisakh N. Population genetic structure of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter) in Iran. PLOS ONE **2016**;11:1-9.

**Elfar** K. Etiology, epidemiology and control of moldy core of apples in Chile. Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile, **2018**:1-8.

**Ewekeye** T, Oke O, Essan O. Studies on post harvest rot of apple (*Malus domestica* Borkh). JPS **2016**;5:36-41.

**Garton** W, Dugan F, Mazzola M, Miles C. Apple anthracnose [monografía en internet]. Mount Vernon: Washington State University, **2016** [consultado 2019 septiembre 4]:1-4. Disponible en: <http://treefruit.wsu.edu/crop-protection/disease-management/apple-anthracnose/>

**Grabowski** M. Black rot of apple. Minnesota: The University of Minnesota, **2020**:1-4.

**Grammen** A, Wenneker M, Van Campenhout J, Pham K, Van Hemelrijck W, Bylemans D, Geeraerd A, Keulemans W. Identification and pathogenicity assessment of *Colletotrichum* isolates causing bitter rot of apple fruit in Belgium. Eur J Plant Pathol **2019**;157:47-63.

**Grantina L.** Fungi causing storage rot of apple fruit in integrated pest management system and their sensitivity to fungicides. *Rural Sustain Res* **2015**;34:1-11.

**Gur L,** Reuveni M, Cohen Y. Control of *Alternaria* fruit rot in 'Pink Lady' apples by fungicidal mixtures. *CROP PROT* **2020**;127:1-9.

**Guzmán A,** Zambrano D, Rondón A, Laurencio M, Pérez M, León R, Rivera R. Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí, Ecuador. *Rev FCA UNCUYO* **2014**;46:177-189.

**Halal Direct Scotland.** Apples – Red Delicious. Glasgow: Halal Direct Scotland Foods, **2014**:1.

**Hermosillo G,** Quezada MY, Moreno J, Pascual S, Trejo MA. detección de patulina en manzana 'Golden Delicious' y en productos derivados elaborados industrial y artesanalmente comercializados en México. *Rev Iber Tecnología Postcosecha* **2015**;16:281-286.

**Hocking B,** Tyerman S, Burton R, Gilliam M. Fruit calcium: transport and physiology. *Front Plant Sci* **2016**;7:1-17.

**Imam J,** Singh PK, Shukla P. Plant Microbe Interactions in Post Genomic Era: Perspectives and Applications. *Front Microbiol* **2016**;7:1-15.

**Jurick W,** Macarasin O, Gaskins VL, Park E, Yu J, Janisiewicz W, Peter KA. Characterization of postharvest fungicide-resistant *Botrytis cinerea* isolates from commercially stored apple fruit. *Phytopathology* **2017**;107:362–368.

**Khokhar I,** Mukhtar I, Wang J, Jia Y, Yan Y. A report of *Rhizopus oryzae* causing postharvest soft rot of apple fruit in China. *Australas Plant Dis Notes* **2019**;14:1-4.

**Kim Y,** Xiao C. Distribution and incidence of *Sphaeropsis* rot in apple in Washington State. *Plant Dis* **2008**;92:940-942.

**Klich M.** A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, **1988**.

**Kou L,** Gaskins V, Luo Y, Jurick W. First report of *Fusarium avenaceum* causing postharvest decay of 'Gala' apple fruit in the United States. *Plant Dis* **2014**;98:690.

**Kubicek C,** Starr T, Glass N. Plant cell wall–degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **2014**;52:427-451.

**Kumpoun** W, Motomura Y, Harada Y. Inhibition of *Aspergillus* rot by sorbitol in apple fruit with watercore symptoms. *Postharvest Biol Technol* **2003**;29:121–127.

**Lee** S, Park S, Lee J, Back C, Ten L, Kang I, Jung H. First report of fruit rot caused by *Fusarium decemcellulare* in apples in Korea. *Korean J Mycol* **2017**;45:54-62.

**Leiva** M. Modelo de adaptación al cambio climático por medio de la zonificación de aptitud productiva de especies hortofrutícolas priorizadas en la Región del Biobío. Santiago: Centro de Información de Recursos Naturales CIREN, **2017**:1-2.

**León** BC, Romero SA. Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos presentes en seis especies de orquídeas nativas del sector San Pedro de Yumate, Molleturo, Azuay, Ecuador. Cuenca: Universidad de Cuenca, **2017**:38-39.

**Leveau** J. A brief from the leaf: latest research to inform our understanding of the phyllosphere microbiome. *Curr Opin Microbiol* **2019**;49:41-49.

**Levy** K. Brown spot (*Alternaria alternata*) [monografía en internet]. Athens: University of Georgia, **2018** [consultado 2019 septiembre 4]:1. Disponible en: <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5524188>

**Lolas** M, Díaz G. Enfermedades de pre y postcosecha en manzanos. *Boletín Técnico Pomáceas* **2016**;16:2-6.

**López-González** RC, Gómez S, De la Rosa S, Garrido E, Oropeza O, Heil M, Partida L. The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecol* **2017**;26:1-10.

**Mangas** JJ, Díaz D. La manzana y su maduración. En: Blanco D, Mangas JJ, Ed. *Tecnología de la elaboración de sidra: Equipamiento industrial*. Oviedo: SERIDA, **2015**:11-38.

**Marsden** D. 'Golden Delicious' apple [monografía en internet]. Nueva York: Getty Images, **2019** [consultado 2019 octubre 15]:1. Disponible en: <https://photos.com/featured/golden-delicious-apple-david-marsden.html>

**Moore** D, Robson G, Trinci A. Fungi as pathogens of plants. En: Moore D, Ed. *21st Century guidebook to fungi*. 2a. edición. Stockport: The University of Manchester, **2019**:390-421.

**Munir** M, Amsden B, Dixon E, Vaillancourt L, Ward N. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. *Plant Dis* **2016**;100:2194-2203.

**Neo** P. Red apple on branch with leafes [monografía en internet]. EUA: Public Domain Photos, **2017** [consultado 2019 septiembre 4]:1. Disponible en: <http://www.public-domain-photos.com/food/red-apple-on-branch-with-leafes-free-stock-photo-1.htm>

**NMX-FF-061-2003**. Productos agrícolas no industrializados para consumo humano - Fruta fresca - Manzana (*Malus pumila* Mill). (*Malus domestica* Borkh)-Especificaciones. **2003**:7-11.

**Oo** M, Yoon H, Jang H, Oh S. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with bitter rot disease of apple in South Korea. *Plant Pathol J* **2016**;34:480-489.

**Ortuño** A, Díaz L, Del Río J. Evolución de la fisiología vegetal en los últimos 100 años. *Rev Eubacteria* **2015**;34:74-82.

**Pace International**. Crops and diseases – pome fruit. Wapato: Valent Biosciences Corporation, **2019**:1-2.

**Palacio** A, Sánchez E. Influencia de la variedad, portainjerto y época de cosecha en la calidad e índices de madurez en pimiento morrón. *Nova scientia* **2017**;9:1-23.

**Pinto** C, Custódio V, Nunes M, Songy A, Rabenoelina F, Courteaux B, Clément C, Gomes A, Fontaine F. Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Front Microbiol* **2018**;9:3047.

**Pitt** JI. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: CSIRO Division of Food Science, **1991**.

**Poveda** G, Gil C, Vaca I, Levicán G, Chávez R. Cold-active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges. *Biol Res* **2018**;51:1-6.

**Qais** A, Ahmed M, Amira A. Isolation and identification of fungal post-harvest rot of some fruits in Yemen. *PSM Microbiology* **2016**;1:36-44.

**Rai** R, Joshi S, Roy S, Singh O, Samir M, Chandra A. Implications of changing climate on productivity of temperate fruit crops with special reference to apple. *J Horticulture* **2015**;2:1-6.

**Romero** L, Parra R, Jacobo JL, Ojeda DL, Guerreo VM, Ávila GD, Ruiz TJ. Respuesta de portainjertos de manzano a vigor, eficiencia de producción y concentraciones foliar y en fruto de NPK. *Rev Mexicana cienc agric* **2017**;8:849-861.

**SAGARPA**. Planeación agrícola nacional 2017-2030: manzana mexicana [monografía en internet]. CDMX: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **2016** [consultado 2019 septiembre 3]:1-16. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256430/B\\_sico-Manzana.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256430/B_sico-Manzana.pdf)

**Salazar** MR, Chaves B, Hoogenboom G. Freezing tolerance of apple flower buds. *Sci Hort* **2016**;198:344–351.

**Sánchez** S, Martínez-Peniche R, Castillo J, Fernández E. Antagonismo de levaduras nativas contra la pudrición azul (*Penicillium expansum* Link) en frutos de manzana. *Rev Fitotec Mex* **2008**;31:359-366.

**Sharma** M, Kapatia A, Kulshrestha S. Analysis of genetic diversity amongst *Fusarium* Spp. associated with root rot of apple. *Biosci Biotech Res Asia* **2016**;13:463-468.

**Shen** Y, Nie J, Dong Y, Kuang L, Li Y, Zhang J. Compositional shifts in the surface fungal communities of apple fruits during cold storage. *Postharvest Biol Technol* **2018a**;144:55-62.

**Shen** Y, Nie J, Li Z, Li H, Wu Y, Dong Y, Zhang J. Differentiated surface fungal communities at point of harvest on apple fruits from rural and peri-urban orchards. *Sci Rep* **2018b**;8:1-12.

**SIAP**. Anuario estadístico de la producción agrícola [monografía en internet]. CDMX: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, **2019** [consultado 2019 septiembre 3]. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

**Sikdar** P, Mazzola M, Xiao CL. Genetic and pathogenic characterization of *Phacidiopycnis washingtonensis* from apple and pacific madrone from the western United States. *Phytopathology* **2018**;109:1-11.

**Silva** ME, Freitas KR, Balbi MI, Terumi A, Clemente E, Stangarlin JR. Control del moho azul en poscosecha de manzana con productos naturales. *Idesia* **2015**;33:57-63.

**Singh** A, Gupta R, Saikia S, Pant A, Pandey R. Diseases of medicinal and aromatic plants, their biological impact and management. *Plant Genet Resour* **2016**;14:370-383.

**Soto** S, Rosales M, Lolas M. Enfermedad de poscosecha en manzanas 'Cripps Pink'. Santiago de Chile: INIA, **2017**:41-44.

**Sujeeta** KM, Shikha M, Khushboo S. Isolation and screening of amylase producing fungi. *Int J Curr Microbiol App Sci* **2017**;6:783-796.

**Tabilo** H. Evaluación de biocontroladores de *Diplodia seriata*, en sarmientos no enraizados de uva de mesa cv. 'Thompson Seedless' bajo condiciones de laboratorio. Santiago de Chile: Universidad de Chile, **2014**:1-17.

**The Tree Center**. Fuji apple tree [monografía en internet]. Davidsonville: The Tree Center Plant Supply Co., **2019** [consultado 2019 octubre 3]:1. Disponible en: <https://www.threetreecenter.com/fuji-apple-tree/>

**Thynne** E, McDonald MC, Solomon PS. Phytopathogen emergence in the genomics era. *Trends Plant Sci* **2015**;20:246–255.

**Toranzo** J. Producción mundial de manzanas y peras. Río Negro: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, **2016**:6-18.

**Tozlu** E, Tekiner N, Örtücü S. (2018). Investigation on the biological control of *Alternaria alternata*. *Indian J Agric Sci* **2018**;88:1241-1248.

**USApple**. Popular varieties [monografía en internet]. Falls Church: USApple, **2019** [consultado 2019 octubre 3]:1-18. Disponible en: <http://usapple.org/the-industry/apple-varieties/>

**Valentines** M, Vilaplana R, Torres R, Usall J, Larrigaudière C. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biol Tech* **2005**;36:227–234.

**Vigil** A. Fenología de seis variedades de manzano (*Malus domestica*) en el primer año de instalación en la ecorregión Puna, Castilla – Arequipa 2017. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín, **2018**:19-21.

**Villa** A, Pérez R, Morales H, Basurto M, Soto J, Martínez E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agron* **2015**;2:194-205.

**Wallace** R, Hirkala D, Nelson L. Postharvest biological control of blue mold of apple by *Pseudomonas fluorescens* during commercial storage and potential modes of action. *Postharvest Biol Technol* **2017**;133:1–11.

**Wallace** R, Hirkala D, Nelson L. Mechanisms of action of three isolates of *Pseudomonas fluorescens* active against postharvest grey mold decay of apple during commercial storage. *Biol* **2018**;117:13–20.

**Wang** N, Jiang S, Zhang Z, Fang H, Xu H, Wang Y, Chen X. *Malus sieversii*: the origin, flavonoid synthesis mechanism, and breeding of red-skinned and red-fleshed apples. *Hortic Res* **2018**;5:1-12.

**Wassermann** B, Müller H, Berg G. An apple a day: which bacteria do we eat with organic and conventional apples? *Front Microbiol* **2019**;10:1-13.

**Wei** J, Niu C, Liu B, Yuan Y, Yue T. Identification and characterization of epiphytic yeasts on apples in China. *RSC Adv* **2017**;7:44766–44772.

**Wenneker** M, Pham K, Lemmers M, de Boer F, van der Lans A, van Leeuwen P, Hollinger T, Thomma B. First report of *Fusarium avenaceum* causing wet core rot of 'Elstar' apples in the Netherlands. *Plant Dis* **2016**;100:1501.

**Wiseman** MS, Kim YK, Dugan FM, Rogers JD, Xiao CL. A new postharvest fruit rot in apple and pear caused by *Phacidium lacerum*. *Plant Dis* **2016**;100:32–39.

**Yamane** H, Wada M, Honda C, Matsuura T, Ikeda Y, Hirayama T. Overexpression of *Prunus* DAM6 inhibits growth, represses bud break competency of dormant buds and delays bud outgrowth in apple plants. *PLOS ONE* **2019**;14:1-10.

**Zhang** X, Sun Y, Yang Q, Chen L, Li W, Zhang H. Control of postharvest black rot caused by *Alternaria alternata* in strawberries by the combination of *Cryptococcus laurentii* and Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester. *Biol* **2015**;90:96–101.

**Zhang** H, Mahunu G, Castoria R, Apaliya M, Yang Q. Augmentation of biocontrol agents with physical methods against postharvest diseases of fruits and vegetables. *Trends Food Sci Tech* **2017**;69:1-32.

## **Anexos**

### **Anexo I. Medios de cultivo**

#### NYDA

- Caldo nutritivo (Bioxon, México) 8 g/L.
- Extracto de levadura (Bioxon, México) 5 g/L.
- Glucosa (Meyer, México) 10 g/L.
- Agar (MCD Lab, México) 20 g/L.

#### APD 10%

- Extracto de papa 0.4 g/L.
- Glucosa 2 g/L.
- Agar 1.5 g/L.

#### Agar exudado de manzana

- Exudado de manzana 120 mL/L (Cinco manzanas maduras cv. 'Golden Delicious' se desinfectaron y se colocaron en 500 mL de agua destilada, se dejaron remojar toda la noche y se recuperó el sobrenadante).
- Agar 15 g/L.

#### YPD 10%

- Extracto de levadura 1 g/L.
- Peptona de caseína (Bioxon, México) 2 g/L.
- Glucosa 2 g/L.
- Agar 15 g/L.

#### Agar V8

- Jugo V8 200 mL/L.
- Carbonato de calcio 3 g/L.
- Agar 15 g/L.

#### Agar carboximetil celulosa

- Carboximetilcelulosa (Karal, México) 1% (p/v).
- Sulfato de amonio (J.T. Baker, EUA) 0.5 g/L.
- Cloruro de calcio (J.T. Baker, EUA) 0.5 g/L.
- Fosfato monobásico de potasio (Meyer, México) 0.1 g/L.
- Fosfato dibásico de potasio (Meyer, México) 0.1 g/L.
- Agar 15 g/L.

#### Agar almidón

- Almidón hidrosoluble (Karal, México) 1% (p/v).
- Sulfato de amonio 0.5 g/L.
- Cloruro de calcio 0.5 g/L.
- Fosfato monobásico de potasio 0.1 g/L.
- Fosfato dibásico de potasio 0.1 g/L.
- Agar 15 g/L.

#### Agar pectina

- Pectina cítrica (Karal, México) 1% (p/v).
- Sulfato de amonio 0.5 g/L.
- Cloruro de calcio 0.5 g/L.
- Fosfato monobásico de potasio 0.1 g/L.

- Fosfato dibásico de potasio 0.1 g/L.
- Agar 15 g/L.

**Anexo II. Diámetros de lesión producidos por los aislados en fruto y por el control positivo *P. expansum*.**

Cuadro 9. Diámetros de lesión en fruto de hongos de Etapa 1. Se muestra el diámetro de lesión producido por *P. expansum*. \*: micelio estéril; Act. AL: actividad amilolítica; Act. PL: actividad pectinolítica; Act. CL: actividad celulolítica; N: no se realizó ensayo.

Clave	Género	Diámetro de lesión (mm)	Diámetro de control (mm)
H5GDE1 2018	<i>Alternaria</i>	8.92 ± 9.25 <sup>ab</sup>	24.85
H7GDE1 2018	<i>Alternaria</i>	9.44 ± 0.79 <sup>ab</sup>	24.85
H11GDE1 2018	<i>Alternaria</i>	14.26 ± 8.04 <sup>a</sup>	24.85
H1GDE1 2018	<i>Aspergillus</i>	10.65 ± 1.57 <sup>ab</sup>	24.85
H2GDE1 2018	<i>Cladosporium</i>	6.30 ± 5.80 <sup>ab</sup>	24.85
H4GDE1 2018	<i>Cladosporium</i>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	24.85
H9GDE1 2018	<i>Colletotrichum</i>	5.99 ± 5.28 <sup>ab</sup>	24.85
H6GDE1 2018	<i>Fusarium</i>	20.83 ± 1.07 <sup>a</sup>	37.70
H13GDE1 2018	<i>Rhizopus</i>	13.01 ± 4.35 <sup>a</sup>	24.85
H3GDE1 2018	-	10.03 ± 0.29 <sup>ab</sup>	37.00
H8GDE1 2018	-	12.00 ± 2.01 <sup>a</sup>	37.00
H10GDE1 2018	-	9.47 ± 9.55 <sup>ab</sup>	37.70
H12GDE1 2018	-	10.45 ± 1.22 <sup>ab</sup>	37.00
H14GDE1 2018	-	8.28 ± 0.81 <sup>ab</sup>	37.00

Valores seguidos por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey (P = 0.05).

Cuadro 10. Diámetros de lesión en fruto de hongos de Etapa 2. Se muestra el diámetro de lesión producido por *P. expansum*. \*: micelio estéril; Act. AL: actividad amilolítica; Act. PL: actividad pectinolítica; Act. CL: actividad celulolítica; N: no se realizó ensayo.

Clave	Género	Diámetro de lesión (mm)	Diámetro de control (mm)
H5GDE2 2018	<i>Alternaria</i>	20.55 ± 7.03 <sup>a</sup>	24.85
H11GDE2 2018	<i>Alternaria</i>	6.15 ± 5.35 <sup>ab</sup>	24.85
H2GDE2 2018	<i>Cladosporium</i>	2.64 ± 4.58 <sup>b</sup>	24.85
H3GDE2 2018	<i>Cladosporium</i>	8.11 ± 1.40 <sup>ab</sup>	24.85
H6GDE2 2018	<i>Cladosporium</i>	15.70 ± 10.65 <sup>a</sup>	45.23
H8GDE2 2018	<i>Penicillium</i>	9.27 ± 0.92 <sup>ab</sup>	37.00
H9GDE2 2018	<i>Penicillium</i>	22.22 ± 8.42 <sup>a</sup>	24.85
H1GDE2 2018	-	10.30 ± 0.33 <sup>ab</sup>	37.00
H4GDE2 2018	-	11.35 ± 2.96 <sup>ab</sup>	37.00
H7GDE2 2018	-	10.75 ± 1.33 <sup>ab</sup>	37.00
H10GDE2 2018	-	21.13 ± 2.34 <sup>a</sup>	37.70

Valores seguidos por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey (P = 0.05).

Cuadro 11. Diámetros de lesión en fruto de hongos de Etapa 3. Se muestra el diámetro de lesión producido por *P. expansum*. \*: micelio estéril; Act. AL: actividad amilolítica; Act. PL: actividad pectinolítica; Act. CL: actividad celulolítica; N: no se realizó ensayo.

Clave	Género	Diámetro de lesión (mm)	Diámetro de control (mm)
H8GDE3 2018	<i>Alternaria</i>	16.72 ± 14.81 <sup>abc</sup>	24.85
H4GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	10.81 ± 0.55 <sup>abc</sup>	37.00
H9GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	8.81 ± 0.59 <sup>abc</sup>	24.85
H10GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	17.78 ± 2.02 <sup>abc</sup>	37.00
H11GDE3 2018	<i>Aspergillus</i>	8.32 ± 1.24 <sup>abc</sup>	24.85
H2GDE3 2018	<i>Cladosporium</i>	5.62 ± 4.88 <sup>bc</sup>	24.85
H5GDE3 2018	<i>Cladosporium</i>	3.06 ± 5.31 <sup>c</sup>	24.85
H7GDE3 2018	<i>Cladosporium</i>	15.03 ± 9.94 <sup>abc</sup>	24.85
H3GDE3 2018	<i>Penicillium</i>	21.88 ± 3.12 <sup>ab</sup>	37.00
H6GDE3 2018	<i>Penicillium</i>	37.35 ± 1.49 <sup>a</sup>	37.00
H12GDE3 2018	-	11.23 ± 2.24 <sup>abc</sup>	37.00

Valores seguidos por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey (P = 0.05).