



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química

"Evaluación de fungicidas y antagonistas  
microbianos aplicados en el campo, y de levaduras  
inoculadas en manzanas en poscosecha, en la  
prevención de la pudrición azul (*Penicillium  
expansum* Link)".

Tesis  
Que como parte de los requisitos para obtener el  
grado de

Maestro en  
Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta  
Deyanira Castañeda Desales

Querétaro, Qro., Febrero de 2005

No. Adq. H69746

No. Título \_\_\_\_\_

Clas 632.411

C346e

2005

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

“Evaluación de fungicidas y antagonistas microbianos aplicados en el campo, y de levaduras inoculadas en manzanas en poscosecha, en la prevención de la pudrición azul (*Penicillium expansum* Link)”.

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**Presenta:**  
Deyanira Castañeda Desales

**Dirigido por:**  
Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche

**SINODALES**

Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche  
Presidente

Dr. Eduardo Fernández Escartín  
Secretario

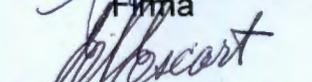
M. en C. José Castillo Tovar  
Vocal

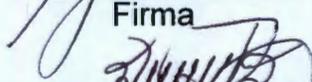
Dr. Salvador Pérez González  
Suplente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Suplente

M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes  
Director de la Facultad de Química

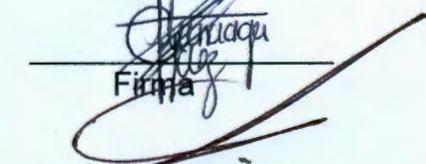
  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Dr. Sergio Quesada Aldana  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Febrero de 2005  
México



*La esperanza no sabe ser vencida;  
sobre el futuro pende toda; miente,  
mas quiere ser creída.  
Séneca.*

*El camino que lleva de la  
intimidad a la grandeza pasa  
por el sacrificio.  
Kassner.*

## RESUMEN

En los huertos de manzano de la Sierra de Querétaro se presentan enfermedades que afectan tanto el follaje como el fruto, destacando la roña producida por *Venturia inaequalis*. Por otro lado, existen ciertos hongos que atacan a la manzana en poscosecha, provocando severas pérdidas, como *Penicillium expansum* Link, causante de la pudrición azul. Los fungicidas comúnmente empleados para el control de ambos tipos de enfermedades, además de ser tóxicos para la salud humana, pueden provocar la aparición de cepas del hongo resistentes al producto. Por ello, actualmente se buscan métodos alternos, como es el control biológico. Sin embargo, se desconoce el efecto que los tratamientos químicos y biológicos aplicados en precosecha puedan tener sobre el antagonismo y el patógeno en poscosecha. En el presente trabajo se evaluó el poder antagonista de cepas de levaduras aisladas de la superficie de manzanas sobre el control de la pudrición azul (*P. expansum*) en manzanas previamente asperjadas en el campo con Captán o con una suspensión de *Bacillus* y *Trichoderma*. La levadura 22-211 propició el mayor porcentaje de inhibición sobre *P. expansum* en manzanas no asperjadas en el campo, por lo cual fue probada, junto con dos levaduras seleccionadas en estudios previos (5vtt + 38-432), en manzanas asperjadas. En dichas pruebas se observó, por un lado, que el hongo obtuvo un menor desarrollo en las manzanas tratadas en el campo con *Bacillus* y *Trichoderma* y que no fueron desinfectadas antes de inocular a las levaduras y, por otro lado, que la mezcla de levaduras (5vtt + 22-211) logró la mayor inhibición del hongo. El comportamiento de las levaduras no se vio afectado ni por el Captan, ni por *Bacillus-Trichoderma* cuando las manzanas fueron desinfectadas. En las manzanas asperjadas en el campo con *Bacillus* y *Trichoderma* y no desinfectadas, los distintos tratamientos de levaduras, mas no el control, tuvieron un mayor efecto antagonista sobre *P. expansum*. El sistema Biolog permitió la identificación de dos de cuatro levaduras sobresalientes, siendo la cepa 22-211 identificada como *Pichia guilliermondii* y la cepa 3-5241 como *Saccharomyces boulardii*.

**(Palabras clave:** *Penicillium expansum*, manzana, levaduras, control biológico)

## SUMMARY

Apple orchards established in Queretaro are seriously damaged by diseases affecting leaves and fruits, but mainly by scab (*Venturia inaequalis*). On the other hand, there are certain fungi which develop in stored apples, provoking severe losses, as *Penicillium expansum* Link which causes the blue mold. Most common fungicides used for the control of both diseases could be toxic and promote development of resistant strains. At present, alternative methods including biological control are being tested. However, the effect of chemical and biological treatments applied in the orchard on antagonist and/or pathogen in stored apples has not been investigated. In this research, the antagonism of yeast strains isolated from the surface of apples on the control of blue mold (*P. expansum*) in apples sprayed in the field with Captan and *Bacillus* and *Trichoderma* was studied. The yeast strain 22-211 promoted the highest inhibition of *P. expansum* in non-treated apples, and it was tested, together with two other yeast strains, selected in previous studies, in apples treated in the field (5vtt + 38-432). In these tests, *P. expansum* decreased growth on apples sprayed in the field with *Bacillus* and *Trichoderma* and not disinfected before inoculating the yeasts. The mix of two yeast strains (5vtt + 22-211) obtained the maximal inhibition of the fungus. The antagonism promoted by the yeast was affected neither by Captan nor by the suspension of *Bacillus-Trichoderma* when apples were disinfected before inoculation. In apples sprayed with *Bacillus* and *Trichoderma* and not disinfected, different treatments of yeast strains, but not the control, showed a higher antagonism on *P. expansum*. Two of four outstanding yeast strains were identified by the Biolog system; 22-211 strain resulted *Pichia guilliermondii* and 3-5241 strain, *Saccharomyces boulardii*.

**(Palabras clave:** *Penicillium expansum*, apple, yeast, biological control)

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios por darme la fuerza necesaria en todo momento y por estar ahí siempre.

A mi Familia, por ser el soporte de mi vida.

A mi madre, en mención muy especial por su gran apoyo y amor.

A mi padre porque a pesar de su lejanía el siempre está en mis pensamientos.

A mis hermanos porque cada uno me ha dejado una enseñanza, por sus palabras, por aquellos momentos que hemos compartido tanto alegres como tristes.

A esos pequeños ángeles que han llenado el tiempo con sonrisas y alegría (mis sobrinos).

A mi tío, a pesar de su silencio.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca-crédito otorgada para llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche, por su gran apoyo y por haber confiado en mí.

A mis sinodales al M. en C. José Castillo Tovar, la Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, al Dr. Eduardo Fernández Escartín y al Dr. Salvador Pérez González por las observaciones y comentarios realizados.

A los productores de manzana de San Joaquín y Cadereyta, por brindarme la materia prima con la cual se llevo a cabo parte de este trabajo.

Agradezco a mis amigos profundamente.

A mis compañeros de generación y de laboratorio por compartir un espacio y un tiempo.

Gracias en sí... a la vida.

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	i
<b>SUMMARY</b>	ii
<b>DEDICATORIAS</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>ÍNDICE</b>	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Antecedentes e importancia del manzano</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Origen y antecedentes históricos</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Distribución e importancia</b>	<b>3</b>
a) A nivel Mundial	3
b) A nivel Nacional	4
c) A nivel Regional	4
<b>2.2. Botánica del manzano</b>	<b>5</b>
<b>2.2.1. Taxonomía</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2. Anatomía</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3. Fisiología</b>	<b>8</b>
a) Desarrollo vegetativo	8
b) Desarrollo reproductivo	8
- Floración	9
- Desarrollo del fruto	9
- Fisiología de Poscosecha	10

<b>2.3. Aspectos generales del cultivo del manzano</b>	<b>11</b>
<b>2.3.1. Requerimientos ecológicos</b>	11
a) Clima	11
b) Suelo	12
<b>2.3.2. Prácticas culturales</b>	13
a) Plantación	13
b) Cultivares	13
c) Fertilización	14
d) Control de Plagas y Enfermedades	14
<b>2.4. Manejo en poscosecha de la manzana</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1. Cosecha, selección y empaque</b>	16
a) Cosecha	16
b) Selección	17
c) Empaque	18
<b>2.4.2. Almacenamiento</b>	18
<b>2.4.3. Enfermedades en poscosecha</b>	20
a) Fisiológico	21
b) Ocasionadas por hongos	22
<b>2.4.4. Métodos de control de enfermedades en poscosecha</b>	24
a) Temperatura	24
b) Humedad	24
c) Atmósferas controladas	25
d) Fungicidas	25
<b>2.5. Control biológico</b>	<b>26</b>
<b>2.5.1. Generalidades</b>	26
<b>2.5.2. Tipos de organismos que se controlan</b>	27
<b>2.5.3. Modos de acción de los agentes de biocontrol</b>	28
<b>2.5.4. Algunos experimentos de control biológico con microorganismos</b>	30
<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Localización del sitio experimental</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Material biológico</b>	<b>36</b>
3.2.1. <i>Manzanas</i>	36
3.2.2. <i>Penicillium expansum</i> Link	37
3.2.3. <i>Levaduras</i>	38
<b>3.3. Tratamientos aplicados a las manzanas en el campo</b>	<b>38</b>
<b>3.4. Pruebas de antagonismo</b>	<b>39</b>
3.4.1. <i>Preparación de los inóculos</i>	39
a) Suspensión del antagonista	39
b) Suspensión del patógeno	41
3.4.2. <i>Prueba de antagonismo en manzana</i>	41
- Inoculación de las manzanas	41
a) Pruebas de antagonismo de levaduras en manzanas no tratadas en el campo	43
b) Pruebas de antagonismo en manzanas tratadas en el campo	45
c) Prueba de antagonismo en manzanas tratadas con captán	46
<b>3.5. Resistencia de levaduras seleccionadas al captán</b>	<b>48</b>
<b>3.6. Aislamiento de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.</b>	<b>50</b>
<b>3.7. Identificación de las levaduras con capacidad antagónica</b>	<b>52</b>
<b>3.8. Análisis de los datos</b>	<b>52</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Levaduras aisladas y seleccionadas</b>	<b>53</b>
<b>4.2. Selección de levaduras con potencial antagónico</b>	<b>53</b>
4.2.1. <i>Pruebas iniciales por grupos</i>	53
4.2.2. <i>Prueba Confirmatoria</i>	61
<b>4.3. Ensayo de levaduras antagónicas con manzanas tratadas en el campo</b>	<b>63</b>
4.3.1. <i>Almacenamiento a Temperatura ambiente</i>	63
A) Análisis de varianza	63
B) Pruebas de medias	63
<i>B<sub>1</sub>. Efecto del tratamiento en el campo</i>	63
<i>B<sub>2</sub>. Efecto de las levaduras</i>	65
<i>B<sub>3</sub>. Efecto de las levaduras en cada uno de los tratamientos en el campo</i>	66
- Testigo	66
- Captán	68

- <i>Bacillus</i> sp. – <i>Trichoderma</i> sp. con desinfección	68
- <i>Bacillus</i> sp. – <i>Trichoderma</i> sp. sin desinfección	68
<b>4.3.2. Almacenamiento en frío</b>	<b>69</b>
A) Análisis de varianza	69
B) Pruebas de medias	69
<i>B<sub>1</sub>. Efecto del tratamiento en el campo</i>	69
<i>B<sub>2</sub>. Efecto de las levaduras</i>	71
<i>B<sub>3</sub>. Efecto de las levaduras en cada uno de los tratamientos en el campo</i>	73
- Testigo	73
- Captán	74
- <i>Bacillus</i> sp. – <i>Trichoderma</i> sp. con desinfección	74
- <i>Bacillus</i> sp. – <i>Trichoderma</i> sp. sin desinfección	75
<b>4.4. Antagonismo de levaduras en manzanas tratadas con Captán</b>	<b>75</b>
<b>4.4.1. Selección de levaduras</b>	<b>75</b>
<b>4.4.2. Ensayo en manzanas tratadas con Captán</b>	<b>77</b>
A) Análisis de varianza	77
B) Pruebas de medias	77
<i>B<sub>1</sub>. Efecto del tratamiento con Captán</i>	77
<i>B<sub>2</sub>. Efecto de las levaduras</i>	78
<i>B<sub>3</sub>. Efecto de las levaduras en cada uno de los tratamientos de Captán</i>	79
- Testigo (almacenado)	79
- Captán (almacenado)	80
- Testigo (sin almacenar)	81
- Captán (sin almacenar)	81
<b>4.5. Ensayo de levaduras in vitro para evaluar su tolerancia al captán</b>	<b>82</b>
A) Análisis de varianza	82
B) Pruebas de medias	82
<i>B<sub>1</sub>. Efecto de las levaduras</i>	82
<i>B<sub>2</sub>. Efecto de la concentración de captán</i>	83
C) Efecto de la interacción	84
<b>4.6. Identificación de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp. en manzanas tratadas en el campo</b>	<b>85</b>
<b>4.7. Identificación de levaduras con capacidad antagónica</b>	<b>86</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>91</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

2.1. Clasificación taxonómica del manzano.....	6
3.1. Identificación de las muestras utilizadas.....	37
3.2. Calendario de la aplicación de los tratamientos antifungicos en campo.....	39
4.1. Levaduras aisladas y seleccionadas.....	53
4.2. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo A después de ocho días de incubación a 26° C.....	54
4.3. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo B después de ocho días de incubación a 26° C.....	55
4.4. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo C después de ocho días de incubación a 26° C.....	56
4.5. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo D después de ocho días de incubación a 26° C.....	57
4.6. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo E después de ocho días de incubación a 26° C.....	58
4.7. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo F después de ocho días de incubación a 26° C.....	59
4.8. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo G después de ocho días de incubación a 26° C.....	60
4.9. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura del grupo H después de ocho días de incubación a 26° C.....	61
4.10. Desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura, seleccionada en ensayos previos, después de ocho días de incubación a 26° C.....	62
4.11. Valores de “F” y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable “crecimiento diametral del hongo” de los factores de estudio y su interacción.....	63

4.12. Efecto de los distintos tratamientos aplicados en el campo sobre la severidad ocasionada por <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’, con levaduras confundidas.....	64
4.13. Desarrollo diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’ en función de la cepa de levadura (solas o en mezcla), con tratamientos de campo confundidos.....	65
4.14. Desarrollo diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’ almacenadas a 26° C en función de la cepa de levadura (sola o en mezcla), en cada uno de los tratamientos aplicados en el campo.....	67
4.15. Valores de “F” y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable “desarrollo diametral del hongo” de los factores de estudio y su interacción en distintos tiempos de almacenamiento.....	69
4.16. Efecto de las aplicaciones en campo sobre el desarrollo diametral (cm.) de <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’, con levaduras confundidas después de 30 y 45 días de incubación a 1° C.....	70
4.17. Efecto de las levaduras (solas o en mezclas) sobre el desarrollo diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’, con aplicaciones en el campo confundidas, después de 30 y 45 días de incubación a 1° C.....	72
4.18. Efecto de las levaduras solas o en mezclas sobre la severidad (diámetro de la lesión) ocasionada por <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’ en cada uno de los tratamientos aplicados en el campo después de 30 días de incubación a 1° C.....	73
4.19. Efecto de las levaduras solas o en mezclas sobre la severidad (diámetro de la lesión) ocasionada por <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’ en cada uno de los tratamientos aplicado en el campo después de 45 días de incubación a 1° C.....	74
4.20. Efecto de diferentes levaduras aisladas en la Sierra de Querétaro sobre la severidad ocasionada por <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’.....	76
4.21. Valores de “F” y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable “desarrollo diametral del hongo” de los factores de estudio y su interacción.....	77
4.22. Efecto de las aplicaciones del Captán sobre el desarrollo diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’, con levaduras confundidas.....	78

4.23. Efecto de las levaduras (solas o en mezclas) sobre el control de la severidad ocasionada por <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’, con aplicaciones de Captán confundidas.....	79
4.24. Efecto de las levaduras solas o en mezclas sobre el crecimiento diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas ‘Golden Delicious’ en cada uno de los tratamientos de Captán aplicados.....	80
4.25. Valores de “F” y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable “diámetro de inhibición del área de crecimiento” de los factores de estudio y su interacción.....	82
4.26. Diámetro de inhibición del crecimiento de la cepa de levadura, con concentraciones de Captán confundidas.....	83
4.27. Efecto de las concentraciones empleadas de Captán, sobre el diámetro de inhibición del área de crecimiento, con levaduras confundidas.....	83
4.28. Cepas de levaduras identificadas por el sistema Biolog.....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

2.1. Partes estructurales de la flor.....	8
2.2. Manzana dañada por <i>V. Inaequalis</i> .....	16
3.1. Ubicación de las comunidades de muestreo en el municipio de Cadereyta, Querétaro.....	35
3.2. Ubicación de las comunidades de muestreo en el municipio de San Joaquín, Querétaro.....	36
3.3. Esquema de preparación del inóculo de levadura y de <i>P. expansum</i> .....	40
3.4. Técnica de inoculación de las manzanas.....	42
3.5. Prueba de antagonismo en manzanas no tratadas en el campo.....	44
3.6. Prueba de antagonismo en manzanas tratadas en el campo.....	47
3.7. Prueba de antagonismo en manzanas tratadas con Captán.....	49
3.8. Resistencia de levaduras al Captán.....	51
4.1. Interacción entre el factor levadura y la concentración aplicada de Captán sobre el diámetro de inhibición del área de crecimiento.....	84
4.2. Microorganismos aislados de manzanas tratadas con <i>Bacillus</i> sp.- <i>Trichoderma</i> sp. en campo y sin tratar. Aislados en diferentes medios de cultivo.....	86

## I. INTRODUCCIÓN

Entre los países productores de manzana, México ocupa el vigésimo tercer lugar, aportando cerca de 1 % de la producción mundial (FAO, 2003). Las principales zonas productoras se encuentran en los estados del norte del país, aunque en las partes altas del centro de la república el manzano se cultiva generalmente bajo temporal. Tal es el caso del estado de Querétaro, donde existen algunas zonas que cuentan con un clima apropiado para el cultivo de este frutal, siendo los principales municipios productores San Joaquín y Cadereyta (INEGI, 1999).

Entre los principales problemas que limitan la producción de manzana en la región de Querétaro podemos citar la presencia de enfermedades durante el cultivo y en poscosecha, destacando en el primer caso la roña, producida por *Venturia inaequalis*, que provoca la caída prematura de la fruta así como manchas en forma de costras durante el cultivo y el almacenamiento (Agrios, 1988). Esta enfermedad afecta significativamente la calidad de la fruta al grado de hacerla inapta para su comercialización. Actualmente no se lleva a cabo intervención alguna para el control de ésta y otras enfermedades, por lo que se están realizando, de manera local, algunos experimentos tendientes a determinar la eficacia de algunos fungicidas y de microorganismos (*Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp.) para su control.

Por otro lado, durante el almacenamiento del producto, existen diversos microorganismos que provocan podredumbres en la fruta, siendo *Penicillium expansum* la especie que genera las mayores pérdidas. Éste infecta comúnmente a frutos que son heridos durante la manipulación y en los procedimientos de lavado realizados después de la cosecha, pudiendo también penetrar al fruto a través de sitios de infección producidos por otros hongos (Agrios, 1988).

Existen diversos métodos para controlar las enfermedades que se presentan en poscosecha en la manzana, particularmente *Penicillium*, destacando la desinfección de la fruta, la aplicación de calor, los tratamientos con calcio y el empleo de fungicidas. Los tratamientos con calcio, si bien dan buenos resultados al aumentar la firmeza de la fruta, tienen el inconveniente de que, si la concentración de calcio a proporcionar a la fruta es excesiva, puede provocarse la formación de fisuras (Salunkhe y Desai, 1984). Los

tratamientos con calor, por su parte, pueden alterar el sabor de la fruta. El método de control primario empleado son los fungicidas, aunque tienen la desventaja de contener componentes cancerígenos (Usall *et al.*, 1996), ocasionar daños al medio ambiente y generar cepas del patógeno resistentes al producto (Leverentz *et al.*, 2000).

En la actualidad se buscan métodos alternativos para el control de enfermedades en poscosecha, dentro de los cuales destaca el control biológico que consiste en el empleo de microorganismos con capacidad antagónica. Se han detectado en la manzana algunas cepas de bacterias y levaduras, de especies como *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas syringae*, *Cryptococcus spp.*, *Pichia guilliermondii*, *Acremonium breve* (Wisniewski y Wilson, 1992) y *Candida sake* (Usall *et al.*, 2000), capaces de desarrollar a temperaturas de almacenamiento, inhibiendo el desarrollo del patógeno en estudio.

Aparentemente no se ha estudiado el efecto que los fungicidas o microorganismos que se aplican durante el cultivo pudieran tener sobre las levaduras antagónicas utilizadas para el control de *Penicillium expansum* en poscosecha, o bien sobre el propio *P. expansum*.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la eficiencia de distintas cepas de levaduras aisladas de la superficie de manzanas cultivadas en la región San Joaquín-Cadereyta sobre el control de *Penicillium expansum* en frutos de manzana tratados con Captán o inoculados con *Bacillus sp.* y *Trichoderma sp.* en precosecha y almacenados a distintas temperaturas (26° C ó 1° C).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Antecedentes e importancia del manzano

#### 2.1.1. Origen y antecedentes históricos

Los primeros vestigios del manzano (*Malus spp.*) datan de la edad de piedra, tal como lo evidencian hallazgos de fósiles de árboles encontrados en piedras en Suiza y Austria (D'Esclapon, 1976; Delahaye y Vin, 1997). El origen de esta fruta se encuentra ubicado en el Suroeste de Asia; al sur de las montañas del Cáucaso, entre el Mar negro y el Mar Caspio (Inlandfruit, 2003).

El antepasado principal de la manzana doméstica es *Malus sylvestris*. La manzana silvestre de Asia antigua provenía de árboles que producían centenares de frutas minúsculas, que eran amargas y que contenían numerosas semillas marrones; ésta era una fruta poco apetecible al paladar. Se dice que los horticultores romanos jugaron un papel muy importante para que en la actualidad pueda saborearse un fruto jugoso y dulce (Inlandfruit, 2003).

El manzano fue cultivado por los griegos (aunque de manera muy limitada), los franceses, los romanos y los egipcios. El cultivo se extendió a América, habiendo sido introducido a principios de 1600 por colonizadores europeos. Su propagación durante esa época fue por semilla, dada su facilidad de transporte (Vegparadise, 2003).

Al hablar de la historia del manzano en América cabe mencionar a John Champan conocido como "Johny Appleseed", quien viajó ampliamente plantando árboles de manzano en los lugares que visitaba, propagando así a la especie (Vegparadise, 2003).

#### 2.1.2. Distribución e Importancia

##### a) A nivel mundial

El manzano es cultivado en diferentes regiones del mundo, principalmente en los valles montañosos. En 2002, la producción mundial fue de 57,982,587 Ton., donde los principales países productores fueron: China, Estados Unidos, Francia, Turquía e Italia. México, por su parte, ocupa el vigésimo tercer lugar, aportando cerca de 1 % de la producción mundial (FAO, 2003).

## **b) A nivel nacional**

México cuenta con diversas zonas aptas para el cultivo de este frutal, principalmente en el norte del país, ya que las variedades de manzano consideradas finas, como 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Starking Delicious' y 'Rome Beauty', tienen requerimientos de más de 800 horas de frío, situación que sólo llegan a presentarse en estas áreas. La producción nacional en 2002 fue de 428,216 Ton. en 58,016 ha establecidas, siendo los principales estados productores: Chihuahua, Coahuila, Durango, Puebla y Nuevo León (INEGI, 1999). También se le puede encontrar en zonas altas de los estados de Veracruz, Hidalgo, Oaxaca, Zacatecas, México y Querétaro, aunque la producción es relativamente baja (Ramírez y Cepeda, 1993).

## **c) A nivel regional**

En el estado de Querétaro existen algunas zonas que cuentan con un clima apropiado para el cultivo del manzano, como las partes serranas. En estas zonas se encuentran laderas con pendientes importantes, en alturas superiores 2,000 msnm, temperaturas medias anuales de alrededor de 15° C y precipitaciones que varían de 500 a 1,500 mm anuales (Martínez y Pérez, 1997). De acuerdo a la SAGARPA (2004), en el 2003 se produjeron 1,074 Ton., siendo los principales municipios productores: San Joaquín, Cadereyta, Pinal de Amoles y Amealco (INEGI, 1999).

Entre los principales problemas que limitan la producción de manzana en la región podemos citar los accidentes climatológicos como las heladas que, cuando llegan a ser tardías, ocasionan la caída de la flor o del fruto recién fecundado; el granizo que, al golpear la fruta, disminuye su calidad, y la sequía que provoca daños importantes, puesto que el cultivo del manzano se da generalmente en la zona bajo temporal.

Otro aspecto importante es la deficiencia en la aplicación de las técnicas de cultivo, como la selección de cultivares y portainjertos, la falta de fertilización, podas, la ausencia de aclareo de frutos, y de saneamiento del huerto, lo que propicia que las concentraciones de ciertos microorganismos patógenos se incrementen.

En las huertas se presenta una gran cantidad de enfermedades tanto en el follaje como en el fruto. En el primer caso, el principal microorganismo identificado ha sido *Podosphaera leucotricha*, causante de la cenicilla polvorienta u *Oidium* y, en el fruto, lo

son *Venturia inaequalis* causante de la roña y *Fusicladium dendriticum* Wallr, causante de la mancha oscura (Caltzontzin, 2003). En 2004 se tuvieron daños muy severos por roña en la región, originando con ello grandes pérdidas a los productores.

En los huertos establecidos en la región no se lleva a cabo intervención alguna para el control de enfermedades, de ahí que resulte necesaria la aplicación de algún método de control que podría consistir en el uso de algún fungicida, o bien, de un método alternativo como el uso de microorganismos con capacidad antagónica (control biológico).

Debido a los problemas mencionados, las manzanas producidas en la región son generalmente de mala calidad. Aunado a ello, el intermediarismo y la carencia de bodegas frigoríficas para el almacenamiento del fruto, hace que la comercialización de la fruta se lleve a cabo de manera muy deficiente.

Durante el almacenamiento de la manzana, el principal problema lo constituye la presencia de enfermedades fungosas como la pudrición azul causada por *Penicillium expansum* Link, que origina uno de los más importantes pudrimientos destructivos en manzanas. Éste es considerado un parásito de heridas; la infección puede ocurrir a 0° C y, aunque el desarrollo es lento a bajas temperaturas de almacenamiento, éste se acelera cuando la fruta es transferida a un ambiente caluroso (Agrios, 1988).

## **2.2. Botánica del manzano**

### **2.2.1. Taxonomía**

El manzano (*Malus domestica* Borkh), como actualmente lo conocemos, es un complejo híbrido compuesto por diversas especies del género *Malus*. La especie silvestre predominante es *M. sieverssi*, pero otras especies que probablemente han aportado genes a la actualmente cultivada, son: *M. orientalis* Uglitzk (originaria del Cáucaso), *M. sylvestris* Miller (originaria de Europa), *M. baccata* (originaria de Siberia), *M. mandshurica* (originaria de Manchuria) y *M. prunifolia* (originaria de China) (Parra, 1999).

La clasificación taxonómica del manzano se muestra en la Tabla 2.1 (González, 1999; Ramírez y Cepeda, 1993).

**Tabla 2.1.** Clasificación taxonómica del manzano

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Espermatophytae</i>
Subdivisión	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Rosaidea</i>
Familia	<i>Rosaceae</i>
Subfamilia	<i>Pomoidea</i>
Género	<i>Malus</i>
Especies	<i>M. domestica</i> Borkh, <i>M. communis</i> , <i>M. sylvestris</i> , <i>M. floribunda</i> , <i>M. pumila</i> , <i>M. mitis</i> , <i>M. baccata</i> , <i>M. protti</i> .

(Fuente: Ramírez y Cepeda, 1993)

### 2.2.2. Anatomía

- **Planta:** El manzano es un árbol perenne cuya altura oscila entre 6 y 10 m; su tronco generalmente es tortuoso y tiene ramas gruesas, copa ancha y poco regular (González, 1999). El manzano alcanza hasta 80 años sobre patrón silvestre y, a partir de los cuatro años, se tiene producción cuando éste se injerta (Calderón, 1987).
- **Raíz:** Es pivotante cuando proviene del embrión de la semilla, sin embargo, en el caso de los portainjertos clonales, es fascicular. Se considera un órgano de reserva, almacena en sus tejidos sustancias procedentes de la savia elaborada. La función respiratoria de las raíces, aunque débil, es importante porque todo factor que lo impida actúa en perjuicio del árbol (González, 1999).
- **Tallo:** Al principio es herbáceo y posee cierta acción fotosintética, la cual se pierde al hacerse leñoso y constituirse en el tronco definitivo, sus funciones son muy importantes, ya que transporta a las hojas los elementos nutritivos disueltos en el agua que han penetrado en la planta a través de los pelos absorbentes de la raíz; además transporta y proporciona a las raíces, brotes, hojas, flores y frutos, los

compuestos orgánicos necesarios para el crecimiento, fructificación y formación de reservas (Ramírez y Cepeda, 1993).

- Hojas: Simples, de color verde oscuro por el haz y leñoso y blanquecino por el envés. En las hojas se lleva a cabo la fotosíntesis y de su buen funcionamiento depende el desarrollo del árbol y su producción (Ramírez y Cepeda, 1993).
- Flores: Son hermafroditas, se encuentran conectadas a las ramas por el pedúnculo, después está el receptáculo al que están conectados los cinco sépalos (láminas u hojitas verdes en la base de la flor), se tiene también la corola (conjunto de pétalos): Envuelto por los pétalos se encuentra el órgano masculino (androceo) constituido por cinco estambres que a su vez están formados por un filamento que sostiene la antera que produce el polen. El órgano femenino de la flor es el pistilo que está constituido por el ovario, el estilo (tubo que conecta el estigma con los ovarios) y el estigma (receptor del polen) (Figura 2.1). Las flores son blancas o rosa brillante; el polen es demasiado pesado y pegajoso para ser transportado por el viento, por lo que se requiere de insectos polinizadores, comúnmente las abejas (González *et al.*, 1999). En el manzano se presenta el fenómeno de incompatibilidad de polen y estigma, por lo cual, la fecundación generalmente no es realizada por el polen de la misma flor y es necesario contar en el huerto con árboles polinizadores a fin de que se lleve a cabo una polinización cruzada (Álvarez, 1996).
- Fruto: Se clasifica botánicamente como un “pomo”, el cual se caracteriza por ser un fruto simple formado por cinco carpelos y un ovario ínfero. La parte comestible del fruto corresponde al receptáculo floral (Álvarez, 1996). El fruto es carnosos y de sabor dulce; varía en tamaño, color y forma (globular, cónico, con la zona pedicelar y la zona del cáliz hundidas en la parte central). Su superficie es lisa, roja o amarilla, según la variedad. En su interior normalmente contiene cuatro o cinco semillas protegidas por cámaras cartilaginosas provenientes de los cinco carpelos del pistilo floral (INEGI, 1998; González *et al.*, 1999).

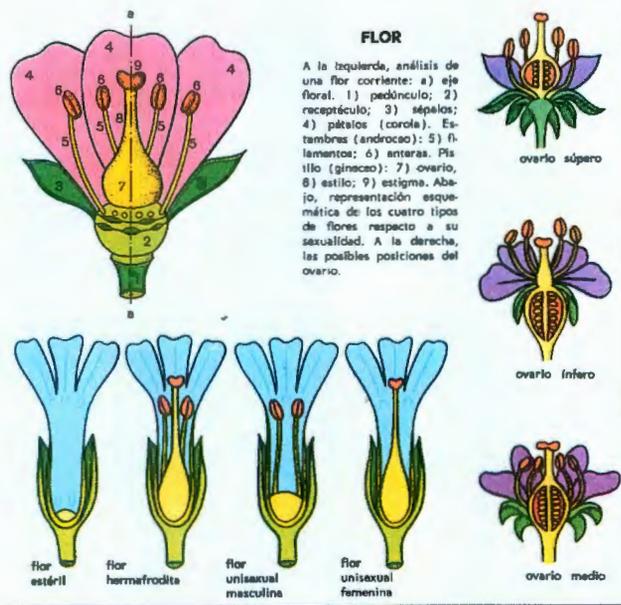


Figura 2.1. Partes estructurales de la flor

### 2.2.3. Fisiología

#### a) Desarrollo vegetativo

El ciclo vegetativo anual del manzano empieza con la caída de las hojas a mediados de octubre hasta mediados de noviembre; en este periodo se inicia el reposo invernal del árbol que se prolonga hasta febrero. En marzo se manifiesta la renovación de la actividad vegetativa a partir del desborre o brotación; al principio de abril ocurre la floración y aparición de las primeras hojas y el cuajado o amarre del fruto a finales del mismo mes; posteriormente, de mayo a septiembre, se da el periodo de máxima vegetación en el que tiene lugar el desarrollo de las hojas y los frutos, así como la acumulación de reservas nutritivas para el siguiente ciclo; la cosecha se inicia a finales de agosto y se alarga, en algunas regiones, hasta finales de septiembre. Después, el árbol se prepara para la caída de las hojas (Ramírez y Cepeda, 1993).

#### b) Desarrollo reproductivo

En los árboles frutales la floración comienza a aparecer cuando la gran actividad vegetativa inicial se detiene al haberse ya formado un considerable y consistente sistema

aéreo, correspondiente a otro similar radical y habiendo en consecuencia acumulación de materia orgánica, especialmente almidones (Calderón, 1987).

### **- Floración**

Se dice que los árboles están en floración cuando los primeros pétalos están cayendo. En zonas templadas la floración dura entre cinco y diez días. Las etapas de desarrollo de la flor son las siguientes (Arévalo, 1979):

1. Reposo. Corresponde a la etapa en que la yema floral, ya diferenciada, se encuentra antes de brotar.
2. Hinchazón de yemas. Cuando las yemas se hinchan, pero antes de que abran.
3. Brotación floral. Las flores muestran su color rosado mientras empiezan a salir de los sépalos.
4. Floración. Las flores están abiertas y listas para recibir polen.
5. Caída de los pétalos. Después de estar abiertas tres días, el estigma y el estilo se secan y los pétalos empiezan a caer.
6. Amarre o cuajado del fruto. Las flores fecundadas empiezan a desarrollar en frutas.

### **- Desarrollo del fruto**

Como consecuencia de la fecundación, el ovario de la flor desarrolla y se transforma en el fruto. El proceso que conduce a la fecundación comienza cuando el grano de polen se pone en contacto con el estigma. Después de que éste germina, el núcleo generatriz (gameto masculino) se transporta dentro del tubo polínico y a través del estilo, alcanzando los óvulos situados en el ovario. Este proceso finaliza con la unión de las células reproductoras y la caída de los pétalos de la flor (Calderón, 1987). Es importante hacer notar que la manzana presenta una curva de crecimiento de tipo sigmoideal.

#### *\*Etapa de multiplicación celular*

Inmediatamente después de la fecundación, comienza un período de intensa multiplicación celular que dura un tiempo más o menos corto, variable de cuatro a ocho semanas. Posteriormente el crecimiento del fruto se detiene sensiblemente, al disminuir la multiplicación celular. En este momento, se realiza la formación completa y el

endurecimiento del mismo, aumentando notablemente el contenido de materia seca (dura de dos a tres semanas) (Calderón, 1987).

#### *\*Etapa de elongación celular*

Etapa de gran crecimiento del fruto, generalmente más prolongada, con duración de cinco a diez semanas, en la cual las células existentes, y que forman el fruto, aumentan grandemente de tamaño (Calderón, 1987).

#### *\*Etapa de maduración*

Mucho antes de que la anterior fase termine, empiezan a ocurrir en el fruto transformaciones bioquímicas de gran importancia, que determinan la maduración del mismo y que, en tiempo, se sobrepone con la de elongación celular (Calderón, 1987). Es un proceso complejo que involucra cambios en la textura, firmeza, color del epicarpio, producción de compuestos volátiles, así como una evolución en la producción de etileno. Los cambios generales asociados con la maduración incluyen el ablandamiento de la pulpa, la conversión hidrolítica del almidón en azúcares, la disminución de la acidez, cambios en la pigmentación (los pigmentos verdes de la clorofila se transforman en xantofilas y carotenos, hay síntesis de antocianinas) e incremento en el aroma y cambios en el sabor (Salunkhe y Kadam, 1995).

#### **- Fisiología de poscosecha**

Después de la cosecha, las frutas y hortalizas continúan desarrollando su metabolismo y manteniendo sistemas fisiológicos. En efecto, ellas respiran tomando O<sub>2</sub> y liberando CO<sub>2</sub> y calor, y también transpiran. Mientras los frutos se encuentran unidos a la planta, las pérdidas debidas a la respiración y transpiración son repuestas de otras partes de la planta a través del flujo de savia (que contiene azúcares, aminoácidos, minerales y agua) a través del sistema vascular. La respiración y la transpiración continúan después de la cosecha, por lo cual, las frutas y hortalizas dependen de sus reservas de alimentos y de agua para poder mantener estos procesos (Weichmann, 1987).

En la respiración se da una degradación de compuestos (azúcares y ácidos orgánicos) presentes normalmente en las células, a moléculas más simples (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O). La

velocidad de respiración del producto es un excelente indicador de la actividad metabólica del tejido y, por lo tanto, una excelente guía para tener una idea de la vida de almacenamiento del producto. Si medimos el consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> durante las diferentes etapas de desarrollo del fruto, puede tenerse un patrón de la respiración (Wills *et al.*, 1988). En el caso de frutas climatéricas, como la manzana, se presenta un aumento súbito de la respiración, seguido por una declinación gradual en la misma; el climaterio es inducido por el etileno. Para las frutas no climatéricas la respiración disminuye hasta llegar a la muerte del fruto (Weichmann, 1987).

En el caso de la manzana, la síntesis de ARN y proteínas, así como el incremento de la actividad del ácido linolenico y lipoxidasa durante el climaterio, parecen estar involucrados de alguna manera en la síntesis de etileno. Además, durante esta etapa, se presenta un incremento en la actividad de ciertas enzimas como la carboxilasa piruvica, clorofilasa, ácido fosfatasa y ribonucleasa, así como cambios significativos en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, compuestos volátiles, color (clorofila, carotenoides y antocianinas), textura y fenoles (Salunkhe y Desai, 1984).

## **2.3. Aspectos generales del cultivo del manzano**

### **2.3.1. Requerimientos ecológicos**

#### **a) Clima**

Los climas templados resultan muy adecuados para el manzano, que requiere de periodos variables de frío y estado latente para fructificar, resistiendo en invierno temperaturas de hasta -40° C. Por el contrario, las regiones secas o calurosas le son poco favorables (Álvarez, 1996). En las zonas susceptibles de verse afectadas por las heladas primaverales, si no se cultivan variedades de floración tardía o escalonada, puede perderse parte o la totalidad de las cosechas (Juscafresa, 1973).

- **Pluviometría**

El agua es un factor de considerable importancia en el cultivo del manzano. En los terrenos donde el riego no es posible, se estima que las precipitaciones anuales deben ser, por lo menos, de 700 mm, y aún superiores en las regiones cálidas. Algunos autores señalan

como precipitaciones más convenientes para este frutal las comprendidas entre 600 y 800 mm y como excesivas las que pasan de 1000 mm (Ramírez y Cepeda, 1993).

#### ▪ **Temperatura**

La cantidad de frío que precisa un árbol es variable según las especies y variedades, pero la falta de frío invernal es siempre un problema, en ocasiones muy grave. El requerimiento de frío de las diferentes variedades permite clasificar los manzanos de la siguiente forma: bajo requerimiento, de 500 a 600 horas frío; requerimiento regular, de 600 a 700 horas frío; alto requerimiento, de 700 a más horas frío (CONAFRUT, 1972). El requerimiento de frío se puede definir como la cantidad de frío que precisa un árbol para que sus yemas florales y vegetativas puedan brotar ; dicho requerimiento se mide o expresa por el término “hora frío”, que es el tiempo durante el reposo invernal que el árbol esta expuesto a temperaturas inferiores a 7.2° C (Calderón, 1987).

#### ▪ **Viento**

Los vientos fuertes ocasionan graves daños al desgarrar las ramas o producir la caída de las flores y los frutos; también afectan la acción de los insectos polinizadores. El viento es un peligroso enemigo de los huertos frutales, especialmente si es seco en la época de la floración, pues acorta su período de fecundación. Los daños son aún mayores si el viento procede del mar y arrastra consigo cloruros u otras sales. Los vientos salados pueden producir quemaduras más o menos graves en las hojas y en los frutos (Álvarez, 1996).

#### **b) Suelo**

El manzano posee una gran flexibilidad de adaptación a los diferentes tipos de suelo; el rendimiento del árbol depende del tipo de suelo. Los suelos que el manzano requiere deben ser de textura media (francos) a ligera (arenosos), con una profundidad de por lo menos 60 cm de suelo bien drenado, debido a que sus raíces solamente respiran en un suelo permeable y no demasiado húmedo (González *et al.*, 1999). Las raíces del manzano necesitan de una mayor aireación que las de otras especies, ya que son susceptibles de morir por asfixia en tierras muy duras o compactas, o por encharcamientos de agua prolongados. Es impropio el cultivo del manzano en tierras secas. El pH más

favorable oscila entre 5.5 y 6.5, pero la planta puede desarrollarse en realidad en terrenos con un pH comprendido entre 4.0 y 8.5 (Álvarez, 1996).

### **2.3.2. Prácticas culturales**

#### **a) Plantación**

Antes de realizar una plantación de manzano debe darse una serie de labores preparatorias con el fin de que las raíces del árbol encuentren un medio óptimo para su desarrollo. Primero se rompe el terreno con una labor de subsuelo y a continuación, con el arado, se da una labor profunda que incorpore bien el estiércol y después se vuelve a gradear. Una vez preparado el terreno se procede a la plantación; es necesario distribuir los árboles de una manera regular, según disposiciones geométricas, los principales sistemas de plantación son los siguientes (Álvarez, 1996):

- Tresbolillo: Los manzanos van situados en los vértices de triángulos equiláteros.
- Marco real: Los árboles van situados en los vértices de cuadrados cuyos lados son la distancia o marco de plantación.
- Curvas de nivel: Es el sistema que se recomienda para terrenos con pendientes elevadas. Las terrazas pueden hacerse continuas para toda una fila de árboles, o bien independientes para cada árbol. Las terrazas de dos a cinco metros de ancho suelen ser las preferidas.

#### **b) Cultivares**

Se han descrito más de 7,000 cultivares de manzano desde 1804 hasta la fecha; esto refleja la gran diversidad genética existente. Sin embargo, actualmente el mercado mundial está dominado por aquellos que derivan genéticamente de dos: 'Red Delicious' y 'Golden Delicious'. El primero ha servido como fuente para la selección de algunos mutantes de las manzanas rojas, como 'Red Ace', 'Red Chief', 'Oregon Spur', 'Starking', 'Top Red' y 'Well Spur', entre otras; 'Fuji' y 'Empire' se derivan de 'Red Delicious' por selección de semilla. 'Golden Delicious', por su parte, ha sido utilizado para la selección de semilla de los siguientes cultivares: 'Gala', 'Mutsu' y 'Jonagold', y por mutación, 'Agua Nueva II' (Parra, 1999).

En México, entre las variedades de mayor importancia por su peso en la producción nacional, podemos encontrar cuatro: 'Red Delicious', 'Golden Delicious', 'Starking Delicious' y 'Rome Beauty'. Recientemente se han introducido al país la 'Gala' y la 'Fuji' (Parra, 1999).

### **c) Fertilización**

El éxito económico de una plantación de manzanos se encuentra estrechamente relacionado con el empleo racional de los abonos, por lo cual se debe llevar a cabo una adecuada utilización de ellos por parte de los agricultores que en ocasiones no saben emplearlos y no combaten con regularidad y eficacia las plagas y enfermedades así como no ayudan a mejorar la calidad del cultivo (Salvat, 1970). Los árboles de manzano requieren de N, P, K y otros elementos que precisa la planta en proporción muy escasa son: B, Fe, Zn, Cu, Mg etc (Salunkhe y Kadam, 1995).

### **d) Control de Plagas y Enfermedades**

Se tienen pérdidas de cosecha y de productos agrícolas almacenados como consecuencia de las enfermedades, plagas y condiciones adversas que se presentan.

Las alteraciones del manzano pueden ser producidas por (Álvarez, 1996):

#### *-Plagas*

- Insectos. Atacan las raíces, tallos, hojas, flores y frutos, entre los que podemos citar el gusano de las manzanas, los barrenillos, los gusanos del suelo que devoran las raíces, el gorgojo de la flor, los pulgones, etc. Se combaten por medios químicos y en casos particulares, mediante control biológico.
- Roedores. Los ratones y topillos se comen la corteza de la raíz y muchas veces producen la muerte fulminante del árbol. También causan importantes daños en los frutos. Se emplean para combatirlos humos asfixiantes, cebos envenenados a base de sulfato de estricnina, cebos hemorrágicos, sustancias contaminadas con virus que propagan entre los roedores una enfermedad infecciosa y pulverizaciones con Endrín.

- Determinadas especies de pájaros, que en muchas zonas fruteras llegan a ser una plaga de importancia. Se combaten con el uso de espantapájaros, cebos envenenados y jaulas-trampas.

#### -Enfermedades

- Virus. Se propagan generalmente por vía vegetativa (injerto, estaquillas de árboles contaminados) y, más raramente, por vectores tales como los nemátodos o insectos, como los pulgones. No existe ningún tratamiento virucida y la forma posible de combatir es plantar material sano y procurar mantenerlo en ese estado, tratamientos químicos y lucha biológica en los casos en los que ésta sea posible.
- Bacterias. Como los tumores de raíz, el fuego bacteriano, etc. Estas enfermedades se pueden combatir mediante el empleo de compuestos químicos, así como llevando a cabo el saneamiento del terreno.
- Nemátodos. Parásitos presentes en las raíces de las plantas cultivadas. La forma de combatirlos es el mantener el suelo libre de vegetación, que sirva de huésped de multiplicación al nemátodo.
- Hongos. Como *Podosphaera leucotricha* causante de la cenicienta polvorienta u oidium en las hojas. En el fruto *Fusicladium dendriticum* Wallr. causante de la mancha oscura y *Venturia inaequalis* causante de la roña, etc. Estas enfermedades se previenen con la utilización de compuestos químicos, y otras cultivando especies resistentes o saneando los terrenos.

La roña (*Venturia inaequalis*) es la principal enfermedad que se presenta en el fruto del manzano durante su cultivo (ver figura 2.2). La infección de la fruta aparece como costras de forma circular claras, las cuales al principio son aterciopeladas y de color verde-olivo llegando a ser oscuras. La infección temprana de la fruta provoca su caída prematura. Cuando la infección se lleva a cabo cerca de la madurez, resulta en pequeñas lesiones que no son visibles en la cosecha, pero que forman las costras durante el almacenamiento. Los frutos infectados son pequeños y con corta vida de almacenamiento (Agrios, 1988).



Figura 2.2. Manzana dañada por *V. Inaequalis*

Cuando el hongo infecta las hojas propicia su caída prematura, lo que ocasionará pérdidas de la cosecha al año siguiente, al quedar el árbol debilitado y no formar botones florales (Álvarez, 1996).

- Ciclo biológico: El hongo productor de la roña tiene dos fases distintas; una de parásito, *Spilocaea pomi*, que es como aparece sobre las hojas y frutos en la época de savia movida del árbol, y otra saprofítica, en la fase de *Venturia*, desarrollándose sobre las hojas caídas en el suelo después del otoño hasta finales de la primavera. La primera fase comprende el estado asexual o anamorfo, y la segunda, el sexual o telemorfo (Sivanesan, 1984).

## **2.4. Manejo en poscosecha de la manzana**

### **2.4.1. Cosecha, selección y empaque**

#### **a) Cosecha**

En la operación de cosecha de la manzana se deben tomar en cuenta dos tipos de madurez, que son (Corrales, 1989):

➤ Madurez hortícola. Para conservar la calidad de los productos, éstos deben cortarse en este estado de madurez, el cual se interpreta como el estado de desarrollo de una planta u órgano vegetal que satisface los requisitos necesarios para su utilización, ya sea en estado fresco o industrial.

➤ **Madurez fisiológica.** Se refiere al estado de desarrollo de las plantas o de los órganos vegetales, a partir del cual, éstos pueden continuar en forma normal con el proceso de maduración, ya sea en la misma planta o fuera de ella, como en el caso de los frutos climatéricos.

Con el seguimiento de la madurez se busca que un producto determinado pueda cosecharse (porque económicamente así lo convenga), pero con la idea de que éste pueda lograr una calidad aceptable al consumidor final (Corrales, 1989).

Las mediciones objetivas más prácticas son aquellas que pueden ser fácilmente realizadas en el campo y que indican cambios físicos y químicos que ocurren durante la maduración de la fruta y que son: **color** (externo e interno), **firmeza de la pulpa**, contenido de almidón, relación azúcares / ácidos, acidez de la pulpa, número de días transcurridos de la plena floración hasta la recolección, desprendimiento del fruto, jugosidad de la pulpa, entre otros (Molina y Durán, 1970).

## **b) Selección**

Cuando la manzana procedente del huerto llega envasada en cajas de madera o de plástico al frigorífico, la primera operación que debe realizarse es la selección o triado, en la cual se van separando los frutos magullados en la recolección y transporte, los podridos, los heridos por cualquier causa, los deformes, los afectados por roña o moteado y todos éstos se destinan a la industria para la elaboración de sidra, jugo, etc. Una vez seleccionada la fruta, se procederá a su limpieza, o bien, se llevará a cabo directamente el calibrado (Álvarez, 1996).

En el proceso de tratamiento completo, las manzanas son lavadas, cepilladas, enjuagadas, presecadas, enceradas y secadas. La manzana lavada y cepillada se enjuaga con duchas de agua fresca y pasa a través de rodillos de secar antes de recibir la aplicación de la cera especial en capa bien uniforme que mejora su calidad y presentación con un brillo adecuado. En la fase del encerado se aplican fungicidas para proteger la fruta contra las enfermedades durante la conservación y evitar el escaldado. Por último, un equipo de secado rápido con calor hace que la manzana quede en una situación que repele el agua y lista para pasar a las máquinas de calibrado (Álvarez, 1996).

### **c) Empaque**

Con el empaque se logra una comercialización más ordenada de los productos. Los contenedores facilitan la transferencia de los productos del lugar de producción hasta los puntos de consumo (Molina y Durán, 1970). Entre los tipos de contenedores más utilizados, tenemos (Salunkhe y Kadam, 1995):

◆Cajas de madera: Las manzanas son generalmente envasadas en cajas de madera. La caja se forra con papel periódico, en el fondo de la caja se puede colocar una almohadilla de lana así como también colocar entre las capas de fruta. La caja es reforzada externamente con alambre de acero. El empaque de manzanas en cajas de madera resulta en un alto magullamiento y muestra máxima pérdida en peso de la fruta.

◆Bandejas: Se utilizan bandejas de pulpa de papel, la fruta se envuelve individualmente o en ocasiones esto no se lleva a cabo. Estas bandejas se colocan en cajas.

◆Cartones corrugados de fibra de madera: Éstos han remplazado a las cajas de madera para el empaque de muchas frutas y verduras. Los cartones son capaces de resistir daños en el transporte, ellos causan un mínimo magullamiento de la fruta en comparación con las cajas de madera y también reducen la pérdida de peso de la fruta.

#### **2.4.2. Almacenamiento**

El almacenamiento tiene como función controlar la velocidad de respiración y transpiración de frutas y hortalizas sin causar daño por frío, disminuir el crecimiento de microorganismos, preservar al producto en una forma aceptable para el consumidor, así como extender la disponibilidad de éste en el mercado, de tal manera que permita contarse con manzana en una época en la cual no se produce en el campo (Salunkhe *et al.*, 1991).

Los principales factores que deben ser considerados para tener éxito en el almacenamiento (Salunkhe *et al.*, 1991) son:

♣Temperatura. Debe ser la deseada para la fruta u hortaliza a almacenar. Una temperatura por debajo del rango óptimo causara daños por frío, mientras que, una temperatura por encima, reducirá la vida de almacenamiento ya que aceleraría sus procesos vitales. La temperatura a la cual las manzanas pueden ser almacenadas es de  $-1^{\circ}\text{C}$  a  $+3^{\circ}\text{C}$ , pero está en función de la variedad (Westwood, 1993).

♣ Humedad relativa. La humedad relativa debe ser mantenida entre 85 y 90 %, ya que, si se tiene una humedad relativa por debajo de este rango, los frutos perderán turgencia, además, el producto tiende a marchitarse y, si se tiene una humedad relativa por encima de este rango, puede promoverse el crecimiento de microorganismos.

♣ Composición atmosférica. La ventilación es imprescindible porque una atmósfera saturada de etileno producido por la propia manzana almacenada acelera la maduración de ésta. La composición atmosférica en una cámara de almacenamiento es controlada por la adición de gases o por la remoción física o química de éstos.

♣ Luz. La conservación de la manzana debe realizarse en la oscuridad ya que la luz acelera sus procesos vitales.

#### *Tipos de almacenamiento utilizados para manzanas*

- Cámara frigorífica. En las cámaras frigoríficas con atmósfera normal, la mayor parte de las variedades de manzana tienen su óptimo de conservación entre  $-1^{\circ}\text{C}$  y  $+3^{\circ}\text{C}$ , con humedad relativa entre 85 y 90 %. El frío en estos almacenes se produce artificialmente por medio de instalaciones automáticas que trabajan con gas cloruro de metilo, freón o amoníaco. El control de la temperatura y de la humedad relativa se lleva automáticamente mediante termómetros e higrómetros situados en las paredes de la cámara. No todas las variedades de manzana tienen el mismo período de conservación. Así, mientras en algunas como la 'Reineta Roja de Canadá' o la 'Fresnosa', no conviene prolongar su vida más allá de diciembre, otras pueden durar hasta el mes de junio, tales como la 'Golden Delicious', 'Rome Beauty', etc. (Álvarez, 1996).

- Cámaras de atmósfera controlada. Este sistema permite conservar las manzanas durante más tiempo y en mejores condiciones de calidad que las que se obtienen en las cámaras frigoríficas ordinarias. Este método se basa en el enriquecimiento de la atmósfera con anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) y el empobrecimiento de oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Las mezclas de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  que se utilizan son muy variables y dependen de las variedades de manzana a conservar. Para 'Golden Delicious' y 'Rome Beauty' se recomienda de 2.5 a 3 %  $\text{O}_2$ , 1.5 %  $\text{CO}_2$  y  $0^{\circ}\text{C}$ , mientras que, para la 'Rosalisa', se aconseja de 2 a 3 %  $\text{O}_2$ , 2-3 %  $\text{CO}_2$  y  $3^{\circ}\text{C}$ . Una vez que la fruta se almacena en la cámara, ya no debe volver a abrirse hasta la salida para el consumo (Álvarez, 1996).

- Almacenamiento hipobárico: Es una forma de almacenamiento en atmósfera controlada y que consiste en la reducción de la presión atmosférica a una temperatura dada. Para la variedad 'Jonathan' se recomienda almacenar a 0.13 atm. (Salunkhe *et al.*, 1991).

- Cámaras de maduración acelerada. El proceso consiste en cosechar anticipadamente la manzana y almacenarla en cámaras con atmósfera especialmente acondicionada para que puedan salir al mercado unos días antes que la fruta que madura normalmente. Se utiliza etileno mezclado con nitrógeno en la proporción de 5 % y 95 %, respectivamente. Estas cámaras disponen de un sistema de calentamiento rápido que eleva la temperatura y la mantiene entre 22° y 25° C, una instalación de inyección y dosificación de gas etileno con nitrógeno (Álvarez, 1996).

### *Daño por frío*

Es un daño fisiológico irreversible a tejidos de plantas, células, órganos, que resulta de la exposición de plantas o frutas sensibles al frío a temperaturas por debajo del umbral crítico de temperatura, que provoca daño. En las manzanas el daño que se presenta es el oscurecimiento interno, una pudrición blanda, el escaldado. etc. El daño por frío puede fácilmente evitarse si el producto no es expuesto a temperaturas por debajo del umbral crítico (Weichman, 1987). La temperatura a la cual la manzana debe ser almacenada para evitar que se presente el daño por frío va a estar en función de la variedad; por ejemplo, en el caso de manzanas 'Golden Delicious', puede ser entre -1° C y 0° C, aunque se tienen variedades que requieren de temperaturas más elevadas como el caso de 'Jonathan', la cual debe ser almacenada a 2° C y 'McIntosh' que debe ser almacenada entre 2° C y 3° C (Salunkhe, 1995).

### **2.4.3. Enfermedades en poscosecha**

Las enfermedades en poscosecha de frutas y hortalizas propician la mayor pérdida en la producción de alimentos; estas pérdidas son difíciles de cuantificar (Wilson y Lawrence, 1985). Las enfermedades que la manzana sufre después de la recolección pueden ser de tipo fisiológico o parasitario.

### **a) Fisiológico**

Escaldado de la manzana. Grave enfermedad cuyo origen aún se desconoce, aunque se atribuye a un exceso de sustancias volátiles en el almacén, en particular etileno, el retraso en el almacenaje o el envejecimiento de la fruta, que aumenta las posibilidades de padecer este daño. Los frutos son más propensos cuando el clima es cálido y seco algunas semanas antes de la recolección. Los síntomas de la enfermedad son unas manchas pardas que aparecen sobre las manzanas, superficiales al principio, pero que pueden, con el tiempo, penetrar en la pulpa. La forma de combatirla es con tratamientos en la piel con difenilamina o con dimetilfenilurea (Álvarez, 1996).

Manchas amargas o bitter pit. La causa de esta enfermedad parece ser una elevada concentración de ciertas sales en el agua de riego. Varios años seguidos de sequía traen consigo una reducción del calcio y un aumento del magnesio, que terminan por provocar un aumento de la enfermedad, también los riegos o las lluvias abundantes al final de la estación de crecimiento dan lugar a este daño así como el exceso de abonos nitrogenados. Se caracteriza por unas manchas hundidas sobre la piel, tienen cierta semejanza con los daños ocasionados por el granizo y pueden presentar una tonalidad roja o verde brillante las cuales al final se vuelven pardas o grises. La forma más eficaz de combatirla son las pulverizaciones con sales de calcio, nitrato y mejor aún cloruro potásico (Álvarez, 1996).

Pardeamiento del corazón. Aparece en frutas que han estado almacenadas a bajas temperaturas de tres a cuatro meses y que son transferidas a temperaturas elevadas. Se puede presentar en frutas que estuvieron sombreadas durante su cultivo o que la cosecha se realizó después de un extenso período de humedad, de clima frío o donde se tuvo una irrigación frecuente. Se caracteriza por un oscurecimiento de la pulpa próxima a los carpelos; en algunos cultivares, el desorden se hace primeramente evidente por una decoloración rosa o amarilla. Este daño es reducido por un retardo en el almacenamiento, inmersiones en etoxiquina y difenilamina, el encerado y tratamientos con calor antes del almacenamiento (Wills *et al.*, 1988).

## **b) Ocasionadas por hongos**

### **•Pudrimiento “alternaria” (*Alternaria* spp.)**

- Síntomas: Enmohecimiento gris oscuro que puede colonizar la cavidad del corazón y pudrir la carne circundante. El tejido que ha sufrido un daño físico o fisiológico es frecuentemente invadido.

- Ciclo biológico: Este hongo puede sobrevivir en el suelo en forma de esporas (clamidosporas). Bajo condiciones favorables, las esporas asexuales (conidios) son producidas en abundancia y son diseminadas por el viento y la lluvia. El hongo frecuentemente se aloja en partes de flores; en condiciones de calor y humedad, puede causar una infección que más tarde se manifiesta dentro de la fruta (Snowdon, 1990).

### **•Pudrimiento café (*Monilinia* sp.)**

- Síntomas: La primera indicación de la infección de la fruta es el desarrollo de una pequeña mancha circular de color café. Bajo condiciones húmedas, el hongo puede romper la piel, formando frecuentemente círculos concéntricos alrededor del punto de infección. En presencia de luz hay una copiosa producción de esporas de color gris-café. Ocasionalmente las frutas infectadas cambian a un negro brillante en almacenamiento y en la ausencia de luz no hay formación de esporas. El hongo puede infectar la fruta sana adyacente a la fruta dañada. En un estado avanzado el pudrimiento tiende a quedarse firme y seco.

- Ciclo biológico: La fruta infectada de forma temprana en el crecimiento puede sufrir pudrimiento en el árbol. El hongo sobrevive en el invierno y cuando las condiciones llegan a ser favorables, las esporas llegan a ser diseminadas por todas partes de la huerta. La liberación de ascosporas coincide con la emergencia de brotes y flores jóvenes y después se lleva a cabo la infección de las partes de la flor, el hongo se disemina dentro de la fruta que se está desarrollando. Las frutas más viejas son más susceptibles de ser infectadas por conidias dispersadas por corrientes de aire o por insectos y la penetración es usualmente por heridas del fruto (Snowdon, 1990).

### **•Pudrimiento y enmohecimiento gris (*Botrytis cinerea*)**

-Síntomas: Al final del cáliz, se presenta un ligero enrojecimiento de la piel circundante, de ahí una lesión seca oscura aparece; la cual puede progresar teniéndose así

un pudrimiento blando de color café que afecta a la fruta entera. El hongo comúnmente puede entrar a través de grietas en la piel o en alguna parte de la fruta. Bajo condiciones de humedad hay una abundante producción de esporas gris-café.

- Ciclo biológico: El hongo sobrevive como esclerocio en el suelo y en restos de la planta y bajo condiciones favorables las esporas asexuales (conidia) son formadas. Este hongo invade partes de la flor y más tarde a la fruta o bien puede infectar a la fruta a través de heridas producidas en está durante la cosecha y manipulación. El pudrimiento se puede presentar aún a temperaturas de  $-1^{\circ}\text{C}$  y entonces la infección extenderse en las frutas sanas (Snowdon, 1990).

#### ■Enmohecimiento y pudrimiento azul (*Penicillium expansum* Link)

Este hongo causa uno de los más importantes pudrimientos destructivos en manzanas.

- Síntomas: El primer síntoma es un ablandamiento acuoso, manchas cafés (las cuales rápidamente aumentan de tamaño si se tiene una temperatura entre  $20$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente se presenta un enmohecimiento blanco en el centro de la mancha y después se inicia la producción de esporas azul-verdosas. Hay un margen claro entre la pulpa blanda podrida y el tejido firme y saludable (Agrios, 1988).

- Ciclo biológico: *P. expansum* es considerado un parásito de heridas e infecta comúnmente la fruta lesionada durante la manipulación y los procedimientos de lavado realizados después de la cosecha de la fruta. El enmohecimiento azul puede también entrar a través de sitios de infección producidos por *Gloeosporium*, *Mucor* o *Phytophthora* o por las lenticelas, especialmente si existieron alternancias de excesos y carencias de agua previos a la cosecha, o cuando la fruta se ha debilitado por la maduración y envejecimiento. La fruta dañada por el granizo antes de la cosecha muestra una tendencia a presentar este tipo de pudrimiento en el almacenamiento. La infección puede ocurrir a temperaturas de almacenamiento ( $0^{\circ}\text{C}$ ) en las cuales el desarrollo del hongo es lento, sin embargo, cuando la fruta es transferida a un ambiente caluroso, el desarrollo del hongo se torna violento (Snowdon, 1990). Las esporas de *P. expansum* sobreviven de estación a estación en los cajones de empaque contaminados, donde el hongo puede producir una gran cantidad de esporas que también pueden llegar a la cámara frigorífica provenientes del campo cuando

las cajas vienen sucias de tierra, de frutas podridas o por el aire. Una sola fruta en mal estado puede tener esporas suficientes para contaminar toda la línea de empaque o bien dañar a frutas sanas que se encuentran en la cercanía (Fagro, 2003). Este hongo produce una toxina (patulina) que es resistente al calor, por lo cual se necesita un estricto control de calidad de las frutas procesadas, ya que esta micotoxina puede causar lesiones o degeneraciones de órganos internos como los intestinos, riñones y el hígado, así como afectar el sistema nervioso central (Agrios, 1988).

- Control. El tratamiento en poscosecha a partir de fungicidas ha sido tradicionalmente el método más común para combatir la pudrición azul. Ésta puede ser reducida por otros procedimientos, así como por combinaciones de ellos, y pueden ser los siguientes (Kearneysville, 2003):

- Saneamiento general y evitar condiciones favorables para la infección.
- Evitar el daño de la fruta.
- Tratamientos químicos.
- Control biológico.

#### **2.4.4. Métodos de control de enfermedades en poscosecha**

##### **a) Temperatura**

No hay una temperatura ideal para el almacenamiento de todas las frutas y verduras, porque su respuesta varía ampliamente. Disminuyendo la temperatura en productos no climatéricos se disminuye la velocidad de deterioro, mientras que en productos climatéricos puede también ser usada para demorar la maduración. La temperatura a la cual las manzanas pueden ser almacenadas es de  $-1^{\circ}\text{C}$  a  $3^{\circ}\text{C}$ , pero está en función de la variedad que se trate (Westwood, 1993). A bajas temperaturas se tiene una disminución en la velocidad de crecimiento de los microorganismos y las esporas de muchos hongos no germinarán (Wills *et al.*, 1988).

##### **b) Humedad**

Cuando se tiene una humedad relativa de 90 %, el crecimiento de muchos hongos y bacterias puede ser inhibido; aunque ciertos hongos particulares se ven inhibidos cuando la

humedad relativa alcanza 85 %. Cuando se tiene una humedad relativa de 90 %, la fruta manifiesta una mejor apariencia y presenta una mejor calidad interna (Wills *et al.*, 1988).

### **c) Atmósferas controladas**

El fundamento de este método de control está en la acción del frío y en el enriquecimiento de la atmósfera con anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) que reduce los procesos respiratorios de la fruta y el empobrecimiento de oxígeno (O<sub>2</sub>), que produce el mismo efecto. La disminución del nivel de oxígeno y el aumento del anhídrido carbónico tiene un límite a partir del cual las manzanas, según las variedades, sufren daños a veces de consideración. Así, la escasez de oxígeno por debajo de 2 %, provoca la fermentación, los tejidos se ennegrecen, hay producción de alcohol y la fruta termina por morir. El umbral de tolerancia para el anhídrido carbónico depende de las variedades, así 'Golden Delicious' tolera hasta 9 % mientras que 'Cox's Orange Pippin' no puede pasarse de 5 %; los daños más frecuentes que produce el exceso de CO<sub>2</sub> son el corazón pardo y el corazón rosa (Álvarez, 1996).

La actividad de varios microorganismos puede ser reducida por este método ya que, al retardar la maduración y senescencia del producto, éste se vuelve más resistente al ataque de microorganismos patógenos (Wills *et al.*, 1988).

### **d) Fungicidas**

Son compuestos químicos que inhiben la germinación, el desarrollo y la reproducción de hongos patógenos, o bien son completamente letales a ellos (Agris, 1991). Se pueden dividir en dos grandes grupos (Ortiz, 1996):

- ♣ **Contacto.** Impiden la germinación de las esporas al ponerse en contacto con ellas, es decir, forman una fina capa protectora sobre la superficie del follaje, impidiendo que las esporas que lleguen germinen y penetren causando nuevas infecciones. Como ejemplos tenemos los de cobre y sus derivados, los Ditiocarbamatos, el Captán, entre otros.
- ♣ **Sistémicos.** Son aquellos que, aplicados al suelo o al follaje, son absorbidos por la planta y translocados a través del sistema vascular, eliminando las infecciones ya establecidas en el interior de la misma, protegiendo así los brotes nuevos. Algunos ejemplos son el Benomyl, Thiabendazol, dimetirimol, entre otros.

Los fungicidas constituyen un medio de control primario para las enfermedades en poscosecha, pero actualmente existe una preocupación por parte de los consumidores y de los científicos acerca del uso de compuestos químicos en los alimentos, ya que éstos pueden ocasionar problemas de salud y daños al medio ambiente. Asimismo, se ha observado que los hongos pueden generar resistencia a los fungicidas comunes (Leverentz *et al.*, 2000), por lo cual actualmente se está buscando emplear métodos de control alternos.

## **2.5. Control biológico**

### **2.5.1. Generalidades**

La fusión de los conocimientos biológicos y agrícolas que dieron origen al control biológico ocurrió en el Siglo XIX (De Bach, 1979).

Nigam y Mukerji definen al control biológico como la manipulación directa o indirecta, por parte del hombre, de los agentes vivos que, de forma natural, tienen capacidad de control. Esta manipulación provoca un incremento en su capacidad de inhibición de las plagas y enfermedades (Usall *et al.*, 1996).

El uso de agentes biológicos para el control de plagas y enfermedades está basado en el hecho de que los enemigos naturales intervienen en los niveles de regulación de los agentes causales de éstas. Los organismos vivos, incluidos los patógenos, tienen el potencial para incrementar su número indefinidamente y para ajustar su número en respuesta a los cambios ambientales en el cual ellos se encuentran (USDA, 1978).

Existen tres causas por las cuales se pueden generar plagas o enfermedades (USDA, 1978):

- ☼ Introducción accidental o intencional de agentes causales dentro de un medio ambiente favorable sin enemigos naturales.

- ☼ Crecimiento de cultivos susceptibles en situaciones de monocultivo.

- ☼ Uso de pesticidas que afecten a organismos benéficos e induzcan desarrollo de resistencia y otros cambios en las poblaciones de agentes causantes de plagas y enfermedades.

### ***2.5.2. Tipos de organismos que se controlan***

**Insectos.** Estos organismos pueden ser controlados, ya sea por otros insectos ó por microorganismos. Nadie sabe con exactitud cuándo fue que el hombre se dio cuenta por primera vez de los hábitos entomófagos de los insectos (De Bach, 1979). La función de muchos insectos predadores es la de mantener un balance entre los organismos dentro del medio ambiente que ellos ocupan. Ésta es una de las más importantes funciones porque previene que aquellos que tienen el potencial para llegar a ser plagas no lo hagan (USDA, 1978). Algunos ejemplos de insectos que se usan para el control de otros son las catarinas (las cuales se usan para controlar pulgones), chinches, escarabajos, hormigas, avispas, etc. Por otro lado, también se emplean microorganismos para el control de insectos, cuyo modo de acción puede ser por contacto, infectando normalmente al huésped a través de integumento, esto incluye a hongos entomógenos, así como a ciertos nemátodos entomófilos o por ingesta de organismos para que se cause la infección como bacterias, virus, protozoarios, riquetsias y nemátodos (De Bach, 1979).

**Microorganismos.** Para el control de enfermedades ocasionadas por microorganismos se utilizan otros microorganismos llamados antagonistas. Dentro de este contexto, se puede definir al control biológico como la utilización de microorganismos con capacidad antagónica.

Las características de un microorganismo antagonista ideal son las siguientes (Wisniewski y Wilson, 1992):

- a) Genéticamente estable (durante su utilización no debe de perder su virulencia).
- b) Efectivo a bajas concentraciones.
- c) No ser exigente en cuanto a los requerimientos nutricionales.
- d) Habilidad para sobrevivir a condiciones adversas ambientales (bajas temperaturas y atmósferas controladas).
- e) Efectivo contra un amplio rango de patógenos en una gran variedad de frutas y verduras.
- f) Crecer en un medio de cultivo barato.
- g) No producir metabolitos que sean perjudiciales a la salud humana.
- h) Resistente a los pesticidas.
- i) Compatible con procesamientos comerciales.

j) No patógeno para el hospedero.

### **2.5.3. Modos de acción de los agentes de biocontrol**

#### **a) Por competencia de nutrientes y/o espacio**

El término competencia fue descrito por Wicklow (1981) como un nicho entrecruzado, en donde se produce la demanda, de forma simultánea, de alguno de sus recursos por parte de dos o más poblaciones microbianas. Los antagonistas que tienen este modo de acción pueden estar a menudo mejor adaptados a las condiciones adversas del medio que los patógenos; ya que han de mostrar un rápido crecimiento, ser capaces de utilizar nutrientes a bajas concentraciones, sobrevivir y desarrollarse en la superficie del fruto o en el lugar de la infección a bajas temperaturas, pH o condiciones osmóticas que no son beneficiosas para el crecimiento del patógeno. Normalmente, en este tipo de antagonismo se inhibe el desarrollo del patógeno, pero no se le destruye (Droby y Chalutz, 1994, citado por Usall *et al.*, 1996).

#### **b) Producción de antibióticos y otros inhibidores**

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos. Se ha sugerido que la producción de antibióticos, o bien de metabolitos tóxicos, es la causa de la existencia de inhibiciones en algunos cultivos (Skidmore, 1976).

En la búsqueda de antagonistas naturales para el control de las enfermedades de poscosecha también se ha apuntado, en algunos casos, que la causa de la inhibición del crecimiento del patógeno podría ser la producción de algún antibiótico por parte del antagonista; éste es el caso de *Pseudomonas cepacia*, productor de pirrolnitrina y que controla un amplio rango de patógenos en distintos frutos, entre los que destaca *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzanas y peras (Janisiewicz y Roitman, 1988).

#### **c) Inducción de procesos de resistencia del huésped**

Las plantas, como otros seres vivos del planeta, han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra, lo que les llevó a desarrollar mecanismos de defensa contra sus invasores.

Durante la interacción del agente de biocontrol y del huésped, se han observado procesos de desarrollo de resistencia que provocan cambios químicos y/o osmóticos a favor del antagonista y en contra del patógeno (McLaughlin *et al.*, 1991). La presencia de algunos metabolitos secundarios producidos por algunos microorganismos puede inducir procesos de resistencia en el huésped o producción de sustancias inhibitorias. Generalmente, en estos procesos, no se elimina al patógeno en su totalidad, pero se le mantiene a niveles bajos (Schonbeck y Dehene, 1988, citado por Usall *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que las levaduras antagonicas son capaces de inducir respuestas de resistencia en el tejido del huésped, tal es el caso de *Pichia guilliermondii* (US-7), usada en manzanas, duraznos y cítricos, que induce la síntesis de la enzima fenilalanina amonio liasa y de la fitoalexina en la piel del fruto, como repuesta de defensa (Wilson *et al.*, 1994).

#### *d) efecto del pH*

La existencia de un pH inadecuado en el lugar de actuación del patógeno puede inhibir su desarrollo. La producción de ácido por parte de algunas bacterias, puede dar lugar a condiciones desfavorables al crecimiento de los patógenos (Blakeman y Fokkema, 1982).

#### *e) Interacción directa con el patógeno*

El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista; generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como: quitinasas, celulasas,  $\beta$  (1-3) glucanasas y proteasas que destruyen las paredes de los hongos. Por ejemplo: *Trichoderma hamatum* produce  $\beta$  (1-3) glucanasas, quitinasas, por medio de las cuales rompe las paredes de *Rhizoctonia solani*. Muchas bacterias inhiben al hongo produciendo la lisis de las esporas, tubos germinativos o hifas (Chet y Baker, 1981).

Las levaduras pueden colonizar una superficie por largos períodos bajo condiciones secas. Producen polisacáridos extracelulares los cuales incrementan su sobrevivencia y restringen los sitios de colonización por microorganismos patógenos, además son mínimamente afectadas por los pesticidas (Wisniewski y Wilson, 1992). Las bacterias muestran potencial para el control de un amplio rango de microorganismos que causan pudrimiento, sin embargo, éstas generalmente producen antibióticos, característica que

puede representar una preocupación al evaluar su aplicación de manera comercial (Wisniewski y Wilson, 1992).

Si bien los microorganismos pueden ser utilizados de manera individual, el empleo de mezclas de ellos podría aumentar el espectro de acción; es decir que sea capaz de controlar múltiples enfermedades en diferentes frutas, disminuir la concentración requerida del agente de biocontrol, o bien, que uno de los microorganismos que componen la mezcla genere condiciones favorables para el otro, incrementando con ello la efectividad del sistema de biocontrol (Leibinger *et al.*, 1997).

Es importante determinar la compatibilidad del microorganismo antagonista con los tratamientos aplicados durante el cultivo y en poscosecha sobre la fruta y determinar si este microorganismo puede en un futuro emplearse de manera comercial (Wisniewski y Wilson, 1992).

#### **2.5.4. Algunos experimentos de control biológico con microorganismos**

La idea de la lucha microbiológica no es nueva, Leben en 1965 habla ya extensamente de la relación de los microorganismos epifíticos de las plantas y de sus enfermedades; indica que la superficie de las partes aéreas de las plantas son un buen hábitat para una multitud de microorganismos, algunos de los cuales son capaces de interferir en el crecimiento de los patógenos. Por lo tanto, desde hace tiempo, se han empleado microorganismos antagonistas para el control de patógenos causantes de enfermedades en el campo como lo evidencia la utilización de diferentes cepas de especies del género *Trichoderma* (*Trichoderma hamatum* y *Trichoderma harzianum*) las cuales han demostrado tener un efecto antagónico sobre *Rhizoctonia solani* en cultivos como rábano, frijol, tomate y berenjena (Chet y Baker, 1981). En el caso específico de *Trichoderma harzianum*, se obtuvo un incremento en su capacidad antagónica al utilizar pentacloronitrobenceno (PCNB) en cultivos de frijol, tomate y berenjena (Hadar *et al.*, 1979) y se observó que su sistema quitinolítico de control se basa en  $\beta$ -1-4-N acetilgucosaminidas y endoquitinasas (Haran *et al.*, 1996).

Kim *et al.* (1997) estudiaron la actividad antagónica de una cepa de *Bacillus* sp. (L324-92) para el control de patógenos causantes de enfermedades de la raíz del trigo (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Phythium irregulare*). La

bacteria fue efectiva para controlar dichas enfermedades; determinándose que el efecto benéfico de la bacteria se debe, en gran parte, a que tiene la capacidad de crecer en un rango de temperaturas comprendido entre 4 y 40° C.

La utilización de bacterias para el control de enfermedades no se limita al campo, éstas también han sido empleadas para controlar patógenos causantes de daño en poscosecha. *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus subtilis* se han empleado para controlar al hongo *Monilinia fructicola*, causante de daño en frutas como durazno, chabacano y ciruela (Pusey y Wilson, 1984). Hablando de manera específica de *Bacillus subtilis*, se ha observado que al asperjarla conjuntamente con un fungicida (Dicloran, empleado para el control de *Rhizopus*) provee un efecto protector contra *Rhizopus* en durazno (Pusey *et al.*, 1986). Otra bacteria también empleada es *Pantoea agglomerans*, ésta tiene la capacidad de controlar a hongos tales como *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en peras, bajo condiciones de almacenamiento en atmósferas controladas y a 1° C (Nunes *et al.*, 2001). Se ha determinado que las condiciones adecuadas para obtener una máxima producción de biomasa de *P. agglomerans* con mínimo costo del medio de cultivo se pueden lograr al utilizar fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y levadura de cerveza en polvo) y fuentes de carbono (sacarosa, melasa) (Costa *et al.*, 2001).

En lo que se refiere al empleo de levaduras, una de las cepas más estudiadas por el control que ejerce sobre patógenos causantes de daño en poscosecha es *Candida sake* (CPA-1), la cual ha sido utilizada para controlar *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en almacenamiento en frío (1° C/60 días) (Viñas *et al.*, 1997). Esta cepa conserva su efecto antagónico sobre *P. expansum*, aun bajo atmósferas controladas (3% O<sub>2</sub> y 3% CO<sub>2</sub>) durante 60 días a 1° C (Usall *et al.*, 2000).

También se han realizado pruebas semicomerciales empleando manzanas sin daño físico y almacenadas a 1° C, en donde *Candida sake* (CPA-1) redujo la incidencia de *Penicillium expansum* en más de 70 %, después de tres meses de almacenamiento. Bajo atmósferas controladas (3 % O<sub>2</sub> + 3 % CO<sub>2</sub>) esta levadura presentó una efectividad similar a la observada con la aplicación de fungicidas (imazalil y tiabendazol+folpet). Al realizar determinaciones *in vitro*, el crecimiento de la levadura fue inhibido por Captán, Ziram e

Imazalil en la dosis mínima requerida que fue de 1550, 2000 y 1000 ppm, respectivamente (Usall *et al.*, 2000).

Así como se han empleado microorganismos individuales para el control de enfermedades, se ha buscado experimentar con mezclas de ellos, obteniéndose resultados satisfactorios. En un estudio realizado por Janisiewicz y Bors (1995) se observó que el empleo de una mezcla de *Pseudomona siryngae* y *Sporobolomyces roseus* tiene un mayor control sobre *P. expansum* que la utilización de éstos de manera individual; de la misma manera, una mezcla de *Candida sake* y *Pantoea agglomerans* ejerce control sobre *P. expansum* y *B. cinerea*, tanto en manzanas como en peras, ya que *C. sake*, de manera individual, es más efectivo en el control de enfermedades en manzanas que en peras y *P. agglomerans* lo hace al contrario.

Leibinger *et al.* (1997) determinaron que la aplicación en el campo de *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* y *Bacillus subtilis* en manzanas resulta en una población estable de antagonistas en almacenamiento en frío y una reducción de las enfermedades en poscosecha ocasionadas por *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Pezizula malicorticis*. El mayor control ejercido sobre los patógenos analizados se obtuvo cuando se emplearon mezclas de microorganismos que cuando éstos fueron aplicados de manera individual.

En resumen, podemos decir que nuestro país cuenta con zonas productoras de manzana localizadas en los estados del norte, aunque en las partes altas del centro de la república se cultiva dicho frutal, siendo la situación del Estado de Querétaro. Uno de los principales problemas que allí se presenta es la roña, causada por *Venturia inaequalis* y que propicia grandes pérdidas. Por otro lado, durante el almacenamiento del producto la fruta se deteriora enormemente por la presencia de *P. expansum*. Para el control de estas enfermedades se usan comúnmente los fungicidas, teniéndose la alternativa del control biológico que es mas seguro en comparación con los principales productos químicos utilizados actualmente, puesto que los microorganismos no se acumulan en los alimentos; produce un efecto insignificante en el balance ecológico particularmente porque no destruyen los enemigos naturales de las especies patógenas a diferencia de algunos pesticidas; el uso de microorganismos es frecuentemente compatible con otros sistemas de

control (incluidos los productos químicos) (Viñas *et al.*, 2001). No se sabe el efecto que el control de enfermedades en el campo puede tener sobre el patógeno o sobre la levadura en poscosecha.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de cepas de levaduras aisladas de la superficie de manzanas para el control de *Penicillium expansum* en manzanas tratadas con Captán o microorganismos en precosecha, y almacenadas a distintas temperaturas.

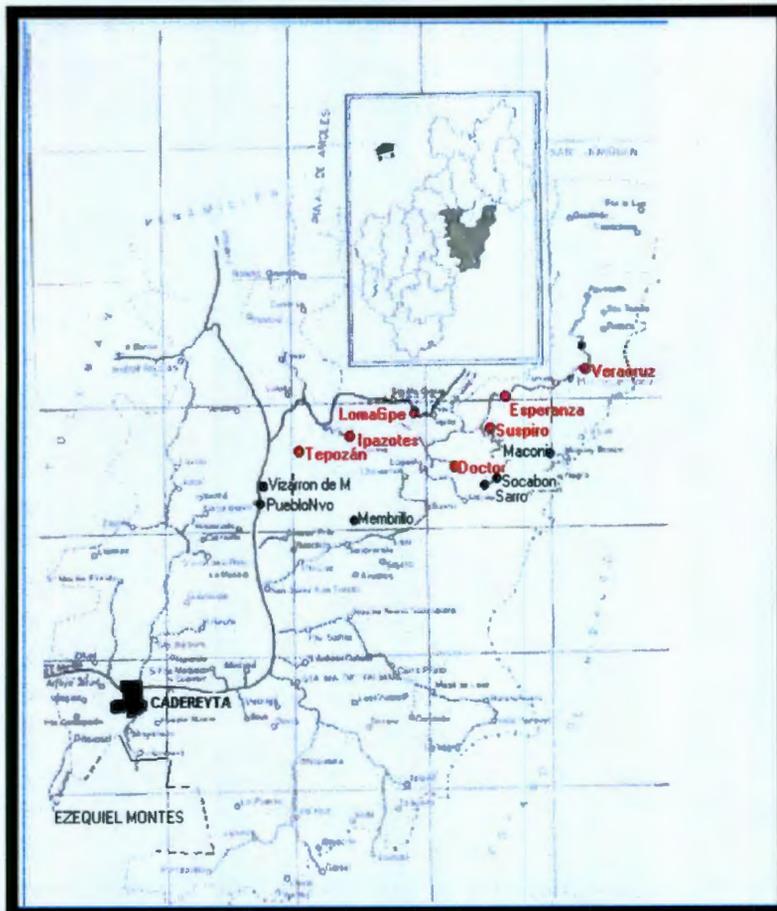
## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar levaduras de la superficie de manzanas producidas en la región de San Joaquín y Cadereyta, y probar su capacidad antagónica contra *P. expansum* en manzana.
- Determinar el efecto de levaduras antagónicas sobre *P. expansum* en manzanas tratadas con Captán en precosecha y almacenadas a 26° C ó 1° C.
- Evaluar el desarrollo de *P. expansum* en manzanas inoculadas con levaduras antagónicas, asperjadas en precosecha con *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp., y almacenadas a 26° C ó 1° C.
- Evaluar el efecto antagónico de una mezcla de levaduras sobre el control de *P. expansum*.
- Determinar la resistencia al Captán de algunas cepas de levaduras seleccionadas.

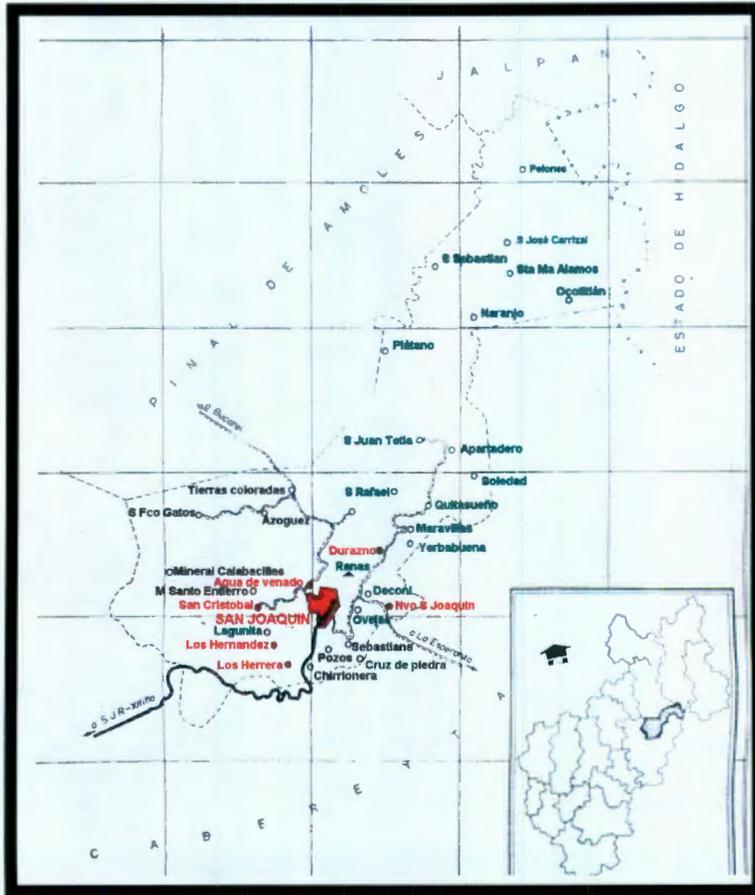
### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en la región productora de manzana de los municipios de Cadereyta y San Joaquín, Qro. La colecta de las muestras de manzanas se realizó en distintas comunidades de dichos municipios. La ubicación de las comunidades se muestra en la Fig. 3.1 y 3.2. También se utilizó un huerto comercial ubicado en la Comunidad de Santa Ana, Mpio. de San Joaquín.



**Fig. 3.1.** Ubicación de las comunidades de muestreo en el municipio de Cadereyta, Querétaro.



**Fig. 3.2.** Ubicación de las comunidades de muestreo en el municipio de San Joaquín, Querétaro.

### 3.2. Material biológico empleado

#### 3.2.1. Manzanas

Se utilizaron 21 muestras de manzanas (cinco manzanas de cada muestra) de distintas variedades, de las cuales se llevó a cabo el aislamiento de levaduras. Por otro lado, se emplearon manzanas ‘Golden Delicious’ que en el campo recibieron un tratamiento específico que consistió en un fungicida (Captán) o en microorganismos (*Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp.) para el control de *Venturia inaequalis*. Por otra parte, para realizar la prueba de tolerancia al Captán, se emplearon manzanas que fueron adquiridas en la Central de abastos. En la Tabla 3.1 se presentan los datos relacionados con el origen de las muestras.

Tabla 3.1. Identificación de las muestras utilizadas

No <sup>1</sup>	Propietario	Origen	Cultivar
1	Susana Matías Maqueda	Los Herrera, S.J.	'Golden Delicious'
2	Susana Matías Maqueda	Los Herrera, S.J.	'Red Delicious'
3	Pedro Martínez González	El Deconí, S.J.	'Golden Delicious'
4	Salvador Martínez	Maravillas, S.J.	'Red Delicious'
5	Galdino González Martínez	Maravillas, S.J.	'Red Delicious'
6	Salvador Trejo Resendiz	San Joaquín	'Golden Delicious'
8	Dolores de la Vega	San Joaquín	'Red Delicious'
11	Mariano Pérez Vega	San Joaquín	'Golden Delicious'
12	Mariano Pérez Vega	San Joaquín	'Rayada'
13	Domingo Arteaga Martínez	Santa Ana, C.	'Golden Delicious'
15	Bonifacio Camacho	Los Herrera, S. J.	'Red Delicious'
16	Domingo Arteaga Martínez	Santa Ana, C.	'Rayada'
18	María Paz Sánchez	San Cristóbal, S. J.	'Golden Delicious'
21	Valentín Yáñez Martínez	San Cristóbal, S. J.	'Red Delicious'
22	Edmundo Gutiérrez	San Rafael, S. J.	'Red Delicious'
24	Aarón Ledesma	Agua de Venado, S. J.	'Red Delicious'
25	José Vega Martínez	El Doctor, C.	'Golden Delicious'
26	José Vega Martínez	El Doctor, C.	'Red Delicious'
27	Serafín González	La Esperanza, C.	'Rayada'
<b>28</b>	<b>José Pioquinto Sánchez<sup>2</sup></b>	<b>Santa Ana, C.</b>	<b>'Golden Delicious'</b>
29	José Pioquinto Sánchez	Santa Ana, C.	'Red Delicious'

<sup>1</sup>El número de la colecta corresponde al del concurso regional realizado en San Joaquín en el 2002. De las muestras participantes en dicho concurso, solo se realizaron algunas colectas en el huerto

<sup>2</sup>Huerto donde se obtuvo la manzana tratada con fungicida o microorganismos

S.J.= San Joaquín, C.= Cadereyta.

### 3.2.2. *Penicillium expansum* Link

Se empleó una cepa de *Penicillium expansum* Link CFNL.2016\* (aislada de manzanas 'Golden Delicious' en proceso de pudrición) de la colección del Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de Poscosecha del DIPA. La cepa se almacenó en placas de Agar papa dextrosa (APD); se realizaron resiembras cada dos meses en placas con APD e inoculaciones sobre frutos de manzana (Usall, 2000).

(\*) La cepa fue registrada por el Ceparario de el Departamento de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 3.2.3. Levaduras

Se aislaron 263 cepas de levaduras de manzanas de la región, de las cuales 128 fueron seleccionadas para realizar las pruebas de antagonismo (Tabla 4.1). Las manzanas de donde se aislaron las levaduras se colocaron en cajas de madera rotuladas y se almacenaron en una cámara frigorífica a 1° C y 85-90 % de humedad relativa, hasta su utilización.

Se tomaron cinco manzanas de cada una de las muestras colectadas. Cada manzana se colocó al interior de una bolsa de plástico conteniendo 80 ml de diluyente de peptona y la bolsa fue sellada herméticamente. Posteriormente, las manzanas fueron frotadas vigorosamente durante 5 minutos. A partir del diluyente de peptona se realizaron diluciones decimales ( $10^{-1}$ - $10^{-5}$ ), se tomó 0.1 ml de cada dilución y se extendió por superficie en placas con APD suplementado con rosa de bengala (0.6%). Las placas se incubaron durante 48 h a 26° C. De cada una de las placas se seleccionaron colonias con diferente morfología y se aislaron en APD con ampicilina a 1%; las placas se incubaron a 26° C durante 48 h. Las cepas de levaduras se conservaron en tubos de ensaye conteniendo APD inclinado, adicionándoles aceite mineral en la parte superior y almacenándolas a 2° C, hasta su utilización.

### 3.3. Tratamientos aplicados a las manzanas en el campo

Se seleccionó una huerta con base en su accesibilidad y las condiciones de manejo en que ésta se encontraba. Posteriormente se realizó la selección por homogeneidad de los árboles sobre los cuales se realizarían los tratamientos. Éstos se efectuaron cada 30 días aproximadamente y consistieron en cinco aplicaciones periódicas de Captán (400g / 100 L de agua), a partir del mes de febrero y hasta julio, sin realizarse aplicaciones en el mes de marzo debido a la presencia de lluvias abundantes. Por otro lado, se llevaron a cabo cuatro aplicaciones intercaladas de *Bacillus* sp.(\*) ( $6.68 \times 10^4$  UFC/ml) y *Trichoderma* sp. (\*) ( $5 \times 10^4$  conidios/ml) desde el mes de abril hasta julio, aunque en el caso de *Bacillus* sp. solamente se aplicó en una ocasión, en el mes de abril. El calendario de aplicaciones se sintetiza en la Tabla 3.2. La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo en un huerto comercial ubicado en la Comunidad de Santa Ana, Mpio. de San Joaquín (ver Tabla 3.1).

Tabla 3.2. Calendario de la aplicación de los tratamientos antifúngicos en campo

Fecha	Captán	Control Biológico ( <i>Bacillus</i> sp - <i>Trichoderma</i> sp)
I-II	X	-
22-III-02	-	-
19-IV-02	X	X ( <i>Bacillus</i> )
24-V-02	X	X ( <i>Trichoderma</i> )
21-VI-02	X	X ( <i>Trichoderma</i> )
26-VII-02	X	X ( <i>Trichoderma</i> )

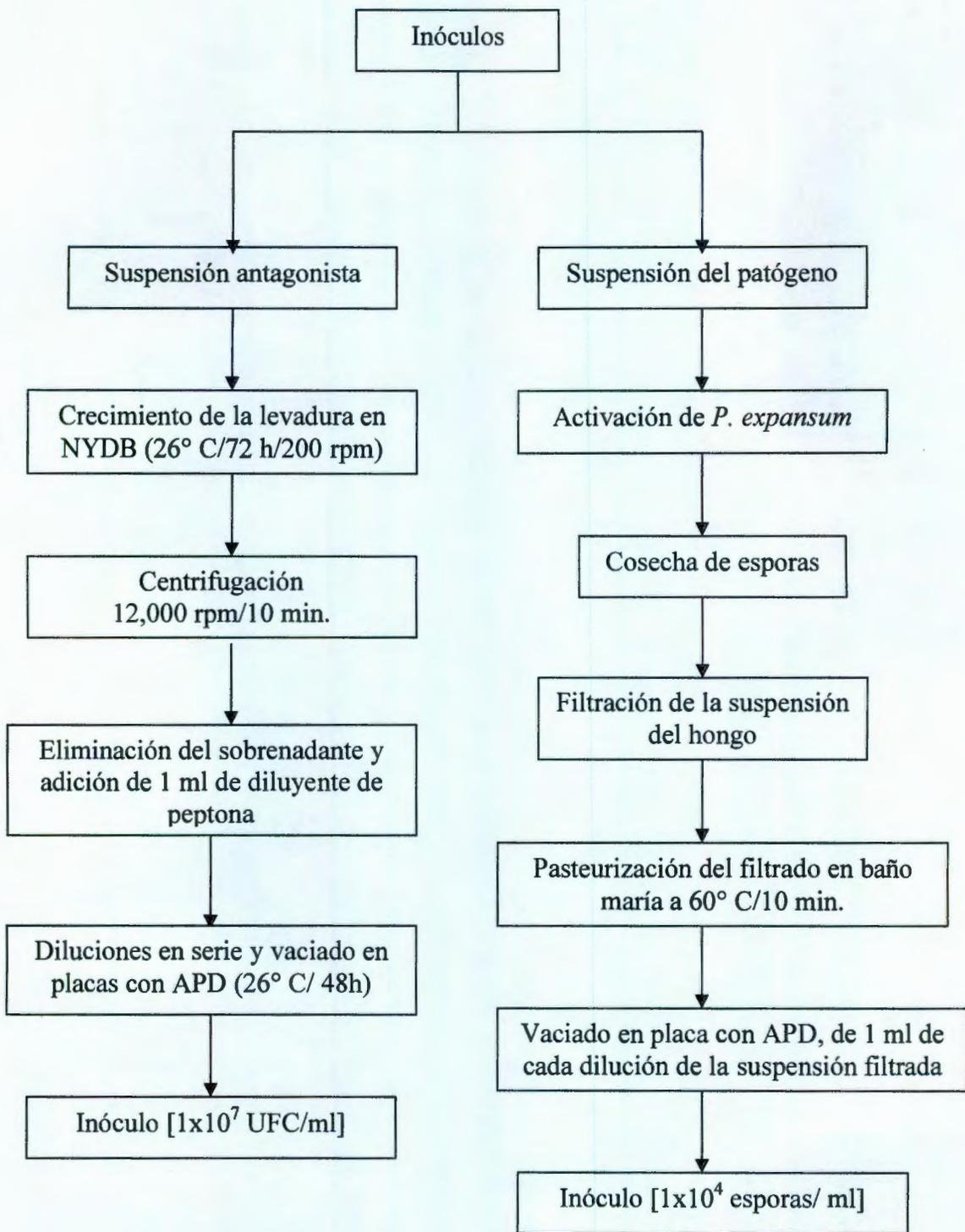
(\*) Estos microorganismos fueron aislados, identificados y purificados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología por Castillo (2001). *Bacillus* sp. fue aislado de epidermis de manzana de la región y *Trichoderma* sp. de trozos de madera.

### 3.4. Pruebas de antagonismo

#### 3.4.1. Preparación de los inóculos

##### a) Suspensión del antagonista

Las levaduras a ser probadas se hicieron crecer en tubos conteniendo Caldo Nutritivo Dextrosa para Levaduras (NYDB: 8 g de caldo nutritivo, 5 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa y 1000 ml de agua), los cuales fueron incubados a 26° C durante 72 h con agitación a 200 rpm (agitador Maxi-Mix III<sup>TM</sup>, tipo 65800) (Usall *et al.*, 2000). El medio NYDB se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en 1 ml de diluyente de peptona. Posteriormente se realizaron diluciones en serie a partir del concentrado y, mediante la técnica de vaciado en placa, 1 ml de cada dilución fue colocado en placas con APD las cuales fueron incubadas a 26° C/48 h. La concentración del inóculo se ajustó a  $1 \times 10^7$  UFC/ml. El concentrado de células fue almacenado por no más de cinco días a 4° C. Para el caso de las mezclas, evaluadas en distintos experimentos (ver inciso 3.4.2b y 3.4.2c), una vez que el inóculo se ajustaba a la concentración deseada, se procedió a mezclar el mismo volumen de cada suspensión de levadura (Nunes *et al.*, 2001) (ver Fig. 3.3).



**Fig. 3.3.** Esquema de preparación del inóculo de levadura y de *P. expansum*

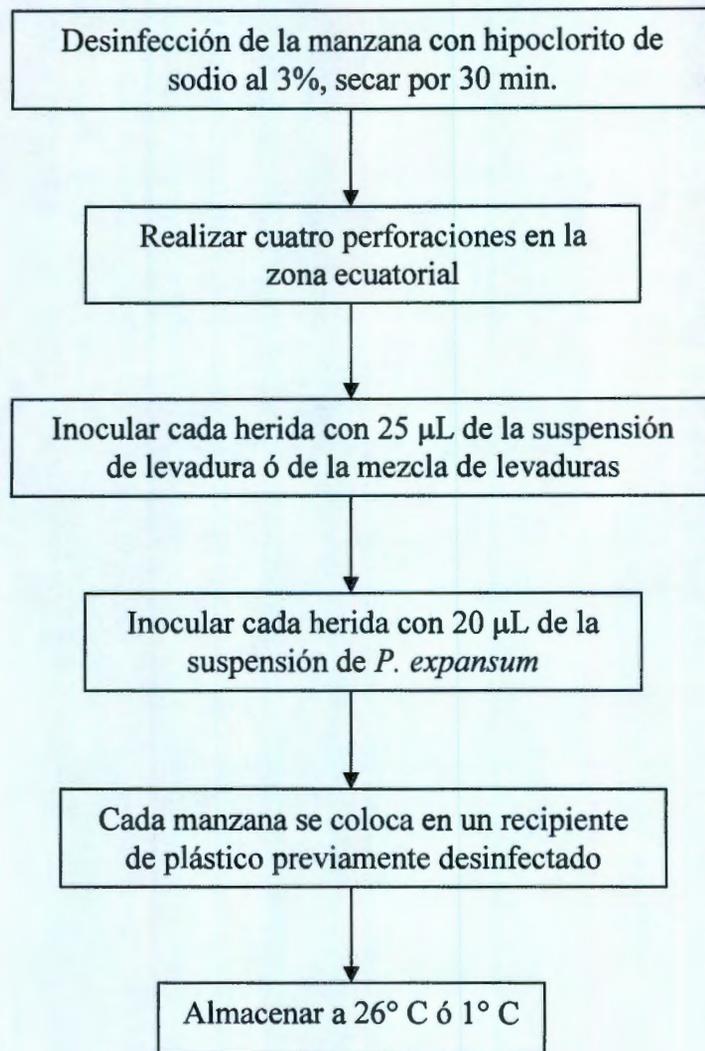
## b) Suspensión del patógeno

La cepa del hongo, que se encontraba en almacenamiento en APD a 1° C, se activó tomando un poco del micelio del cultivo con una aguja de disección, éste se inoculó en cuatro puntos equidistantes en una placa de APD. Después de ocho días de incubación a 26° C, las esporas se cosecharon con una varilla de vidrio estéril, la cual se pasó sobre el crecimiento del hongo adicionado de diluyente de peptona para liberar las esporas. La suspensión del microorganismo se filtró a través de gasa doble estéril y el filtrado se pasteurizó en baño María a 60° C por 10 minutos. El recuento de las esporas se realizó mediante la técnica de vaciado en placa en APD; las placas se incubaron a 26° C durante 48 h, el inóculo se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^4$  esporas / ml. La suspensión de esporas fue almacenada en refrigeración hasta por seis días a 4° C. (Viñas *et al.*, 1997) (Fig.3.3.).

### 3.4.2. Prueba de antagonismo en manzana

#### - Inoculación de las manzanas

Las manzanas 'Golden Delicious', sin tratar o tratadas, ya sea con microorganismos ó Captán colectadas en el huerto de Santa Ana, San Joaquín, Qro. (ver inciso 3.2.1) se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio a 3 %, y se secaron durante 30 min. En la zona ecuatorial de la manzana se realizaron cuatro perforaciones equidistantes (cubo de 3 mm<sup>3</sup>) con ayuda de un escalpelo estéril. Cada herida se inoculó con 25 µL de la suspensión de la levadura ó de la mezcla de levaduras en cuestión y se secó durante 1 h bajo la campana de flujo laminar. Posteriormente, en cada una de las heridas, se inoculó una suspensión de *P. expansum* con 20 µL y se secó por espacio de 1 h, también al interior de la campana de flujo laminar (Viñas *et al.*, 1997). Cada manzana se colocó en un recipiente de plástico (7.7 cm de ancho x 9.0 cm de largo) desinfectado previamente con alcohol a 70 %, el cual fue posteriormente tapado y la muestra almacenada a 26° C ó 1° C (Fig. 3.4).



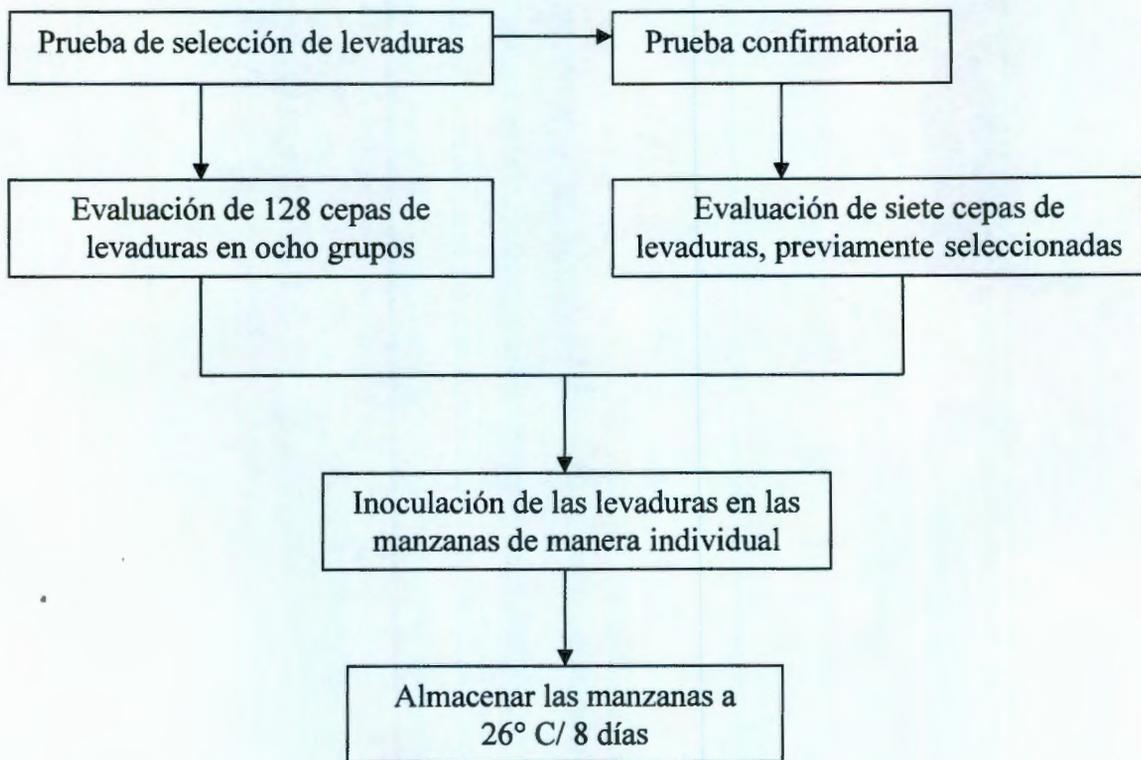
**Figura 3.4.** Técnica de inoculación de las manzanas

a) *Pruebas de antagonismo de levaduras en manzanas no tratadas en el campo*

Se evaluó un total de 128 cepas de levaduras en ocho ensayos con distinto número de levaduras, en cada uno de los cuales se incluyó un testigo que consistió en inocular a las manzanas únicamente con la suspensión del hongo. Posteriormente se llevó a cabo un experimento con las siete cepas de levaduras que mostraron el mejor comportamiento en la prueba inicial. En ambas pruebas las manzanas empleadas fueron almacenadas a 26° C durante ocho días (Fig. 3.5).

El diseño del experimento fue el siguiente:

- **Diseño experimental.** Unifactorial completamente al azar con tres repeticiones para la prueba inicial y siete repeticiones para la prueba confirmatoria.
- **Factor de estudio.** Cepas de levaduras
- **Tratamientos.** 128 cepas de levaduras para la prueba inicial y siete cepas de levaduras para la prueba confirmatoria.
- **Unidad Experimental.** Una manzana con cuatro heridas en la zona ecuatorial
- **Variable evaluada.** Severidad (diámetro de la lesión ocasionada por *P. expansum* después de ocho días de incubación). La medición de esta variable se llevó a cabo tomando en cuenta la distancia comprendida de un extremo al otro de la herida, con la ayuda de un Vernier.



**Figura 3.5.** Prueba de antagonismo en manzanas no tratadas en el campo.

## b) Pruebas de antagonismo en manzanas tratadas en el campo

Se emplearon manzanas 'Golden Delicious' tratadas con Captán ó microorganismos (*Bacillus* sp y *Trichoderma* sp.) y un testigo consistente en manzanas a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento en el campo. Sobre estas manzanas fue inoculada la cepa de levadura seleccionada en la prueba confirmatoria y otras dos cepas de levaduras (5vtt y 38-432) aisladas previamente por Sánchez (2002). Estas levaduras fueron inoculadas tanto de manera individual como en mezclas en manzanas previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio a 3 %. Para el caso de las manzanas tratadas con microorganismos en el campo (*Bacillus* sp y *Trichoderma* sp.), se tuvieron dos situaciones: manzanas que fueron desinfectadas y manzanas sobre las cuales no se aplicó la desinfección. Posteriormente, las manzanas fueron almacenadas durante ocho días a 26° C o durante mes y medio en cámara frigorífica a 1° C (Fig. 3.6).

El diseño del experimento fue el siguiente:

- **Diseño experimental.** Bifactorial completamente al azar con cinco repeticiones
- **Factores de estudio**
  - Aplicaciones en el campo
  - Levaduras
- **Tratamientos**
  - **Aplicaciones en el campo**
    - Captán
    - *Bacillus* sp y *Trichoderma* sp. **con** desinfección de la manzana (tratamiento con hipoclorito de sodio a 3% antes de la inoculación).
    - *Bacillus* sp y *Trichoderma* sp. **sin** desinfección de la manzana
    - Testigo (manzana sin tratar en el campo).
  - **Levaduras**
    - 5vtt
    - 22-211
    - 38-432
    - 5vtt + 22-211
    - 5vtt + 38-432

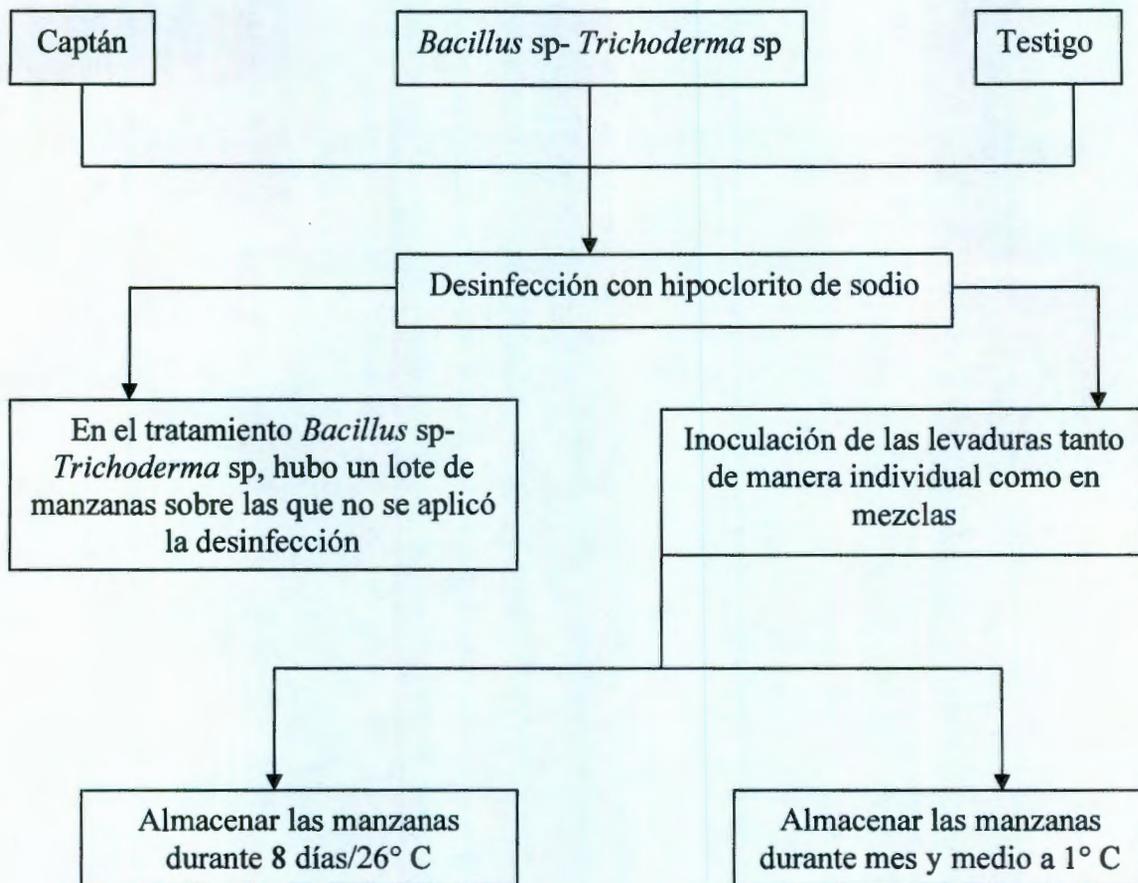
- 22-211 + 38-432
  - 5vtt + 22-211 + 38-432
  - Testigo (sin levadura)
- **Unidad experimental.** Una manzana con cuatro heridas en la zona ecuatorial
  - **Variable evaluada.** Severidad. Después de ocho días de incubación a 26° C o durante mes y medio a 1° C.

**c) Prueba de antagonismo en manzanas tratadas con Captán**

En esta prueba se emplearon manzanas que fueron adquiridas en la Central de Abastos (ver 3.2.1.), las cuales fueron tratadas en el laboratorio con una solución de Captán (400,000 ppm) bañándolas durante 30 s. En lo que corresponde a las manzanas tratadas con el fungicida se dividieron en dos lotes. Uno se almacenó a 1° C por un mes y el otro no se almacenó, sino que las manzanas solo fueron secadas bajo la campana de flujo laminar y posteriormente utilizadas. Por otro lado, se emplearon manzanas no tratadas con Captán, las cuales fueron divididas de igual manera en dos lotes. Uno en donde las manzanas fueron almacenadas por un mes a 1° C y otro donde no fueron almacenadas. Se emplearon tres levaduras que fueron inoculadas tanto de manera individual como en mezclas en manzanas, que se almacenaron durante 8 días a 26° C. Las manzanas empleadas en este estudio no se desinfectaron (Fig. 3.7).

El diseño del experimento a seguir fue:

- **Diseño experimental.** Bifactorial completamente al azar con cinco repeticiones
- **Factores de estudio**
  - Desinfección con Captán
  - Levaduras
- **Tratamientos**
  - **Desinfección con Captán**
    - Inmersión durante 30 s. en Captán y almacenada un mes
    - Inmersión durante 30 s. en Captán y sin almacenar
    - Sin tratamiento con Captán y almacenada por un mes



**Figura 3.6.** Prueba de antagonismo en manzanas tratadas en el campo

- Sin tratamiento con Captán y sin almacenar.
- **Levaduras**
  - 22-211
  - 3-5241
  - 8-121
  - 22-211+3-5241
  - 22-211+8-121
  - 3-5241+8-121
  - 22-211+3-5241+8-121
  - Testigo.
- **Unidad experimental.** Una manzana con cuatro heridas en la zona ecuatorial
- **Variable evaluada.** Severidad. Después de ocho días de incubación a 26° C.

### 3.5. Resistencia de levaduras seleccionadas al Captán

Se colocó 1 ml de la levadura, previamente activada, a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml en el fondo de una caja de Petri, adicionando posteriormente APD temperado a 45° C; el medio se homogeneizó y se dejó solidificar. Posteriormente, discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron inmersos en soluciones de Captán a diferentes concentraciones (0, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm). Los discos fueron secados por una hora bajo la campana de flujo laminar y posteriormente se colocaron en la superficie de la placa. Las placas fueron incubadas a 26° C durante 48 h (Fig. 3.8).

El diseño del experimento fue el siguiente:

- **Diseño experimental.** Bifactorial completamente al azar con tres repeticiones
- **Factores de estudio:**
  - Concentración de Captán
  - Levaduras
- **Tratamientos:**
  - **Concentración de Captán**
    - Captán a 500 ppm

- Captán a 1000 ppm
- Captán a 1500 ppm
- Captán a 2000 ppm
- **Levaduras**
  - 22-211
  - 8-121
  - 3-5241
  - 5vtt
  - 38-432
- **Unidad experimental.** Una caja de Petri con 20 discos de papel filtro colocados sobre la superficie.
- **Variable evaluada.** Diámetro de inhibición del área de crecimiento, alrededor del disco de papel; después de dos días de incubación a 26° C.

### 3.6. Aislamiento de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp.

Se utilizaron manzanas tratadas en el campo con *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. y manzanas que no recibieron ningún tratamiento. Éstas fueron almacenadas durante siete meses a 1° C. Cada manzana se colocó en una bolsa de plástico y se adicionaron 80 ml de caldo nutritivo (Merck), la manzana se frotó vigorosamente durante cinco minutos. A partir del caldo nutritivo se tomó una muestra con un asa bacteriológica, la cual se sembró por estría cruzada en los siguientes medios de cultivo: Agar nutritivo glucosado acidulado (2.5% de Glucosa, Ph = 4); Agar nutritivo. Para llevar a cabo el aislamiento de *Trichoderma* sp., se cortaron pequeños pedazos de la manzana tratada con dicho microorganismo en el campo y se colocaron en cajas con APD, incubando por siete días a 28° C, en acuerdo con Castillo (2003).

### **3.7. Identificación de las levaduras con capacidad antagónica**

Para la identificación de las levaduras que mostraron la mayor capacidad antagónica se utilizó el sistema Biolog (Mora). El procedimiento empleado fue el siguiente:

La cepa de levadura a ser identificada se transfirió del tubo donde se encontraba almacenada a placas de APD; se realizaron tres resiembras sucesivas de 48 h. De la última transferencia, se tomaron células del microorganismo y se colocaron en un tubo conteniendo 16 ml de agua estéril, dicho tubo fue sometido a agitación y posteriormente se ajustó a la densidad celular recomendada (47 % de transmitancia). Enseguida la suspensión de células fue inoculada en una microplaca YT (100  $\mu$ l/pozo). La microplaca fue incubada por 24, 48 y/o 72 hrs. Posteriormente, la microplaca fue leída en un programa (Biolog's MicroLog 3) instalado en el equipo Biolog el cual llevó acabo la identificación de la levadura.

### **3.8. Análisis de los Datos**

Se efectuó el análisis de varianza de Fisher y la prueba de medias de Student, utilizando el paquete estadístico Statgraphics (Manugistics, Rockville, MD).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Levaduras aisladas y seleccionadas

De las 29 muestras de manzanas colectadas en la región de San Joaquín y Cadereyta, se aislaron 263 cepas de levaduras. De éstas, 128 fueron seleccionadas para las pruebas de antagonismo en presencia de *Penicillium expansum* con base en su morfología colonial contrastante. En la Tabla 4.1 se consigna el número de levaduras recuperadas y seleccionadas para las pruebas de antagonismo en cada muestra de manzana colectada.

Tabla 4.1. Levaduras aisladas y seleccionadas

Nº de muestra	Levaduras recuperadas	Levaduras seleccionadas
1	1	1
2	22	14
3	13	12
4	5	4
5	9	3
6	2	1
8	12	7
11	12	8
12	3	3
13	7	6
15	3	3
16	16	8
18	40	20
21	8	4
22	28	16
24	56	12
25	0	0
26	0	0
27	3	1
28	15	5
29	0	0
Total	263	128

### 4.2. Selección de levaduras con potencial antagónico

#### 4.2.1. Pruebas iniciales por grupos

Cabe recordar que, para evaluar el poder antagónico de las levaduras, éstas fueron divididas en ocho grupos, realizándose ocho ensayos, ("A" a "H") con un número distinto de

individuos, en cada uno de los cuales se colocó un control (manzanas inoculadas con el hongo y en ausencia de levadura). Posteriormente, con aquellas levaduras, que propiciaron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo, se realizó una prueba confirmatoria.

En la Tabla 4.2 se observa el efecto de 11 cepas de levadura del Grupo A sobre la severidad de la lesión causada por *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious'. En ella puede constatar que, después de ocho días de incubación, el desarrollo diametral del hongo en ausencia de levaduras fue de 4.1 cm. Solamente una levadura manifiesta diferencia significativa con el control, la cepa 3-1211 con una inhibición del crecimiento diametral del hongo de 10.5 %, la cual puede considerarse modesta. Dicha inhibición corresponde teóricamente a 19.5 % del crecimiento del hongo en área. Se puede también observar que tres levaduras presentan un valor de severidad mayor al del propio control, lo cual podría deberse a que estas levaduras quizás sean capaces de liberar ciertos compuestos que podrían haber sido aprovechados por el hongo.

Tabla 4.2. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del Grupo A después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
3-1211	3.67 a	10.5	19.5
2-4122	3.79 a b	7.6	14.6
2-1132	3.85 a b c	6.1	11.8
1-4121	3.97 a b c d	3.2	6.3
2-513	3.99 a b c d	2.7	5.3
2-1142	4.01 a b c d	2.2	4.4
2-4112	4.07 b c d	0.7	1.5
<b>Control</b>	4.10 b c d	-	-
2-214	4.12 b c d	-0.5	-0.9
2-512	4.20 c d	-2.4	-4.9
2-411	4.27 d	-4.2	-8.4
"F" (D.M.S)	2.01 n. s. (0.37)		

<sup>a</sup> Promedio de 12 lesiones (cuatro lesiones por fruto).

Medias con la misma letra son iguales (Student,  $\alpha \leq 0.05$ ).

\*\*=Diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ )

\* = Diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ )

n. s. = No significancia

D.M.S.= Diferencia Mínima Significativa

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área se obtuvo en función del control.

En el Grupo B se aprecia que seis levaduras presentan diferencias significativas con el control, cuyo crecimiento diametral, de 3.79 cm., resultó ligeramente inferior al obtenido en el grupo precedente. La levadura más sobresaliente fue la 3-511 con un porcentaje de inhibición del

crecimiento del hongo de 24.3 % y que corresponde a 42.6 % de inhibición en crecimiento en área (Tabla 4.3). Este porcentaje de inhibición resulta sensiblemente superior al obtenido por cualquiera de las levaduras en el experimento precedente (Grupo A). Aquí es también notorio como el mayor crecimiento del hongo, a diferencia del ensayo anterior, se obtuvo cuando no se inoculó levadura alguna (control).

Tabla 4.3. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del Grupo B después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
3-511	2.87 a	24.3	42.6
4-521	3.08 a b	18.7	33.1
3-224	3.09 a b	18.5	33.5
3-331	3.20 a b c	15.6	28.7
3-528	3.24 a b c d	14.5	26.1
2-222	3.29 b c d	13.2	24.7
5-521	3.44 b c d e	9.2	17.6
3-131	3.45 b c d e	9.0	17.2
3-434	3.46 b c d e	8.7	16.7
4-231	3.47 b c d e	8.4	16.2
5-431	3.48 b c d e	8.2	15.7
3-212	3.50 c d e	7.7	14.7
4-411	3.57 c d e	5.8	11.4
3-538	3.62 d e	4.5	8.8
<b>Control</b>	3.79 e	-	-
"F" (D.M.S)	2.90** (0.41)		

Para los detalles, ver Tabla 4.2

En el Grupo C, la cepa de levadura 8-121 fue la única que inhibió significativamente el crecimiento diametral del hongo con un porcentaje de 25.3 %, equivalente a 44.3 % de inhibición del crecimiento en área (Tabla 4.4). Este valor es superior al obtenido por las levaduras analizadas en los grupos A y B. Dicha levadura fue retenida para realizar la prueba confirmatoria. Se puede también observar que 10 levaduras tienen un valor de severidad mayor al del propio control.

Tabla 4.4. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del Grupo C después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
8-121	2.39 a	25.3	44.3
8-313	2.88 a b	10	19.0
8-312	2.97 b c	7.2	13.9
8-511	3.04 b c d	5	9.8
11-232	3.08 b c d e	3.8	7.3
8-111	3.13 b c d e	2.2	4.4
11-512	3.14 b c d e	1.9	3.7
<b>Control</b>	3.20 b c d e	-	-
6-211	3.21 b c d e	-0.3	-0.6
8-321	3.25 b c d e	-1.6	-3.1
11-511	3.30 b c d e	-3.1	-6.3
8-521	3.38 b c d e	-5.6	-11.6
11-431	3.40 b c d e	-6.3	-12.8
11-311	3.48 c d e	-8.8	-18.3
12-431	3.52 c d e	-10	-21.0
12-512	3.58 d e	-11.9	-25.1
5-211	3.60 d e	-12.5	-26.5
11-211	3.63 e	-13.4	-28.6
<b>"F" (D.M.S)</b>	<b>2.31* (0.58)</b>		

Para los detalles, ver Tabla 4.2.

En la Tabla 4.5 se observa que ninguna de las cepas de levaduras presentó un efecto antagónico significativo sobre *P. expansum*. El porcentaje de inhibición de la mejor levadura de este grupo (13-121) fue de 9.9 % correspondiente a una inhibición del crecimiento en área de 18.7 %. Ambos valores resultan inferiores a los observados en los grupos anteriores (A, B, C). Igualmente, se puede observar que más de la mitad de las cepas de levaduras analizadas presentan un valor de severidad superior al del propio control, cuyo valor fue de 3.33 cm.; que es un valor solamente superior al del control del grupo C al compararlo con los grupos previos.

Tabla 4.5. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del grupo D después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
13-121	3.00 a	9.9	18.7
11-111	3.08 a b	7.5	14.4
15-121	3.10 a b	6.9	13.3
13-222	3.18 a b c	4.5	8.7
16-111	3.26 a b c d	2.1	4.1
18-113	3.31 a b c d e	0.6	1.2
15-313	3.32 a b c d e	0.3	0.6
13-122	3.33 a b c d e	0.0	0.0
<b>Control</b>	3.33 a b c d e	-	-
16-313	3.37 a b c d e	-1.2	-2.5
12-111	3.43 a b c d e f	-3.0	-6.2
18-118	3.45 a b c d e f	-3.6	-7.4
16-314	3.49 b c d e f	-4.8	-9.9
16-521	3.49 b c d e f	-4.8	-9.9
11-212	3.55 c d e f g	-6.6	-13.7
18-117	3.56 c d e f g	-6.9	-14.4
16-514	3.60 c d e f g h	-8.1	-16.9
13-212	3.67 d e f g h	-10.2	-21.5
16-513	3.68 d e f g h	-10.5	-22.2
16-311	3.69 d e f g h	-10.8	-22.9
15-211	3.75 e f g h	-12.6	-26.9
13-123	3.86 f g h	-15.9	-34.5
16-315	3.96 g h	-18.9	-41.5
13-221	4.02 h	-20.7	-45.9
<b>"F" (D.M.S)</b>	<b>2.95** (0.45)</b>		

Para los detalles, ver Tabla 4.2

De las distintas cepas de levaduras que conforman el Grupo E, ninguna de las cepas evaluadas presentó diferencia significativa con el control (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del grupo E después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
18-222	2.83 a	10.4	19.8
18-129	2.95 a b	6.7	12.9
18-512	3.12 a b c	1.3	2.6
18-415	3.16 a b c	0	0
<b>Control</b>	3.16 a b c	-	-
18-126	3.18 a b c	-0.6	-1.3
18-115	3.21 a b c	-1.6	-3.2
18-211	3.27 a b c	-3.5	-7.0
18-516	3.29 a b c	-4.1	-8.4
18-5110	3.32 a b c	-5.1	-10.3
18-413	3.36 a b c	-6.3	-13.0
18-214	3.39 a b c	-7.3	-15.1
21-111	3.57 b c	-13.0	-27.6
18-521	3.72 c	-17.7	-38.5
"F" (D.M.S)	1.12 n.s. (0.62)		

Para los detalles, ver Tabla 4.2

En el Grupo F se observa que cuatro cepas de levaduras presentan una inhibición significativa del crecimiento diametral del hongo. Destaca la cepa 22-218 con un altísimo porcentaje de inhibición (80.1 % del crecimiento diametral y un sorprendente 96 % del crecimiento en área). Otras levaduras sobresalientes fueron 22-321, 22-211 y 22-421 (63.6 %, 62.1 % y 52.4 % de inhibición, respectivamente). Es interesante subrayar que estas cepas de levaduras fueron las que mayor control presentaron sobre el patógeno a lo largo de todos los experimentos realizados, por lo cual fueron retenidas para la prueba confirmatoria. Cabe también hacer notar que estas cuatro cepas fueron recuperadas de la misma muestra de manzana. El valor de severidad del control de este grupo fue de 3.32 cm. que es superior al observado en los grupos C y E.

La capacidad antagonica de la cepa 22-218 es comparable con la obtenida por Viñas *et al.* (1997) con una cepa de *C. sake* en manzanas 'Golden Delicious' almacenadas durante siete días a 20° C, ya que dichos autores obtienen una inhibición del crecimiento diametral del hongo de 80.8 %. Ahora bien, Sánchez (2004) obtuvo, bajo condiciones similares a las usadas en este trabajo, un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral de *P. expansum* de 45 % con la

levadura '26-224' (la mejor de 140 evaluadas). Este porcentaje resultó inferior al observado por la levadura 22-218.

Tabla 4.7. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del grupo F después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
<b>22-218</b>	<b>0.66 a</b>	<b>80.1</b>	<b>96.1</b>
<b>22-321</b>	<b>1.21 b</b>	<b>63.6</b>	<b>86.7</b>
<b>22-211</b>	<b>1.26 b</b>	<b>62.1</b>	<b>85.6</b>
<b>22-421</b>	<b>1.58 b</b>	<b>52.4</b>	<b>77.3</b>
18-514	2.93 c	11.8	22.1
18-421	2.97 c	10.5	20.0
21-112	3.06 c	7.8	15.0
22-411	3.09 c d	6.9	13.3
22-217	3.15 c d e	5.1	9.9
22-2110	3.19 c d e	3.9	7.6
22-322	3.21 c d e	3.3	6.5
22-213	3.30 c d e f	0.6	1.2
<b>Control</b>	<b>3.32 c d e f</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
18-417	3.34 c d e f g	-0.6	-1.3
21-221	3.57 d e f g	-7.5	-15.6
18-321	3.58 d e f g	-7.8	-16.3
18-515	3.59 e f g	-8.1	-17.0
21-213	3.73 f g	-12.4	-26.2
22-212	3.82 g	-15.1	-32.5
<b>"F" (D.M.S)</b>	<b>30.27** (0.49)</b>		

Para los detalles, ver Tabla 4.2

De todas las levaduras evaluadas que conformaron el Grupo G solamente la 22-521 manifestó una inhibición significativa de *P. expansum*, con un porcentaje de 24.8 %. Dicha levadura fue retenida para la prueba confirmatoria (Tabla 4.8). El porcentaje de inhibición obtenido por la levadura mencionada es solamente inferior a los logrados por las mejores levaduras en los grupos C (8-121) y F (22-218, 22-321, 22-211, 22-421). Se puede notar que el crecimiento diametral que presenta el control es de 2.99 cm., valor que corresponde al más pequeño observado en todos los lotes.

Tabla 4.8. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del grupo G después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
<b>22-521</b>	<b>2.25 a</b>	<b>24.8</b>	<b>43.5</b>
22-522	2.52 a b	15.7	28.9
24-216	2.90 b c	3.0	6.0
<b>Control</b>	2.99 b c d	-	-
24-214	3.15 c d e	-5.4	-11.0
24-311	3.25 c d e	-8.7	-18.1
24-422	3.30 c d e	-10.4	-21.8
24-211	3.31 c d e	-10.7	-22.5
24-522	3.33 c d e	-11.4	-23.9
22-513	3.33 c d e	-11.4	-23.9
24-412	3.34 c d e	-11.7	-24.8
18-323	3.40 c d e	-13.7	-29.2
22-524	3.45 c d e f	-15.4	-33.1
24-316	3.52 d e f	-17.7	-38.6
24-314	3.56 d e f	-19.1	-41.7
24-217	3.59 e f	-20.1	-44.2
22-415	3.60 e f	-20.4	-44.9
22-516	3.62 e f	-21.1	-46.6
24-113	3.73 e f	-24.8	-55.6
24-222	4.02 f	-34.5	-80.8
<b>"F" (D.M.S)</b>	<b>3.88** (0.59)</b>		

Para los detalles, ver Tabla 4.2

En la Tabla 4.9 se puede observar que solo la levadura 3-5241 presenta una inhibición significativa del crecimiento diametral del hongo con un modesto porcentaje de 13 % que en inhibición del crecimiento en área corresponde a 24.3 %. Esta levadura fue retenida para realizar la prueba confirmatoria. De las 14 levaduras analizadas en este lote solamente dos presentan un valor de severidad por debajo del control (3-5241 y 2-1222). El valor de severidad del control fue de 3.0 cm, el cual es solamente superior al del grupo G.

Tabla 4.9. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura del grupo H después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
<b>3-5241</b>	<b>2.61 a</b>	<b>13</b>	<b>24.3</b>
2-1222	2.94 b	2	4.0
<b>Control</b>	3.00 b c	-	-
3-535	3.18 b c d	-6.0	-12.3
28-412	3.24 c d	-8.0	-16.6
27-112	3.28 d e	-9.3	-19.5
2-431	3.32 d e	-10.7	-22.4
3-5131	3.34 d e	-11.3	-23.9
28-111	3.35 d e	-11.7	-24.6
28-212	3.42 d e f	-14.0	-29.8
28-312	3.42 d e f g	-14.0	-29.8
28-112	3.43 d e f g	-14.3	-30.7
2-2212	3.53 e f g	-17.7	-38.3
2-1112	3.64 f g	-21.3	-47.1
2-213	3.67 g	-22.3	-49.5
"F" (D.M.S)	10.02** (0.25)		

Para los detalles, ver Tabla 4.2

Resumiendo los resultados obtenidos en esta serie de pruebas, podemos decir que, de las 128 cepas de levaduras analizadas, 14 propiciaron una inhibición significativa del crecimiento del hongo, 43 no la tuvieron, pero el valor de severidad obtenido fue menor al del control y, finalmente, 71 manifestaron un incremento en el crecimiento del hongo. Con las siete levaduras que manifestaron el mayor poder antagónico, señaladas en negritas en las tablas, se procedió a realizar una prueba confirmatoria.

#### 4.2.2. Prueba confirmatoria

La cepa 22-211 fue quien ejerció el mayor control sobre *P. expansum*, con un porcentaje de inhibición del desarrollo diametral de 23.9 % (Tabla 4.10). Este valor fue significativamente inferior al presentado por la cepa en la prueba anterior (62.1 %) (Tabla 4.7). La levadura 22-218, a pesar de tener diferencia significativa con el control, con un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo de 10.4 %, no tuvo el mismo comportamiento que en la prueba preliminar, en la cual había sido la que mayor inhibición del crecimiento diametral del hongo había alcanzado de todas las levaduras evaluadas.

De las restantes cinco levaduras, a excepción de la 22-321, todas presentaron una inhibición significativa del crecimiento del hongo. En general, la tendencia observada fue que las

levaduras inhiben al patógeno en menor medida que en la prueba anterior. Ello podría deberse a que las levaduras no presentan estabilidad genética, es decir no logran mantener la misma capacidad de acción sobre el patógeno (Usall *et al.*, 1996).

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Sánchez (2004), podemos destacar, que dicho autor obtuvo una levadura ('23-61') que presentó el mayor nivel de control del crecimiento del hongo con un porcentaje de inhibición superior a 53 %, a ocho días de incubación de las manzanas, el cual es un valor superior al obtenido por la mejor levadura en el presente trabajo.

Tabla 4.10. Desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura, seleccionada en ensayos previos, después de ocho días de incubación a 26° C

Levadura	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición del crecimiento diametral (%)	Inhibición del crecimiento en área (%)
22-211	2.71 a	23.9	42.0
22-421	2.98 ab	16.3	30.0
3-5241	3.08 b	13.5	25.1
8-121	3.14 bc	11.8	22.2
22-218	3.19 bc	10.4	19.7
22-521	3.24 bc	9.0	17.2
22-321	3.38 cd	5.1	9.9
<b>Control</b>	3.56 d	-	-
<b>"F" (D.M.S)</b>	<b>6.83** (0.28)</b>		

<sup>a</sup> Promedio de 28 lesiones (cuatro lesiones por fruto)  
Para los detalles ver Tabla 4.2

La cepa 22-211 fue utilizada, junto con las cepas 5vt y 38-432, seleccionadas en experimentos previos por Sánchez (2004), para los experimentos ulteriores con manzanas previamente tratadas en el campo con fungicidas y microorganismos.

### 4.3. Ensayo de levaduras antagónicas con manzanas tratadas en el campo

#### 4.3.1. Almacenamiento a temperatura ambiente (26° C)

##### A) Análisis de varianza

En la Tabla 4.11 se puede observar un efecto significativo de los tratamientos aplicados en el campo (Captán, *Bacillus* sp.-*Trichoderma* sp., testigo) y de las levaduras inoculadas en poscosecha sobre el crecimiento diametral del hongo, mas no en la interacción de ambos factores.

Tabla 4.11. Valores de "F" y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable "crecimiento diametral del hongo" de los factores de estudio y su interacción.

Factor	"F"
A. Tratamiento en el campo	11.93 **
B. Levadura	10.21 **
I (A x B)	1.36 n.s.

\*\*=Diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ )

n.s. = No significancia

##### B) Pruebas de medias

###### **B<sub>1</sub> Efecto del tratamiento en el campo**

El único tratamiento que redujo significativamente el desarrollo diametral de *P. expansum* fue el correspondiente a la aplicación de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp., pero donde no se desinfectó la manzana antes de inocular a las levaduras. El porcentaje de inhibición fue de 17.6 % que equivale a una inhibición del crecimiento en área a 32.1 % (Tabla 4.12). Lo anterior parece indicar un efecto inhibitor de los microorganismos asperjados en la huerta y que pudieron haber sobrevivido desde el momento en que se hicieron las aplicaciones en el campo hasta la utilización de las manzanas en este experimento (siete meses); o de la microbiota nativa, sobre el desarrollo de *P. expansum*.

Tabla 4.12. Efecto de los distintos tratamientos aplicados en el campo sobre la severidad ocasionada por *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious', con levaduras confundidas

Tratamiento	Severidad (cm) <sup>a</sup>	Inhibición crec. diametral (%)	Inhibición crec. en área (%)
<i>Bacillus-Trichoderma</i> (sin desinfección)	2.20 a	17.6	32.1
<i>Bacillus-Trichoderma</i> (con desinfección)	2.66 b	0.4	0.9
Captán	2.73 b	-2.3	-4.5
<b>Testigo</b>	2.67 b	-	-
"F" (D.M.S)	11.93** (0.20)		

<sup>a</sup> Promedio de 160 lesiones (cuatro lesiones por fruto) medida después de ocho días a 26° C.

\*\*=Diferencia altamente significativa (P ≤ 0.01).

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área se obtuvo en función del testigo.

Para el caso en el cual las manzanas fueron tratadas con *Bacillus-Trichoderma*, pero que fueron desinfectadas antes de realizar la inoculación de las levaduras, el diámetro de la lesión fue de 2.66 cm., valor comparable al del Testigo (2.67 cm.). Este resultado muy probablemente se debe a que, la desinfección realizada con hipoclorito de sodio, redujo la carga microbiana presente, por lo cual no se observó inhibición significativa del crecimiento diametral de *P. expansum*.

El que los microorganismos asperjados en el huerto hubieran tenido un efecto inhibitor sobre *P. expansum* se ve apoyado por otros trabajos de investigación, en los cuales, cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. han sido utilizadas exitosamente para controlar diversos patógenos en varios cultivos. Tal es el caso de *Trichoderma hamatum*, que ha sido usada para controlar *Rhizoctonia solani* en rábano y frijol, y *Pythium* sp. en chícharo (Chet y Baker, 1981). Asimismo, *Bacillus* sp. ha sido usado para controlar enfermedades de la raíz del trigo, alfalfa (*Damping off*), algodón (*Damping off*), soya (pudrición *Rhizoctonia*), entre otras (Kim *et al.*, 1997). En nuestro caso particular, el efecto de dichos microorganismos estaría manifestándose para el control de una enfermedad presente en un fruto en poscosecha.

Por su parte, el Captán aplicado en el campo no tuvo una influencia significativa sobre el desarrollo de *P. expansum*, ya que el promedio del diámetro de la lesión (2.73 cm.) es comparable al del Testigo (manzana no tratada en campo) cuyo valor es de 2.67cm. Este resultado puede deberse a que, por un lado, las manzanas tratadas con Captán ya no presentaban residuos del fungicida después de siete meses de almacenamiento, o bien, a que ni las levaduras

ni el hongo fueron afectados por este producto. Para poder elucidar lo que pudo haber ocurrido, habría que diseñar un nuevo experimento realizando pruebas *in vitro* para ver si las levaduras son o no tolerantes al Captán o bien realizando pruebas *in vivo* en donde la aplicación del funguicida se lleve acabo en manzanas y se determine el efecto que este tiene sobre las levaduras así como sobre el hongo al ser inoculados en las manzanas tratadas.

### **B<sub>2</sub> Efecto de las levaduras**

Por lo que respecta al efecto de las levaduras, en la Tabla 4.13 podemos observar que todos los tratamientos, excepto la levadura 38-432 sola, reducen significativamente el diámetro de la lesión ocasionada por *P. expansum*, siendo el mejor tratamiento la mezcla 5vtt + 22-211, con un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo de 29 %.

Tabla 4.13. Desarrollo diametral de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en función de la cepa de levadura (solas o en mezcla), con tratamientos de campo confundidos

Levadura	Severidad (cm) <sup>a</sup>	Inhibición crec. diametral (%)	Inhibición crec. en área (%)
5vtt + 22-211	2.25 a	29.0	49.7
22-211 + 38-432	2.34 a b	26.2	45.5
5vtt + 38-432	2.36 a b	25.6	44.6
22-211	2.39 a b	24.6	43.2
5vtt	2.51 a b	20.8	37.3
5vtt+22-211 + 38-432	2.55 b	19.6	35.4
38-432	2.94 c	7.3	13.9
<b>Control</b>	3.17 c	-	-
"F" (DMS)	10.21** (0.28)		

<sup>a</sup> Promedio de 80 lesiones (cuatro lesiones por fruto) medida después de ocho días a 26° C

Medias con la misma letra son iguales (Student  $\alpha \leq 0.05$ )

\*\*=Diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ )

D.M.S.= Diferencia Mínima Significativa

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área se obtuvo en función del control

En la misma tabla, es interesante observar que, en general, existe una tendencia a que las mezclas de levaduras inhiban el crecimiento del hongo en mayor medida que el promedio de las levaduras individuales que componen una mezcla determinada. Por ejemplo, el desarrollo diametral de *P. expansum* en presencia de la levadura 22-211 de manera individual es de 2.39 cm., el promedio respectivo para la levadura 5vtt es de 2.51 cm., sin embargo, cuando se mezclan ambas levaduras el valor obtenido es de 2.25 cm.

Análogamente, la levadura 38-432, que no presenta diferencia significativa con el control, y cuyo valor de severidad fue de 2.94 cm., al estar en mezcla con otras levaduras como la 22-211 (con la cual el hongo creció 2.39 cm.), el valor de severidad fue de 2.34 cm., el cual ya es significativamente inferior al control. Lo mismo sucede cuando la misma levadura (38-432) se encuentra en mezcla con 5vtt (con la cual el hongo crece 2.51 cm.), en donde el valor de severidad nuevamente se reduce considerablemente (2.36 cm.).

Estos hechos pueden deberse a que, cuando los microorganismos antagonicos se encuentran mezclados, se tiene una mejor utilización de nutrientes del medio y, por lo tanto, una menor disponibilidad de éstos para el patógeno o bien, que uno de los microorganismos que componen la mezcla genere condiciones favorables para el otro (Janisiewicz, 1996), así como, que los microorganismos que conforman la mezcla tengan diferentes mecanismos de acción sobre el patógeno, lo cual permitiría tener un mayor control sobre éste (Nunes *et al.* 2001).

Nunes *et al.* (2001) estudiaron el efecto antagonico sobre *P. expansum* de dos cepas de dos distintas especies de levaduras (*Candida sake* y *Pantoea agglomerans*) solas y en mezcla, empleando concentraciones de  $2 \times 10^7$  UFC/ml, en donde *C. sake* presentó de manera individual, un porcentaje de inhibición de 82.1 %, mientras que para *P. agglomerans* el porcentaje respectivo fue de 47.0 %. La mezcla de ambos microorganismos incubando las manzanas durante siete días a 20° C, propició un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo de 87.6 %, valor superior al obtenido por dichos microorganismos empleados de manera individual. Vale la pena comentar que dicho porcentaje de inhibición resulta muy superior a los obtenidos en el presente trabajo.

### **B<sub>3</sub>. Efecto de las levaduras en cada uno de los tratamientos en el campo**

- Testigo (manzanas no asperjadas en el campo)

En la Tabla 4.14 (segunda columna) se observa que solo tres tratamientos presentan diferencia significativa con el control (manzanas que solo se inocularon con el patógeno), siendo el mejor tratamiento la mezcla formada por las levaduras 22-211+38-432, con un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo de 26.6 % correspondiente a 46.2 % en área. Se puede ver que los tratamientos donde se encuentra la levadura 22-211, tanto de manera individual como en las mezclas que conforma, presentan diferencia significativa con el control, a excepción de la mezcla de las tres levaduras (5vtt+22-211+38-432).

Tabla 4.14. Desarrollo diametral de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' almacenadas a 26° C en función de la cepa de levadura (sola o en mezcla), en cada uno de los tratamientos aplicados en el campo

Levadura	Testigo	Captán	<i>Bacillus-Trichoderma</i>	
			con desinfección	sin desinfección
22-211+ 38-432	2.23 <sup>1</sup> a (26.6)	2.32 a (27.3) <sup>2</sup>	2.61 a (18.7)	2.20 b (32.1)
5vtt+ 22-211	2.29 ab (24.7)	2.56 ab (19.8)	2.49 a (22.4)	1.65 a (49.1)
22-211	2.47 abc (18.8)	2.56 ab (19.8)	2.64 a (17.8)	1.88 ab (42.0)
5vtt+22-211+38-432	2.59 abcd (14.8)	2.94 ab (7.8)	2.54 a (20.9)	2.13 ab (34.3)
5vtt + 38-432	2.75 bcd (9.5)	2.57 ab (19.4)	2.41 a (24.9)	1.73 ab (46.6)
5vtt	2.95 cd (3.0)	2.62 ab (17.9)	2.62 a (18.4)	1.87 ab (42.3)
38-432	3.03 d (0.3)	2.98 ab (6.6)	2.78 ab (13.4)	2.88 c (11.1)
<b>Control</b>	3.04 d	3.19 b	<b>3.21 b</b>	<b>3.24 c</b>
"F" (D.M.S)	3.52** (0.50)	1.18 n.s. (0.76)	1.90 n.s. (0.52)	10.84** (0.50)

<sup>1</sup>Promedio de 20 lesiones (cuatro lesiones por fruto) medida después de ocho días a 26° C, expresado en cm.

<sup>2</sup>Porcentaje de inhibición del crecimiento diametral de *P. expansum*.

Para los detalles, ver Tablas 4.2

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral se obtuvo en función del correspondiente control para cada tratamiento.

Si analizamos el comportamiento particular de la levadura 22-211, se observa que el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento diametral del hongo va disminuyendo a través de las diversas pruebas efectuadas. Por ejemplo, en la prueba inicial, manifestó un valor de 62.1 %; en la prueba confirmatoria el porcentaje respectivo fue de 23.9 % y, en este último experimento, el porcentaje de inhibición disminuye a solo 18.8 % (Tabla 4.14).

Para el caso de las levaduras 5vtt y 38-432, aisladas previamente por Sánchez (2004), los porcentajes de inhibición reportados por dicho autor fueron de 37.1 % y 40.5 %, respectivamente, valores muy superiores a los obtenidos en el presente trabajo (3.0 % para 5vtt y 0.3 % para 38-432).

La disminución en el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento diametral de *P. expansum* en las diferentes pruebas realizadas con la levadura 22-211, 5vtt y 38-432, puede ser debido al estado de madurez de las manzanas utilizadas, ya que en el caso de la cepa 22-211, en la prueba de selección de levaduras se emplearon manzanas que habían estado cinco meses almacenadas; para la prueba confirmatoria se utilizaron manzanas almacenadas por seis meses y, finalmente, en la prueba definitiva en la cual además fueron empleadas las cepas 5vtt y 38-432, las manzanas tenían un tiempo de almacenamiento de siete meses.

#### - Captán

Analizando de manera interna el comportamiento de las levaduras dentro de las manzanas tratadas con Captán (Tabla 4.14, tercera columna) podemos observar que el único tratamiento que presenta diferencia significativa con el control (manzanas inoculadas solo con el patógeno), es la mezcla 22-211 + 38-432 con un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo de 27.3 % equivalente a una inhibición del crecimiento en área de 47.1 %. Ahora, comparando entre el tratamiento llamado Testigo y el Captán, podemos observar que no se presenta un efecto del fungicida sobre las levaduras y/o el hongo, ya que los resultados obtenidos son comparables a los del Testigo (columna 2).

#### - *Bacillus* sp.-*Trichoderma* sp. con desinfección

Analizando el comportamiento de las levaduras dentro de este tratamiento, la cepa 38-432 es la única que no presenta diferencia significativa con el control (manzanas inoculadas solo con el patógeno), siendo la mezcla 5vtt+38-432 el mejor tratamiento, con una inhibición del crecimiento diametral del hongo de 24.9 % equivalente a la inhibición del crecimiento en área de 43.6 %. Comparando entre el tratamiento llamado Testigo y *Bacillus* sp.-*Trichoderma* sp. con desinfección, podemos observar que los resultados son comparables y que el tratamiento (aplicación de microorganismos) no afectó el comportamiento de las levaduras. Lo que posiblemente ocurrió fue que la desinfección con hipoclorito de sodio redujo la carga microbiana presente en dicha fruta.

#### - *Bacillus* sp.-*Trichoderma* sp. sin desinfección

Dentro de este tratamiento, la única levadura que no tiene diferencia significativa con el control es la cepa 38-432; siendo el mejor tratamiento una mezcla 5vtt + 22-211 la cual tiene un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo de 49.1% equivalente en inhibición en área a 74 %. Comparando entre los tratamientos donde se llevó acabo la aplicación de *Bacillus* sp.-*Trichoderma* sp desinfectando y sin desinfectar, se observa que todas las cepas de levaduras, tanto individuales como en mezcla, en el tratamiento donde no se llevó acabo la desinfección, a excepción de la cepa 38-432 y del control, presentan un mayor efecto antagónico sobre *P. expansum*, que cuando las manzanas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio.

Si la disminución en el desarrollo del hongo se debiera únicamente a los microorganismos de campo (ya sea la microflora nativa o los microorganismos asperjados), se esperaría obtener también una mayor acción antagónica en las manzanas inoculadas solamente con el patógeno (control), cosa que no sucedió. En efecto, los valores obtenidos para el crecimiento del hongo fueron de 3.24 y 3.21 para manzanas no desinfectadas y manzanas desinfectadas, donde en teoría no se encontrarían presentes los microorganismos aplicados en el campo, respectivamente (Tabla 4.14, quinta y cuarta columnas).

Lo anterior sugiere un efecto sinérgico de los microorganismos aplicados en el campo o de la microflora nativa de las manzanas con las levaduras inoculadas en poscosecha. Si bien no sabemos con exactitud entre qué microorganismos pudiera haberse dado el sinergismo, existen trabajos de investigación tales como el de Leibinger *et al.* (1997) quienes observaron que una cepa de *Bacillus subtilis* en mezcla con otra de *Aureobasidium pullulans*, aplicadas en el campo, resultaron efectivas para controlar *P. expansum* y otros patógenos en poscosecha.

#### 4.3.2. Almacenamiento en frío (1° C)

##### A) Análisis de varianza

No se observa ningún efecto de los factores evaluados, ni de la interacción de ambos sobre el crecimiento diametral de *P. expansum*, en ninguno de los tiempos de almacenamiento (Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Valores de "F" y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable "desarrollo diametral del hongo" de los factores de estudio y su interacción en distintos tiempos de almacenamiento

Factor	30 días	45 días
A. Tratamiento en el campo	1.54 n.s.	1.94 n.s.
B. Levadura	1.05 n.s.	1.37 n.s.
I (A x B)	1.41 n.s.	1.18 n.s.

n.s.= No significancia

##### B) Pruebas de medias

###### B<sub>1</sub> Efecto del tratamiento en el campo

Después de 30 días de almacenamiento de las manzanas inoculadas, el tratamiento que mayor control ejerció sobre *P. expansum* fue el Testigo (manzanas no tratadas en campo), con un diámetro de la lesión de 0.83 cm., siendo únicamente inferior al tratamiento con microorganismos en campo y donde se aplicó la desinfección ( $\varnothing = 1.10$  cm.).

Sin embargo, el tratamiento Testigo no presenta diferencia significativa ni con el tratamiento con Captán, ni con el tratamiento a base de microorganismos (*Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp) sin desinfección de las manzanas antes de inocular las levaduras, siendo los índices de severidad observados de 0.91 cm y 0.87 cm, respectivamente (Tabla 4.16).

Tabla 4.16. Efecto de las aplicaciones en campo sobre el desarrollo diametral (cm.) de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious', con levaduras confundidas después de 30 y 45 días de incubación a 1° C

Aplicaciones en campo	30 días	45 días
<i>Bacillus-Trichoderma</i> (sin desinfección)	0.87 <sup>1</sup> a b (-4.8,-9.3) <sup>2</sup>	2.32 a b (-12.6,-27.0)
Captán	0.91 a b (-9.6,-20.4)	2.29 a b (-11.2,-23.7)
<i>Bacillus-Trichoderma</i> (con desinfección)	1.10 b (-32.5,-75.9)	2.61 b (-26.7,-60.7)
Testigo	0.83 a	2.06 a
"F" (D.M.S)	1.54 n.s. (0.3)	1.94 n.s. (0.5)

<sup>1</sup> Promedio de 160 lesiones (cuatro lesiones por fruto).

<sup>2</sup> Porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área de *P. expansum*, respectivamente.

Para los detalles, ver Tabla 4.2

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área se obtuvo en función del correspondiente testigo para cada tiempo.

Los resultados obtenidos después de 45 días de almacenamiento a 1° C son básicamente los mismos que cuando las manzanas se almacenaron durante 30 días (Tabla 4.16). Nuevamente se obtuvo con el Testigo la menor severidad del patógeno (2.06 cm.), siendo estadísticamente distinto del tratamiento con *Bacillus* sp-*Trichoderma* sp con desinfección, cuyo índice de severidad fue de 2.61 cm. Con respecto al incremento promedio en el diámetro de la lesión de los diferentes tratamientos entre 30 y 45 días de almacenamiento, se puede observar que éste fue del orden del 250 %.

El hecho de que ni el tratamiento correspondiente a manzanas tratadas con microorganismos (*Bacillus* sp y *Trichoderma* sp.) sin desinfección, ni el tratamiento correspondiente a manzanas tratadas con Captán, tuvieran diferencias con el Testigo, posiblemente se deba a que, a causa del tiempo transcurrido de ambos tratamientos aplicados en el campo, quedarán en la manzana pocas trazas del producto o de los microorganismos, incapaces de causar efecto alguno en el hongo.

En el caso de las manzanas tratadas con microorganismos, las condiciones para el crecimiento y sobrevivencia de éstos pudieron ser desfavorables bajo el almacenamiento en frío a 1° C. En efecto, Leibinger *et al.* (1997) observaron que las poblaciones de *Bacillus* sp. disminuían considerablemente en manzanas almacenadas en frío en comparación con las poblaciones de levaduras que estaban evaluando, hallazgo inesperado, ya que se sabe que varias especies del género *Bacillus* forman endosporas que deberían facilitar su sobrevivencia en la superficie de la fruta.

Por lo que respecta al Captán, las manzanas podrían presentar pocos residuos de este fungicida, lo cual concuerda con Koivistoinen *et al.* (1965) quienes observaron una reducción de 90 % en los niveles de Captán presentes en granos de frijol sometidos a ocho meses de almacenamiento en congelación.

Contrariamente a los resultados obtenidos en el presente trabajo, Wolfgang *et al.* (1997) observaron que, aplicaciones en el campo de distintos microorganismos (*Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* y *Bacillus subtilis*) procuraron un cierto control de varios microorganismos *Botrytis cinerea*, *Pezizula malicorticis* y *P. expansum*, en manzanas almacenadas durante seis meses a 2° C y 95 a 100 % de humedad relativa.

### **B<sub>2</sub> Efecto de las levaduras**

Por lo que respecta al efecto de las levaduras después de 30 días de almacenamiento a 1° C, en la Tabla 4.17 se puede observar que el único tratamiento que presenta diferencia significativa con el control (manzanas inoculadas sólo con el patógeno) fue la levadura 38-432; con un porcentaje de inhibición del hongo de 35.1 %. Este resultado sugiere que, de las levaduras probadas en el presente experimento, solamente ésta tiene la capacidad de crecer y sobrevivir bajo condiciones de almacenamiento en frío (1° C).

Tabla 4.17. Efecto de las levaduras (solas o en mezclas) sobre el desarrollo diametral de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious', con aplicaciones en el campo confundidas, después de 30 y 45 días de incubación a 1° C

Levadura	30 días		45 días	
	Medias <sup>1</sup>	% inhibición <sup>2</sup>	Medias	% inhibición
38-432	0.72 a	35.1, (57.7)	1.98 a	21.7, (38.8)
22-211	0.82 a b	26.1, (45.4)	2.02 a	20.2, (36.4)
5vtt+22-211+38-432	0.83 a b	25.1, (44.3)	2.08 a	17.8, (32.4)
5vtt+38-432	0.87 a b	21.6, (39.2)	2.25 a	11.1, (21.1)
5vtt+22-211	0.97 a b	12.6, (23.7)	2.61 a	-3.2, (-6.4)
22-211+38-432	1.02 a b	8.1, (15.5)	2.50 a	1.2, (2.4)
5vtt	1.09 a b	1.8, (4.1)	2.58 a	-1.9, (-4.0)
<b>Control</b>	1.11 b		2.53 a	
"F" (D.M.S)	1.05 n.s. (0.38)		1.37 n.s. (0.64)	

<sup>1</sup>Promedio de 80 lesiones (cuatro lesiones por fruto) expresado en cm.

<sup>2</sup> Porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área (entre paréntesis) de *P. expansum*

Para los detalles, ver Tabla 4.2.

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área se obtuvo en función del correspondiente control para cada tiempo.

El hecho de que los otros tratamientos de levaduras, ya sea solas o en mezcla, no hayan tenido efecto alguno sobre el desarrollo del hongo, posiblemente se deba a su baja capacidad para desarrollar en frío o a que las manzanas utilizadas en este experimento tenían ya siete meses de almacenamiento al momento en que se inició el experimento. De acuerdo con Janisiewicz *et al.* (1992), el estado de madurez de la fruta afecta el poder antagónico de los microorganismos, siendo necesarias concentraciones más elevadas del antagonista conforme la fruta se encuentra más madura.

Finalmente, conviene destacar que con todos los tratamientos evaluados (levaduras individuales como en mezcla) se obtuvieron valores de severidad inferiores a los del control.

En lo que se refiere al efecto de las levaduras después de 45 días de almacenamiento a 1° C, ninguna de ellas presentó diferencia significativa con el control, como se observa en la Tabla 4.17. El hecho de que la levadura 38-432 ya no haya presentado efecto antagónico sobre el patógeno podría deberse a que conforme pasa el tiempo, el hongo incrementa su capacidad para ir colonizando paulatina aunque lentamente la manzana.

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo obtenido en el presente trabajo se encuentra por debajo del logrado por Viñas *et al.* (1997) utilizando una cepa de *C. sake* para el control de *P. expansum* en manzanas almacenadas durante siete días a 20° C (80.8 %) y, 60 días a 1° C (91.7 %).

### B<sub>3</sub> Efecto de las levaduras en cada uno de los tratamientos en el campo

En las Tablas 4.18 y 4.19 se muestra el efecto de distintas levaduras o mezclas de éstas sobre el crecimiento de *P. expansum* después de 30 y 45 días de almacenamiento, respectivamente, en cada uno de los tratamientos realizados en el campo.

#### - Testigo

En este caso se observa que ninguna de las levaduras, ya sea de manera individual o en mezclas, inhibe el desarrollo de *P. expansum* en las manzanas que no recibieron tratamiento alguno en el campo, en ninguno de los tiempos de muestreo considerados (30 y 45 días).

Tabla 4.18. Efecto de las levaduras solas o en mezclas sobre la severidad (diámetro de la lesión) ocasionada por *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en cada uno de los tratamientos aplicados en el campo después de 30 días de incubación a 1° C

Levadura	Testigo	Captán	<i>Bacillus-Trichoderma</i>	
			con desinfección	sin desinfección
38-432	0.51 <sup>1</sup> a (40.0)	0.72 ab (20.0) <sup>2</sup>	1.08 a (10.0)	0.58 ab (60.8)
22-211+38-432	0.59 a (30.6)	0.79 ab (12.2)	1.43 a (-19.2)	1.26 bc (14.9)
5vtt+22-211+38-432	0.73 a (14.1)	0.56 a (37.8)	0.91 a (24.2)	1.12 bc (24.3)
5vtt+38-432	0.84 a (1.2)	0.80 abc (11.1)	1.09 a (9.2)	0.77 abc (48.0)
5vtt	0.96 a (-12.9)	1.42 bc (-57.8)	1.03 a (14.2)	0.96 abc (35.1)
22-211	1.05 a (-23.5)	0.53 a (41.1)	1.14 a (5.0)	0.57 ab (61.5)
5vtt+22-211	1.11 a (-30.6)	1.59 c (-76.8)	0.92 a (23.3)	0.25 a (83.1)
Control	0.85 a	0.90 abc	1.20 a	1.48 c
"F" (D.M.S)	0.45 n.s. (0.92)	1.95 n.s. (0.80)	0.67 n.s. (0.58)	2.19 n.s. (0.80)

<sup>1</sup>Promedio de 20 lesiones (cuatro lesiones por fruto).

<sup>2</sup>Porcentaje de inhibición del crecimiento diametral de *P. expansum*.

Para los detalles, ver Tabla 4.2.

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral se obtuvo en función del correspondiente control para cada tratamiento.

Tabla 4.19. Efecto de las levaduras solas o en mezclas sobre la severidad (diámetro de la lesión) ocasionada por *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en cada uno de los tratamientos aplicados en el campo después de 45 días de incubación a 1° C.

Levadura	Testigo	Captán	<i>Bacillus-Trichoderma</i>	
			con desinfección	sin desinfección
38-432	1.54 <sup>1</sup> a (33.9)	2.15 ab (6.1) <sup>2</sup>	2.58 ab (-6.2)	1.63 a (46.7)
22-211+38-432	1.71 a (26.6)	1.93 ab (15.7)	3.64 b (-49.8)	2.75 ab (10.1)
5vtt+22-211+38-432	1.91 a (18.0)	1.72 a (24.9)	2.24 a (7.8)	2.45 ab (19.9)
5vtt+38-432	2.03 a (12.9)	2.05 ab (10.5)	2.38 a (2.1)	2.55 ab (16.7)
22-211	2.10 a (9.9)	1.68 a (26.6)	2.33 a (4.1)	1.97 ab (35.6)
5vtt	2.34 a (-0.4)	3.16 b (-38.0)	2.25 a (7.4)	2.58 ab (15.7)
5vtt+22-211	2.51 a (-7.7)	3.33 b (-45.4)	3.01 ab (-23.9)	1.59 a (48.0)
Control	2.33 a	2.29 ab	2.43 a	3.06 b
"F" (D.M.S)	0.46n.s. (1.42)	1.61n.s. (1.42)	1.54n.s. (1.13)	1.46n.s. (1.28)

<sup>1</sup>Promedio de 20 lesiones (cuatro lesiones por fruto)

<sup>2</sup> Porcentaje de inhibición del crecimiento diametral de *P. expansum*

Para los detalles, ver Tablas 4.2

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral se obtuvo en función del correspondiente control para cada tratamiento.

#### - Captán

Para el caso de las manzanas tratadas con Captán (tercera columna de ambas tablas), no se observa diferencia significativa de las levaduras evaluadas con el control (manzanas inoculadas solo con *P. expansum*) después de 30 días de almacenamiento, aunque la levadura 22-211 propicia la menor severidad.

En general, puede considerarse que no hubo influencia alguna del fungicida (Captán) sobre las levaduras, puesto que los resultados obtenidos son comparables a los del Testigo a 30 días, aunque podemos citar algunas excepciones, como el caso de la levadura 22-211, cuyo índice de severidad fue de 0.53 cm. y la mezcla 5vtt+22-211+38-432 en la cual éste fue de 0.56 cm. Los índices de severidad obtenidos con el Testigo para este tratamiento, fueron de 1.05 cm. y 0.73 cm., respectivamente. Este mismo comportamiento se repite, en general, después de 45 días de almacenamiento.

#### - *Bacillus* sp - *Trichoderma* sp (con desinfección)

Ninguna de las levaduras analizadas, ya sea de manera individual o en mezcla manifiesta una inhibición significativa del patógeno en ninguno de los tiempos de almacenamiento considerados (30 y 45 días). Comparando entre *Bacillus* sp-*Trichoderma* sp (con desinfección) y el Testigo a los 30 días, se tiene diferencia entre ambos tratamientos, ya que la tendencia general es que los valores de severidad mostrados por las levaduras (individuales o en mezcla) en las

manzanas desinfectadas (Tabla 4.18, cuarta columna) son superiores a los obtenidos en el Testigo (Tabla 4.18, segunda columna), a excepción de la mezcla 5vtt+22-211 (0.92 cm.). Después de 45 días de almacenamiento, los valores de severidad de las diferentes levaduras y sus mezclas son nuevamente superiores al Testigo a excepción de la levadura 5vtt.

- *Bacillus sp- Trichoderma sp* (sin desinfección)

Finalmente, para las manzanas tratadas con *Bacillus sp-Trichoderma sp* sin desinfección (quinta columna, Tabla 4.18), se tiene una inhibición significativa sobre *P. expansum* después de 30 días de almacenamiento, por parte de las levaduras 38-432 con 60.8 %, 22-211 (61.5 %) y 5vtt+22-211 (83.1 %). En general puede observarse que no hubo influencia del tratamiento *Bacillus sp- Trichoderma sp* sin desinfección sobre las levaduras, puesto que los resultados obtenidos son comparables a los del testigo, aunque ciertas levaduras en las manzanas tratadas presentan valores de severidad inferiores a los observados en el testigo; como es el caso de la 22-211 (0.57 cm.) y de la mezcla 5vtt+22-211 (0.25 cm.). Ahora, comparando entre *Bacillus sp-Trichoderma sp* sin desinfección y *Bacillus sp-Trichoderma sp* con desinfección (quinta vs. cuarta columna), se tiene que en el caso de *Bacillus sp- Trichoderma sp* sin desinfección la mayoría de las levaduras evaluadas tienen un valor de severidad menor que en el tratamiento *Bacillus sp- Trichoderma sp* con desinfección, a excepción de la mezcla 5vtt+22-211+38-432.

Después de 45 días de almacenamiento, la levadura 38-432 y la mezcla 5vtt+22-211 manifiestan porcentajes significativos de inhibición sobre *P. expansum* (46.7 % y 48 %, respectivamente). Comparando este tratamiento (quinta columna) con el Testigo (segunda columna), se aprecia que los resultados son similares en ambos tratamientos. Aunque, en el primer caso, la levadura 22-211 y la mezcla 5vtt+22-211 presentan valores de severidad inferiores a los que muestran en las manzanas no tratadas (Testigo) (1.97 cm y 1.59 cm, vs. 2.10 cm y 2.51 cm, respectivamente).

#### **4.4. Antagonismo de levaduras en manzanas tratadas con Captán**

##### **4.4.1. Selección de levaduras**

La razón de haber procedido a realizar un experimento para evaluar la tolerancia de levaduras al Captán fue que en los experimentos anteriores (ensayo de levaduras antagónicas con manzanas tratadas en el campo, inciso 4.3) no se observó ningún efecto del fungicida aplicado en

el campo, ya sea sobre las levaduras o sobre *P. expansum*. No podríamos concluir que el producto no tiene efecto sobre el hongo, puesto que existía la posibilidad de que no hubiera residuos significativos de éste en la manzana después de ocho meses de aplicado en el campo.

Dado que la prueba confirmatoria fue desalentadora (ver Tabla 4.10) se llevó a cabo en primera instancia una nueva selección de las levaduras con las cuales se iba a trabajar en esta prueba, con la finalidad de emplear levaduras diferentes a las ya estudiadas en el ensayo de levaduras antagónicas con manzanas tratadas en el campo (inciso 4.3). Específicamente se probaron las levaduras listadas en la Tabla 4.20, que habían resultado sobresalientes en las pruebas iniciales.

Los resultados obtenidos muestran que las cepas 8-121, 3-5241 y la 22-211 fueron las que mayor control ejercieron sobre *P. expansum*, presentando porcentajes de inhibición del crecimiento diametral del hongo muy elevados de (82.5 %, 77.6 % y 72.0 %, respectivamente) (Tabla 4.20), por lo cual fueron retenidas para el experimento de tolerancia al Captán, en donde se probaron solas o en mezclas. En esta prueba es también notorio que el mayor crecimiento del hongo se obtuvo cuando no se inoculó levadura alguna (control). Comparando los resultados anteriormente mencionados con los obtenidos por las mismas cepas (8-121, 3-5241 y la 22-211) en la prueba confirmatoria (ver Tabla 4.10) se puede observar que los porcentajes de inhibición son inferiores, ya que fueron de 11.8%, 13.5 % y 23.9% respectivamente.

Tabla 4.20. Efecto de diferentes levaduras aisladas en la Sierra de Querétaro sobre la severidad ocasionada por *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious'.

Levadura	Severidad (cm) <sup>a</sup>	Inhibición crec. diametral (%)	Inhibición crec. en área (%)
8-121	0.60 a	82.5	97.0
3-5241	0.77 a	77.6	94.9
22-211	0.96 ab	72.0	92.2
22-218	0.97 ab	71.7	92.0
22-421	2.13 bc	38.0	61.5
22-521	2.47 cd	28.0	48.2
22-321	2.91 cd	15.2	28.0
<b>Control</b>	3.43 d	-	-
<b>"F" (DMS)</b>	<b>7.07** (1.18)</b>		

<sup>a</sup> Promedio de 20 lesiones (cuatro lesiones por fruto) medidas después de ocho días a 26° C

\*\*=Diferencia altamente significativa (P ≤ 0.01)

Para los detalles, ver Tablas 4.2

#### 4.4.2. Ensayo en manzanas tratadas con Captán

##### A) Análisis de varianza

Se puede observar en la Tabla 4.21 que, tanto el tratamiento con Captán aplicado a las manzanas, en este caso en poscosecha, como la levadura, propician un efecto significativo sobre el crecimiento diametral de *P. expansum*. Sin embargo, la interacción de ambos factores no fue significativa.

Tabla 4.21. Valores de "F" y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable "desarrollo diametral del hongo" de los factores de estudio y su interacción

<b>Factor</b>	<b>F</b>	<b>Significancia estadística</b>
A. Tratamiento con Captán	3.43 *	0.0192
B. Levadura	4.56 **	0.0001
I. ( A x B )	0.83 n.s.	0.6845

n.s.= No significancia

\* = Diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

\*\*= Altamente significativa ( $p \leq 0.01$ )

##### B) Pruebas de medias

###### B<sub>1</sub> Efecto del tratamiento con Captán

El tratamiento que más redujo el desarrollo diametral de *P. expansum* fue aquel donde las manzanas fueron sumergidas en la solución de Captán y que fueron almacenadas por un mes de manera previa a la inoculación de las levaduras (tratamiento 1); el valor de severidad (desarrollo diametral) fue de 1.12 cm., dicho tratamiento presenta diferencia significativa con dos tratamientos (Testigo almacenado y sin almacenar) los cuales manifiestan valores respectivos de 1.61cm y 1.73 cm. Sin embargo, el tratamiento 1 no presenta diferencia significativa con el número 2 (Captán, sin almacenar), cuyo valor de severidad fue de 1.48 cm (Tabla 4.22). El Captán sin almacenar (tratamiento 2) no tiene diferencia significativa con el tratamiento número 3 y 4 (Testigo, almacenado y sin almacenar) cuyo valor de severidad fue de 1.61 y 1.73 cm. respectivamente.

Tabla 4.22. Efecto de las aplicaciones del Captán sobre el desarrollo diametral de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious', con levaduras confundidas

Tratamiento	Almacenamiento <sup>1</sup>	Severidad (cm.) <sup>a</sup>	Inhibición crec. diametral (%)	Inhibición crec. en área (%)
1.Captán	Si	1.12 a	30.4	51.7
2.Captán	No	1.48 a b	14.5	26.8
3.Testigo	Si	1.61 b		
4.Testigo	No	1.73 b		
"F" (D.M.S)		3.43* (0.40)		

<sup>a</sup> Promedio de 160 lesiones (cuatro lesiones por fruto) medida después de ocho días a 26° C. Medias con la misma letra son iguales (Student,  $\alpha \leq 0.05$ ).

\* = Diferencia significativa

D.M.S.= Diferencia Mínima Significativa

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral y en área se obtuvo en función del correspondiente testigo.

<sup>1</sup> Almacenamiento de la manzana a 1° C, durante un mes, antes de la inoculación e incubación a 26° C durante 8 días.

El hecho de que las manzanas tratadas con Captán y almacenadas durante un mes (tratamiento 1) hayan tenido un crecimiento diametral del hongo inferior al de las manzanas almacenadas sin tratar (1.12 vs. 1.61) probablemente se debe a que los residuos del producto (Captán) en la manzana tuvieron un mayor efecto inhibitor sobre el hongo que sobre las levaduras involucradas en el experimento, lo que se vería reflejado en un menor desarrollo del hongo.

Por otra parte, el hecho de que el crecimiento diametral del hongo en las manzanas tratadas con Captán haya sido superior cuando éstas no se almacenaron que al ser almacenadas (1.48 vs. 1.12), sugiere que, en el primer caso, donde podría suponerse una mayor concentración del fungicida, el tratamiento afectó más a las levaduras que al hongo, lo que disminuiría el efecto inhibitor de éstas sobre el patógeno.

Ahora bien si comparamos los promedios de los dos tratamientos sin almacenar (tratamiento 2 y 4), se observa que el crecimiento del hongo es menor cuando se aplica el Captán, lo que indicaría que el fungicida tiene un mayor efecto sobre *Penicillium expansum*.

### B<sub>2</sub> Efecto de las levaduras

Por lo que corresponde al efecto de las levaduras, lo primero que hay que destacar es que todos los tratamientos reducen significativamente el diámetro de la lesión ocasionada por *P. expansum* (Tabla 4.23), siendo el mejor la mezcla de tres levaduras (22-211+3-5241+8-121)

con un porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo de 60.1 %, equivalente en inhibición del crecimiento en área a 84.1 %.

Por otro lado, si comparamos el promedio de los valores de severidad obtenidos por las levaduras individuales con los obtenidos por todas las mezclas empleadas, se observa que estas últimas tienden a manifestar un mayor efecto antagónico sobre el crecimiento diametral del hongo. Por ejemplo: la mezcla 22-211+8-121 presenta un valor de severidad de 1.29 cm., el cual es inferior al promedio de los valores individuales de las dos levaduras involucradas en la mezcla (1.39 cm.). Este fenómeno había sido ya observado en el experimento ensayo de levaduras antagónicas con manzanas tratadas en el campo (ver Tabla 4.13 y 4.17) y coincide sensiblemente con los resultados obtenidos por Nunes *et al.* (2001).

Tabla 4.23. Efecto de las levaduras (solas o en mezclas) sobre el control de la severidad ocasionada por *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious', con aplicaciones de Captán confundidas

Levadura	Severidad (cm) <sup>a</sup>	Inhibición crec. diametral (%)	Inhibición crec. en área (%)
22-211+3-5241+8-121	0.97 a	60.1	84.1
8-121	1.28 ab	47.3	72.2
22-211+8-121	1.29 ab	46.9	71.8
3-5241+8-121	1.35 ab	44.4	69.2
22-211+3-5241	1.36 ab	44.0	68.8
22-211	1.50 ab	38.3	61.9
3-5241	1.71 b	29.6	50.4
<b>Control</b>	2.43 c	-	-
"F" (D.M.S)	4.56** (0.57)		

<sup>a</sup> Promedio de 80 lesiones (cuatro lesiones por fruto) medida después de ocho días a 26° C

\*\*=Diferencia altamente significativa (P ≤ 0.01).

Para los detalles, ver Tabla 4.2

### **B<sub>3</sub> Efecto de las levaduras en cada uno de los tratamientos de Captán**

- Testigo (almacenado)

En este tratamiento podemos observar que ninguna de las levaduras analizadas, ya sea de manera individual o en mezclas, presenta diferencia significativa con el control (manzanas inoculadas solo con el hongo) (Tabla 4.24). Los porcentajes de inhibición producidos por las levaduras 8-121, 22-211 y 3-5241 (45.0 %, 42.9 % y 12.1 %, respectivamente), resultan sensiblemente inferiores a los obtenidos por las mismas en la prueba en que fueron seleccionadas (Tabla 4.20). Lo anterior podría deberse a que el almacenamiento de las manzanas pudo haber

tenido un efecto sobre el desarrollo de las levaduras o del hongo. La disminución del poder antagonico de las levaduras en pruebas consecutivas había sido ya observada en los experimentos anteriores (Inciso 4.2.2 y 4.3.1).

Tabla 4.24. Efecto de las levaduras solas o en mezclas sobre el crecimiento diametral de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en cada uno de los tratamientos de Captán aplicados.

Levadura	Testigo (almacenada)	Captán (almacenada)	Testigo (sin almacenar)	Captán (sin almacenar)
22-211+3-5241+8-121	0.98 <sup>1</sup> a (59.2)	1.03 a (62.7) <sup>2</sup>	1.17 a (54.8)	0.71 a (63.8)
22-211+8-121	1.23 a (48.8)	1.03 a (62.7)	1.66 abc (35.9)	1.24 ab (36.7)
8-121	1.32 a (45.0)	0.81 a (70.7)	1.30 ab (49.8)	1.69 ab (13.8)
22-211	1.37 a (42.9)	0.78 a (71.7)	2.17 bc (16.2)	1.70 ab (13.3)
22-211+3-5241	1.49 a (37.9)	0.92 a (66.7)	1.84 abc (29.0)	1.20 ab (38.8)
3-5241+8-121	2.02 a (15.8)	0.85 a (69.2)	1.33 ab (48.7)	1.22 ab (37.8)
3-5241	2.11 a (12.1)	0.76 a (72.5)	1.81 abc (30.1)	2.16 b (-10.2)
Control	2.40 a	2.76 b	2.59 c	1.96 b
"F" (D.M.S)	0.91 n.s. (1.50)	3.51** (1.04)	2.14 n.s. (0.95)	1.52 n.s. (1.11)

<sup>1</sup>Promedio de 20 lesiones (cuatro lesiones por fruto) medida después de ocho días a 26° C

<sup>2</sup> Porcentaje de inhibición del crecimiento diametral (entre paréntesis) de *P. expansum*

Para los detalles, ver Tabla 4.2

El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral se obtuvo en función del correspondiente control en cada uno de los tratamientos.

#### - Captán (almacenado)

Se observa que todas las levaduras, ya sea de manera individual como en mezclas, inhiben de manera significativa a *P. expansum*, sin embargo, no se manifiestan diferencias al interior de las levaduras (Tabla 4.24).

Al comparar entre el Testigo (almacenado) y el Captán (almacenado) (segunda y tercera columnas) podemos observar que, para el segundo caso, el valor de severidad de las levaduras, a excepción de la mezcla 22-211+3-5241+8-121, es menor que en el caso del Testigo almacenado, lo cual sugiere que el Captán no está afectando a las levaduras y si está afectando al hongo, aunque esto ultimo pareciera descartarse al observar el comportamiento del control en ambas columnas (manzanas inoculadas solo con *P. expansum*); se tiene para el tratamiento Captán (almacenado) un diámetro de la lesión de 2.76 cm, valor superior al observado para el control en el tratamiento Testigo (almacenado) (2.40 cm).

#### -Testigo (sin almacenar)

Se tiene un efecto significativo de los tratamientos 22-211+3-5241+8-121, 8-121 y 3-5241+8-121 sobre el crecimiento diametral del hongo, con porcentajes de inhibición de 54.8 %, 49.8 % y 48.7 %, respectivamente. El porcentaje de inhibición alcanzado por las levaduras 8-121, 3-5241 y 22-211 es menor en este tratamiento (Testigo, sin almacenar) que en la prueba de selección realizada (ver Tabla 4.20) y, como ya se había observado anteriormente, la capacidad antagonica de las levaduras disminuye al realizar experimentos consecutivos. Comparando ambos Testigos (almacenado y sin almacenar, segunda y cuarta columna) podemos observar que el tiempo de almacenamiento de las manzanas no afecta la acción de las levaduras, puesto que los valores de severidad en ambos tratamientos son similares.

#### - Captán (sin almacenar)

En este tratamiento se puede observar que solamente la mezcla 22-211+3-5241+8-121 inhibe significativamente el crecimiento diametral del hongo (63.8 %). Al comparar el comportamiento de las distintas levaduras en las manzanas tratadas con Captán (sin almacenar) y el Testigo (sin Captán y sin almacenar), se observa que en el primer tratamiento, los diámetros de las lesiones ocasionadas por *P. expansum* son menores en la generalidad de los casos, lo que permite suponer que el fungicida tiene un mayor efecto sobre el hongo que sobre las levaduras.

Si comparamos los valores de severidad de ambos controles (manzanas inoculadas solo con *P. expansum*, columnas 4 y 5), podemos observar que el valor es menor cuando se aplica el Captán (1.96 cm vs. 2.59 cm), lo que nos indica que dicho producto esta inhibiendo el desarrollo del hongo, hecho que resulta lógico si pensamos que se trata de un fungicida.

Ahora bien, comparando el comportamiento de las levaduras en ambos tratamientos de Captán, se tiene que las diversas levaduras en el tratamiento sin almacenar propician un diámetro de la lesión superior al tratamiento en que las manzanas se almacenan, lo cual indica que el Captán en mayor concentración (cuando las manzanas no se almacenan) afecta más a las levaduras que en el caso donde la manzana es tratada con Captán, pero almacenada por un mes; con la excepción de la mezcla de levaduras 22-211+3-5241+8-121 cuyo valor de severidad (0.71 cm) es inferior cuando las manzanas no se almacenan, hecho que podría estar sugiriendo que ésta es tolerante al Captán.

También resulta lógico que, en el caso de los dos controles (sin presencia de levadura), el menor desarrollo del hongo se obtenga cuando las manzanas tratadas con Captán no fueron almacenadas antes de ser inoculadas, que en el caso donde las manzanas fueron tratadas con Captán y almacenadas por un mes; ya que el fungicida va perdiendo su efecto en el tiempo (Hubert, M. 1972) y por ello el desarrollo de *P. expansum* sea mayor en el último tratamiento mencionado.

#### 4.5. Ensayo de levaduras *in vitro* para evaluar su tolerancia al Captán

##### A) Análisis de varianza

En la Tabla 4.25 se puede observar que el factor “levadura”, la concentración empleada del Captán y la interacción de ambos factores tienen un efecto significativo en el diámetro de inhibición del área de crecimiento, observada alrededor del disco de papel.

Tabla 4.25. Valores de “F” y significancia estadística en el análisis de varianza para la variable “diámetro de inhibición del área de crecimiento” de los factores de estudio y su interacción

Factor	“F”
A. Levadura	28.32 **
B. Concentración de Captán	138.10 **
C. (A x B)	4.41 **

\*\*= Diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ )

##### B) Pruebas de medias

###### *B<sub>1</sub>* Efecto de las levaduras

Todas las cepas de levaduras evaluadas fueron inhibidas por el Captán, formando un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de papel impregnado con el fungicida. La levadura 22-211 resultó ser la menos sensible, con un diámetro de inhibición de 2.29. El hecho de que las distintas levaduras analizadas hayan presentado una respuesta diferente al fungicida podría deberse a la capacidad de adaptación de cada una de ellas al medio ambiente que les rodea; ya que los microorganismos se mantienen en la naturaleza porque disponen de mecanismos genéticos y fisiológicos que les confieren capacidad de adaptación a su ambiente (Fernández, 2000) (Tabla 4.26). El encontrar levaduras tolerantes al Captán resultaría provechoso dado que dicho producto es un fungicida empleado para el control de muchas enfermedades que se presentan durante el cultivo del manzano (por ejemplo la roña), residuos de este fungicida se tienen en la manzana cosechada y por lo tanto al requerirse la aplicación de un método de control

para las enfermedades que se presentan en poscosecha sobre la manzana; se necesita que dicho método sea compatible o en este caso tolerante a los residuos del captán.

Tabla 4.26. Diámetro de inhibición del crecimiento de la cepa de levadura, con concentraciones de Captán confundidas

Levadura	Diámetro de inhibición (mm) <sup>1</sup>
22-211	2.29 a
8-121	2.67 b
3-5241	2.68 b
5vtt	2.73 b c
38-432	2.79 c
“F” (DMS)	28.3** (0.10)

<sup>1</sup>Diámetro de inhibición del área de crecimiento alrededor del disco de papel. Promedio de 240 halos de inhibición (20 halos por placa) medida después de 48 h a 26° C.

### ***B<sub>2</sub> Efecto de la concentración de Captán***

En la tabla 4.27 se puede observar que, a mayor concentración de Captán, el diámetro del halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de papel fue mayor; aunque no hay diferencia significativa entre las concentraciones 1000 y 1500 ppm. El Captán, siendo un fungicida, actúa sobre hongos, inhibiendo la germinación de esporas, en este caso se trata de levaduras que están consideradas dentro del Reino de los hongos por lo cual es comprensible que a mayor concentración del fungicida, mayor diámetro de inhibición del área de crecimiento se observe.

Tabla 4.27. Efecto de las concentraciones empleadas de Captán, sobre el diámetro de inhibición del área de crecimiento, con levaduras confundidas

Concentración de Captán (ppm)	Diámetro de inhibición (mm) <sup>1</sup>
500	2.06 a
1500	2.72 b
1000	2.80 b
2000	2.94 c
“F” (DMS)	138.10** (0.09)

<sup>1</sup>Diámetro de inhibición del área de crecimiento alrededor del disco de papel. Promedio de 300 halos de inhibición (20 halos por placa) medida después de 48 h a 26° C.

### C) Efecto de la interacción

En la Figura 4.1 se puede observar que la levadura 22-211 manifiesta los menores niveles de inhibición en cada una de las concentraciones de Captán aplicadas. Conforme a lo esperado, el diámetro de inhibición se incrementa en la medida que aumenta la concentración de Captán hasta 1500 ppm, aunque llama fuertemente la atención la disminución que se presenta con 2000 ppm) en la levadura 22-211. En el caso de las levaduras 8-121, 3-5241, 5vtt y 38-432, el comportamiento observado es que al incrementar la concentración empleada del Captán, se aumenta el diámetro de inhibición del área de crecimiento a excepción de la concentración correspondiente a 1500 ppm de Captán, en donde se tiene una disminución en el diámetro de inhibición; siendo la levadura 3-5241 la que menor diámetro de inhibición presenta después de emplear una concentración de Captán de 1500 ppm.

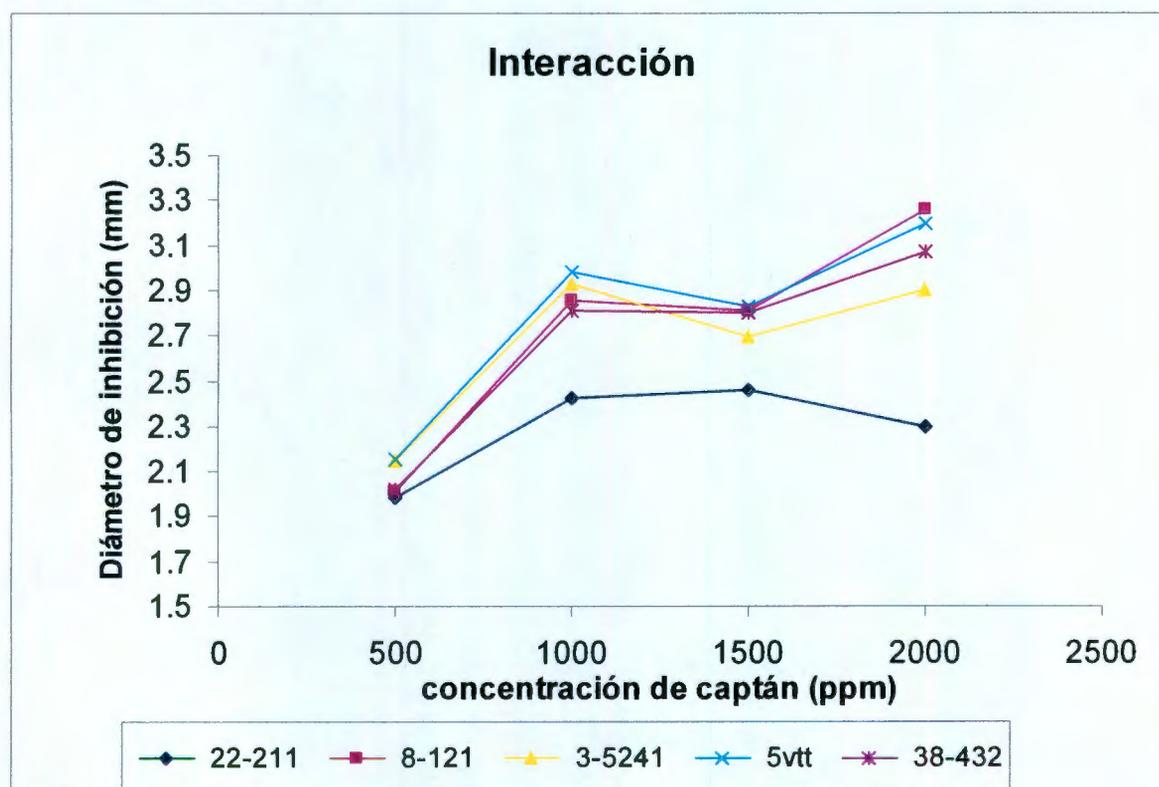


Figura 4.1. Interacción entre el factor levadura y la concentración aplicada de Captán sobre el diámetro de inhibición del área de crecimiento.

#### 4.6. Identificación de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. en manzanas tratadas en el campo

Con la finalidad de poder elucidar la hipótesis de que los microorganismos asperjados en el campo para el control de enfermedades en precosecha (*Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp.) pudieran estar actuando de manera sinérgica con las levaduras inoculadas en las manzanas para reducir aún más el desarrollo de *Penicillium expansum*, tal como se observó en las Tablas 4.12 y 4.14, se buscó detectar la presencia de estos microorganismos tanto de manzanas tratadas con dichos microorganismos, como de manzanas no tratadas.

De las manzanas tratadas con microorganismos en el campo se logró el aislamiento y la identificación de *Bacillus* sp. en cajas de Petri que contenían Agar nutritivo y Agar nutritivo acidulado, aislándose también *Trichoderma* sp. en este último medio de cultivo. La identificación de ambos microorganismos se realizó mediante la observación de su morfología colonial y microscópica por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales, basándonos en manuales especializados (Figura 4.2).

Por el contrario, en las manzanas no tratadas con microorganismos en el campo (Testigo), no lograron aislarse dichos microorganismos. Estos resultados demuestran que los microorganismos aplicados en el campo se mantuvieron viables en el fruto después de siete meses de almacenamiento y apoyan la teoría de que alguno o ambos de los microorganismos aplicados en precosecha (*Bacillus* y/o *Trichoderma*), pudieran ser los responsables del incremento del poder antagónico observado en las levaduras para el control de *P. expansum* (ver Tablas 4.12 y 4.14).

TESTIGO



A) *Alternaria* sp.A)

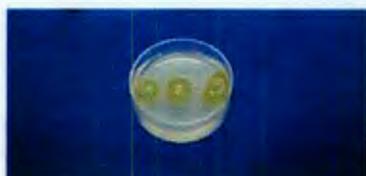


B) *Penicillium* sp.



C) *Penicillium* sp.

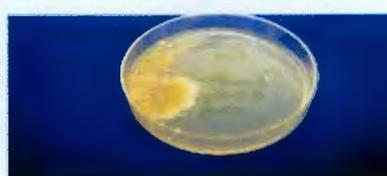
CONTROL BIOLÓGICO



A) *Penicillium* sp.



B) *Bacillus* sp.



C) *Trichoderma* sp.

Figura 4.2. Microorganismos aislados de manzanas asperjadas con *Bacillus* sp.- *Trichoderma* sp. en el campo y sin tratar. Aislados en diferentes medios de cultivo: A) Agar Papa Dextrosa; B) Agar nutritivo; C) Agar nutritivo acidulado

**4.7. Identificación de levaduras con capacidad antagónica**

Mediante la utilización del sistema Biolog pudieron ser identificadas solamente dos de las cuatro cepas de levaduras consideradas sobresalientes, en los diferentes experimentos realizados, a saber: 22-218 en las pruebas iniciales por grupos, 22-211 en la prueba confirmatoria, y 3-5241 y 8-121 en la prueba de selección de levaduras para evaluar el comportamiento en presencia de Captán.

El sistema Biolog especifica que se requiere de un índice de similitud  $\geq 0.5$  con la base de datos del sistema, para que la lectura de la especie sea considerada confiable. Los resultados se presentan en la Tabla 4.28.

Tabla 4.28. Cepas de levaduras identificadas por el sistema Biolog

Cepa	Especie	Probabilidad	Similitud	Distancia genética
22-211	<i>Pichia guilliermondii</i>	100 %	0.828	2.58
3-5241	<i>Saccharomyces boulardii</i>	100 %	0.93	1.0
8-121	-	-	-	-
22-218	-	-	-	-

A continuación se mencionan algunas de las características biológicas más importantes de las especies identificadas y el poder antagónico de cepas de estas especies estudiado en otras investigaciones.

#### **- *Pichia guilliermondii***

Se presentan colonias pequeñas, de color blanco a crema y de consistencia cremosa. La forma de las células varía, pudiendo ser elipsoidal o cilíndrica. Se reproduce asexualmente, por gemación, formando en la mayoría de los casos pseudomicelios. En su estado sexual produce ascas que contienen de una a cuatro ascosporas (ocasionalmente puede tener más de cuatro). La forma de las ascosporas puede ser esférica, de sombrero o de saturno. Dentro de otros sinónimos con los cuales es encontrada, se tienen: *Yamadazyma guilliermondii*, *Candida guilliermondii* variedad *carpophila* (Barnett y Pankhurst, 1974). Esta levadura puede ser encontrada en exudados de árboles y néctar de flores, así como en la superficie de frutas sanas y dañadas (Alexopoulos, 1979). Ha sido utilizada por diferentes investigadores para el control de enfermedades de poscosecha en frutas tales como manzanas (pudrición azul, pudrición gris), uva (pudrición gris, pudrición ocasionada por *Rhizopus*), tomate (pudrición gris, pudrición *alternaria*), cítricos (pudrición verde) (Wisniewski y Wilson, 1992), entre otros.

#### **- *Saccharomyces boulardii***

Se observan colonias de color blanco a crema con una textura cremosa. La forma de las células puede ser cilíndrica, ovalada, esférica o elongada. Se reproducen por gemación formando algunas veces pseudomicelios. En su estado sexual forman ascas las cuales rara vez contienen más de cuatro ascosporas de forma esferoidal (Barnett y Pankhurst, 1974). Tienen una alta capacidad fermentadora. Esta especie puede ser encontrada en sustratos que contienen azúcar como el néctar de las flores y la superficie de frutas, así como en el suelo y en la leche (Alexopoulos, 1979). Es considerada benéfica para el intestino humano puesto que lo protege del establecimiento de microorganismos patógenos, como es el caso de algunas bacterias, amibas y *Candida* (Aegis, 2004).

## V. CONCLUSIONES

### Selección de levaduras con potencial antagónico

- Las levaduras que presentaron el mayor poder antagónico sobre *P. expansum* en las pruebas iniciales, fueron las siguientes: 22-218 con 80.1 %, seguida de 22-321 (63.6 %), 22-211 (62.1%), 22-421 (52.4%), 8-121 (25.3%), 22-521 (24.8%), y 3-524 (13%).
- Cinco de las mejores cepas fueron aisladas de una sola muestra, la número 22.
- La cepa 22-211 ejerció el mayor control sobre *P. expansum* en la prueba confirmatoria, con 23.9 % de inhibición del crecimiento diametral del hongo valor inferior al presentado por esta cepa en la prueba previa.

### Ensayo de levaduras antagónicas con manzanas tratadas en el campo

- La aplicación en el campo de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp., sin desinfección de las manzanas de manera previa a la inoculación de las levaduras, presentó una inhibición significativa del desarrollo diametral de *P. expansum* a 26° C.
- La aplicación de Captán en el campo no influye sobre el poder antagónico contra *P. expansum* de las levaduras en poscosecha.
- Las mezclas de levaduras tienden a inhibir el crecimiento del hongo en mayor medida que el promedio de las levaduras individuales que componen las mezclas.
- El tratamiento que propició el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo fue la mezcla 5vtt + 22-211.
- La aplicación de microorganismos en el campo (*Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp.) tiende a potenciar el poder antagónico de las levaduras (efecto sinérgico), ya que cuando se inocula el hongo en ausencia de la levadura, no se evidencia un efecto de dichos microorganismos.
- Solamente la levadura 38-432 propició un control significativo sobre el patógeno después de 30 días de almacenamiento a 1° C.

### **Antagonismo de levaduras en manzanas tratadas con Captán**

- La aplicación de Captán en las manzanas afecta más al hongo que a la levadura cuando las manzanas son almacenadas en frío durante un mes, así como, cuando la inoculación se realiza inmediatamente después del tratamiento con Captán.
- El tratamiento que propició el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento diametral del hongo fue la mezcla 22-211 + 3-5241 + 8-121.

### **Ensayo de levaduras *in vitro* para evaluar su tolerancia al Captán**

- Las cinco cepas de levaduras analizadas fueron inhibidas por el Captán, observándose que la levadura 22-211 resultó la menos sensible a dicho producto.
- Conforme aumenta la concentración de Captán empleada, el diámetro de inhibición del crecimiento de la levadura es mayor.

### **Microorganismos identificados**

- Los microorganismos aplicados en precosecha (*Bacillus* sp- *Trichoderma* sp) son capaces de sobrevivir en las manzanas después de que éstas permanecen siete meses almacenadas; ya que lograron aislarse de manzanas tratadas en campo con dichos microorganismos y que permanecieron almacenadas (siete meses en cámara frigorífica) de manera previa a su utilización, mas no fue el caso para manzanas almacenadas, pero no tratadas en campo.
- La identificación de dos de cuatro microorganismos antagónicos estudiados fue posible mediante la utilización del sistema *Biolog*; habiendo sido reconocida la cepa 22-211 como *Pichia guilliermondii* y la cepa 3-5241, como *Saccharomyces boulardii*.

### **Recomendaciones para futuros trabajos de investigación**

- Trabajar con manzana recién cosechada o que no tenga más de tres a cinco meses de almacenada.
- Realizar la aplicación de las mejores levaduras reportadas en este trabajo en manzanas sobre las cuales no se realicen heridas, llevando a cabo el experimento en cámara frigorífica (1° C).

## VI. BIBLIOGRAFÍA

**Aegis**, 2004. Internet: <http://www.aegis.com>

**Agrios**, N. G. 1988. Plant Pathology. 3<sup>a</sup> Ed. Academic Press. San Diego, California. pp: 393-398.

**Agrios**, N. G. 1991. Fitopatología. 2<sup>a</sup> Ed. Limusa. México, D. F. pp: 150-159.

**Alexopoulos**, C. J. and Mims, C. W. 1979. Introductory Micology. 3<sup>a</sup> Ed. Sons. Estados Unidos. pp: 259, 265-268.

**Álvarez**, R. S. 1996. El manzano. Publicaciones de Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 4<sup>a</sup> Ed. Madrid, España. pp: 227-473.

**Arevalo**, B. 1979. Fruticultura. Ed. Landívar. Guatemala. pp: 12-16.

**Barnett**, J. A. and Pankhurst, R. J. 1974. A new key to the yeasts. Ed. North Holland. New York. pp: 158-159.

**Blakeman**, J. P. and Fokkema, N. J. 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. *Phytopathology* 20: 167-192.

**Burdon**, L. K. y Williams, P. R. 1986. Microbiología. Ed. Publicaciones Cultural. México. pp: 255-259.

**Calderón**, A. E. 1987. Fruticultura General: El esfuerzo del hombre. 3<sup>a</sup> Ed. Limusa. México, D.F. pp: 312-328.

**Caltzontzin**, F. K. 2003. Evaluación de fungicidas y antagonicos naturales para el control de las enfermedades fungosas del fruto de manzano (*malus domestica*) en huertos establecidos en los municipios de San Joaquín y Cadereyta, Qro. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. pp: 16, 24-35.

**Castillo**, José 2003 (UAQ) Comunicación personal.

**Chet**, I. and Baker, R. 1981. Isolation and Biocontrol Potential of *Trichoderma hamatum* from Soil Naturally Suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290.

**CONAFRUT**, 1972. Anuario Estadístico de la Producción Frutícola en México. Ed. Comisión Nacional de Fruticultura. pp: 3-7.

**Corrales**, 1989. Apuntes Inéditos de Fisiología de Poscosecha. Universidad Autónoma de Chapingo. México.

**Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E. and Viñas, I. 2001.** Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology-Biotechnology* 56: 367-371.

**DeBach, P. 1979.** Control Biológico de las Plagas de Insectos y Malas Hierbas. Ed. Continental. México, D. F. pp: 31-32, 49-52, 70, 153-155, 715-717, 726-729, 734-736.

**Delahaye, T. et Vin, P. 1997.** Le pommier. Ed. Actes Sud. Francia. pp: 9-14.

**Emlab, 2004.** Internet: <http://www.emlab.com>

**Enciclopedia Salvat, 1970.** Ed. Pamplona. Tomo 6. Barcelona. pp: 480-482.

**Fagro, 2003.** Internet: <http://www.fagro.edu>

**FAO. 2003.** FAOSTAT. Internet: <http://apps.fao.org>

**Fernández, E. E. 2000.** Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Editado por la Universidad Autónoma de Querétaro. México. pp: 17.

**Fidler, J. C., Wilkinson, B. G., Sharples, R. O. and Edney, K. L. 1973.** The Biology of Apple and Pear Storage. Ed. CAB. Gran Bretaña. pp: 135-137.

**Frobisher, M. 1969.** Microbiología. Ed. Salvat, S. A. Barcelona. pp: 473-476.

**González, P. A., Sáenz, A., Gómez, A. y Caamal, I. 1999.** Producción y Comercialización de Manzana en México. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Universidad Autónoma de Chapingo, México. pp: 1-8, 18-22, 24, 27-29, 72, 81-84.

**Hadar, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1979.** Biological Control of *Rhizoctonia solani* Damping-Off with Wheat Bran Culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 69: 64-68.

**Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet, I. 1996.** Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*. 86(9): 980-985.

**Hubert, M. 1972.** Insecticide and fungicide handbook. 4<sup>a</sup> Ed. Blackwell. Great Britain. pp: 24-30.

**INEGI. 1998.** Cultivos Perennes de México. VII Censo Agropecuario, pp: 191-199.

**INEGI. 1999.** Anuario Estadístico del Estado de Querétaro. Cultivos perennes de México. VII Censo Agropecuario. pp: 191.

**Inlandfruit, 2003.** Internet: <http://www.inlanfruit.com>

**Janisiewicz, W. J. and Roitman, J. 1988.** Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*. 78: 1697-1700.

**Janisiewicz, J. W. and Bors, B.** 1995. Development of a Microbial Community of Bacterial and Yeast Antagonists to Control Wound-Invading Postharvest Pathogens of Fruits. *Applied and Environmental Microbiology* 61(9): 3261-3267.

**Janisiewicz, J. W.** 1996. Ecological Diversity, Niche Overlap, and Coexistence of Antagonists Used in Developing Mixtures for Biocontrol of Postharvest Diseases of Apples. *Phytopathology* 86 (5): 473-479.

**Juscafresa, B.** 1971. *El Peral y el Manzano*. Ed. Serrahimo y Urpi. Barcelona. pp: 59.

**Juscafresa, B.** 1973. *Árboles Frutales*. Ed. Aedos. Barcelona. pp: 231-235.

**Kearneysville, 2003.** Internet: <http://www.Kearneysville.edu>

**Kim, D., Cook R. J. and Weller, M. D.** 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for Biological Control of Three Root Diseases of Wheat Grown with Reduced Tillage. *Phytopathology* . 87(5): 551-558.

**Leibinger, W., Breuker, B., Hahn M. and Mendgen, K.** 1997. Control of Postharvest Pathogens and Colonization of the Apple Surface by Antagonistic Microorganisms in the Field. *Phytopathology*. 87(11): 1103-1110.

**Leveretz, B., Janisiewicz, J. W. and Conway, S. W.** 2000. Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of Gala apples. *Postharvest Biology and Technology* 21: 87-94.

**Martínez, P. R. y Pérez M. M.** 1997. Efecto de la época de trasplante del portainjerto y de la fecha de injertación sobre la calidad de la planta de manzano propagada en maceta. *Querétaro. Época II, año XII, No. 138*. pp: 42-46.

**McLaughlin, R., Chalutz, E. y Droby, S.** 1991. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection* 10: 172-177.

**Meheriuk, M., Prarge, R. K., Lidster, P.D. and Porrit, S. W.** 1994. *Postharvest Disorders of Apples and Pears*. Canada. pp: 65-68.

**Molina, F. M. y Duran, T. S.** 1970. *Frigoconservación y manejo de frutas, flores y hortalizas*. Ed. AEDOS. Barcelona, España. pp: 75-78.

**Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R. and Viñas, I.** 2001. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on Apples and Pears with the Combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *Journal of Food Protection* 65(1): 178-184.

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

**Ortíz, B. R.** 1996. Aspectos relevantes en el manejo de enfermedades fungosas. Ed. CIBA. México, D.F. pp: 1-41.

**Parra, Q. R. A.** 1999. Crecimiento, relaciones hídricas y nutrimentales en portainjertos de manzano. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México. pp: 16-19.

**Pelczar, J. M.** 1997. Microbiología. 4ª Ed. Estados Unidos. pp: 271-287.

**Phaff, H. J. and Miller, M. W.** 1978. The Life of Yeasts. 2ª Ed. London. pp: 285, 287, 311, 313.

**Pusey, L. P. and Wilson, L. C.** 1984. Postharvest Biological Control of Stone Fruit Brown Rot by *Bacillus subtilis*. Plant Disease 68: 753-756.

**Pusey, L. P., Wilson, L. C., Hotchkiss, W. M. and Franklin, D. J.** 1986. Compatibility of *Bacillus subtilis* for Postharvest Control of Peach Brown Rot with Commercial Fruit Waxes, Dicloran, and Cold-Storage Conditions. Plant Disease 70: 587-590.

**Ramírez, H. y Cepeda, M.** 1993. El manzano. 3ª Ed. Trillas. México, D.F. pp: 160.

**Rebour, H.** 1971. Frutales Mediterráneos. 2ª Ed. Mundi- Prensa. Madrid. pp: 128-130.

**Salunkhe, D. K. and Desai, B. B.** 1984 Postharvest Biotechnology of Fruits. Ed. Press. Vol. 1. Estados Unidos. pp: 125, 131-134.

**Salunkhe, D. K., Bolin, H. R. and Reddy, N. R.** 1991. Storage, Processing and Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. 2ª Ed. Press. Vol. 1. Estados Unidos. pp: 243-247, 251-252, 269-271.

**Salunkhe, D. K. and Kadam, S. S.** 1995. Handbook of Fruit Science and Technology. Ed. Dekker. New York. pp: 93-94, 96-98, 103-105, 109-112.

**Sánchez, V. S. E.** 2001. Evaluación de la Calidad y la Evolución en almacenamiento de variedades de manzana (*Malus spp.*) establecidas en Cadereyta, Qro. Tesis de Licenciatura. Escuela de Quimicofarmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. pp: 3-35.

**Sánchez, V. S.** 2004. Antagonismo de Levaduras nativas de manzana producida en la sierra de Querétaro contra *Penicillium expansum* Link. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. pp: 32-90.

**Sivanesan, A.** 1984. The Bitunicate Ascomycetes. Ed. Cramer. Germany.

**SAGARPA,** 2004. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. pp: 37-41.

**Skidmore, A. M.** 1976. Interactions in relation to biological control of plant pathogens. *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Ed. Academic Press. Londres. pp: 507-528.

**Snowdon, L. A.** 1990. *Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Colour Atlas*. Press, INC. Florida. pp: 172-200.

**Teixidó, N., Usall, J. and Viñas, I.** 1999. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 203-210.

**Trillot, M., Masseron, A. et Tronel, C.** 1993. *Le pomme, les variétés*. Ed. Tec. Doc. París, Francia. 203 pp: 11-32.

**Usall, J., Teixidó, N., Nunes, C. y Viñas, I.** 1996. Los tratamientos de biocontrol. Una alternativa real. *Revista: Fruticultura Profesional*. 82: 40-52.

**Usall, J., Teixidó, N., Fons, E. and Viñas I.** 2000. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 58: 83-92.

**Usall, J., Teixidó, N., Torres, R. and Ochoa, X.** 2000. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 21: 147-156.

**USDA.** 1978. *Biological Agents for Pest Control*. U. S. Department of Agriculture. Washington. pp: 7-19, 24-26, 40-54.

**Vegparadise,** 2003. Internet: <http://www.vegparadise.com>

**Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N. and Sanchís, V.** 1997. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*. 40: 9-16.

**Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Abadías M. y Torres, R.** 2001. Control biológico de mohos en poscosecha de frutas. *Revista: Horticultura*. pp: 90-100.

**Weichmann, J.** 1987. *Postharvest Physiology of Vegetables*. Ed. Dekker. Nueva York. pp: 305, 319.

**Westwood, N. M.** 1993. *Temperature-Zone Pomology*. 3<sup>a</sup> Ed. Timber Press. Singapur. pp: 336-338.

**Wilson, L. C., El-Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J. Y. and Khan, V.** 1994. Potential of induced Resistance to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. *Plant Disease*. 78: 837-844.

**Wilson, L. C. and Lawrence, P.P.** 1985. Potential for Biological Control of Postharvest Plant Diseases. *Plant Disease*. 69 (5): 375-378.

**Wills, R. B., Mc Glasson, W. B., Graham, D. and Lee, T. H. 1988. Postharvest. Ed. Avi. China. pp: 16-27, 34-36.**

**Wisniewski, E. M. and Wilson, L. C. 1992. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Recent Advances. Hort Science. 27(2): 94-98.**