



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**

**CAPACIDAD ANTAGÓNICA A 4 °C Y MECANISMOS DE
ACCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS CONTRA *Penicillium
expansum* LINK EN MANZANA EN POSCOSECHA**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

SERGIO RIVERA AVALOS

Querétaro, Qro. Enero de 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROPAC

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**CAPACIDAD ANTAGÓNICA A 4 °C Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LEVADURAS
NATIVAS CONTRA *Penicillium expansum* LINK EN MANZANA EN POSCOSECHA**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

SERGIO RIVERA AVALOS

Dirigida por

Dr. RAMÓN ÁLVAR MARTÍNEZ PENICHE

SINODALES

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche
Presidente

Dr. Eduardo Fernández Escartín
Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal

Dr. Edmundo Mercado Silva
Suplente

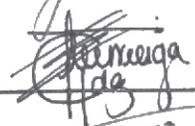
M en C. Gustavo Comejo Pérez
Suplente



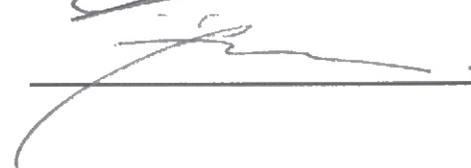
Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química













Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero, 2009
México

RESUMEN

La falta de experiencia en el almacenamiento de la manzana en Querétaro, México propicia pérdidas debidas a daños provocados por *Penicillium expansum* Link, causante de la pudrición azul. El uso de fungicidas sintéticos para controlar las pudriciones no es muy aceptado por lo que actualmente se prueban levaduras antagonicas. El comprender su modo de acción proporciona una base segura para seleccionar nuevos antagonistas. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la capacidad antagonica de levaduras nativas contra *P. expansum* a distintas temperaturas y estudiar algunos de sus posibles mecanismos de acción. Se inocularon manzanas ‘Golden Delicious’ con una suspensión de esporas del hongo en cuatro heridas equidistantes donde posteriormente se inocularon concentraciones conocidas de 50 levaduras antagonicas, midiéndose la incidencia del hongo después de un tiempo de incubación. La antibiosis se evaluó mediante antibiogramas *in vitro* e *in vivo*. La competencia por nutrientes se evaluó mediante placas de cultivo de tejidos con cilindros conteniendo insertos con membrana en un extremo, con lo cual se simuló una fruta herida. Diez cepas de levadura redujeron el diámetro de la lesión en las manzanas en más de 60% después de 10 días de incubación a 27 °C, siendo las más sobresalientes: 38-432 (80 %), 22-111(65%), 24⁻²_{3a} (75%) y 22⁻²_{4a} (90 %), mientras que a 4 °C las cepas 22⁻²_{4a} 38-432 y 22-111 inhibieron al hongo en más de 95% después de 90 días de almacenamiento; sin embargo, no se observó una correlación significativa del comportamiento de las levaduras a esas dos temperaturas ($r = 0.49$). Ninguno de los 50 antagonistas estudiados produjo sustancias antimicóticas. Por lo que respecta a la competencia por nutrientes, la germinación de los conidios de *P. expansum* fue de alrededor de 95% en todos los medios en ausencia de las levaduras; reduciéndose significativamente (10 a 20%) en presencia de cualquiera de las cuatro levaduras evaluadas. Cando la cepa 22-111 fue separada del hongo en el medio por la membrana semipermeable, la germinación de conidios de *P. expansum* se incrementó significativamente (89%) en todos los medios, lo que supone una interacción directa del antagonista con el hongo. Por el contrario, en las cepas 38-432, 24⁻²_{3a} y 22⁻²_{4a} el índice de germinación de *P. expansum* no se incrementó cuando éstas se separaron por la membrana semipermeable, lo que sugiere la competencia por nutrientes como principal modo de acción; el medio nutricional de la manzana podría ser propicio a estas levaduras, que colonizan rápidamente los tejidos de la fruta y así compiten favorablemente con el patógeno.

(Palabras clave: *Levaduras antagonicas*, *Penicillium expansum* Link, *manzana*, *poscosecha*, *control biológico*)

SUMMARY

Lack of experience in the storage of apples in Queretaro, México, leads to losses due to damage provoked by *Penicillium expansum* Link which causes blue mold. The use of synthetic fungicides to control infections is not well accepted and, for this reason, tests are currently being made with antagonistic yeast. Understanding how they work provides a safe basis for selecting new antagonists. The objectives of this work were to evaluate the antagonistic capacities of native yeast against *P. expansum* at different temperatures and to study some of the possible action mechanisms. 'Golden Delicious' apples were inoculated with a suspension of fungus spores in four wounds that were equidistant. After, and in the same places, known concentrations of 50 antagonistic yeasts were inoculated, measuring the incidence of the fungus after and incubation period. The antibiosis was evaluated using antibiograms *in vitro* and *in vivo*. Competition for nutrients was evaluated through culture plates of tissues with cylinders containing inserts with a membrane and one end; with this an injured piece of fruit was simulated. Ten strains of yeast reduced the diameter of the lesion in the apples by more than 60% after 10 days of incubation at 27 °C. The most outstanding were: 38-432 (80%), 24⁻²_{3a} (75%) and 22⁻²_{4a} (90%). At 4 °C the strains 22⁻²_{4a}, 38-432 and 22-111 inhibited the fungus by more than 95% after 90 days of storage. Nevertheless, no significant correlation regarding behavior of the yeasts at those two temperatures ($r= 0.49$) was observed. None of the 50 antagonists studied produced antimycotic substances. Regarding competition for nutrients, the germination of the *P. expansum* spores was approximately 95% in all the media in the absence of yeasts, being reduced significantly (10 to 20%) in the presence of any of the four yeasts evaluated. When the 22-111 strain was separated from the fungus in the middle by a semi-permeable membrane, the germination of *P. expansum* spores increased significantly (89%) in all the media. This leads to the supposition of a direct interaction between the antagonist and the fungus. On the other hand, in the 38-432, 24⁻²_{3a} and 22⁻²_{4a} strains, the rate of germination of *P. expansum* did not increase when they were separated by the semi-permeable membrane. This suggests competition for nutrients as a principal means of action. The nutritional medium of the apple could be propitious for these yeasts which rapidly colonize the fruit's tissues and thus favorably compete with the pathogen.

(Key words: antagonistic yeasts, *Penicillium expansum* Link, apple, postharvest, biological control)

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo pude concluir con este objetivo de mi vida. A mis padres y hermana por su apoyo y confianza. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante. A mi padre por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre. A mi madre por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos, enseñanzas y amor.

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su aporte científico y humano han colaborado a la realización de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que han hecho posible la realización del trabajo presentado en esta memoria de tesis por la ayuda económica brindada, para el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y para la Universidad Autónoma de Querétaro. Gracias por la ayuda y confianza en mi depositada.

Gracias a mi asesor Ramón Alvar

Por permitirme ser parte del grupo de trabajo. Tus consejos, paciencia y opiniones sirvieron para que me sienta satisfecho en mi participación dentro del proyecto de investigación.

Gracias a cada uno de los Profesores

Que participaron en mi desarrollo profesional durante esta etapa, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

Gracias a mis padres Sergio y Minerva

Por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación. Creo ahora entender porque me obligaban a terminar mi tarea antes de salir a jugar, y muchas cosas más que no terminaría de mencionar.

Gracias a mi hermana Sonia

Por tus comentarios, sugerencias y opiniones. Además de ser una buena amiga eres la mejor compañía para compartir el mismo techo.

Gracias a mis amigos

Juan, Julián, Miriam, Sandra, Paola y Mari; por hacer que cada pedazo de tiempo fuera ameno. No voy a olvidar sus consejos, enseñanzas y ayuda durante el lapso de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Antecedentes e importancia del cultivo del manzano	3
2.1.1. Origen	3
2.1.2. Importancia económica y distribución geográfica	3
2.2. Botánica del manzano	5
2.2.1. Taxonomía	5
2.2.2. Anatomía	5
2.2.3. Fisiología	6
2.2.3.1. Ciclo vegetativo	6
2.2.3.2. Floración y fecundación	6
2.2.3.3. Desarrollo del fruto	7
2.2.4. Variedades	8
2.3. Requerimientos edafoclimáticos o ecológicos	10
2.4. Aspectos culturales	10
2.4.1. Propagación	10

2.4.2. Plantación	11
2.4.3. Riego	12
2.4.4. Fertilización	12
2.4.5. Poda	13
2.4.6. Aclareo	13
2.4.7. Recolección	14
2.4.8. Manejo en poscosecha de la manzana	14
2.5. Almacenamiento de la manzana	15
2.5.1. Refrigeración	16
2.5.2. Películas cubrientes	17
2.5.3. Atmósferas controladas y modificadas	17
2.5.4. Daños durante el almacenamiento	18
2.6. El género <i>Penicillium</i>	20
2.6.1. Introducción	20
2.6.2. Descripción, morfología e identificación	21
2.6.3. Biología y Hábitat	23
2.6.4. Mecanismo de infección de <i>Penicillium</i> en la manzana	23
2.7. Métodos de control de enfermedades en poscosecha	24
2.7.1. Antecedentes	24
2.7.2. Estrategias de control	25
2.7.3. Sistemas alternativos	27
2.8. Control biológico	29
2.8.1. Definición y antecedentes	29
2.8.2. Utilización de levaduras	30
2.8.3. Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol	31
2.8.4. Características de un antagonista ideal	35
2.8.5. Uso integral de métodos de control para enfermedades en poscosecha	36

2.8.6. Los antagonistas en atmosferas controladas	37
2.8.7. Etapas de un programa de control biológico	38
2.8.8. Situación actual y perspectivas de la utilización de agentes de biocontrol	40
III. OBJETIVOS	43
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1. Material biológico	44
4.1.1. Frutos	44
4.1.2. Levaduras	45
4.1.3. <i>P. expansum</i> Link	45
4.2. Esquema general de trabajo	46
4.3. Preparación de inóculos	47
4.3.1. <i>P. expansum</i>	47
4.3.2. Levaduras	47
4.4. Resistencia a <i>P. expansum</i> de distintos genotipos de manzana	48
4.4.1. Metodología	48
4.4.2. Diseño del experimento	48
4.5. Evaluación del antagonismo de levaduras contra <i>P. expansum</i>	49
4.5.1. Metodología	49
4.5.2. Diseño del experimento	49
4.6 Evaluación del mecanismo de acción de las levaduras sobre <i>P. expansum</i>	50
4.6.1. Determinación de la producción de sustancias antimicóticas (antibiosis)	50
4.6.2. Estudio de la competencia por nutrientes	51
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	53
5.1. Resistencia a <i>Penicillium expansum</i> de distintos genotipos de manzana	53
5.1.1. Ensayo realizado al momento de la cosecha de cada genotipo	53
5.1.2. Ensayo realizado una vez que todos los genotipos fueron cosechados	54

5.1.3. Análisis de correlación	56
5.2. Evaluación del antagonismo de distintas cepas de levaduras contra <i>Penicillium expansum</i>	58
5.2.1. Evaluación del poder antagónico a temperatura ambiente	59
5.2.2. Evaluación del poder antagónico a temperatura de refrigeración	61
5.2.3. Correlación entre los ensayos a 27 y 4°C de almacenamiento	65
5.3. Evaluación de algunos mecanismos de acción de las levaduras sobresalientes sobre <i>P. expansum</i>	67
5.3.1. Determinación de la producción de sustancias antimicóticas (antibiosis)	68
5.3.2. Estudio de la competencia por nutrientes	71
VI. CONCLUSIONES	85
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
2.1. Clasificación científica del manzano	5
2.2. Principales tipos de irrigación para el manzano	12
2.3. Requerimientos nutricionales del manzano	13
4.1. Genotipos de manzanas cultivados en la sierra de Querétaro.	44
4.2. Cepas de levadura utilizadas en este estudio	45
5.1. Desarrollo diametral (cm) de <i>P. expansum</i> en diferentes genotipos de manzana evaluados al momento de su cosecha	54
5.2. Desarrollo diametral (cm) de <i>P. expansum</i> en diferentes genotipos de manzana almacenada evaluados cuando todos fueron cosechados	55
5.3. Análisis de correlación simple por pares del desarrollo del hongo en distintas condiciones de tiempo y distintos genotipos de manzana	57
5.4. desarrollo diametral (cm) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura en manzana almacenada por 10 días a 27° C	60
5.5. Diámetro de desarrollo (cm) de <i>P. expansum</i> en función de la cepa de levadura en manzana almacenada por 90 días a 4° C	63
5.6. Análisis de correlación simple por pares del desarrollo del hongo en distintas condiciones de tiempo y temperatura	66
5.7. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de <i>P. expuestos</i> por 24 h a 27° en diferentes medios de cultivo	73
5.8. Porcentaje de desarrollo del tubo germinativo de conidias de <i>P. expansum</i> expuestos por 24 h a 27°C en presencia de la cepa 38-432 en diferentes medios de cultivo	75
5.9. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de <i>P. expansum</i> en cilindros con membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 38-432 en diferentes medios.	75
5.10. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de <i>P. expansum</i> expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 22 ⁻² _{4a} en diferentes medios de cultivo	76
5.11. Porcentaje de germinación de conidias de <i>P. expansum</i> en cilindros con	

membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 22 ⁻² _{4a} en diferentes medios de cultivo	77
5.12. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de <i>P. expansum</i> expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 24 ⁻² _{3a} en diferentes medios de cultivo	79
5.13. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de <i>P. expansum</i> en cilindros con membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 24 ⁻² _{3a} en diferentes medios de cultivo	79
5.14. Porcentaje de desarrollo de tubo germinativo de conidios de <i>P. expansum</i> expuestos por 24 h y 26 °C en presencia la cepa 22-111en diferentes medios	81
5.15. Porcentaje de desarrollo de tubo germinativo de <i>P. expansum</i> en cilindros con membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 22-111en diferentes medios	82

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	Pág.
2.1. Desarrollo de la yema floral del manzano	6
2.2. Tipos de conidioforos del género <i>Penicillium</i>	21
2.3. Conidioforos de <i>Penicillium expansum</i> después de 72 horas de incubación sobre manzana ‘Golden Delicious’	22
4.1. Comunidad del suspiro Cadereyta, Qro	45
4.2. Metodología General.	46
4.3. Microplaca de estudio de competición de nutrientes.	52
4.4. Determinación del índice de germinación de las levaduras antagónicas	52
5.1. Diámetro de la infección (cm) producida por <i>P. expansum</i> sobre diversos genotipos de manzana después de diez días	56
5.2. Correlación entre el desarrollo de <i>P. expansum</i> entre frutos recién cosechados y frutos almacenados por 10 días a 27°C	57
5.3. Desarrollo de la lesión causada por <i>P. expansum</i> en manzana ‘Golden delicious’ en presencia de la levadura ‘22-111’ en comparación con el testigo después de 90 días de incubación a 4°C	62
5.4. Correlación entre el desarrollo de <i>P. expansum</i> entre frutos almacenados por 90 días a 4°C y frutos almacenados por 8 días a 27°C	66
5.5. Antibiogramas de <i>P. expansum</i> y las diferentes levaduras evaluadas en NYDA	68
5.6. Antibiogramas de <i>P. expansum</i> y las diferentes levaduras evaluadas en ADP	69
5.7. Antibiogramas de <i>P. expansum</i> y extractos del jugo de manzana	70
5.8. Germinación de conidias por 24 h en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniendo la cepa 38-432	74
5.9. Germinación de conidias por 24 h en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniéndola cepa 22 ⁻² _{4a}	78
5.10. Germinación de conidias por 24 h en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniendo la cepa 24 ⁻² _{3a}	80
5.11. Germinación de conidias por 24 h en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniendo la cepa 22-111	83

I. INTRODUCCIÓN

Mundialmente se producen aproximadamente 60 millones de toneladas de manzana en 5.6 millones de hectáreas, siendo China el principal productor, seguido de EE.UU. Estos dos países aportan 45% de la producción mundial, mientras que México produce 460,000 ton al año ocupando el 23^{er} lugar en la producción (SAGARPA, 2007).

Los estados con mayor superficie y producción de manzana a nivel nacional son Chihuahua y Durango. En el centro del país, particularmente en el estado de Querétaro, este frutal prospera bajo temporal, siendo los principales municipios productores San Joaquín y Cadereyta (INEGI, 1999). Los cultivares más importantes allí establecidos son `Golden Delicious` y `Red Delicious`, además de otros que no han sido claramente identificados (González, 2005).

Las tendencias en la superficie establecida son constantes (700 ha), más no en cuanto a la producción de manzana por año, lo que se debe a factores climáticos como las heladas tardías, el granizo y la sequía. Además, existe una deficiencia en la aplicación de las técnicas de cultivo, como la fertilización, poda, raleo de frutos y saneamiento del huerto, todo lo cual trae como consecuencia una notable disminución en la calidad del fruto (Castañeda, 2005).

El aumento de la producción y la demanda de frutas a lo largo de todo el año han sido determinantes en el desarrollo de tecnologías capaces de conservar la calidad de las frutas para su comercialización en fresco. Siendo la manzana un producto perecedero, se deben preservar en el tiempo sus características organolépticas, así como su apariencia en términos de frescura, color y tersura. Para ello se requieren estrategias para la protección de todos los frutos así como de la calidad de éstos, con el objeto de satisfacer las necesidades del consumidor, ya que la estacionalidad de la producción es relativamente corta y las principales variedades establecidas en la región maduran durante el mes de agosto, época de mayor oferta.

Durante la conservación de la manzana se presentan pérdidas debidas a disminución de peso, lesiones físicas, desordenes fisiológicos y, sobre todo, a la aparición de pudriciones producidas principalmente por hongos, destacando *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *B. cinerea*, *Gloeosporium* spp y *Monilia* spp, siendo el primero el más importante (Viñas y Usall, 2000). Al parecer no se cuenta con referencias precisas respecto a la resistencia genética de los distintos cultivares de manzana al ataque por hongos en poscosecha.

Los sistemas mayoritariamente utilizados para el control de enfermedades en poscosecha de manzana se han basado en la utilización de productos químicos aplicados durante el cultivo y/o justo después de la recolección y previo a su conservación frigorífica, sin embargo, éstos pueden ser tóxicos para la salud del consumidor o provocar la aparición de razas fisiológicas del hongo resistentes al producto (Campbell, 1989). Por ello, se han desarrollado métodos alternativos como el control biológico a través de la utilización microorganismos antagónicos, fundamentalmente las levaduras, que tienen la capacidad de desarrollar a temperaturas de almacenamiento por tiempos prolongados.

Los trabajos realizados en México con control biológico tienen que ver con el aislamiento, selección e identificación de levaduras antagónicas en manzanas almacenadas a temperatura ambiente y su efectividad en combinación con otros productos, sin embargo, no se ha evaluado ni su comportamiento a temperaturas de almacenamiento ni los mecanismos de acción que pudieran ser capaces de desarrollar aquellas que se han reconocido como sobresalientes.

El conocimiento del modo de acción que un microorganismo pueda desarrollar para controlar el desarrollo de patógenos en la fruta es fundamental para su selección como antagonista debido a que la resistencia del patógeno al antagonista es influenciada por el mecanismo o mecanismos de acción que ejerce el antagonista contra el patógeno. Los principales mecanismos conocidos son la antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo) e inducción de resistencia (Cook y Baker 1983).

Es deseable que la producción de antibióticos no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de la aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Cook y Baker, 1983). La antibiosis a su vez genera rechazo por parte de los consumidores quienes exigen se estudie la posible toxicidad u otro tipo de daño a la salud que estos compuestos pudiesen provocar (Campbell, 1989). Sin embargo, algunos investigadores aducen que no puede compararse la liberación de una sustancia a escala microbiana con el uso masivo de agroquímicos.

Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la capacidad antagónica de levaduras nativas contra *P. expansum* a temperatura de almacenamiento (4 °C) y determinar los mecanismos de acción que ejercen estas levaduras. Como complemento de este estudio, se determinó la resistencia genética de distintos cultivares de manzana establecidos en la sierra de Querétaro a *P. expansum*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes e importancia del cultivo del manzano

2.1.1. Origen

Se desconoce el origen exacto del manzano (*Malus domestica* Borkh) cultivado, aunque se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos. Según Ponomarenko es *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem, una especie de manzano silvestre que crece de forma natural en las regiones montañosas de Asia media, podría ser la especie de la que se habrían originado, hace entre 15.000 y 20.000 años, las primeras razas cultivadas de manzano (Delahaye y Vin, 1997).

El manzano fue introducido en España por los pueblos del norte de África y durante el proceso de romanización de la península (Delahaye, 1997; D'Escaplon, 1976); A principios del Siglo XVII, el manzano fue introducido a América por colonizadores europeos, siendo los españoles quienes lo trajeron a México, y quienes se encargaron de diseminarlo por todo el país (Ramírez y Cepeda, 1993).

2.1.2. Importancia económica y distribución geográfica

El manzano es una de las especies de fruta dulce de mayor difusión a escala mundial, debido fundamentalmente a (Inlandfruit, 2003):

- Su facilidad de adaptación a diferentes climas y suelos.
- Su valor alimenticio y terapéutico.
- La calidad y diversidad de productos que se obtienen en la industria transformadora.

Por proceder de climas fríos resiste muy bajas temperaturas, lo que ha permitido cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente fríos, y en particular en todos los de Europa.

A nivel mundial se producen aproximadamente 60 millones de toneladas de manzana al año en 5.6 millones de hectáreas establecidas, siendo China el principal productor con más

de 20 millones de toneladas, seguido de EE.UU. con 5.0 millones. Estos países aportan 45% de la producción mundial, mientras que México ocupa el 22° lugar con 460,000 toneladas producidas al año (SAGARPA, 2007). En México los estados con mayor superficie y producción de manzana son, Chihuahua, Durango y Coahuila. Las tendencias nacionales son estables en superficie, pero inestables en producción dado a factores climáticos como las heladas tardías y el granizo entre otros.

En el estado de Querétaro, el manzano se considera uno de los principales cultivos perennes, actualmente cuenta con 740 ha establecidas, siendo los principales municipios productores: San Joaquín, Cadereyta, Pinal de Amoles y Amealco. (SAGARPA, 2007; INEGI, 1999). Los principales cultivares allí establecidos son: 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', además de un gran número de tipos criollos y otros cultivares que aún no han sido claramente identificados (González, 2005).

En Querétaro, el cultivo del manzano se realiza bajo temporal, ya que los productores no cuentan con la infraestructura necesaria para implementar sistemas de riego. Entre los factores que afectan el desarrollo del cultivo en la región se pueden citar los accidentes climatológicos tales como las heladas, el granizo, o las sequías. Además, existe una deficiencia en la aplicación de las técnicas de cultivo, como la fertilización, poda, aclareo de frutos y el control fitosanitario, todo lo cual trae como consecuencia una notable disminución en la calidad del fruto (Castañeda, 2005).

En consecuencia, la manzana producida localmente, difícilmente puede competir con la fruta proveniente de otras regiones, ya que además, durante la época de maduración de las principales variedades, el precio de la fruta disminuye considerablemente y el productor se encuentra a expensas del intermediario. Sin embargo, esta manzana podría tener la oportunidad de ser comercializada razonablemente bien, en la medida en que madure y se coseche lo más temprano posible, sin necesidad de almacenarla. El almacenamiento puede ser también un recurso para que se busquen mejores precios en épocas tardías.

2.2. Botánica del manzano

2.2.1. Taxonomía

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es un híbrido complejo compuesto por diversas especies del género *Malus*. La especie predominante es *M. sieversii*, pero otras especies que probablemente han contribuido son: *M. orientalis* Uglitzk (originaria del Cáucaso), *M. sylvestris* (originaria de Europa), *M. baccata* (originaria de Siberia) y *M. prunifolia* (originaria de China). Taxonómicamente está clasificada tal como se expresa en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Clasificación científica del Manzano

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Rosales</i>
Familia:	<i>Rosaceae</i>
Subfamilia:	<i>Maloideae</i>
Género:	<i>Malus</i>
Especie:	<i>M. domestica</i>
Nombre binomial de la especie:	
<i>Malus domestica</i> Borkh.	

2.2.2. Anatomía

El manzano es una especie arbórea que presenta un tronco erecto y una copa globosa que normalmente alcanza de 2 a 2.5 m. de altura aunque puede llegar a 10 m. El tallo presenta una corteza cubierta de lenticelas, lisa, adherida, de color ceniciento verdoso sobre los ramos y escamosa y gris parda sobre las partes viejas del árbol. La planta tiene una vida promedio de unos 60 a 80 años. Las ramas se insertan en ángulo abierto sobre el tallo, son de color verde oscuro, a veces tendiendo a negruzco o violáceo. El manzano presenta hojas ovales, cortamente acuminadas, aserradas, con dientes obtusos, blandas, con el haz verde claro y tomentosas, de doble longitud que el pecíolo, con cuatro a ocho nervios alternados y bien desarrollados.

2.2.3. Fisiología

2.2.3.1. Ciclo vegetativo

El manzano es una planta perenne, su ciclo vegetativo anual en el hemisferio Norte empieza con la caída de las hojas desde mediados de octubre hasta mediados de noviembre; se inicia entonces el reposo invernal del árbol, que se prolonga hasta febrero. En marzo la planta 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 a 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 nuevamente para la caída de las hojas (Ramírez y Cepeda, 1993).

2.2.3.2. Floración y fecundación

En los árboles frutales la iniciación floral comienza cuando la yema floral, ya diferenciada, se encuentra en reposo. A pesar de su quiescencia, puede haber una actividad considerable en su interior, habiendo en consecuencia acumulación de materia orgánica, especialmente almidones (Calderón, 1987; Ramírez *et al*, 2002). En la Figura 2.1 se puede observar los diferentes niveles del desarrollo floral, desde la yema en estado latente, hasta el total desarrollo del fruto (Álvarez, 1988).

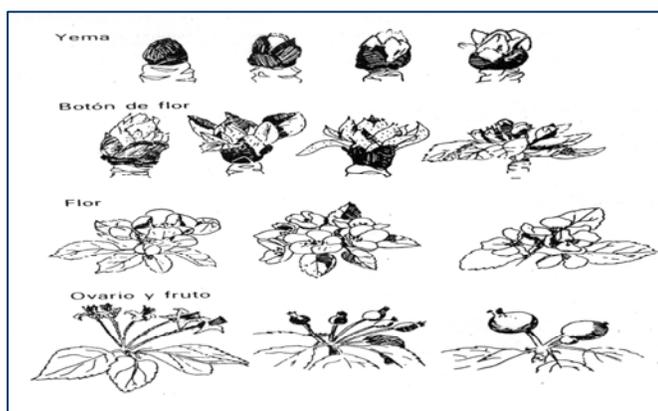


Figura 2.1. Desarrollo de la yema floral del manzano (Álvarez, 1988)

Las variedades comerciales de manzano son en su mayoría autoincompatibles, por lo cual requieren de la polinización cruzada para formar frutos (Keulemans y Eyssen, 1996). Por esto es necesario establecer en el mismo huerto al menos dos variedades distintas que se polinicen mutuamente. Como el viento no juega un papel importante en la polinización cruzada, es recomendable la presencia de abejas para el transporte del polen (Calderón, 1987).

El proceso de la fecundación comienza cuando el grano de polen se pone en contacto con el estigma; después 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. Posteriormente, se unen las células reproductoras y, como resultado de esta fusión, el cigoto se empieza a dividir para crear el embrión. Por otro lado, otro de los núcleos del polen se fusiona con los núcleos polares del saco para formar un cigoto que al desarrollarse dará origen al endospermo, que constituye una fuente rica de sustancias de crecimiento, cuya función inicial es atraer rápidamente metabolitos, para que el embrión pueda prosperar. Por último este proceso finaliza con la caída de los pétalos de la flor (Calderón, 1987; Ramírez *et al*, 2002).

2.2.3.3. Desarrollo del fruto

Cuando la polinización se ha completado y se ha efectuado la fertilización del óvulo, un estímulo hormonal del embrión en desarrollo evita que haya abscisión del fruto y provoca que el ovario y los tejidos adyacentes crezcan, debido a una intensa división celular (fase de multiplicación celular) durante la cual cada célula se divide en dos en forma progresiva para formar el fruto (Westwood, 1993). Esta etapa tarda de cuatro a ocho semanas. A continuación sigue otra etapa de gran crecimiento del fruto (fase de elongación celular), generalmente más prolongada (cinco a diez semanas), en la cual las células ya existentes de la fase anterior, ya no se dividen, solo aumentan de tamaño hasta adquirir grandes proporciones. En este momento la cantidad de materia seca aumenta grandemente y, justo antes de que esta fase termine, empiezan a ocurrir en el fruto transformaciones bioquímicas de gran importancia, que determinan la maduración del mismo, y que llevan a que el fruto adquiera las características deseables para ser consumido (Calderón, 1987).

2.2.4. Variedades

Las variedades de manzano son innumerables (pasan del millar). Las principales variedades a escala mundial son las siguientes (Calderón, 1987).

- **‘Golden delicious’ (Deliciosa Dorada):** el fruto es grande y de color amarillo dorado, más largo que ancho, con la pulpa blanca amarillenta, jugosa, perfumada y muy sabrosa. El pedúnculo es largo o muy largo y la piel delgada y resistente, cubierta con lenticelas grisáceas. Es una excelente polinizadora para la mayoría de las variedades comerciales. Fruto de buena conservación natural y en frío (Calderón, 1987).
- **“Red Delicious” (Deliciosa roja):** fruto de buen tamaño, de color rojo más o menos intenso, con un punteado amarillo, pulpa azucarada, jugosa, ligeramente acidulada y muy aromática. Árbol de buen porte, vigoroso de crecimiento vertical y con tendencia a dar ángulos agudos en la inserción de las ramas. Es autoestéril y de floración semi-tardía. Es un árbol muy exigente desde todos los puntos de vista, particularmente en terreno. Fruto de excelente conservación. Recolección en septiembre-octubre.
- **“Starking”:** es una mutación de “Red delicious”. Fruto grande, cónico, con cinco lóbulos alrededor del ojo muy marcado. pulpa amarilla crujiente, de sabor muy agradable. Epidermis de color rojo vinoso y con estrías más oscuras. Árbol de buen vigor y fertilidad. Buena conservación en frigorífico. Recolección en octubre.
- **“Starkrimson”:** es una mutación de la Starking. Fruto grande, de forma tronco-cónica, con las cinco protuberancias características muy pronunciadas. De color rojo brillante. pulpa crocante, semiazucarada y perfumada. Buena conservación en frigorífico. Árbol de poco vigor, con floración rápida y abundante sobre órganos cortos. Recolección en septiembre-octubre.
- **“Reineta blanca del Canadá”:** árbol vigoroso y productivo. Fruto de tamaño grande, troncocónico, globoso ventrudo y aplastado en la base, de contorno irregular con tendencia a la forma pentagonal. Color amarillo limón o

verdoso mate; a veces, chapa rojo cobrizo en la insolación. Pulpa blanco-amarillenta, jugosa, dulce y al mismo tiempo acidulada. Variedad triploide, mala polinizadora; sin embargo, no parecen presentarse casos de marcada esterilidad. Maduración en otoño-invierno.

- **“Verde doncella”**: árbol de vigor más o menos escaso, muy productivo. Fruto de tamaño mediano, más ancho que alto, de contorno irregular, elíptico, casi siempre rebajado de un lado. Piel acharolada, blanco amarillento, cerosa con chapa sonrosada más o menos viva en la insolación. Pulpa blanco-verdosa, jugosa, dulce y perfumada. De muy buena conservación. Considerada autofértil. Maduración en invierno.
- **“Belleza de Roma” (Roma beauty)**: fruto grande, estriado, color rojo y amarillo, calidad buena, muy atractiva. Muy sensible al oidio. Recolección de noviembre a enero.
- **“Esperiega de Ademuz”**: fruto grande, color amarillo y rojo en la parte que le da el sol; pulpa firme, jugosa, ligeramente acidulada y de muy buena calidad. Recolección en noviembre-diciembre.
- **“Gala”**: es una variedad de origen neozelandés resultante del cruce de *Kidd 's Orange* con *Golden Delicious*, siendo su cultivo recomendable en zonas de regadío españolas. Los árboles son de producción notable y regular, precisando aclareo químico. Los frutos tienen unos calibres medios de 60-80. La manzana es de coloración amarilla y conviene cosecharla a tiempo para evitar la aparición de grietas en la zona del pedúnculo.
- **“Granny Smith”**: es una variedad de origen australiano introducida en España. En Europa goza de un excelente mercado compitiendo con *Golden Delicious*. Los árboles son vigorosos, precoces en la fructificación y muy productivos; tienen tendencia a dar frutos en la extremidad de las ramas, por tanto es importante saber podarlas; prefiere la formación en palmeta; son algo sensibles al moteado y al oidio. Se poliniza con *Golden* y suelen hacerse plantaciones con estas dos variedades exclusivamente.

2.3. Requerimientos edafoclimáticos o ecológicos

El manzano es resistente al frío y no necesita tanta cantidad de calor y luz para la maduración de su fruto. Sufre menos con el exceso de frío que con el de calor y prefiere los climas húmedos a los secos, las flores son sensibles a las heladas tardías de primavera. Soporta temperaturas inferiores a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin que por ello se afecte su corteza, aunque al descender por debajo de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ pueden perecer algunas yemas florales.

La principal limitación para el cultivo del manzano en comarcas meridionales es el requerimiento de horas frío, frecuentemente por encima de 1.000 (en función de las variedades); es en este periodo de latencia en su ciclo anual en el que se asegura la supervivencia de las plantas durante los meses de invierno. Aquí se producen cambios en el metabolismo y crecimiento del manzano que le permiten resistir el frío. Además, la mayoría de las especies frutales necesitan ese período de letargo invernal para poder florecer adecuadamente. En nuestro clima el reposo se regula por la necesidad de las yemas de los árboles de acumulación de un determinado número de horas de frío (temperaturas $< 7^{\circ}\text{C}$) para inducir la salida del reposo invernal, con lo que se asegura haber pasado el período de heladas.

El manzano se adapta a la mayoría de los terrenos, aunque prefiere los de aluvión, silíceo-arcillosos, pero de regadío o muy frescos. Por tener un sistema radical superficial puede vivir en terrenos poco profundos. El agua estancada le resulta perjudicial y tolera el césped mejor que ningún frutal (Álvarez, 1988).

2.4. Aspectos culturales

2.4.1. Propagación

El manzano se puede multiplicar por semilla, por injerto y también por estaca, aunque este último método no es recomendable. A la siembra se recurre para obtener patrones francos y nuevas variedades a través de programas de mejoramiento genético. Se puede hacer el injerto a yema o de corona sobre los siguientes patrones (Parra-Quezada, 2008):

- Franco: tierras profundas, pero con elevado nivel pluviométrico.
- East Malling II (EM-II): vigoroso (sistema radicular expansivo y penetrante), se recomienda para la mayoría de las variedades comerciales y para su uso en cualquier tipo de suelo, aunque es susceptible del exceso de humedad, por ello le conviene los suelos bien drenados.
- East Malling VII (EM-VII): vigor medio, sistema radicular de relativa expansión y penetración en el suelo, llega a determinar un buen anclaje en los suelos limosos. Fácil adaptación a suelos húmedos o con elevadas temperaturas.
- East Malling IX (EM-IX): poco vigorosos, conveniente para formar espalderas. Su sistema radical es de muy limitada penetración y expansión en el suelo.
- M9: es lejos el portainjertos más utilizado, por otra parte tiene una amplia gama de clones libres de virus. En Europa existen más de 30 clones de M9 seleccionados en 5 países: Inglaterra, Bélgica, Países Bajos, Alemania y Francia; de todos estos, las cuatro principales selecciones son: M9 EMLA, M9 NAKB, PAJAM 1 y PAJAM 2.
- MM106 es usado para suelos pobres, para variedades Spur o para replantes de huertos, el M26 está destinado para mejores suelos, pero posee el inconveniente por ser muy susceptible al Burk Not.

2.4.2. Plantación

Los manzanos se plantan normalmente a raíz desnuda durante el periodo de reposo. Este periodo dura aproximadamente desde la caída de la hoja en el otoño hasta la nueva brotación en primavera. Los marcos de plantación son muy variables, dependiendo de los patrones empleados, así como de las distintas formaciones. Normalmente las distancias entre árboles pueden oscilar de 2 a 3 m para el cordón horizontal sencillo y 10 a 12 m, para formas libres sobre franco; las densidades de plantación oscilan entre los 1.500 y los 3.000 árboles/ha en los sistemas en eje y densidades de 1.000 a 3.00 árboles/ha en sistemas en espaldera (González y Sáenz, 1999), o aun densidades mayores.

2.4.3. Riego

El sistema de riego más empleado es el de inundación o a manta. Aunque en las nuevas zonas de producción es cada vez más frecuente la utilización de riego localizado, bien sea por goteo o por microaspersión. En este caso se utiliza fertirrigación (González y Sáenz, 1999)

Tabla 2.2. Principales tipos de irrigación para el manzano

Características	Goteo	Aspersión	Surcos	Inundación
Suelos pesados	Bueno	Bueno	Regular	Malo
Suelos medios	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno
Suelos ligeros	Bueno	Bueno	Regular	Malo
Drenaje deficiente	Bueno	Bueno	Regular	Malo
Eficiencia riego	90%	80%	70%	60%

Desde la entrada en vegetación hasta el otoño los riegos deben ser abundantes y frecuentes, el árbol adulto requiere entre 200 y 300 litros de agua por año.

2.4.4. Fertilización

Cuando el rendimiento y la calidad de los frutos son bajos, puede ser necesario aumentar los niveles de los fertilizantes aplicados, bien sea en el número de elementos o en las unidades de uno solo (Inlandfruit, 2003).

- **NITRÓGENO:** su carencia se manifiesta a mitad del verano, tomando la corteza de los tallos tiernos una coloración rojiza, las hojas apicales pierden clorofila, sus bordes se repliegan hacia la cara superior, y los frutos maduran de manera irregular.
- **POTASIO:** su carencia se caracteriza por la debilidad de los ramos, por rizarse y doblegarse el borde de las hojas hacia el haz, tomando una coloración castaño-rojiza, precipitando su caída. El fruto es de menor tamaño y pierde colorido.

- **MAGNESIO:** su carencia se manifiesta por la pérdida de clorofila en el borde de las hojas, seguida de necrosis y manchas en el centro del pecíolo, que provocan su caída. El tamaño del fruto se reduce y pierde resistencia.

De forma orientativa un abonado para una plantación adulta de manzanos podría ser la siguiente (Inlandfruit, 2003):

Tabla 2.3. Requerimientos nutricionales del manzano

Abonado	Kg/ha
Nitrato amónico cálcico (20.5% N)	500
Superfosfato (18% P ₂ O ₅)	300
Cloruro potásico (60% K ₂ O)	200

2.4.5. Poda

Los objetivos de la poda son ayudar y corregir los hábitos de crecimiento y de fructificación de cada variedad, de forma que se obtengan árboles de esqueleto equilibrado y robusto, capaces de soportar el peso de las cosechas, conseguir una producción abundante, airear e iluminar el centro del árbol y eliminar toda la madera seca, enferma o no productiva. Los sistemas de formación más utilizados son las formas en eje, bien sea libre o con una base estructurada, tipo "fusetto" italiano. También es frecuente el tipo de formación en espaldera, sea en palmeta o incluso, en algunas zonas, el "drapeaux" de origen francés (Álvarez, 1988).

2.4.6. Aclareo

El aclareo de frutos, bien sea de forma manual o química, es necesario para la producción de fruta de calidad, se ha comprobado en la variedad de manzana *Red Delicious* que el aclareo aumenta la cantidad de azúcar en los frutos, la materia seca y algo de su

acidez. La fructificación del manzano se produce en forma de corimbo, dando lugar a dos, tres o más frutos en un solo ramillete, cuando solamente debería producir un solo fruto, por lo tanto deben suprimirse los restantes. Los frutos deben aclararse al alcanzar el tamaño de una avellana, dándoles un movimiento de torsión. Más eficaz que el aclareo de los frutos es el de las flores, porque el árbol no pierde una parte de las reservas que emplea en la formación de aquellos (Ramírez y Cepeda, 1993).

2.4.7. Recolección

Las manzanas se recolectan entre septiembre y octubre, exceptuando las variedades más precoces que se recogen en julio y agosto. (Artés, 2000).

Si se destina al mercado en fresco, el fruto debe recogerse en pleno día, exento de toda humedad y con el máximo cuidado para que no reciba ningún golpe. Si se recoge un tanto verde y no puede ser colocado en el mercado, algunas variedades son muy sensibles al arrugado de la piel y a la pérdida de peso. En la recolección mecanizada se emplean máquinas automáticas que pasan entre las líneas de plantación, éstas provocan vibraciones intensas que hacen que los frutos se desprendan, los cuales caen en unas plataformas o bandejas situadas en la parte inferior y lateral de las máquinas. Otro sistema más económico consiste en un bastidor de lona provisto de ruedas, el cual se empuja a mano y por medio del aparato eléctrico provoca que los árboles se sacudan (Artés, 2000).

2.4.8. Manejo en poscosecha de la manzana

a) 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, procederá a su limpieza, o bien, se llevará a cabo directamente al calibrado (Álvarez, 1988).

b) Clasificación

Hoy en día, las manzanas se someten a normas de clasificación estrictas, la jerarquía de calidades de acuerdo a las características físicas de la manzana, comenzando con la mayor, es (Artés, 2000):

Categoría Extra: los frutos clasificados en esta categoría serán de calidad superior. Presentarán la forma, desarrollo y coloración característicos de la variedad. Los frutos presentarán el pedúnculo intacto y estarán exentos de defectos, a excepción de muy ligeras alteraciones de la epidermis.

Categoría I: los frutos clasificados en esta categoría serán de buena calidad superior. Presentarán las características típicas de la variedad. La pulpa debe estar exenta de todo daño; sin embargo, se admiten para cada fruto defectos de epidermis

Categoría II: en esta categoría se incluyen los frutos que no pueden clasificarse en las categorías superiores, pero responden a las categorías mínimas de calidad. Se admiten defectos de forma, desarrollo y coloración a condición de que los frutos conserven sus características. El pedúnculo puede faltar, siempre que no haya deterioro de la epidermis.

Categoría III: esta comprende los frutos que no pueden ser clasificados en una categoría superior pero que responden a las características previstas para la categoría II, con excepción de los defectos de la epidermis que pueden ser más importantes.

2.5. Almacenamiento de la manzana

El aumento de la producción y la demanda de frutas a lo largo de todo el año han sido determinantes en el desarrollo de tecnologías capaces de conservar la calidad de las frutas para su comercialización en fresco. Los procedimientos utilizados en la conservación de frutos se basan en la elongación máxima del periodo comprendido entre la madurez de recolección y la gustativa, ya que dicho período reúne los aspectos relativos a la maduración propiamente dicha así como al desarrollo de los caracteres organolépticos y

comerciales del fruto (Herrero y Guardia, 1992). Estas tecnologías se basan fundamentalmente en la disminución de la temperatura y la modificación de atmósfera en la que se conservan los frutos.

Uno de los problemas que enfrenta el comerciante de productos hortofrutícolas es con la pérdida de peso de sus productos durante su almacenamiento, ya que se trata de pérdida de peso comercial y, por tanto, es pérdida directa en el mercadeo de los productos. Una pérdida de peso de tan sólo 5% hará que los productos adquieran una apariencia marchita, bajo condiciones cálidas, secas; esto puede ocurrir en algunos productos en cuestión de unas cuantas horas. Incluso en ausencia de marchite evidente, la pérdida de agua puede ocasionar la pérdida de cualidades de textura, ejemplo, el apio deja de crujir al ser mordido; así como la adquisición de colores indeseables (Viñas *et al.*, 1998)

Los factores externos que más influyen en la conservación de la fruta son el frío, la oscuridad, la ventilación y la humedad. La manzana acelera sus procesos vitales con el calor y la luz. La ventilación también es imprescindible, ya que una atmósfera saturada por etileno producido por la propia fruta acelera la maduración (Álvarez, 1988).

2.5.1. Refrigeración

Generalmente se define la refrigeración como cualquier proceso de eliminación de calor. La refrigeración es una rama de la termodinámica que trata con los procesos de reducción y mantenimiento de la temperatura de un espacio o material a temperatura inferior con respecto de los alrededores correspondientes (Willis, 1997).

Las cámaras frigoríficas para la conservación de la manzana funcionan normalmente por encima de 0 °C. La mayor parte de las variedades tiene su óptimo de conservación entre -1 °C y +3 °C, con una humedad relativa de 85 a 95%. El control de la temperatura y de la humedad relativa se llevan automáticamente mediante termómetros e higrómetros situados en las paredes de la cámara. La fruta se almacena en envase de madera o plástico apilados de forma que permita el paso del aire frío que viene de los evaporadores hasta la cámara (Álvarez, 1988).

2.5.2. Películas cubrientes

La superficie de las plantas está protegida por compuestos lipídicos. Las ceras son, característicamente, ésteres de un ácido graso de peso molecular más grande y un alcohol alifático, junto con la cutina, hidroxipolímeros de los ácidos grasos, actúan como una cubierta protectora en muchas de las partes aéreas de la planta (Kader, 1993).

Se ha observado desde tiempos remotos que los productos hortofrutícolas que poseen piel cerosa pierden agua más lentamente y previenen a la planta contra la invasión de patógenos que los que no la poseen. En los frutos maduros las lenticelas se ven a menudo obstruidas por las ceras y otras sustancias de desecho y, por lo tanto, no son funcionales. Así, la pérdida de agua como vapor y el intercambio gaseoso se llevan a cabo a través de la cutícula. De ahí surgió la idea de aplicar ceras a ciertos productos como los cítricos, pepinos, jitomates, manzanas, etc. Además, la aplicación de ceras realza la apariencia de los productos, haciéndolos más comerciales (Kader, 1993).

2.5.3. Atmosferas controladas y modificadas

Las atmósferas controladas son aquellas que difieren de la ambiental en la composición precisa de gases, es decir, se crea una atmósfera artificial monitoreando la cantidad de cada gas que compone la mezcla ambiental deseada para tener un mejor control sobre los procesos metabólicos de los productos hortofrutícolas como es el madurarlos o reducir su metabolismo para prolongar su vida de almacenamiento. Las atmósferas modificadas difieren de las previamente descritas en que las concentraciones de gases que las componen no se pueden monitorear con precisión. Este último tipo de atmósferas se pueden generar pasiva o activamente. En el primer caso se aprovecha la propia respiración del producto. Se cubre el producto con una película plástica, permitiendo así la acumulación de CO₂ y la resultante disminución de O₂ en la atmósfera de almacenamiento, mientras que en el segundo caso se proporciona una mezcla de gases determinada, la cual no es monitoreada con precisión durante todo el tiempo de almacenamiento de los productos (Willis, 1989).

Los frutos que van a ser almacenados por más de un mes se benefician de las Atmosferas Controladas en términos de retención de la firmeza de pulpa, acidez y color de la piel. El tiempo potencial de almacenamiento en AC (1 a 3% O₂ + 1.5 a 3% CO₂ para ‘Golden Delicious’ y 1 a 2% O₂ + 2 a 4% CO₂ para ‘Red Delicious’) es hasta 10 meses (Willis, 1989).

No todas la variedades tienen el mismo potencial de almacenamiento, así, mientras algunas como la “Reineta de Canadá” se almacena por cuatro meses máximo, otras como “Rome Beauty” y “Golden Delicious” pueden durar seis u ocho meses (Álvarez, 1988).

2.5.4. Daños durante el almacenamiento

Durante la conservación de algunas frutas, se producen pérdidas debidas a la disminución de peso y/o a la aparición de alteraciones tanto fúngicas como fisiológicas. Estas pérdidas pueden oscilar entre 8 y 12%, de las cuales entre 4 y 6% son atribuidas a podredumbres. Prácticamente la totalidad de las podredumbres que aparecen durante la poscosecha en fruta de hueso y pepita están causadas por seis especies fúngicas: *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Gloeosporium* spp y *Monilia fructicola* (MacLaughlin, 1990)

Fisiopatías:

Los desordenes fisiológicos corresponden a trastornos o colapsos de los tejidos del fruto, los cuales no son causado por patógenos, productos químicos y/ó daños mecánicos, entre los que se pueden señalar los siguientes:

- Marchitez (*shrive*). Las manzanas ‘Golden Delicious’ son particularmente susceptibles a la pérdida de agua. Esta disminución puede ser tan alta como 3 a 6%.
- Magulladuras. Pueden ser excesivas, especialmente en Golden Delicious donde el daño por impactos es más evidente.
- Corazón acuoso (*watercore*). La pulpa se observa como embebida en agua cerca del corazón debido a la acumulación de sorbitol los en espacios intercelulares.

- Picado amargo (*bitter pit*). Manchas pardas hundidas en la piel, especialmente en la parte calicinal. Este desorden está relacionado con una baja concentración de calcio en la manzana.
- Escaldado superficial (*superficial scald*). Pardeamiento de la piel que se desarrolla en almacenamiento refrigerado.
- Estrés atmosférico. Los niveles de oxígeno inferiores a 1% y de CO₂ superiores a 10% pueden inducir sabores extraños (*off-flavors*) debido a metabolismo fermentativo. Los síntomas de daño por elevado CO₂ incluyen: lesiones pardas parcialmente hundidas en la piel o pardeamiento interno y cavidades.

Enfermedades:

- Corazón Mohoso (*moldy core*). Causado por varios hongos incluyendo *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* y *Penicillium*. Las manzanas Golden Delicious son particularmente susceptibles debido a la abierta o profunda cavidad del seno.
- Suberosis o *russetting*. Esta enfermedad afecta especialmente a las manzanas Golden Delicious, sobre las que se producen unas manchas irregulares de naturaleza suberosa que las desmerece comercialmente, la piel del fruto, desde el principio, está defendida de una capa cerosa para proteger al fruto de los agentes exteriores, y si es destruida por productos pesticidas agresivos, el fruto se cubre de otra capa de naturaleza suberosa, que a pesar de no afectar a la pulpa del fruto lo desmerece comercialmente y además reduce su resistencia a la conservación.
- Moho azul (*blue mold*) y Moho Gris (*grey mold*). Las dos más importantes enfermedades de postcosecha de las manzanas Golden Delicious son causados por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Ambos hongos son patógenos de heridas. La sanitización es crítica para el control de estas enfermedades. El baño de las manzanas (*drenching*) puede esparcir las esporas de *Penicillium* y *Botrytis* a las heridas producidas en la cosecha

La podredumbre azul es la enfermedad más importante en la poscosecha de manzana. Se trata de una podredumbre blanda que se origina en general a partir de una herida. En el centro aparece el signo del hongo (*Penicillium* spp.) de color blanco y luego

se recubre de una esporulación azul de donde viene su nombre. Este hongo no solamente es responsable de la podredumbre de los frutos, sino que también produce una micotoxina cancerígena llamada patulina, la que puede alcanzar niveles tales que descalifiquen la fruta para procesado (elaboración de zumos).

2.6. El género *Penicillium*

2.6.1. Introducción

El nombre *Penicillium* proviene de la raíz latina *penicillus* que significa cepillo, basada en la apariencia que tiene el desarrollo del hongo visto al microscopio sobre frutos. El nombre genérico fue introducido por Link en 1809 como resultado de cambios en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, *Penicillium expansum* ahora es atribuido solo a Link (Ramírez 1982).

El género *Penicillium* incluye especies mitospóricas cuyas formas perfectas se incluyen en la familia *Trichocomaceae*, del orden *Eurotiales*, perteneciente al *Phylum Ascomycota*. Estos teleomorfos se engloban en los géneros *Eupeniillium* y *Talaromyces* (Pitt *et al.*, 2000). Este género ha sido dividido en varios subgéneros, por ejemplo, *Biverticillium* que está relacionado con el telemorfo *Tallamryces*. El subgénero *Penicillium* no tiene forma telemórfica, se caracteriza por la ausencia de reproducción sexual, la poca resistencia a la luz ultravioleta de las esporas y la habilidad de crecer a bajas temperaturas y baja cantidad de humedad. Muchas de sus subespecies se usan industrialmente para obtener alimentos, tal es el caso de *Penicillium roquefortii* o *Penicillium camembertii*, por otro lado también encontramos otras que son patógenas de frutas como son: *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Penicillium expansum es un hongo Ascomiceto, cosmopolita, muy común sobre materia orgánica en contacto con el suelo. Ocasionalmente se puede encontrar sobre granos y productos derivados de cereales, pero tiene mayor importancia en frutas maduras, especialmente manzana y otras pomáceas, uva de mesa y cereza, en postcosecha (Latorre *et al.*, 2002).

Por otro lado, el género comprende un amplio grupo de hongos con características saprofitas, es decir, obtienen su alimento de la materia orgánica muerta o en descomposición y destruyen material orgánico como maderas, alimentos u otros artículos comerciales e industriales (Pelczar *et al.*, 1986).

2.6.2. Descripción, morfología e identificación

Dentro de este género se presentan morfologías muy variadas, sin embargo, todos presentan características comunes, como: micelio vegetativo, septado, estrecho, hialino (color brillante); cuando se cultiva en agar nutritivo se observa como material algodonoso. Este género se caracteriza por formar conidióforos en una estructura ramificada semejante a un pincel, están situados perpendicularmente al desarrollo del micelio aéreo, y termina en células conidiógenas llamadas fiálides (Webster, 1986).

En la Figura 2.2 se ilustran los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Cuando se presentan dos verticilos de fiálides el pincel bivertricilado, y cuando presenta tres niveles de ramificación se le llama *terverticilado*.

Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada y permitiendo la formación de cadenas (Heath, 1996).

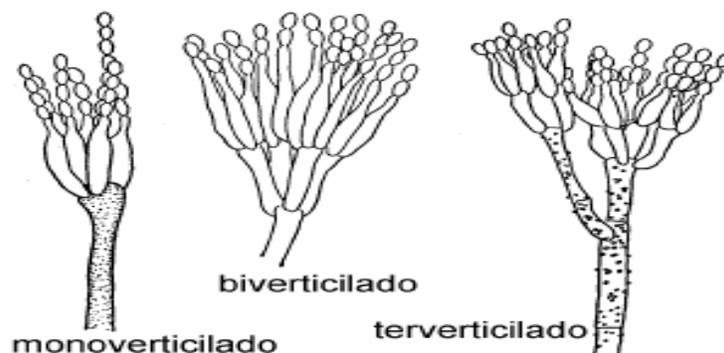


Figura 2.2. Tipos de conidioforos del género *Penicillium*

Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre 2 y 3 μm y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Las paredes del estípote, las ramas o las métulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa. Las fiálides pueden tener forma casi cilíndrica con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 μm y la parte terminal no supera los 3 μm de largo. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies (Heath 1996).

Las colonias de *Penicillium* son circulares si no hay impedimento alguno para su crecimiento, con un borde neto muchas veces sin fructificación y mostrando el color del micelio. Éste es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo o pardo claro. La superficie de la colonia madura, o sea con sus conidios formados, puede ser: aterciopelada, ligeramente algodonosa o con pequeños haces (fascículos) de conidióforos (Heath, 1996).

Dos características microscópicas de importancia en la identificación de *P. expansum* son: el olor característico a tierra húmeda o a moho y la formación de mechones o nidos de conidios en la superficie del crecimiento cuando se observa al microscopio estereoscópico (Janisiewicks, 1999) (Figura 2.3).

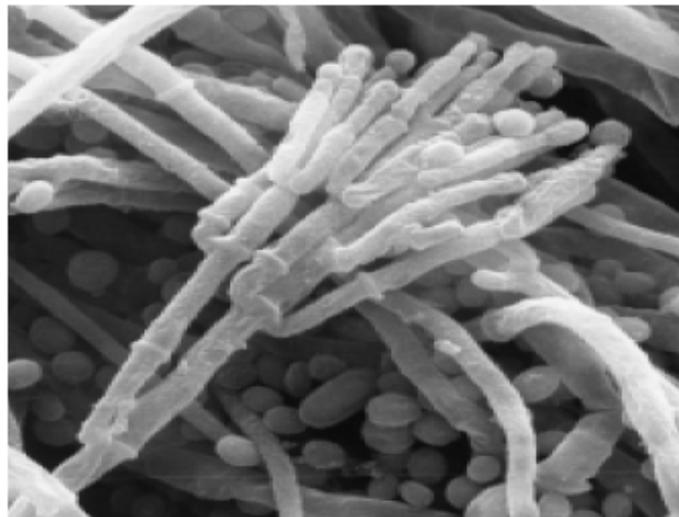


Figura. 2.3. Conidioforos de *Penicillium expansum* después de 72 horas de incubación sobre manzana ‘Golden Delicious’ (Valentines, 2005).

2.6.3. Biología y Hábitat

Las esporas de *Penicillium expansum* son de larga vida y algunas tienden a sobrevivir durante temporadas largas sobre contenedores, sobre todo si éstos son de madera, donde los hongos pueden crecer y reproducirse. La contaminación por estas esporas puede provenir de otras fuentes como el suelo del huerto que se encuentre adherido a las cajas de cosecha, el aire, o el agua de lavado de frutos, sobre todo si esta no se renueva continuamente (Janiesiewics, 1999).

Este moho produce patulina que es una lactona tóxica, resistente al calor. Varios comités científicos clasifican a la patulina como mutagénica, embriotóxica e inmunotóxica. En la Unión Europea, el nivel máximo permisible es de 10-50 µg/kg (Webster, 1986).

2.6.4. Mecanismo de infección de *Penicillium* en la manzana

Penicillium expansum penetra los tejidos de su hospedero a través de aperturas en el epicarpio o la corteza, daños en el tejido fresco ocasionados por punciones magulladuras, daños por insectos, grietas por picaduras de uñas de dedo, tejido necrosado de distinto origen o canales de aberturas normales del cáliz o del pedicelo, sitios de infección de otros hongos como *Gleosporium*, *Mucor* o *Phytophthora*, e incluso, a través de lenticelas (Janiesiewics, 1999).

Para que una infección tenga éxito es necesario que se establezca una relación entre el patógeno y el hospedero. *Penicillium expansum* es un patógeno necrótrofo que no produce estructuras de penetración especializadas pero segrega toxinas que degradan la pared celular, permitiendo a las hifas penetrar al interior de la célula (Valentines, 2005).

Una vez que el hongo ha penetrado el fruto empiezan a aparecer manchas superficiales, poco después un moho blanco comienza a crecer en la superficie de la cáscara o corteza del fruto, cerca de la pared central de la mancha. Posteriormente el hongo sigue su desarrollo y produce esporas, las cuales empezarán a contaminar a otros frutos (Janiesiewics, 1999).

2.7. Métodos de control de enfermedades en poscosecha

2.7.1 Antecedentes

Históricamente se ha intentado minimizar las pérdidas causadas por esas enfermedades mediante la utilización de productos químicos. Este método es actualmente el más utilizado, fundamentalmente a causa de su relativo bajo costo y la comodidad en su aplicación. Pero la utilización masiva, y en algunos casos poco controlada, de estos pesticidas ha generado una serie de problemas como son la aparición de cepas resistentes a los fungicidas habitualmente utilizados, el incremento de residuos en los frutos y la posible aparición de enfermedades iatrogénicas (MacLaughlin, 1990).

Debido al problema que representan los residuos de productos químicos para la salud humana, los diferentes países, y en especial los más desarrollados, han establecido una serie de límites máximos de residuos (LMR) bastante restrictivos, en muchos casos por debajo de los recomendados por el "Codex Alimentarius" (FAO/OMS). La existencia de diferencias entre los países, con respecto a los contenidos máximos permitidos de éstos residuos de plaguicidas, representa en algunos casos una barrera para el comercio y en especial para las exportaciones de fruta. Para eliminar estos obstáculos y favorecer la libre circulación de mercancías, el consejo de la Unión Europea en la directriz 76/895/CEE y la modificada en la 89/186/CEE, intenta uniformizar las legislaciones de los diferentes países europeos, objetivo que no se ha conseguido todavía, ya que queda por regular la mayoría de los plaguicidas.

La sociedad actual se encuentra ante un dilema a este respecto, por un lado hay una demanda creciente de productos de alta calidad, con buen aspecto físico y estado sanitario adecuado, lo que representa obtener fruta lo más limpia posible y por lo tanto libre de podredumbres. Por otro lado, la mayoría de los métodos utilizados de forma habitual para controlar plagas y enfermedades son poco adecuados por todos los problemas ambientales y de salud que comportan (Viñas 2002).

2.7.2. Estrategias de control

Para planificar de forma global la lucha contra enfermedades fúngicas en poscosecha, los tratamientos con productos fungicidas son sólo una de las posibles actuaciones a tener en cuenta. Las estrategias generales de control se fundamentan en (Viñas, 1998):

1. Reducir la contaminación fúngica durante el cultivo

A través de un correcto manejo de la plantación podemos incidir en alguno o en varios de los puntos necesarios para que la podredumbre no se desarrolle. Así, eliminando los restos de frutos de la cosecha anterior, órganos vegetativos afectados como brotes, etc., con lo cual se estarán eliminando fuentes de inóculo de los patógenos que potencialmente podrían ocasionar podredumbres en poscosecha. Un abonado equilibrado con nitrógeno, fósforo y potasio y una correcta planificación de los riegos puede incidir en la resistencia natural a desarrollar podredumbres que presentan los frutos. Además, es necesario planificar los tratamientos químicos en precosecha en función de la epidemiología de los patógenos para cada campaña y para cada caso en particular, con el fin de diseñar la estrategia de control más eficaz.

El momento de la recolección es uno de los puntos clave, esta debe realizarse con extrema precaución, evitando la incidencia de golpes y heridas. Además, se debe descartar los frutos ya afectados por podredumbres, los que han caído en el suelo y han podido contaminarse con esporas, los que presentan heridas en la piel, etc., o bien separarlos del resto para ser tratados adecuadamente. Asimismo, los envases de campo deben mantenerse libres de tierra y de restos vegetales que podrían provocar contaminaciones en el “pulverizado”.

2. Reducir las poblaciones de patógenos en las Centrales Hortofrutícolas

La limpieza y desinfección de las cajas y de las instalaciones, al inicio del almacenamiento, resulta imprescindible para evitar reinfecciones en los frutos. En el caso de las cajas, las instalaciones de la central hortofrutícola, la línea de manipulación, las cámaras frigoríficas, pasillos, etc., es conveniente eliminar los restos de tierra y restos vegetales previamente a su desinfección mediante aspersión con un producto fungicida,

previa comprobación del nivel de contaminación. Para evitar que la materia orgánica interfiera en la actividad del producto desinfectante.

3. Mantener o mejorar la resistencia de los frutos a la infección

Hay que tener en cuenta que un correcto manejo del frío nos permite disminuir o incluso evitar el desarrollo de podredumbres, ya sea por un efecto directo de las bajas temperaturas sobre el hongo, o por un efecto indirecto, manteniendo la resistencia natural del fruto debida a la disminución en su actividad metabólica.

4. Tratamientos antifúngicos en poscosecha

La aplicación de productos fungicidas se basa en la eliminación del inóculo fúngico presente en la superficie del fruto, pero no tiene en cuenta que para que se produzca una podredumbre es necesario que se cumplan cinco condiciones: Nivel suficiente de inóculo; Contacto del inóculo con la fruta; Existencia de vías de penetración; Condiciones ambientales adecuadas y Nivel de susceptibilidad del fruto (Wilson y Wisniewski, 1989).

En todos los casos, para que el patógeno llegue a entrar en contacto con la superficie del fruto, éste debe coincidir espacial y temporalmente con alguno de los procesos de producción, manipulación y/o posterior comercialización del fruto y, además, debe haber una diseminación del inóculo hacia la superficie del fruto.

Para hacer un diagnóstico adecuado en una campaña es necesario conocer las características del fruto a tratar, los mohos que pueden dañar al fruto y conocer los productos químicos a utilizar (dosis, eficacia, toxicidad, límite máximo de residuos y precio) (Viñas, 1997).

Sería interesante para cualquier central cuantificar e identificar sus cepas resistentes a los principales fungicidas para elaborar un adecuado plan de tratamientos poscosecha (Torres *et al.*, 2006)

1. Rotando el uso de los productos fungicidas con el mismo modo de acción, en la medida en que la propia central y las exigencias de sus clientes lo hagan posible, e

2. Incorporando en su programa de tratamientos métodos alternativos a los productos químicos de síntesis.

2.7.3. Sistemas alternativos

Los problemas mencionados anteriormente por el uso de fungicidas, han hecho reflexionar a la opinión pública que solicita productos cada vez menos tóxicos y un medio ambiente menos contaminado. En esta línea, muchas cadenas de supermercados europeas, están exigiendo a los productores normas mucho más estrictas de producción y manejo de la fruta, un ejemplo claro es la aparición de las normas EUREP que vienen a unirse a las de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico de la Administración Sanitaria o a las de producción integrada de algunas Comunidades Autónomas. Todas estas normativas favorecen la futura implantación de sistemas de control biológico (Wilson, 1989).

Los factores anteriormente descritos han incentivado los estudios de métodos alternativos a los procedimientos habituales de control de plagas y enfermedades. Para buscar un sistema alternativo hay que tener en cuenta los siguientes conceptos preliminares (Viñas *et al.*, 1999):

- El nuevo sistema de control, a la larga no ha de generar los mismos problemas ni otros de peores que los surgidos con los productos químicos de síntesis.
- Se tiene que introducir paralelamente el concepto de umbral de daño económico, es decir convivir con un nivel de daño que sea compatible con nuestra estrategia comercial, no hay que pensar en niveles de control total.
- El concepto de control ha de ir relacionado con el de calidad, ya que los sistemas alternativos no han de actuar negativamente contra el concepto global de calidad, el cual incluye la no presencia de residuos químicos perjudiciales para la salud.
- Se tiene que educar a los consumidores, para que entiendan que la apariencia exterior no es siempre síntoma de “buena” fruta.

Entre los sistemas alternativos estudiados podemos destacar (Viñas *et al.*, 1998):

- Medidas profilácticas
- Incremento y inducción de la resistencia natural
- Tratamientos de calor
- Tratamientos con gases (CO₂, Ozono, O₂)
- Pesticidas naturales
- Productos químicos de bajo riesgo
- Irradiación
- Revestimientos
- ¿atmósferas controladas
- Microorganismos antagónicos

Todos estos métodos a su vez pueden ser clasificados en métodos físicos, químicos y biológicos.

Entre los métodos físicos, los tratamientos con calor constituyen una alternativa prometedora al uso de productos químicos de síntesis. Estudios recientes demuestran la eficacia de baños con agua caliente, en el control de la podredumbre verde y azul en poscosecha de cítricos (Palou *et al.*, 2001; 2002). Por otro lado, Plaza *et al.* (2003, 2004a; 2004b) demostraron que la aplicación de un tratamiento de curado a 33°C durante 65 horas controlaba completamente la incidencia de podredumbre verde y azul en mandarinas, naranjas y limones destinados a una comercialización inmediata.

Por otro lado, otras sustancias químicas que presentan una muy baja toxicidad, como los extractos de plantas, aceites esenciales, peróxido de hidrógeno, las sales de carbonato y bicarbonato, etc., son estudiadas y utilizadas en el control de podredumbres. Las que proporcionan mejores resultados en cítricos son las sales de carbonato y bicarbonato. Las investigaciones indican que una inmersión en soluciones de carbonato o

bicarbonato de sodio al 2 o 3% controlan satisfactoriamente las podredumbres verde y azul (Smilanick *et al.*, 1997; 1999; Palou *et al.*, 2001, 2002).

La utilización de microorganismos antagónicos, presentes de forma natural en la superficie del fruto se está convirtiendo en una alternativa viable en la protección de los frutos contra las enfermedades de poscosecha (Viñas y col., 1998).

2.8. Control biológico

2.8.1. Definición y antecedentes

En 1988 Nigam y Mukerji indicaban que el control biológico es 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 de su capacidad de inhibición de las enfermedades. En lo que respecta a las enfermedades en poscosecha el término de control biológico o Biocontrol de enfermedades ha experimentado cambios en cuanto a su contenido y definición, siendo la más aceptada la que define al control biológico como "la reducción del inóculo o de la actividad productora de enfermedad del patógeno, debido a uno o más organismos, incluida la fruta y excluido el hombre". De esta definición se desprenden un gran número de posibles vías a explorar en la búsqueda del control de las enfermedades de poscosecha de frutas y verduras. Estas son: Uso de microorganismos antagónicos, uso de fungicidas naturales derivados de metabolitos del fruto y la manipulación de la resistencia en los frutos. En estas definiciones se apunta también que la relación biológica entre los agentes de control y los patógenos es bastante específica, de tal forma que se debe buscar un método de control para cada enfermedad.

Debemos remarcar que la fruta almacenada en cámaras frigoríficas representa una buena oportunidad para utilizar sistemas de lucha biológica para el control de las enfermedades de post-cosecha, ya que la fruta se encuentra bajo condiciones ambientales controladas, tanto en humedad relativa, temperatura como por la concentración de gases (El-Ghaouth y Wilson, 1995).

La supervivencia del antagonista en el hábitat bajo las condiciones ambientales a las que ha de proteger el material vegetal, será uno de los principales factores que determinen su utilidad como agente de biocontrol. En el caso de la poscosecha el antagonista deberá sobrevivir y conservar su efectividad después de exponerlo a tratamientos de poscosecha y bajo condiciones de almacenamiento, tanto de humedad relativa, como a bajas temperaturas y a diversas relaciones de O₂/CO₂ (Janisiewicz, 1991). Algunos microorganismos, sobre todo las levaduras, pueden crecer y sobrevivir sin agua libre en el fruto y por otra parte, las bajas temperaturas pueden permitir una buena supervivencia de los antagonistas pero disminuir su efectividad (Droby y Chalutz, 1994).

2.8.2. Utilización de levaduras

Al final de la década de 1980 y comienzos del decenio de 1990 se reportaron antagonistas microbianos con capacidad de controlar varios agentes patógenos diferentes en diversos frutos. Entre estos antagonistas, muchas levaduras como por ejemplo *Debaromyces hansenii* para el control en poscosecha de cítricos (Chalutz y Wilson, 1989; Droby *et al.*, 1989; Droby, Chalutz y Wilson, 1991; Wisniewski *et al.*, 1992) y varias peras, ambos de origen natural e introducidos artificialmente, proponiéndose como alternativas prometedoras a fungicidas en el control de enfermedades de post-cosecha (Wilson y Wisniewski, 1992).

Las levaduras presentan características interesantes que las hacen útiles para fines de biocontrol: Por ejemplo, no producen esporas alergénicas (micotoxinas) como lo hacen muchos hongos, o antibióticos como metabolito producido por bacterias antagonistas. Las levaduras tienen por lo general necesidades nutricionales simples y son capaces de colonizar superficies secas por largos períodos de tiempo. Éstas rápidamente utilizan los nutrientes disponibles y pueden resistir muchos de los plaguicidas utilizados en poscosecha. Las levaduras pueden crecer rápidamente en sustratos pobres, en fermentadores y por tanto, son fáciles de producir en grandes cantidades (Stringer, 1982; Bui y Galzy, 1990; Hussein *et al.*, 1996).

2.8.3. Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol

Según Droby y Chalutz (1994), el conocimiento del modo de acción de los antagonistas es importante por una serie de razones: para la optimización de los métodos y los momentos de aplicación de los antagonistas; para el desarrollo de formulaciones apropiadas que incrementen su utilización, pues proporciona una buena base para seleccionar nuevos antagonistas efectivos y finalmente, para el registro de los agentes de biocontrol para su posterior uso comercial.

Los mecanismos por los cuales el agente de biocontrol inhibe al patógeno son poco conocidos, ya que es extremadamente difícil realizar experimentos que puedan excluir todos los otros posibles mecanismos en el complejo entorno de biocontrol. Para la mayoría de organismos de biocontrol se han sugerido varios modos de acción y hasta ahora nadie ha demostrado que un solo mecanismo de acción sea responsable de todo el efecto de biocontrol (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Varios posibles mecanismos de control biológico se han sugerido para ser eficaz contra enfermedades en poscosecha de fruta, entre ellos: antibiosis, competencia por los nutrientes y espacio, parasitismo o la interacción directa con el patógeno, y la inducción de resistencia a tejidos (Droby y Chalutz, 1994).

a) Competencia por los nutrientes y/o el espacio

Los antagonistas que tienen este tipo de modo de acción a menudo están mejor adaptados a las condiciones adversas del medio que los patógenos. El antagonista ha de mostrar un rápido crecimiento en las heridas, tiene que ser capaz de utilizar nutrientes a bajas concentraciones y sobrevivir y desarrollarse en la superficie del fruto o en el lugar de infección a bajas temperaturas, pH extremos 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 (Filonow, 1998).

Botrytis cinerea y *Penicillium expansum* son dos hongos de poscosecha típicamente dependientes de los nutrientes. Son necrotróficos y sus esporas requieren de nutrientes exógenos para poder germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Esos nutrientes los encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo su desarrollo. Droby *et al.* (1994) estudiaron el mecanismo de antagonismo de una cepa de *Pichia guilliermondii* cuando se aplica sobre heridas de pomelos para controlar el ataque por *Penicillium digitatum*. En dicho trabajo concluyen que la competencia por nutrientes es uno de los mecanismos mediante los cuales se logra un efectivo control del patógeno en las heridas (Janisiewicz *et al.*, 2000).

Sin embargo, la competencia por nutrientes es difícil de probar, ya que suele ser muy difícil de excluir en el estudio todos los demás mecanismos. Droby *et al.* (1989) demostraron que la adición de nutrientes exógenos redujo la eficacia de *P. guilliermondii* contra *P. digitatum*. Filonow (1998) observó que las levaduras antagonistas *C. lauretii* y *Sporobolomyces roseus* presentaban un alto consumo de azúcar en comparación al agente patógeno *B. cinérea*. Sin embargo, no existían diferencias en el consumo de azúcar entre las levaduras con y sin actividad de biocontrol, lo que sugiere que otros factores son parte del mecanismo de inhibición. En una placa de cultivo de tejidos con sistema un membrana que separa las inserciones en los organismos, Janisiewicz (2000) fue capaz de demostrar que *Aureobasidium pullulans* consume los aminoácidos e inhibe la germinación de *P. expansum* en el zumo de manzana. La producción de sustancias inhibitorias fue excluida, mediante un test de difusión en agar de filtrados de las placas de cultivo. La competencia por espacio también ha sido reportada, Wilson y colaboradores mencionan que las levaduras son efectivas colonizadoras de la superficie de plantas y destaca la producción de materiales extracelulares (en especial polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos (Wilson *et al.*, 1996).

b) producción de antibióticos y otros inhibidores

En la búsqueda de antagonistas naturales para el control de las enfermedades de poscosecha también se ha señalado que en algunos casos la causa de la inhibición del

crecimiento del patógeno podría ser la producción de algún antibiótico por parte del antagonista, este es el caso de *Pseudomonas cepacia*, productora de pirrolnitrina y que controla una amplia gama de patógenos en distintos frutos, entre los cuales destaca el *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en fruta de pepita (Janisiewicz y Roitman, 1988).

Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que, al igual que cuando se usan fungicidas sintéticos, existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico. El antecedente más notorio ha sido el caso de la aparición de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (causante de la agalla de la corona de las plantas) resistentes al Agrosin 84, un antibiótico producido por *Agrobacterium radiobacter* (Campbell 1989). La antibiosis a su vez genera rechazo por parte de consumidores quienes exigen se estudie la posible toxicidad u otro tipo de daño a la salud que estos compuestos pudiesen provocar. Sin embargo sus defensores alegan que no se puede comparar la liberación de una sustancia a escala microbiana con el uso masivo de agroquímicos. Incluso si los productores de antibióticos parecen ser capaces de controlar las infecciones antes de establecerse, en este momento no hay tales microorganismos registrados para su uso en el sector de las frutas.

c) Por inducción de resistencia en el huésped

Algunos metabolitos secundarios producidos por algunos microorganismos pueden inducir a procesos de resistencia en el huésped, como en la producción de sustancias inhibitoras. Algunos microorganismos antagónicos pueden interaccionar con el tejido, en particular con las heridas, lo que aumenta los procesos de cicatrización (Droby y Chalutz, 1994). Algunas cepas de *Candida* spp. son capaces de causar cambios químicos y osmóticos en los tejidos de manzana (McLaughlin *et al.*, 1990). *P. guilliermondii* ha demostrado ser capaz de estimular la producción de etileno, hormona que activa la fenilalaninammonium-liase (Wisniewski *et al.*, 1991), enzima implicada en la síntesis de fenoles, fitoalexinas y ligninas, además de controlar el decaimiento en poscosecha. Otra especie de interés es *A. pullulans* la cual puede causar un aumento transitorio en β -1,3-

glucanasa, quitinasa, peroxidasa en la manzana a partir de 24 h después del tratamiento (Ippolito *et al.*, 2000).

d) Por interacción directa con el patógeno

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la predación (Blakeman y Brodie, 1976).

1. Parasitismo

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que lisan las paredes de las hifas, conidios o esclerotos (Paster *et al.*, 1993).

Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. La levadura *P. guilliermondii* inhibe y se adhiere firmemente a el micelio de *B.cinerea* (Wisniewski *et al.*, 1991). Jijakli y Lepoivre (1998) también han demostrado que *Pseudomonas anomala* cepa K tiene una fuerte producción de β -1,3-glucanasa enzima que degrada la pared celular de hongos.

Droby *et al.* (1991) demostraron que *P. guilliermondii* puede estimular la producción de etileno en pomelos, mientras que Rodov *et al.* (1994) han observado que estimula la producción de fitoalexinas en cítricos. *Aureobasidium pullulans* y *Candida saitoana* han demostrado inducir la acumulación de β -1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidadas en manzanas (Ippolito *et al.*, 2000; El Ghaouth *et al.*, 2003). Estas observaciones sugieren que todos los antagonistas estimulan algún tipo de respuesta de defensa.

2. Predación

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell 1989).

e) Efecto del pH

La existencia de un pH inadecuado en el lugar de actuación del patógeno puede inhibir su desarrollo. Los agentes de biocontrol podrían actuar variando el pH de la fruta, para que este fuera desfavorable al crecimiento de los patógenos (Wilson y Wisniewski, 2003).

2.8.4. Características de un antagonista ideal

Al momento de seleccionar un microorganismo como agente para el control biológico en postcosecha, además de estudiar su poder inhibitorio, se han de tener en cuenta muchas otras características; las más importantes son (Wilson y Wisniewski, 1989):

2. Estabilidad genética.
3. Efectividad a bajas concentraciones.
4. Poca exigencia en cuanto a requerimientos nutricionales (incluido en bajas temperaturas y en almacenamiento bajo condiciones controladas).
5. Gran capacidad de crecimiento.
6. Efectivo para un gran número de patógenos y para diversas frutas y vegetales.
7. Capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos.
8. Formulación estable en el tiempo.

9. Facilidad de aplicación.
10. No productor de metabolitos secundarios que sean tóxicos para personas y animales.
11. Resistencia a los pesticidas.
12. Compatibilidad con otros tratamientos químicos o físicos.
13. No patogénico sobre el huésped.

Todo antagonista en potencia para ser eficaz contra hongos de poscosecha ha de tener pues la habilidad de colonizar y persistir con comodidad a niveles efectivos, ser compatible con otras prácticas, procesos y productos químicos de poscosecha y ser efectivo a bajas temperaturas y en algunos casos en condiciones de atmósfera controlada. Además el organismo ha de ser producible a gran escala utilizando productos de bajo coste. Si se cumplen todas las premisas, los microorganismos serán potencialmente comercializables (Torres *et al.*, 2006)

2.8.5. Uso integral de métodos de control para enfermedades en poscosecha

Los medios biológicos no pueden en este momento resolver todos los problemas de la fruta que se pudre durante el almacenamiento y deben ser considerados instrumentos que deben utilizarse en combinación con otros métodos en una visión integrada de la enfermedad. Por ejemplo, agentes de biocontrol pueden combinarse con ceras y fungicidas aplicados no sólo en situaciones posteriores, sino también en pre-cosecha (Pusey, 1994). En algunos ensayos de laboratorio y semicomerciales la eficacia de *P. guilliermondii* fue aumentando constantemente mediante la adición de pequeñas concentraciones de imazalil o tiabendazol, alcanzando un nivel de control similar al uso de fungicidas (Droby *et al.*, 1994). Las levaduras son generalmente tolerantes a muchos de los fungicidas utilizados en poscosecha: *Metschnikowia pulcherrima* (Spadaro *et al.*, 2004) es tolerante a concentraciones relativamente altas de benzimidazoles (benomilo y tiabendazol) y dicarboximidazoles (vinclozolin y procimidona). Por otra parte, los microorganismos necesitan para sobrevivir en el marco del ambiente comercial de temperatura, humedad y condiciones

de almacenamiento. La eficacia de *M. pulcherrima* contra *B.cinerea* y *P. expansum* se incrementa cuando los frutos son almacenados a baja temperatura en comparación con el almacenamiento a 23 °C, debido a que el antagonista es más adaptable que los agentes patógenos a bajas temperaturas (Spadaro *et al.*, 2004).

Entre las combinaciones de tratamientos biológicos con otras técnicas alternativas a los productos químicos encontramos: la termoterapia, los rayos ultravioleta (Chalutz *et al.*, 1992), utilización de productos naturales (Aharoni *et al.*, 1993), infiltraciones de calcio (Janisiewicz *et al.*, 1998), bicarbonato de sodio (Teixidó *et al.*, 2001) o etanol (Spadaro *et al.*, 2002).

El cloruro de calcio combinado con una aplicación antagonista en manzanas aumenta el control de *P. expansum* después de tres y seis meses de almacenamiento a 1 °C, en comparación con el tratamiento biológico por sí solo (Janisiewicz *et al.*, 1998). Incluso un enfoque más integrado, con experiencia en manzanas "Gala" (Conway *et al.*, 1999) consiste en un tratamiento térmico (cuatro días a 38 ° C), seguido de cloruro de calcio (2%) y la aplicación de una suspensión celular de *Pseudomonas syringae*. En los resultados de estos tratamientos combinados, se observó una reducción de la infección, lo que ha demostrado ser significativamente mejor que el uso del tratamiento de calcio, aplicación de antagonistas, o de calefacción por sí solos.

La eficacia de *Pantoea agglomerans* para el control de moho verde mejoró cuando se combina con bicarbonato de sodio (Teixidó *et al.*, 2001), un aditivo alimentario común, sin restricciones para su aplicaciones en Europa y América del Norte, y clasificada como un ingrediente en los productos alimenticios orgánicos.

2.8.6. Los antagonistas en atmosferas controladas

Las frutas están sometidas a un amplio margen de condiciones de almacenamiento para detener las alteraciones fisiológicas y microbianas. Una variedad de ambientes son creados y mantenidos para conseguir este fin. Incluyendo la refrigeración y las atmosferas modificadas/controladas a pesar de que las enfermedades de poscosecha pueden ser reducidas al modificar las condiciones de almacenamiento, los tratamientos con fungicidas son de gran importancia para disminuir, de forma eficaz, las podredumbres fúngicas. El

uso de microorganismos antagonistas como sustitutivos de los fungicidas bajo estas condiciones presenta algunos retos y oportunidades únicas, que a continuación se tratan (Snowdon, 1990).

La composición de las poblaciones epifitas en los frutos recolectados a la entrada de la central hortofrutícola puede influir en su almacenamiento y los tratamientos de pre almacenamiento pueden afectar profundamente tales poblaciones. Los patógenos varían en su adaptabilidad a las diferentes condiciones de almacenamiento. En la selección de los antagonistas es preciso elegir a aquellos mejor adaptados, a la supervivencia, al crecimiento sobre el fruto, a las superficies de vegetales y a las heridas bajo condiciones de almacenamiento y que tengan una ventaja adaptativa sobre determinados patógenos específicos (Snowdon, 1990).

La adaptabilidad de los patógenos y antagonistas necesita ser examinada bajo condiciones ambientales específicas, como las que se presentan en atmosferas de almacenamiento controladas y modificadas. Los nutrientes que se encuentran sobre la superficie de la planta pueden afectar la composición y número de microorganismos epifitos. Cuando las frutas y las hortalizas maduran en almacenamiento desprenden una serie de nutrientes, sustancias volátiles y otros compuestos secundarios. Algunas de estas sustancias químicas pueden actuar favoreciendo el crecimiento microbiano y otras pueden ser biocidas o biológicamente inertes. Si deseamos aplicar de forma efectiva antagonistas para el control de las enfermedades de almacenamiento de frutas y vegetales, debemos entender los cambios nutricionales/medio químicos que tienen lugar en las superficies de los frutos almacenados y como estos afectan a las interacciones antagonista-patógeno-huésped (Snowdon, 1990).

2.8.7. Etapas de un programa de control biológico

Para definir un sistema biológico que controle una determinada enfermedad, se han de considerar muchos factores, entre otros podemos citar la capacidad de mantenerse por si mismo en la planta y en que condiciones ambientales se adaptara mejor y podrá obtener unos niveles de población suficientes para competir con la microflora existente. Para que un

microorganismo se convierta en un agente de biocontrol y pueda comercializarse, es imprescindible la colaboración de todos los grupos implicados en el proceso, entre los que se incluye a los investigadores y a las empresas del sector de los agroquímicos (Viñas *et al.*, 1998).

Las etapas a cubrir son las siguientes (Viñas *et al.*, 1998):

- Descubrimiento e identificación del agente de biocontrol (aislamiento).
- Realización de los ensayos de eficacia.
- Realización de los ensayos de seguridad, tanto para el hombre, como para el ambiente, y para los organismos que no ha de controlar.
- Estudio de la estabilidad genética del agente de biocontrol, ya que durante su utilización no habría de perder su actividad.
- Estudio de su potencial para la producción en masa.
- Formulación del agente de biocontrol con elementos que incrementen su eficacia.
- Realización de ensayos de estabilidad y caducidad del producto.
- Estudio del mercado potencial
- Evaluación de los costes del producto.
- Realización de análisis de inversiones.
- Realización de ensayos a nivel comercial.
- Patente del agente de biocontrol.
- Registro del agente de biocontrol.
- Comercialización y venta del pesticida biológico a los usuarios.

Un aspecto muy importante en la comercialización de los agentes de biocontrol es la aceptación por parte de la sociedad de la aplicación de microorganismos "vivos" en los alimentos. Esta idea no es nueva, ya que desde tiempos muy antiguos, las fermentaciones mediante microorganismos han sido un método importante para preservar los alimentos. La adición de microorganismos en la preparación del pan y en productos derivados de la leche ha sido ampliamente aceptada. Por esto parece que la sociedad aceptaría los antagonistas

microbianos si estos llegasen a ser una alternativa segura y efectiva a los fungicidas sintéticos (Wilson *et al.*, 1991).

Si lo analizamos a nivel de competitividad, podremos ver que los agentes de biocontrol tienen grandes ventajas frente a los productos de síntesis, las cuales se podrían resumir en (viñas *et al.*, 1999)

- Son más seguros en comparación con los principales productos químicos utilizados actualmente, ya que los microorganismos no se acumulan en los alimentos
- Los microorganismos utilizados como agentes de control, pueden ser más persistentes a lo largo del tiempo que los productos químicos, ya que los primeros no alteran de manera sustancial los principales aspectos del patógeno.
- Los agentes microbianos producen un efecto insignificante en el balance ecológico, particularmente porque no destruyen a los enemigos naturales de las especies patógenas.
- La utilización de microorganismos en el control de las enfermedades es muy a menudo compatible con otros sistemas de lucha, incluidos los productos químicos

2.8.8. Situación actual y perspectivas de la utilización de agentes de biocontrol

En los últimos años se ha intensificado la investigación en el campo de la lucha biológica de las enfermedades de poscosecha en fruta; podemos destacar manzana y pera (Janisiewicz, 1987; 1988; 1991; Janisiewicz, 1999), en frutos de hueso (Pusey y cols, 1988; Pussey y Wilson, 1984), en cítricos (Chalutz, 1989; Smilanick y Dennis-Arrue, 1992), en plátanos (Kanapathipillai y Jantan, 1985) y en frutas pequeñas como son las fresas (Janisiewicz, 1998).

Actualmente también se están realizando muchos estudios para la mejora de la capacidad antagónica de los agentes de biocontrol ya descubiertos, como la adición de nutrientes (Janisiewicz *et al.*, 1992) o la combinación con otros sistemas de lucha (El Ghaouth y Wilson, 1988). También se están dedicando muchos esfuerzos en nuevos

trabajos de manipulación genética (Pusey, 1994). Muchos analistas sobre industrias y negocios de pesticidas están de acuerdo en afirmar que la transición desde el control químico al biológico, si bien será gradual, es inevitable. Los dos principales factores que determinan que sea o no factible la utilización de un determinado agente de biocontrol, son su fiabilidad y la rentabilidad económica. En los últimos años se ha avanzado mucho en la búsqueda de agentes de biocontrol de postcosecha, con unos buenos resultados, debido principalmente a la facilidad de reproducir los resultados en condiciones de atmósfera controlada. (Viñas, 1998)

Pero este avance en la investigación no ha rendido frutos concretos en Europa, debido principalmente a que en la Unión Europea no existe una legislación que favorezca su registro. Prueba de ello es que actualmente no hay ningún agente de biocontrol registrado en poscosecha. Contrariamente al que podría suponerse, en EE.UU. ya existe una normativa específica de registro de los agentes de biocontrol, que consiste en una serie de niveles de estudios toxicológicos, cada vez más costosos y largos, pero si el agente de biocontrol supera el primero, se acepta sin necesidad de realizar más estudios toxicológicos. Esta gran diferencia de costos y tiempo es principalmente debida al gran interés por parte de la EPA (Agencia de Protección Medio-ambiental) de los EE.UU., en facilitar la aparición de pesticidas biológicos (Viñas, 2002)

En la actualidad existen tres productos comerciales de levadura de biocontrol disponibles en el mercado para combatir el decaimiento en post-cosecha de frutas. Aspire® (Ecogen, Inc, Langhorne, Pa) basado en la levadura *Candida oleophila* utilizado como spray o inmersión en contra de las enfermedades de pepita y cítricos (Janisiewicz y Korsten, 2002; Janisiewicz *et al.*, 2003). Rendimiento Plus® con *Cryptococcus albidus* como antagonista activo se introdujo comercialmente en el mercado sudafricano en 1997 y se utiliza como un producto biológico contra *Botrytis*, *Penicillium* y *Mucor* en manzanas y peras. El reciente producto Shemer®, están registrados en Israel, se basa en la levadura identificada como *Metschnikowia fructicola* y es eficaz contra una amplia gama de agentes patógenos de uva, fresa y camote (Kurtzman y Droby, 2001)

En México, Sánchez (2008)) demostró que levaduras nativas recuperadas de la superficie de manzano en la Sierra de Querétaro presentan alta capacidad antagónica contra *P. expansum* Link y que no existe una correlación significativa entre el comportamiento de las levaduras en ensayos *in vitro* comparados con los realizados sobre frutos (*in vivo*). Por su parte, Castañeda (2005) observó que la aplicación de Captán en el campo para control de enfermedades de precosecha no altera el efecto antagónico de las levaduras; incluso, la aplicación de microorganismos en el campo (*Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp.) tiende a potenciar el poder antagónico de éstas, así como que el efecto antagónico por mezclas de levaduras es igual o incluso superior al que tienen estas en forma individual contra *P. expansum*.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad antagonica de levaduras nativas contra *P. expansum* durante el almacenamiento a 4 °C y estudiar algunos de los posibles mecanismos de acción que ejercen estas levaduras.

Objetivos específicos

1. Evaluar la resistencia genética de diferentes genotipos de manzana establecidos en la Sierra de Querétaro a *P. expansum* Link en poscosecha.
2. Evaluar el poder antagonico de distintas levaduras contra *P. expansum* en manzanas almacenadas en cámara frigorífica a 27 °C por diez días y a 4° C por 90 días.
3. Determinar si las levaduras con elevado poder antagonico sobre *P. expansum* son capaces de producir sustancias antimicóticas. o competir por nutrientes y/o espacio con el patógeno.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Frutos

Se utilizaron manzanas de distintos genotipos o cultivares. Algunas de las características de éstos se consignan en la Tabla 4.1. Las manzanas fueron cosechadas en estado de madurez aparente en un huerto comercial establecido en la comunidad de ‘El Suspiro’, perteneciente al municipio de Cadereyta, Qro. (Fig. 4.1) y llevadas directamente al laboratorio antes de recibir cualquier tipo de tratamiento de poscosecha. Hasta su utilización en los ensayos, los frutos se mantuvieron en una cámara frigorífica a 4 °C y 90% de humedad relativa (HR). El día previo al del ensayo los frutos se seleccionaron, se lavaron con agua corriente y se dejaron secar en las condiciones ambientales del laboratorio hasta su utilización.

Tabla 4.1. Genotipos de manzanas cultivados en la sierra de Querétaro

N°	Código	Descripción	Vigor del árbol	Rendimiento estimado
1	436	Anna x Gala	Muy alto	Muy bueno
2	424	Anna x Princesa	Muy alto	Bueno
3	SM1	Origen desconocido	Bueno	Muy bueno
4	467	Origen desconocido	Bajo	Regular
5	SM2	Origen desconocido	Bueno	Regular
6	428	(Anna x Gala)	Bueno	Muy bueno
7	401	Tropical Beauty x Princess	Regular	Regular
8	429	Anna x CLR9T10	Alto	Bueno
9	438	(Anna x CLR9T10)	Bueno	Regular
10	SM3	Origen desconocido	Bajo	Bueno
11	421	Anna x Gala	Regular	Muy Bueno
12	419	Golden 650 x Gala	Muy alto	Regular
13	SM4	Sin Marca 4	Muy alto	Bueno
14	SM5	Sin Marca 5	Regular	Bueno
15	--	“Golden Delicus”	Alto	Muy alto
16	--	“Red Delicus”	Alto	Muy alto
17	--	“Rayada”	Alto	Muy alto
18	--	<i>Micromalus</i>	Alto	Muy alto
19	--	<i>Lourdes</i>	Alto	Muy alto

(Mendoza, 2008)



Figura 4.1. Ubicación de la Comunidad del suspiro en el municipio de Cadereyta, Qro.

4.1.2. Levaduras

Se utilizaron 50 cepas de levaduras que fueron aisladas de manzanas de la región productora de Querétaro y de velos de vinos producidos en el Laboratorio de Fisiología de Poscosecha de la UAQ (Sánchez, 2008; Castañeda, 2005). Seis de ellas han sido identificadas a nivel de especie (Tabla 4.2). Estas levaduras se encuentran almacenadas a 4°C en NYDA (caldo nutritivo, 8 g l⁻¹; extracto de levadura 5 g l⁻¹; dextrosa 10 g l⁻¹; agar 15 g l⁻¹).

Tabla 4.2. Cepas de levadura utilizadas en este estudio

Cepa	Especie
5 vtt	<i>Candida incommunis</i>
38-432	<i>Debaromyces hansenii C</i>
35-111	<i>Cryptococcus albidus</i>
4 bco	<i>Pichia membrifanciens</i>
26-224	<i>Torulaspota spp.</i>
22-211	<i>Pichia guillermndii</i>
3-5241	<i>Saccharomyces boulardio</i>

4.1.3. *P. expansum* link

Se utilizó la cepa del hongo *P. expansum* Link CFNL2016* (aislada de manzanas ‘Golden Delicious’ en proceso de pudrición y seleccionada por su agresividad en manzanas); ésta se incubó y mantuvo en agar papa dextrosa (APD: 200 ml de extracto de

* Registrada por el Cepario de el Departamento de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Nuevo León

papas hervidas, 20 g de dextrosa, 20 g de agar y 800 ml de agua) a 25°C durante siete a 10 días. Para mantener su virulencia, se inoculó sobre manzanas y se reaisló periódicamente.

4.2. Esquema general de trabajo

La metodología general de trabajo se muestra en la Figura 4.2. Muestras de manzana de diferentes cultivares se evaluaron en cuanto a su tolerancia al hongo *P. expansum* Link. Por otro lado, se evaluó mediante pruebas de efectividad *in vivo* en manzanas ‘Golden Delicious’ la capacidad antagonista a 4 °C de 50 de levaduras contra *P. expansum*. Posteriormente, se efectuaron ensayos, *in vivo* y *in vitro* para estudiar algunos posibles mecanismos de acción que ejercen las levaduras sobre el patógeno (*P. expansum*).

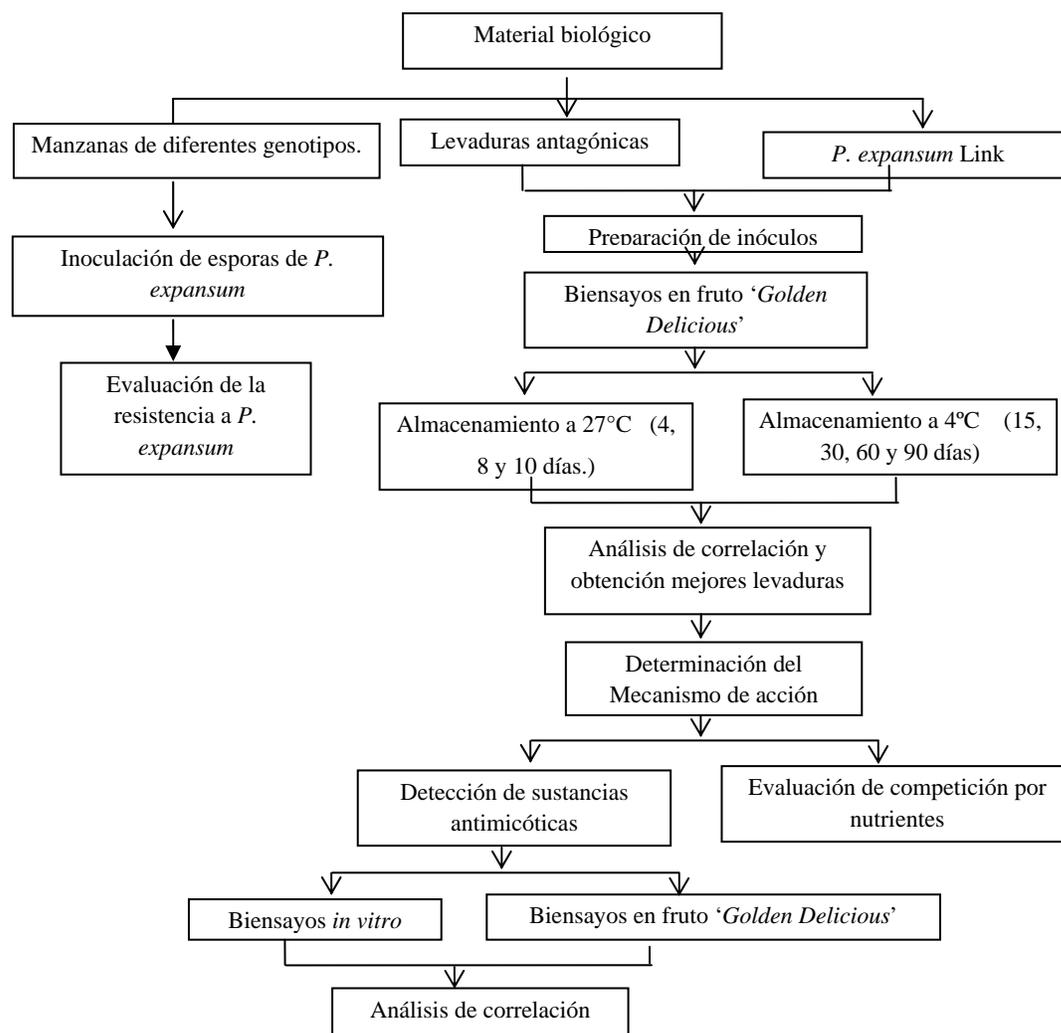


Figura 4.2. Metodología General

4.3. Preparación de inóculos

4.3.1. *P. expansum*

La cepa del hongo que se encontraba almacenada en APD a 4 °C fue activada tomando una fracción del micelio del cultivo con la ayuda de una aguja de disección, ésta se inoculó en cuatro puntos equidistantes en una nueva placa de APD, y se incubó por ocho días a 26 °C. Se retiró micelio del nuevo crecimiento para resembrarlo en otra placa e incubarlo nuevamente por ocho días. Posteriormente, una suspensión conidial fue preparada agregando 10 ml de diluyente peptona sobre la superficie de los medios de cultivos (crecidos en APD por ocho días), obteniéndose así las esporas de la superficie. Las esporas recuperadas se contaron con una cámara de Neubauer y fueron diluidas para obtener una concentración de 1×10^4 CFU ml⁻¹ para utilizarse en experimentos para el control de la enfermedad (Viñas, 2002).

4.3.2. Levaduras

Los cultivos de levaduras almacenadas a 4 °C en NYDA fueron resembrados en 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) durante 72 h a 26 ± 1 °C y 200 rpm de agitación (Usall, 2001). El medio NYDB se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 1 ml de diluyente de peptona. Posteriormente se realizaron diluciones en serie a partir del concentrado y, a partir de la técnica de vaciado en placa, 1 ml de cada solución fue colocado en placas con APD las cuales se sometieron a incubación a 26° C/48 h. Para experimentos posteriores la concentración del inóculo se ajustó a 1×10^7 UFC/ml (Sánchez, 2008).

4.4. Resistencia a *P. expansum* de distintos genotipos de manzana

4.4.1. Metodología

Muestras de manzana de los diferentes genotipos colectados en un huerto semicomercial establecido en 'El Suspiro', Cadereyta, Qro. se lavaron con agua corriente y se dejaron secar bajo la campana de flujo laminar por 10 minutos. Posteriormente 20 µl de la suspensión de esporas de *P. expansum* se inocularon con una micropipeta en cuatro incisiones equidistantes de aproximadamente 3 mm de longitud, 3 mm de anchura y 3 mm de profundidad, practicadas previamente en la zona ecuatorial de cada fruto. Las manzanas inoculadas se dejaron secar en una campana de flujo laminar por 1h (Viñas *et al.*, 1997). Cada manzana fue colocada en un frasco de plástico con tapa hermética (7.7 cm. de ancho x 9.0 cm. de largo) desinfectado previamente con etanol a 70%. El frasco se tapó y la muestra fue almacenada a 26° C por diez días, midiéndose el desarrollo de la lesión después de cuatro, ocho y diez días.

4.4.2. Diseño del experimento

- a) **Diseño de tratamientos:** Unifactorial
- b) **Diseño experimental.** Completamente al azar con cinco repeticiones
- c) **Factor de estudio.** Diferentes cultivares de manzana (20 tratamientos).
- d) **Unidad experimental.** Una manzana con tres heridas en la zona ecuatorial, tomando como dato unitario el promedio obtenido de las tres heridas
- e) **Variables evaluadas.**

- Severidad (diámetro de la lesión ocasionada por *P. expansum* después de ocho días de incubación). La medición de esta variable se llevará a cabo tomando en cuenta la distancia comprendida de un extremo al otro de la herida, con la ayuda de un Vernier.

- Incidencia: El porcentaje de heridas que presentaron desarrollo del hongo en comparación del blanco.

4.5. Evaluación del antagonismo de levaduras contra *P. expansum*

4.5.1. Metodología

Para este ensayo se utilizaron manzanas 'Golden Delicious' en estado de madurez fisiológica aparente. A los frutos se les lavó con agua corriente y se infringieron cuatro perforaciones en forma de cubo (3 x 3 x 3 mm) equidistantes en la zona ecuatorial (Green, 1992). En las heridas realizadas se depositaron 25 µl de una suspensión celular del antagonico o de agua destilada estéril para el caso del testigo. Una hora después se inocularon en las heridas 20 µL de la suspensión del hongo (10^4 UFC ml⁻¹), que se dejaron secar 1 h bajo flujo laminar; y los frutos se depositaron dentro de frascos de plástico desinfectados con etanol a 70%; éstos se rotularon y se taparon para evitar contaminaciones y se colocaron en incubación a 26 y 4 °C, un experimento para cada temperatura, tomándose lecturas de las variables cada 15, 30, 60 y 90 días en el ensayo realizado a 4°C y cada cuatro, ocho y diez días en los ensayos realizados a 26°C.

4.5.2. Diseño del experimento

El diseño experimental que se utilizó fue uno completamente al azar con cinco repeticiones, siendo el factor de estudio las distintas levaduras y la unidad experimental un fruto con tres heridas, tomándose como valor unitario el promedio de las tres lecturas.

Las variables evaluadas fueron:

- ***Incidencia del daño causado por el hongo:*** Porcentaje de heridas que mostraron síntomas visibles de la infección (González, 1999; Leibinger *et al.*, 1997; Teixidó *et al.*, 1998).
- ***Severidad del daño causado por el hongo:*** Diámetro de la lesión en milímetros después de cuatro, ocho y 12 días (González, 1999; Teixidó *et al.*, 1998).

Asimismo, se llevó a cabo un análisis de correlación simple por pares entre los resultados obtenidos con las distintas levaduras a las dos temperaturas.

4.6. Evaluación de mecanismos de acción de las levaduras sobre *P. expansum*

Las levaduras que observaron el mejor comportamiento en los ensayos realizados a las dos temperaturas fueron seleccionadas para evaluar los posibles mecanismos de acción que éstas pudieran ser capaces de desarrollar.

4.6.1. Determinación de la producción de sustancias antimicóticas (antibiosis)

Un día antes del ensayo las manzanas fueron extraídas de la cámara frigorífica, se lavaron con agua y se dejaron secar. Posteriormente fueron colocados cinco frutos por tratamiento en alvéolos (Droby, 1994), los cuales consistían en lo siguiente:

	Tratamientos	1ª inoculación	2ª inoculación
1	Testigo	Sln. Amortiguadora	Sln. amortiguadora
2	Control (-)	Sln. Amortiguadora	Patógeno
3	Control (+)	Fungicida	Patógeno
4	Muestra	Levadura	Patógeno

A cada fruto se infringieron cuatro heridas equidistantes con ayuda de un punzón y en cada fruto (en sus heridas) y se inoculó el tratamiento respectivo; para el caso del blanco (presencia de fungicida) y el control negativo, 15 µl de una solución amortiguadora, para el control positivo se inoculó 15 µl de un fungicida (captán) a una concentración de 1%. Finalmente, para la muestra se inocularon 15 µl de una suspensión de levadura a una concentración de 10⁷ ufc/ml.

Una vez inoculado cada fruto se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se inocularon 15 µl de una suspensión de esporas del patógeno a una concentración de 10⁴ esporas/ml. En el caso del blanco se inoculó con solución amortiguadora y se dejó secar. Para corroborar que se inoculó la concentración adecuada del hongo, se sembraron 10 µl de la suspensión de esporas del patógeno por extensión de superficie en NYDA, se incubó a

27 °C durante 48 h, y se efectuó haciendo el recuento de estas colonias. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento (Droby, 1994).

Las manzanas ya inoculadas se incubaron por seis días a 20°C después de lo cual se tomó una muestra con ayuda de un escarpelo (cubo de 5 x 5 x 5 mm) de una de las heridas y se pasó a un tubo Eppendorf. Posteriormente se trituró la muestra en presencia de 100µl de agua estéril. Para obtener la mayor parte de jugo posible, se adicionaron 150 µl más de agua y se agitó por 10 segundos. Para separar la pulpa del extracto de jugo, el tubo Eppendorf se centrifugó a 13000 rpm a 20 °C por 20 min., tras lo cual se obtuvo el sobrenadante mediante filtración (con filtro de 0.22 µm). El jugo obtenido se aplicó en gotas en tres discos de papel filtro estériles que previamente habían sido colocados sobre placas de NYDA. En el centro de cada placa se inoculó el patógeno *P. expansum*, dejándose incubar las placas a 26°C hasta el momento de la lectura (presencia o ausencia de halos de inhibición); para cada uno de los ensayos se preparó una placa por cada herida del fruto.

4.6.2. Estudio de la competencia por nutrientes

Para este estudio se utilizaron tres placas, una de las cuales fue el control (sin levadura), la segunda constituía al patógeno y al antagonista separado por un filtro, y la tercera sin filtro (Figura 4.3) (Droby, 1994).

Preparación del control

- œ En una placa de micropozos, se colocó en los pozos 0.6 ml de agua estéril, jugo de manzana a 1, 5 o 10%, o medio sintético NYDA a 20% o 40%, diluido en solución fisiológica (8.5 g/l NaCl). Posteriormente, en cada pozo se adicionaron 0.4 ml de la suspensión del patógeno (*P. expansum*) preparada previamente en el ensayo de germinación a una concentración de 10^5 esporas/ml.

Preparación de la muestra con filtro

En una placa de micropozos, se colocaron en cada pozo 0.6 ml de agua estéril, jugo de manzana 1, 5 o 10%, o medio sintético NYDA 20 o 40%, diluido en solución fisiológica (8.5 g/l NaCl). A cada pozo se agregó el antagonista correspondiente (10^7 ufc/ml), y posteriormente se colocó un cilindro (Millipore 0.4 μ m) con 0.4 ml de la suspensión del patógeno (10^5 esporas/ml).

Preparación de las muestras sin filtro

Una placa de micropozos se preparó como se indicó en el párrafo anterior, a excepción de que el filtro no fue colocado en los pozos.

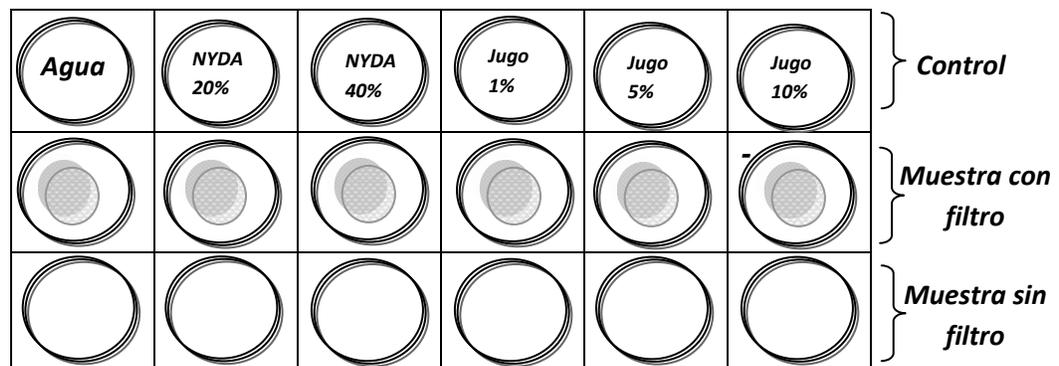


Figura 4.3. Microplaca de estudio de competición de nutrientes

Las placas se incubaron a 20°C durante 24-48 h. y se realizaron lecturas del porcentaje de esporas germinadas observando los pozos en el microscopio de inversión. Se contaron 100 colonias por tratamiento en tres diferentes campos.

Número de germinaciones				
0	1	2	3	4
○	○○	○○○	○○○○	○○○○○+

Figura 4.4. Determinación del índice de germinación de las levaduras antagónicas

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. Resistencia a *Penicillium expansum* de distintos genotipos de manzana

Dado que los 14 genotipos de manzana considerados en este estudio presentan fechas de maduración muy diversas (Mendoza, 2008), se realizaron dos ensayos: el primero escalonado en el tiempo en el cual la resistencia a *Penicillium* fue evaluada en el momento en que las manzanas de cada genotipo fueron cosechadas, y el segundo una vez que todos los genotipos se hubieron cosechado, para lo cual las manzanas de la mayor parte de los genotipos evaluados se almacenaron al momento de su maduración esperando la cosecha de las más tardías.

5.1.1. Ensayo realizado al momento de la cosecha de cada genotipo

Los signos de la infección de *P. expansum* después de la inoculación artificial de las heridas de la manzana empezaron a ser evidentes después de cuatro días de la inoculación para todos los genotipos. El patógeno fue causando una necrosis progresiva desde el punto de la inoculación. Los mayores valores de severidad mayores fueron obtenidos a los 10 días de la inoculación con la suspensión de esporas en manzanas de cáscara amarilla. Mientras tanto, el progreso de la infección en la mayoría de manzanas de cáscara roja fue más lenta ('Lourdes', SM2 y 436). Manzanas inoculadas con agua destilada no desarrollaron síntomas de infección.

En la Tabla 5.1 se puede observar el desarrollo de *P. expansum* sobre diferentes genotipos de manzana en tres tiempos de incubación. Prácticamente todos los genotipos, a excepción de dos (SM1, 'Rayada' y 418) redujeron significativamente el desarrollo del hongo con relación a 'Golden Delicious' después de 10 días de incubación. Los mejores genotipos fueron el 436 y 'Lourdes'. En este último el hongo mostró el menor desarrollo en todos los tiempos de incubación, lo que puede ser atribuido al contenido de polifenoles presente en la cascara de manzana.

Tabla 5.1. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en diferentes genotipos de manzana evaluados al momento de su cosecha

Genotipo	Color	Día 4	Día 8	Día 10
SM1	Amarilla	1.04 ab	3.62 a	5.72 a
Golden	Amarilla	1.15 a	3.19 ab	5.17 b
Rayada	Roja	1.09 a	2.91 bcd	4.97 b
418	Amarilla	1.15 a	3.12 bc	4.78 bc
428	Amarilla	1.18 a	3.21 ab	4.41 cd
142	Chapeada	0.65 de	2.53 d	4.06 de
RED	Roja	0.88 bc	2.69 cd	3.90 ef
SM6	Chapeada	0.77 cd	2.54 d	3.80 ef
438	Roja	0.89 bc	2.82 bcd	3.72 ef
467	Roja	1.07 ab	2.71 cd	3.52 f
429	Roja	0.75 cd	2.82 bcd	3.39 fg
436	Chapeada	0.55 de	1.78 e	2.92 gh
SM2	Roja	0.64 de	1.83 e	2.65 h
Lourdes	Chapeada	0.49 e	1.01 f	1.47 i
Valor F		28.57	54.40	117.98

Medias de 20 heridas, contadas después de 10 días de incubación a 27° C. Diferentes letras en la columna indica diferencia significativa (Tukey-Kramer; $P=0.05$).

El desarrollo diametral del hongo sobre ‘Golden Delicious’ fue de 5.2 cm después de 10 días de almacenamiento, el cual resulta sensiblemente igual que el obtenido sobre esta variedad en otros experimentos, (Sánchez, 2008, y Castañeda, 2005) donde se obtuvieron desarrollos diametrales de 5 cm después de 12 días de incubación.

5.1.2. Ensayo realizado una vez que todos los genotipos fueron cosechados

En la Tabla 5.2 se presenta el desarrollo de *P. expansum* en diversos genotipos de manzana evaluados simultáneamente el 23 de agosto del 2007. Nuevamente se observa que ‘Golden Delicious’ presenta la mayor susceptibilidad al desarrollo del hongo después de diez días de almacenamiento (5.2 cm de crecimiento diametral), contrariamente a ‘Lourdes’ quien presentó la menor susceptibilidad a *P. expansum* a los tres tiempos de medición con 0.99 cm después de diez días. En este ensayo, al igual que el que se realizó al momento de la cosecha, se observó a un grupo de genotipos con una alta susceptibilidad a la infección. Cabe indicar que estos genotipos (SM1, 418 y Golden) son de cáscara amarilla

destacándose entre ellas ‘Golden Delicious’ y SM1. Resultados similares obtuvo Soto-Muñoz (2008) al comparar la resistencia de diversos genotipos de manzana contra *P. expansum*, observando una tendencia a una mayor susceptibilidad de los frutos con cascara roja a la infección. Estos resultados mostrados por Soto-Muñoz (2008) concuerdan con las observaciones de El-Ghaouth (1998), quien reporta una mayor susceptibilidad de ‘Golden Delicious’ en comparación a ‘Red Delicious’, dicha susceptibilidad puede deberse al alto contenido de polifenoles que exhiben las variedades de cáscara roja, los cuales presentan cierta capacidad antimicótica (El-Ghaouth, 1998). Sin embargo, haría falta realizar otros experimentos donde se evaluara la composición del epicarpio y el mesocarpio de los distintos frutos analizados para poder determinar las causas de la tolerancia de algunos genotipos a la infección por *P. expansum*.

Tabla 5.2. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en diferentes genotipos de manzana almacenada evaluados cuando todos fueron cosechados

Genotipo	Color	Día 4	Día 8	Día 10
Golden	Amarilla	0.95 ab	2.67 abc	5.17 a
Rayada	Roja	1.17 a	2.87 ab	5.01 ab
SM1	Amarilla	0.78 abc	3.36 a	4.40 abc
418	Amarilla	1.12 a	2.85 abc	4.34 abc
142	Chapeada	0.63 bc	2.52 bcd	4.06 bcd
SM6	Chapeada	0.76 abc	2.54 bc	3.77 cde
436	Chapeada	0.74 abc	2.30 bcd	3.53 cdef
429	Roja	0.79 abc	2.24 bcd	3.12 defg
438	Roja	0.76 abc	2.06 bcd	3.09 defg
SM2	Roja	0.65 bc	2.23 bcd	2.88 efg
428	Amarilla	0.82 abc	2.08 bcd	2.85 efg
RED	Roja	0.81 abc	2.04 cd	2.63 fg
467	Roja	0.76 abc	1.72 de	2.35 g
Lourdes	Chapeada	0.43 cd	0.93 e	0.99 h
Valor F		4.78	12.50	30.97

* Medias de 20 heridas, contadas después de 10 días de incubación a 27° C. Diferentes letras en la columna indica diferencia significativa (Tukey-Kramer; $P=0.05$).

En la figura 5.1 se muestra que en general las frutas que fueron inoculadas después de un periodo de almacenamiento mostraron un menor desarrollo de *P. expansum* que aquellos que fueron inoculados una vez cosechados (pe.: ‘Lourdes’ 0.99 cm almacenada vs.

‘Lourdes’ 1.47 cm, al momento de la cosecha, después de 10 días de almacenamiento al igual que ‘Red delicious’), siendo esta diferencia de importancia significativa.

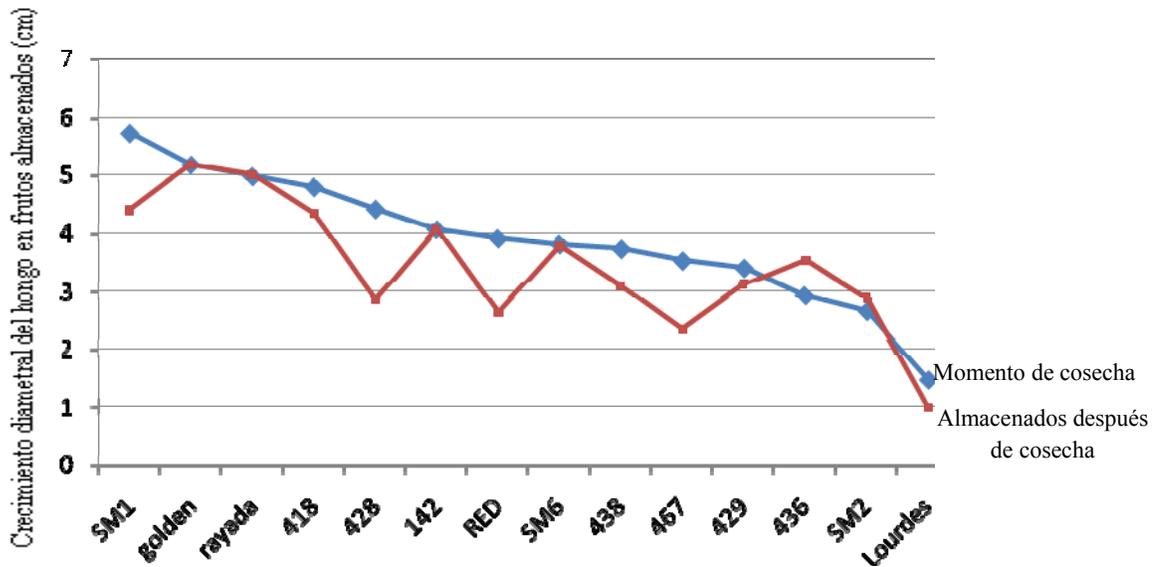


Figura 5.1. Diámetro de la infección (cm) producida por *P. expansum* sobre diversos genotipos de manzana después de diez días

5.1.3. Análisis de correlación

En la Tabla 5.3 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos entre el experimento realizado al momento en que las manzanas de cada genotipo fueron cosechados y el realizado una vez que todos los genotipos se hubieron cosechado, en distintos tiempos de incubación.

Solamente algunas correlaciones significativas se presentan entre distintos tiempos de incubación dentro de un mismo tipo de experimento, específicamente entre el crecimiento diametral de la infección en manzanas almacenadas a los 8 y 10 días ($r = 0.8005, p \leq 0.05$).

Sin embargo, no se advierte una correlación significativa del desarrollo de la infección entre los dos experimentos a ocho días de incubación ($r = 0.60, p \leq 0.05$). Cuando se comparan los resultados obtenidos en los dos experimentos después de diez días de incubación el coeficiente de correlación es relativamente importante ($r = 0.77$).

Tabla 5.3. Análisis de correlación simple por pares del desarrollo del hongo en distintas condiciones de tiempo y distintos genotipos de manzana

	Momento de cosecha			Simultáneamente		
	Día 4	Día 8	Día 10	Día 4'	Día 8'	Día 10'
Día 4	1	0.805	0.754	0.545	0.356	0.445
Día 8		1	0.899	0.512	0.602	0.585
Día 10			1	0.532	0.730	0.777
Día 4'				1	0.432	0.461
Día 8'					1	0.805
Día 10'						1

*Correlaciones con significancia estadística ($p=0.05$)

En la Figura 5.2 se ilustra la distribución de los distintos genotipos evaluados en los dos experimentos realizados después de diez días de almacenamiento. A los diez días de incubación de los frutos inoculados de ambos experimentos, el índice de correlación fue significativamente importante ($r=0.77$, $p \leq 0.05$). Esto se ilustra claramente en la Figura, donde los puntos correspondientes a cada uno de los genotipos se encuentran muy cercanos a la recta de regresión. En esta misma figura se puede ver cuáles son los más tolerantes (‘ en el ángulo inferior izquierdo) y viceversa en las parte alta de la recta las que presentan la mayos susceptibilidad (Golden y SM1)

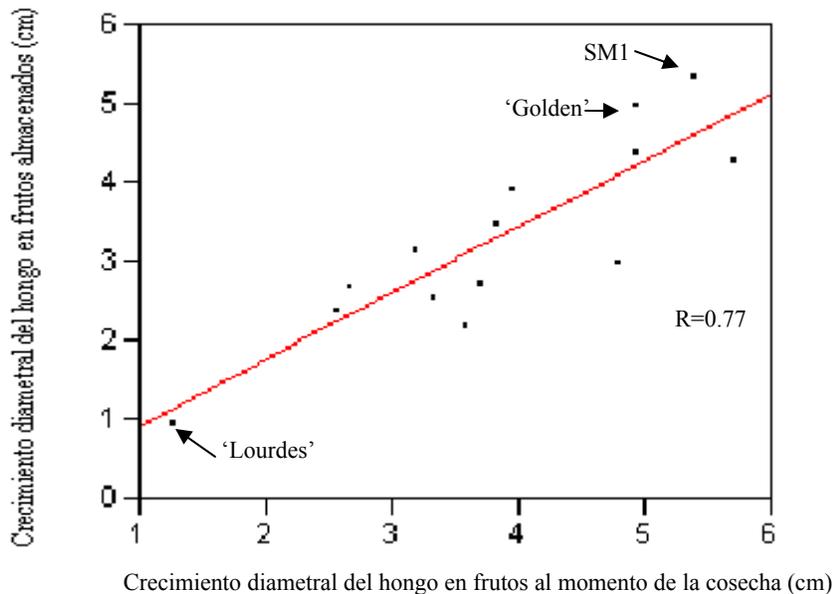


Figura 5.2. Correlación entre el desarrollo de *P. expansum* entre frutos recién cosechados y frutos almacenados por 10 días a 27°C.

La forma en que la que se analice la resistencia de cada genotipo es de importancia primordial para determinar la resistencia de manzanas a *P. expansum*. Como se muestra en nuestros resultados, una diferencia de un mes en la fecha de cosecha resulta en diferencias importantes en el desarrollo del hongo. En un primer enfoque, esta diferencia en la susceptibilidad está probablemente relacionada con los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración. La reducción en firmeza y el aumento en la concentración de azúcar que se producen en la maduración de las frutas son dos factores de importancia que determinan el desarrollo de los hongos, dado que este tipo de hongo requiere concentraciones de azúcar bajas para que la espora pueda germinar. Se sugiere evaluar cada uno de los genotipos en el momento de su cosecha y comparar sus resultados con un genotipo altamente susceptible como es ‘Golden Delicious’.

5.2. Evaluación del antagonismo de distintas cepas de levaduras contra *Penicillium expansum*

Existe un gran número de estrategias para seleccionar microorganismos con capacidad antagónica, sin embargo, el modelo que consiste en la inoculación del patógeno y el antagonista sobre manzanas heridas es el más usado y que se acerca más a las condiciones que pueden encontrarse comercialmente. Este método tiene ventajas sobre los ensayos *in vitro*, ya que es posible identificar antagonistas potenciales productores de sustancias antimicóticas o enzimas líticas y seleccionar antagonistas con diferentes mecanismos de acción, como puede ser la competencia por nutrientes y/o espacio, que favorezcan el desarrollo de los microorganismos antagónicos sobre el patógeno (Viñas *et al.*, 2000); Si estos ensayos se realizan *in vitro* las pequeñas diferencias en el ambiente nutricional pudieran ocasionar que el microorganismo no presente el mismo comportamiento que en los ensayos *in vivo*.

La búsqueda de microorganismos potencialmente antagónicos mediante pruebas sobre los frutos heridos ha sido la base para la producción comercial de fungicidas naturales (Teixido *et al.*, 1998).

Conviene recordar que las 50 cepas de levaduras que fueron recuperadas de la superficie de manzanas fueron evaluadas a temperatura ambiente (27 °C) y a temperatura

de almacenamiento (4 °C), midiendo periódicamente en ambos casos el incremento de la lesión, además, en cada experimento se utilizó un testigo (manzanas inoculadas con el hongo y en ausencia de levaduras), Posteriormente, se realizó un análisis de correlación del comportamiento de esas levaduras a ambas temperaturas.

5.2.1. Evaluación del poder antagónico a temperatura ambiente

En la Tabla 5.4 se observa el efecto antagónico de las levaduras en el desarrollo diametral del hongo sobre frutos de manzana almacenadas a 27 °C. Solamente cuatro de las cepas (38-432, 22-111, 22⁻²_{4a} y 24⁻²_{3a}) redujeron el crecimiento del hongo después de ocho días de incubación y tuvieron efecto significativo, presentando diámetros de lesión de 0.43, 0.93, 0.71 y 1.2 cm respectivamente.

Las manzanas que fueron inoculadas solamente con el patógeno (testigo) presentaron diámetros de lesión de 3.57 cm a los ocho días; Al comparar con otros autores encontramos que Castañeda (2005) y Sánchez (2008) reportan en manzana ‘Golden Delicious’ diámetros de lesión de 3.5 y 3.15 cm respectivamente, al mismo tiempo de incubación, resultados similares a los encontrados en este trabajo. En la misma tabla se observan levaduras sin efecto antagónico alguno sobre el hongo, pues no presentaron diferencia significativa con el testigo (18⁻¹_{2a}, 18⁻¹_{1b} y 23⁻⁶₁), con diámetros de lesión de 3.4, 3.32 y 3.6 cm después de los ocho días de almacenamiento.

A modo de comparación, se puede citar que Viñas (1998) obtuvo, después de ocho días de incubación, índices de disminución de la lesión de 70 % a partir de una cepa de *Candida sake* aislada de manzana. Este resultado es muy similar a lo obtenido con las levaduras más sobresalientes en el presente estudio.

Tabla 5.4. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura en manzana almacenada por 10 días a 27° C.

Cepa	Día 4	Día 8	Día 10
38-432	0 a	0.43 a	0.6 a
22-111	0.12 ab	0.93 abc	1.22 ab
22 ² _{4a}	0.11 ab	0.71 ab	1.5 abc
24 ² _{3a}	0.46 abcdefgh	1.2 abcd	1.91 abcd
22 ¹ _{2a}	0 a	1.36 abcde	2.11 abcde
26 ² ₂₄	0.18 abc	1.6 abcdefgh	2.42 abcdef
22 ¹ _{2j}	0.58 abcdefghij	1.56 abcdefgh	2.53 abcdef
8 ¹ ₂₁	0.41 abcdefg	1.92 bcdefghi	2.59 abcdef
16 ¹ _{3d}	0.29 abcde	1.69 abcdefgh	2.63 abcdefg
8 ¹ _{3c}	0.51 abcdefghi	1.74 abcdefgh	2.69 abcdefg
22 ¹ _{3a}	0 a	1.48 abcdef	2.77 abcdefgh
11 ¹ _{2a}	0.5 abcdefghi	1.74 abcdefgh	2.79 abcdefgh
5 ¹ _{5a}	0.64 bcdefghijk	1.52 abcdefg	2.82 bcdefgh
16 ¹ _{5c}	0.42 abcdefg	1.72 abcdefgh	2.96 bcdefghi
24 ¹ _{5f}	0.17 abc	1.48 abcdef	3.04 bcdefghi
8 ³ _{1a}	0.58 abcdefghij	2.25 cdefghij	3.23 bcdefghi
22 ^{1x} _{2a}	0.22 abcd	2.26 cdefghij	3.27 bcdefghij
18 ¹ _{1c}	0.88 fghijklmn	2.3 cdefghij	3.28 bcdefghij
v.p.3 ¹ _{5c}	0.73 cdefghijkl	2.42 defghij	3.28 bcdefghij
16 ¹ _{5a}	0.62 bcdefghijk	2.27 cdefghij	3.3 bcdefghij
27	0.84 Efghijklm	2.63 defghij	3.44 bcdefghijk
22 ¹ _{2x}	0.62 bcdefghijk	2.46 defghij	3.49 bcdefghijk
18 ² _{3c}	0.91 fghijklmn	2.15 bcdefghij	3.5 cdefghijk
4-bco	1.18 klmnop	2.64 defghij	3.5 cdefghijk
28	0.65 bcdefghijk	2.66 defghij	3.52 cdefghijk
18 ¹ _{1a}	0.61 bcdefghijk	2.69 defghij	3.53 cdefghijk
16 ¹ _{3a}	0.32 abcdef	2.14 bcdefghij	3.54 cdefghijk
18 ^{1x} _{1a}	0.96 ghijklmn	2.47 defghij	3.54 cdefghijk
22 ² _{3b}	0.94 ghijklmn	2.62 defghij	3.59 cdefghijk
3 ⁵² ₄₁	1.32 lmnop	2.61 defghij	3.6 cdefghijk
24 ¹ _{2g}	0.81 efghijkl	2.93 ghij	3.65 cdefghijk
D2 ² _{1b}	0.67 bcdefghijk	2.67 defghij	3.68 cdefghijk
28 ¹ _{1b}	0.62 bcdefghijk	2.69 defghij	3.76 defghijk
22 ² _{3d}	0.43 abcdefg	2.55 defghij	3.76 defghijk
38 ² ₄	0.86 efghijklm	2.86 fghij	3.79 defghijk
22 ² ₁₈	1.15 jklmnop	2.72 efghij	3.82 defghijk
11 ¹ _{2b}	0.83 efghijklm	2.53 defghij	3.94 defghijk
8 ¹ _{1b}	1.08 ijklmno	2.61 defghij	4.17 efghijk
13 ² _{2b}	0.77 defghijkl	2.98 hij	4.22 efghijk
18 ¹ _{2a}	1.13 jklmnop	3.4 j	4.3 efghijk
22 ² _{5b}	1.05 ijklmno	2.71 fghij	4.38 fghijk
18 ¹ _{1b}	1.57 op	3.32 ij	4.4 fghijk
35 ¹ ₁₁	1.41 mnop	2.93 ghij	4.47 fghijk
SI ₁	1.15 jklmnop	2.89 ghij	4.85 hijk
23 ⁶ ₁	1.71 p	3.46 j	4.91 hijk
5-VTT	1.05 hijklmno	2.76 efghij	5.46 jk
control	1.47 nop	3.57 j	5.53 k
Valor F	17.07	8.31	6.73

- Medias de 20 heridas, contadas después de 10 días de incubación a 27° C. Diferentes letras en la columna indica diferencia significativa (Tukey-Kramer; $P=0.05$).

Cabe señalar que la medición del diámetro de la lesión después de ocho días pudiera ser la que nos proporciona la información más confiable sobre el comportamiento de una cepa de levadura en estudio, siendo por esto la más utilizada, ya que es el tiempo al que otros autores miden la severidad en el fruto (Janisiewicz, 2000; Viñas, 1998).

A ocho y 10 días de almacenamiento, 40% de las levaduras evaluadas presentaron una inhibición significativa del crecimiento del hongo sobre el fruto (20 de 50 cepas), solo cuatro cepas (8% del total) inhibieron el crecimiento del hongo en más de 70%.

Como comparación, podemos mencionar que Viñas (1998) obtuvo, después de ocho días de incubación, 40% de cepas con inhibición significativa (de 933 probadas), y 9.6% de ellas redujeron el crecimiento del hongo sobre las manzanas en más de 50%. En este mismo sentido Sánchez (2008) obtuvo 38.5% (de 104) de las levaduras con una inhibición significativa del patógeno y ninguna de ellas redujo el crecimiento del hongo en más de 50%, presentándose en dichos estudios levaduras con un poder antagonico de alrededor de 20% menor a las probadas en este trabajo.

5.2.2 Evaluación del poder antagonico a temperatura de refrigeración

En la Tabla 5.5 se observa el desarrollo diametral del hongo en frutos de manzana en función de las cepas de levaduras evaluadas a 4 °C. En ella se observa que seis de las levaduras (22^{-2}_{4a} , 22^{-2}_{3d} , 28^{-1}_{1b} , 8^{-1}_{3c} , 22-111 y 38-432) redujeron significativamente el crecimiento del hongo después de 90 días de almacenamiento frigorífico, donde las cepas 22^{-2}_{4a} , 22^{-2}_{3d} , 28^{-1}_{1b} y 8^{-1}_{3c} no permitieron desarrollo de la lesión, mientras en las cepas 22-111 y 38-432 los diámetros de lesión fueron de 0.08 y 0.18 cm respectivamente, destacándose la cepa 22-111 que se mantuvo como una de las más sobresalientes a 27°C. En la Figura 5.3 se presentan manzanas inoculadas solamente con *P. expansum* (control) junto a manzanas que fueron inoculadas tanto con la cepa 22-111 como con el patógeno; se puede observar que después de los 90 días de almacenamiento no se presentó desarrollo de la lesión en las manzanas que fueron inoculadas con la cepa 22-111, caso contrario al control en el que se puede observar un desarrollo visible de la infección.



Figura 5.3. Desarrollo de la lesión causada por *P. expansum* en manzana ‘*Golden delicious*’ en presencia de la levadura ‘22-111’ en comparación con el testigo después de 90 días de incubación a 4°C

A 90 días de almacenamiento, el testigo presentó un desarrollo de la lesión de 5 cm que resultó similar al obtenido cuando el hongo se encontraba en presencia de 20 de las levaduras evaluadas; 44% de las levaduras (22 de 50 cepas) inhibieron significativamente el crecimiento del hongo sobre el fruto, cuatro cepas más presentaron una inhibición del hongo superior al 90 % y cuatro cepas (8% del total) no permitieron el desarrollo del hongo (0 cm), inhibiendo el crecimiento del hongo en 100%.

Castañeda (2005) en un estudio del nivel de antagonismo de diversas levaduras o mezclas de éstas contra *P. expansum*, reporta que solo una de ellas logró reducir el diámetro de la lesión en 35% a temperatura de refrigeración. Esta inconsistencia de resultados sugiere que solamente algunas de las levaduras utilizadas en este tipo de ensayos tienen la capacidad de crecer y sobrevivir bajo condiciones de almacenamiento en frío.

Tabla 5.5. Diámetro de desarrollo (cm) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura en manzana almacenada por 90 días a 4° C

Levadura	Día 30	Día 60	Día 90
22 ⁻² _{4a}	0.00 a	0.00 a	0.00 a
22 ⁻² _{3d}	0.00 a	0.00 a	0.00 a
28 ⁻¹ _{1b}	0.00 a	0.00 a	0.00 a
8 ⁻¹ _{3c}	0.00 a	0.00 a	0.00 a
22-111	0.00 a	0.00 a	0.08 a
38-432	0.00 a	0.00 a	0.18 a
22 ⁻¹ _{2i}	0.10 ab	0.40 abc	0.40 ab
22 ⁻² _{3b}	0.00 a	0.00 a	0.40 ab
24 ⁻² _{3a}	0.00 a	0.34 abc	0.86 abc
16 ⁻¹ _{3d}	0.00 a	0.00 a	0.95 abcd
8 ⁻¹ _{2l}	0.00 abc	0.46 hij	1.17 abcde
16 ⁻¹ _{5c}	0.00 a	0.20 ab	1.20 abcdef
4-bco	0.00 a	0.22 ab	1.25 abcdefg
8 ⁻³ _{1a}	0.00 a	0.31 abc	1.27 abcdefgh
22 ⁻² _{5b}	0.00 a	0.20 ab	1.32 abcdefghi
18 ⁻¹ _{1a}	0.00 a	0.00 a	1.58 bcdefghij
24 ⁻¹ _{5f}	0.00 a	0.41 abc	1.65 abcdefghij
V.P.3 ⁻¹ _{5c}	0.10 ab	0.41 abc	1.79 abcdefghij
22 ⁻¹ _{2a}	0.12 ab	0.45 abcd	2.00 abcdefghijk
16 ⁻¹ _{3a}	0.00 a	0.38 abc	2.01 abcdefghijk
18 ⁻² _{3c}	0.20 abc	0.79 abcd	2.09 abcdefghijk
D ⁻² _{1b}	0.34 abcde	0.92 abcde	2.18 abcdefghijk
22 ^{-1x} _{2a}	0.00 a	0.42 abcd	2.30 abcdefghijkl
18 ⁻¹ _{1c}	0.00 a	0.66 abcd	2.30 abcdefghijkl
38 ⁻² ₄	0.18 abc	1.72 bcdefg	2.99 bcdefghijkl
18 ^{-1x} _{1a}	0.00 a	0.90 abcde	3.02 bcdefghijkl
11 ⁻¹ _{2a}	0.00 a	1.54 bcdefg	3.04 bcdefghijkl
22 ⁻¹ _{3a}	0.16 abc	1.29 abcdef	3.09 bcdefghijkl
35 ⁻¹ ₁₁	0.44 abcde	2.48 fghij	3.19 cdefghijkl
16 ⁻¹ _{5a}	0.00 a	0.98 abcdef	3.22 cdefghijkl
24 ⁻¹ _{2x}	0.19 abc	0.94 abcde	3.68 defghijkl
8 ⁻¹ _{1b}	0.00 a	0.00 a	3.83 efg hijkl
8 ⁻¹ _{2l}	0.19 a	3.30 hij	3.90 efg hijkl
26 ⁻² ₂₄	0.00 a	2.98 ghij	3.91 efg hijkl
11 ⁻¹ _{2b}	0.00 a	1.47 abcdefg	3.95 fghijkl
22 ⁻² ₁₈	0.82 e	3.01 ghij	3.97 ghijkl
18 ⁻¹ _{1b}	0.00 a	0.85 abcde	4.00 ghijkl
27	0.00 a	1.30 abcdef	4.02 hijkl
22 ⁻¹ _{2x}	0.35 abcde	1.95 defghi	4.04 ijkl
5 ⁻¹ _{5a}	0.00 a	1.68 bcdefg	4.06 ijkl
18 ⁻¹ _{2a}	0.14 ab	1.29 abcdef	4.08 jkl
13 ⁻² _{2b}	0.52 abcde	1.81 cdefgh	4.14 jkl
28	0.00 a	1.11 abcdef	4.64 kl
23-61	0.77 de	3.45 ij	4.69 kl
5-VTT	0.69 cde	3.47 ij	5.00 l
SI ₁	0.22 abc	2.35 efghij	5.00 l
control	0.61 bcde	3.83 j	5.00 l
Valor F	5.64	18.53	11.27

Medias de 20 heridas, contadas después de 10 días de incubación a 27° C. Diferentes letras en la columna indica diferencia significativa (Tukey-Kramer; $P=0.05$).

Más de 150 microorganismos con capacidad antagónica habían sido aislados y probados en ensayos *in vitro* por Sánchez (2008). Solo 50 de éstos fueron probados *in vivo* en el presente estudio. cuatro de ellos previenen el decaimiento de la fruta en forma significativa en diferentes condiciones: *Debaromyces hansenii* C (cepa 38-432), *Pichia guilliermondii* (cepa 22-111), cepa 24²_{3a} y la cepa 22²_{4a}; estas cepas fueron seleccionadas para determinar algunos de los mecanismos de acción que pudieran ser capaces de desarrollar para contrarrestar el desarrollo del hongo. El efecto antagónico de las levaduras sobre el hongo observado en las pruebas *in vitro* se perdió totalmente al realizarse las pruebas en heridas de manzana, almacenadas a 27 y 4°C después de 10 y 90 días, respectivamente.

En el presente trabajo, la cepa 22²_{4a} redujo significativamente la pudrición azul a 27°C en frutos de manzana que fueron heridos e inoculados con el agente patógeno después de ocho días de almacenados. Ésta también presenta una alta eficacia en la reducción de la podredumbre causada por *P. expansum* sobre frutos de manzana bajo condiciones de almacenamiento en frigorífico (4 °C), no observándose una diferencia significativa en la eficacia de esta cepa al ser evaluada a una u otra temperatura. Resultados similares fueron obtenidos por Francés (2003) para *P. agglomerans* el cual al ser inoculado sobre manzana manifestó un efecto antagónico significativo contra *P. expansum* a diferentes condiciones de almacenamiento (5, 20 y 27°C).

La cepa 38-432 en una concentración de 1×10^7 , redujo la incidencia y el diámetro de la lesión de la infección significativamente en frutos heridos “Golden delicious” inoculados con *P. expansum* en una concentración de 1×10^4 . La incidencia de la putrefacción azul era de 100 % sobre fruto no tratado y al hacer el tratamiento preventivo con la cepa 38-432 la incidencia se redujo en 20% (presentando 80% menos de heridas infectadas con relación al testigo). El porcentaje de severidad o de desarrollo de la lesión disminuyó de 100% en fruta no tratada a 10.84% al ser tratada con la cepa 38-432 (con una eficacia de 90%); Al realizar ensayos de esta cepa a 4°C se obtuvo una disminución significativa del diámetro de la lesión (96%) en comparación al testigo. El diámetro de las lesiones del fruto se redujo significativamente por la cepa 38-432 en todos los casos. Castañeda (2005) al comparar el nivel de inhibición de levaduras en forma individual y

mezclas de ellas en frigoconservación, solo logró observar un máximo de inhibición de desarrollo de infección (*P. expansum*) de 35.1% con la levadura *Debaromyces hansenii*.

Al evaluar el antagonismo de la cepa 22-111 a 27°C, se advierte que ésta reduce la putrefacción azul (*P. expansum*) significativamente sobre los frutos de manzana que fueron heridos e inoculados con el agente patógeno. La cepa mostró un mayor efecto antagónico contra *P. expansum* sobre frutos de manzana bajo condiciones de almacenamiento en frigorífico a 4°C observándose un desarrollo de la lesión que corresponde a 1.6% con relación al testigo, siendo por lo tanto eficiente a las dos temperaturas probadas. Resultados similares fueron obtenidos por Francés (2003) para el antagonista *P. agglomerans* cuando se evaluó el efecto antagónico contra *P. expansum*, en manzanas almacenadas a 5°C.

Cuando fue evaluada a 27 °C la cepa 24²_{3a} reduce la putrefacción azul (*P. expansum*) significativamente (73%) sobre los frutos de manzana que fueron heridos e inoculados con el agente patógeno. Del mismo modo, se observó que esta cepa presenta un elevado efecto antagónico a temperatura de frigoconservación reduciendo así el desarrollo de la lesión en más de 80% en comparación al control. No se observó diferencia significativa en la eficacia de esta cepa al ser evaluada a una u otra temperatura.

5.2.3. Correlación entre los ensayos a 27°C y 4°C de almacenamiento

En la Tabla 5.6 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos entre los experimentos realizados a 27 y 4 °C en los diferentes tiempos de incubación. Las únicas correlaciones significativas son algunas que se presentan entre distintos tiempos de incubación dentro de un mismo tipo de experimento, específicamente entre el crecimiento diametral del hongo en manzanas almacenadas a 4°C a los 60 y 45 días ($r = 0.9099$, $p \leq 0.05$) y a 27°C a los ocho y diez días (0.89 , $p \leq 0.05$).

Tabla 5.6. Análisis de correlación simple por pares del desarrollo del hongo en distintas condiciones de tiempo y temperatura

	día 4	día 8	día 10	día 30	día 45	día 60	día 90
día 4	1	0.728	0.682	0.265	0.403	0.492	0.361
día 8		1	0.899*	0.326	0.380	0.396	0.464
día 10			1	0.364	0.462	0.491	0.519
día 30				1	0.590	0.543	0.380
día 45					1	0.909*	0.633
día 60						1	0.710
día 90							1

*Correlaciones con significancia estadística ($p=0.05$)

Sin embargo, se advierte una muy baja correlación del comportamiento de la levadura después de los 90 días de almacenamiento a 4°C con el observado después de ocho días de almacenamiento a 27°C ($r = 0.4648$, $p \leq 0.05$), en otros tiempos de análisis a 4°C con 27°C el índice de correlación no fue significativo, siendo casi inexistente. Esta baja correlación se ilustra en la Figura 5.4 en la cual se observa una amplia dispersión en el comportamiento de las levaduras con respecto a la recta.

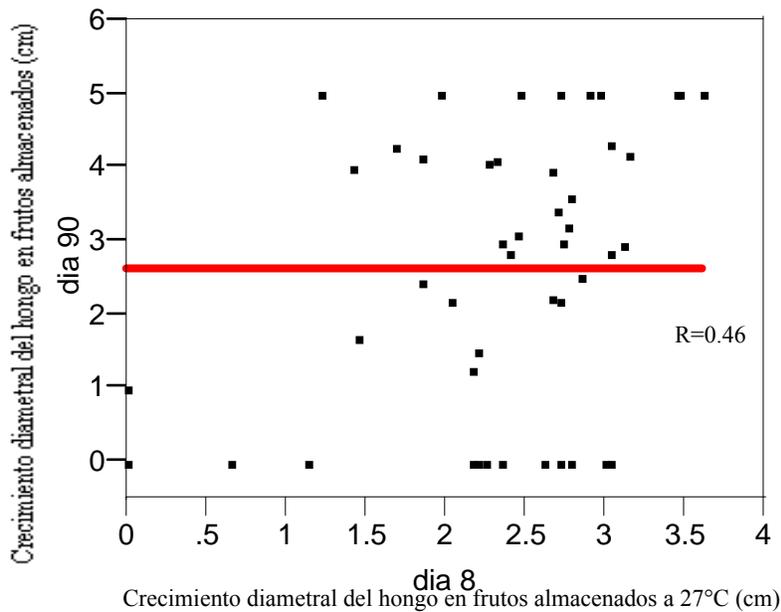


Figura 5.4. Correlación entre el desarrollo de *P. expansum* entre frutos almacenados por 90 días a 4°C y frutos almacenados por 8 días a 27°C.

La ausencia de correlación entre el comportamiento de las levaduras almacenadas a 27°C de las que fueron almacenadas a 4 °C probablemente se deba a que algunas levaduras son capaces de tolerar o sobrevivir a temperaturas de refrigeración, mientras otras tiendan a inactivarse a estas temperaturas.

Viñas (2000) menciona que los microorganismos inicialmente recuperados para ser probados como antagónicos contra *P. expansum* no muestran un comportamiento consistente cuando son sometidos a diversas temperaturas de incubación. Existen microorganismos que presentan muy buenas respuestas a temperatura ambiental (27°C) y no así a temperatura de frigoconservación y viceversa. De la misma manera, existen microorganismos que presentan muy buena respuesta a ambas condiciones de temperatura, algo que se observó en nuestros experimentos (cepa 38-432, cepa 22-111, cepa 24⁻²_{3a} y la cepa 22⁻²_{4a}).

5.3. Evaluación de algunos mecanismos de acción de las levaduras sobresalientes sobre *P. expansum*

El conocimiento de los mecanismos de acción utilizados por un agente de control biológico (ACB) permite establecer las condiciones óptimas para la interacción con el agente patógeno (Spadaro y Gullino, 2004). Sin embargo, el estudio y el conocimiento de los mecanismos de acción es una tarea difícil debido a las complicadas interacciones que ocurren entre ACB, agente patógeno, huésped, medioambiente y los otros microorganismos presentes Janisiewicz *et al.* (2000).

Algunos mecanismos de biocontrol en distintos ACB han sido descritos en las enfermedades de poscosecha incluyendo antibiosis (Gueldner *et al.*, 1988; Janisiewicz *et al.*, 1991; Edwards y Seddon, 2001), resistencia inducida en el tejido del huésped (Ghaouth *et al.*, 2001; Janisiewicz *et al.*, 2003), interacción directa (Castoria *et al.*, 2001), competencia por nutrientes (Wisniewski *et al.*, 1989; Mari *et al.*, 1996; Filonow, 1998; Bonaterra *et al.*, 2003) y espacio (Andrews *et al.*, 1994; Pasichnyk *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se evaluaron algunos mecanismos de acción de las cepas de levadura que presentaron mayores efectos antagónicos contra *P. expansum* a las dos

temperaturas evaluadas caracterizando fenotípicamente. Los mecanismos evaluados fueron la interacción directa, la competición por nutriente y la antibiosis (en este último caso para todas las cepas evaluadas) por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

5.3.1. Determinación de la producción de sustancias antimicóticas (antibiosis)

a) Ensayos *in vitro*

En la Figura 5.5 se presentan los antibiogramas en NYDA de algunos de las 50 levaduras estudiadas así como el de un control positivo (Fig. 5.3 A) que contiene al hongo *P. expansum* inhibido en su crecimiento por la presencia de *Sclerotinia* (microorganismo productor de antimicótico). Se puede observar que en ninguno de los antibiogramas se presentó formación de halos de inhibición, como si se observa en el control positivo, en el cual la presencia de una sustancia antimicótica (en este caso un fungicida, el captan) inhibe el desarrollo del hongo. Se concluye de este estudio que, bajo estas condiciones del estudio, no hay producciones de sustancias antimicóticas por ninguna de las 50 levaduras evaluadas.

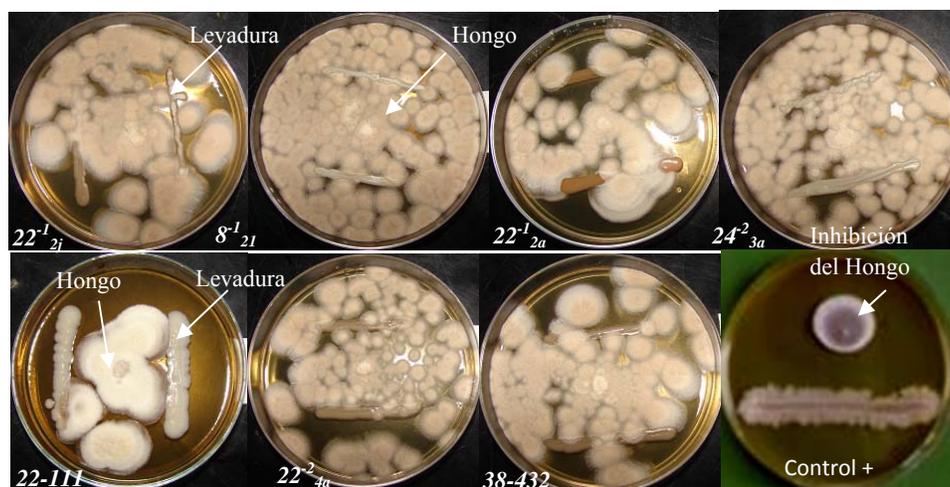


Figura 5.5. Antibiogramas de *P. expansum* y las diferentes levaduras evaluadas en NYDA

En la Figura 5.6 se presentan antibiogramas en APD para algunas de las 50 levaduras evaluadas en las que se puede observar el mismo comportamiento que cuando fueron crecidas en NYDA, no lográndose observar la presencia de halos o bien inhibición del desarrollo del hongo por la presencia de la levadura.

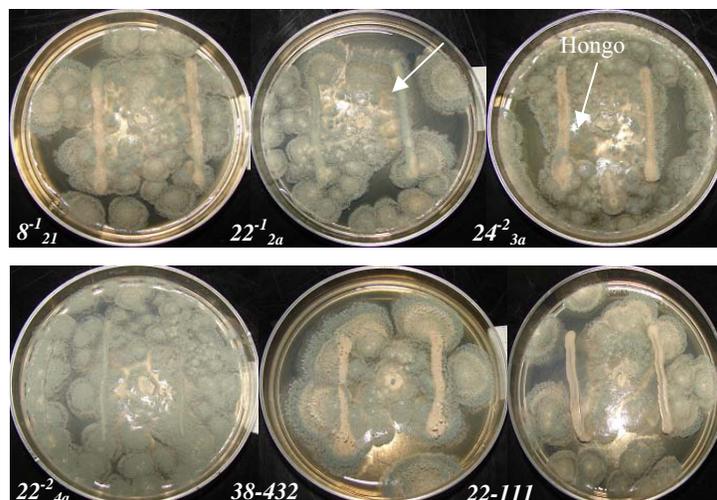


Figura 5.6. Antibiogramas de *P. expansum* y las diferentes levaduras evaluadas en ADP

Podemos afirmar que al hacer desarrollar *in vitro* a las levaduras en presencia del patógeno no se observó la producción de sustancias antimicóticas al menos no en cantidad suficiente para inhibir el crecimiento del patógeno, no importando el medio de cultivo de crecimiento, por lo que se puede afirmar que, al menos *in vitro*, no hay producción de antimicóticos. Resultados similares fueron obtenidos por Vázquez (1998) quien no detectó la presencia de halos de inhibición contra *P. expansum* en presencia de varias cepas de levaduras con capacidad antagónica. En este mismo sentido, Bonaterra (2002) al tratar de identificar el mecanismo de acción que podría desarrollar *P. agglomerans* contra *P. expansum* menciona que no es capaz de producir sustancias antimicóticas en ninguno de los medios estudiados. Resultados diferentes a este estudio fueron reportados por Campbell (1989) y Montesinos (2001), quienes señalan que *Agrobacterium radiobacter* produce sustancias antimicóticas capaces de inhibir el desarrollo de *P. expansum* y *B. cinérea* en pera.

b) Ensayos *in vivo*

En la Figura 5.7 se presentan antibiogramas de *P. expansum* en presencia de un extracto obtenido de células de levaduras que estuvieron en contacto con el patógeno en heridas realizadas en manzanas. Se observa que cuando el patógeno se encuentra en

contacto con el fungicida captán (Fig. 5.7 B), se presenta inhibición del desarrollo del hongo. Mientras que en los antibiogramas correspondientes a las cepas de levaduras 38-432, 22-111 y 22⁻²_{4a} (Fig. 5.7 C, D y F) se observó un desarrollo del hongo en toda la placa de cultivo sin que hubiera inhibición alguna. En el caso del control negativo, en el antibiograma se colocó un extracto proveniente de manzanas que habían sido inoculadas solamente con el patógeno; se observó desarrollo del hongo en toda la placa de cultivo.



Figura 5.7. Antibiogramas de *P. expansum* y extractos del jugo de manzana

Una situación extraña fue observada en el caso de la cepa 24⁻²_{3a} (Fig. 5.7 E) en donde la presencia del extracto parece potenciar el desarrollo del hongo, lo cual se pudiera deberse a la producción de alguna sustancia por la cepa de levadura que beneficie el desarrollo del hongo. Aparentemente no existen reportes de comportamientos similares a esta levadura, sin embargo, este comportamiento se puede deber a la competencia por nutrientes que presenta con el patógeno cuando se encuentran en contacto directo o a que la levadura aporte nutrientes que beneficien el desarrollo del hongo.

Aparentemente no existen reportes sobre ensayos *in vivo* para la identificación de cepas productoras de antimicóticos, siendo éste un trabajo pionero en el área.

La ausencia de producción de compuestos antimicóticos contra *P. expansum* ha sido reportada en diversas cepas de levaduras al utilizar ensayos con cultivos dobles en

diferentes medios de crecimiento (Janisiewicz *et al.*, 1991; Vázquez, 1998, Edwards y Seddon, 2001). Los resultados obtenidos en el presente trabajo con un sistema que trata de emular las condiciones *in vivo* coinciden sensiblemente con los arriba citados y muestran que ninguna de estas cepas de levaduras evaluadas producen sustancias antimicóticas, o al menos no en cantidad suficiente para impedir la germinación de las esporas del agente patógeno *P. expansum*.

5.3.2. Estudio de la competencia por nutrientes

Cabe recordar que el estudio de la competencia por nutrientes entre las cepas y *P. expansum* fue abordado a través del método *in vitro* descrito por Janisiewicz *et al.* (2000), cuyo principio se basa en evaluar el efecto de la reducción de nutrientes por un antagonista sobre la germinación y crecimiento del agente patógeno con un sistema *in vitro* que simule a las condiciones *in vivo*. Para este método “no-destructivo” se utilizaron placas de cultivo millicell (Millipore, MA, USA) de tejidos con un inserto cilíndrico de poliestireno con un filtro PTFE hidrofílico con un tamaño de poro de 0.45 μm semipermeable en la parte inferior; este filtro permite el libre paso de nutrientes y metabolitos entre los dos compartimentos. Este método ha sido usado por muchos autores en el estudio de competencia por nutrientes en las enfermedades de poscosecha (Janisiewicz *et al.*, 2000; Poppe *et al.*, 2003; Bonaterra *et al.*, 2003).

La preparación del jugo de manzana, las suspensiones de agente de biocontrol y la suspensión del agente patógeno, fueron llevadas a cabo tal como se describió en la sección 4.6.2.

A diferencia de la antibiosis como mecanismo de acción, aparentemente hay pocos estudios sobre la competencia por nutrientes y/o por espacio. Sin embargo, algunos reportes sobre la interacción entre microorganismos señalan que algunas bacterias y levaduras pueden asimilar nutrientes en soluciones diluidas más rápidamente y en mayor cantidad que los agentes patógenos fúngicos (Brodie y Blakeman, 1976). Esto da como resultado que una reducción notable en los nutrientes del medio por parte del antagonista, propicie una disminución en la germinación de esporas y el desarrollo de la hifa del patógeno. Por

ejemplo, ha sido reportado que la competición por nutrientes podría ser importante en el control de *Botrytis cinerea* y *P. expansum* por *Erwinia herbicola* microorganismo que aparentemente agota los aminoácidos contenidos en el medio de cultivo (Janisiewicz *et al.*, 2000).

El método descrito por Janisiewicz *et al.* (2000) para estudiar la competición por nutrientes sin la interferencia de competición por espacio fue usado con *P. expansum* y las siguientes cepas de levadura seleccionadas: *Debaromyces hansenii* C (cepa 38-432), *Pichia guilliermondii* (cepa 22-111), cepa 24⁻²_{3a} y cepa 22⁻²_{4a}. Como ya se mencionó arriba, éstas fueron elegidas por su elevado poder antagónico evaluado a las dos condiciones de temperatura de este estudio.

a) Caso de la cepa 38-432 (*Debaromyces hansenii* C)

En la Tabla 5.7 se muestra el comportamiento de los conidios de *P. expansum* en diferentes medios de cultivo en ausencia de la cepa 38-432. Se observa que los conidios de *P. expansum* no germinan en absoluto cuando se encuentran incubados en agua destilada, por el contrario su germinación fue muy elevada en todos y cada uno de los distintos medios de cultivo a distintas concentraciones después de 24 h de incubación (Tabla 5.7). Para la concentración de jugo a 5% y NYDA a 40%, los porcentajes de germinación observados fueron mayores (100 y 98% respectivamente); asimismo, el tubo germinativo fue notablemente más largo en estos tratamientos.

Por su parte, aunque en el medio de cultivo NYDA 20%, las esporas obtuvieron 95% de germinación, el desarrollo del tubo germinativo fue raquítrico, lo que puede deberse a una disminución en nutrientes disponibles para un buen desarrollo de la hifa.

Tabla 5.7. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de *P.* expuestos por 24 h a 27° en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Escala de germinación.				
	0	1	2	3	4
Agua	100	0	0	0	0
NYDA (20%)	5	0	14	24	57
NYDA (40%)	0	0	0	0	100
Jugo (1%)	3	1	1	0	95
Jugo (5%)	2	0	0	0	98
Jugo (10%)	6	2	2	0	90

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤ 2 , 3 tubo germinativo ≤ 3 , 4 tubo germinativo > 4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

En la Figura 5.8 se observa el desarrollo de tubos germinativos del hongo en distintos medios de cultivo y distintas condiciones. Cuando el hongo fue incubado por 24h tanto en jugo 10% como en NYDA 40% (Fig. 5.8 A y D) se observó un desarrollo total del tubo germinativo, no obstante en jugo a 10% el tubo germinativo fue raquítico, lo cual se puede deber a una falta de nutrientes asimilables para las esporas. En esta misma figura se presenta una disminución significativa en el desarrollo del tubo germinativo cuando las esporas fueron germinadas en presencia del antagonista 38-432 en jugo 10% y NYDA 40% (Figura 5.8 B y E). Sin embargo, cuando las esporas fueron separadas por una membrana del antagonista (Figura 5.8 C y F) no se observaba un completo desarrollo del tubo germinativo, solo en alguna de las esporas después de las 24 h de incubación se presentaba un tubo germinativo, mas no desarrollado completamente.

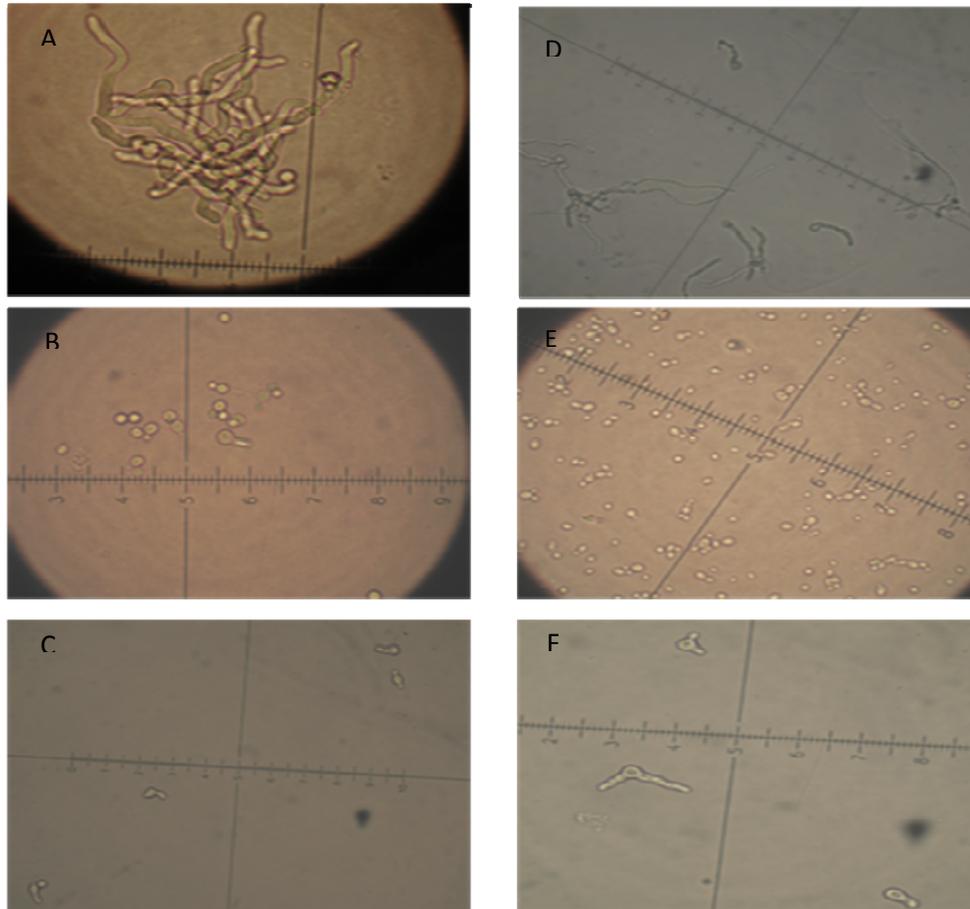


Figura 5.8. Germinación de conidias por 24 h en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniendo: A, NYDA 40%; B, NYDA 40%+antagonista 38-432; C, NYDA 40%+antagonista 38-432 y filtro; D, Jugo al 10%; E, 0 jugo 5%+antagonista 38-432; F, jugo 5%+antagonista 38-432 y filtro.

Al colocar las esporas del patógeno en contacto directo con el antagonista en los mismos medios utilizados para el caso anterior, el índice de germinación de las esporas se vio inhibido. En efecto, cuando las esporas se encontraban en jugo a 10% solo 6% de las esporas presentaron un desarrollo del tubo germinativo, y éste resultó muy pequeño en comparación al tratamiento anterior. El antagonista impidió la germinación de los conidios en jugo a las diferentes concentraciones y redujo en gran medida la germinación en NYDA a 40% (Tabla 5.8). El medio NYDA a 20% fue el que permitió el mayor desarrollo del tubo germinativo (13%), sin embargo este desarrollo no fue en forma completa. Estos resultados indican que el antagonista competir por nutrientes con el patógeno, o bien, puede existir una interacción directa entre el patógeno y el antagonista.

Tabla 5.8. Porcentaje de desarrollo del tubo germinativo de conidias de *P. expansum* expuestos por 24 h a 27°C en presencia de la cepa 38-432 en diferentes medios de cultivo

Tratamiento	Escala de germinación.				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	100	0	0	0	0
NYDA (20%) + Antagonista	87	9	4	0	0
NYDA (40%) + Antagonista	86	12	0	2	0
Jugo (1%) + Antagonista	90	10	0	0	0
Jugo (5%) + Antagonista	92	6	0	1	1
Jugo (10%) + Antagonista	94	5	0	0	1

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤ 2 , 3 tubo germinativo ≤ 3 , 4 tubo germinativo > 4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

Un comportamiento similar al expuesto anteriormente se observó cuando el antagonista fue separado por una membrana semipermeable; donde los conidios contenidos en NYDA no germinaron en 74% y 80% de los conidios en jugo en cualquier concentración tampoco germinaron (Tabla 5.9). Este comportamiento indica que la presencia de la membrana no impide la inhibición de las esporas, lo que muestra que no hay una interacción directa entre esta cepa y el patógeno, sino más bien una competencia por nutrientes.

Tabla 5.9. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de *P. expansum* en cilindros con membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 38-432 en diferentes medios.

Tratamiento	Escala de germinación.				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	100	0	0	0	0
NYDA (20%) + Antagonista	71	0	4	9	16
NYDA (40%) + Antagonista	74	0	7	8	11
Jugo (1%) + Antagonista	80	3	0	8	9
Jugo (5%) + Antagonista	82	0	3	11	4
Jugo (10%) + Antagonista	85	9	6	0	0

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤ 2 , 3 tubo germinativo ≤ 3 , 4 tubo germinativo > 4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

b) Caso de la cepa 22⁻²_{4a}

Cuando se colocó al antagonista (22⁻²_{4a}) en contacto célula a célula con el patógeno, en la concentración de jugo a 1% y NYDA a 20%, no germinaron el 91% y 95% respectivamente de esporas (Tabla 5.10). El antagonista impidió la germinación de los conidios en jugo a las diferentes concentraciones y redujo en gran medida la germinación en NYDA al 40%. Del mismo modo a cuando se encontraban solas las esporas con agua, en este ensayo no se produjo germinación de las esporas, lo que nuevamente nos indica que las esporas necesitan nutrientes para poder germinar.

Tabla 5.10. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de *P. expansum* expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 22⁻²_{4a} en diferentes medios de cultivo

Tratamiento	Escala de germinación.				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	100	0	0	0	0
20% NYDA+ Antagonista	95	5	0	0	0
40% NYDA+ Antagonista	71	16	5	6	2
1% Jugo+ Antagonista	91	9	0	0	0
5% Jugo+ Antagonista	82	18	0	0	0
10% Jugo+ Antagonista	89	8	3	0	0

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤2, 3 tubo germinativo ≤3, 4 tubo germinativo >4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

Cuando las esporas se colocaron en contacto directo con la cepa 22⁻²_{4a}, más de 80% no germinaron, independientemente del medio de cultivo empleado, 75% menos de germinación que en el caso de las esporas del control.

Resultados semejantes se obtuvieron cuando el antagonista fue separado por una membrana semipermeable; donde las conidias contenidas en agua no germinaron, las contenidas en NYDA germinaron en 10% y 75% de los conidios en jugo en cualquier concentración no presentaron germinación (Tabla 5.11). En Jugo a 1% se presentó la mayor germinación (25%), sin embargo esta germinación es comparable a la germinación del estudio anterior.

Tabla 5.11. Porcentaje de germinación de conidias de *P. expansum* en cilindros con membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 22⁻²_{4a} en diferentes medios de cultivo

Tratamiento	Escala de germinación.				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	100	0	0	0	0
20% NYDA+ Antagonista	91	9	0	0	0
40% NYDA+ Antagonista	90	10	0	0	0
1% Jugo+ Antagonista	75	4	10	3	8
5% Jugo+ Antagonista	79	6	0	4	11
10% Jugo+ Antagonista	80	0	9	5	6

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤2, 3 tubo germinativo ≤3, 4 tubo germinativo >4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

Los resultados expuestos anteriormente se ilustran gráficamente en la Figura 5.9, en la que se presenta el desarrollo del tubo germinativo del hongo en diferentes medios de cultivo (NYDA 40% y jugo 10%). Cuando las esporas del antagonista estuvieron en contacto célula-célula con el patógeno (Figura 5.9 B y E), las esporas presentaron un bajo desarrollo del tubo germinativo en cualquiera de los medios estudiados, este comportamiento continuo aun cuando las esporas fueron separadas por una membrana del antagonista (Figura 5.9 C y F). Los resultados obtenidos para esta cepa de levadura 22⁻²_{4a} son muy similares a los encontrados para la cepa 38-432 y sugieren que la competencia por nutrientes es el principal o uno de los principales mecanismos de acción de esta levadura, datos similares a éstos fueron reportados por Janisiewicz (2000) al tratar de proponer un método no destructivo en la determinación de competencia por nutrientes

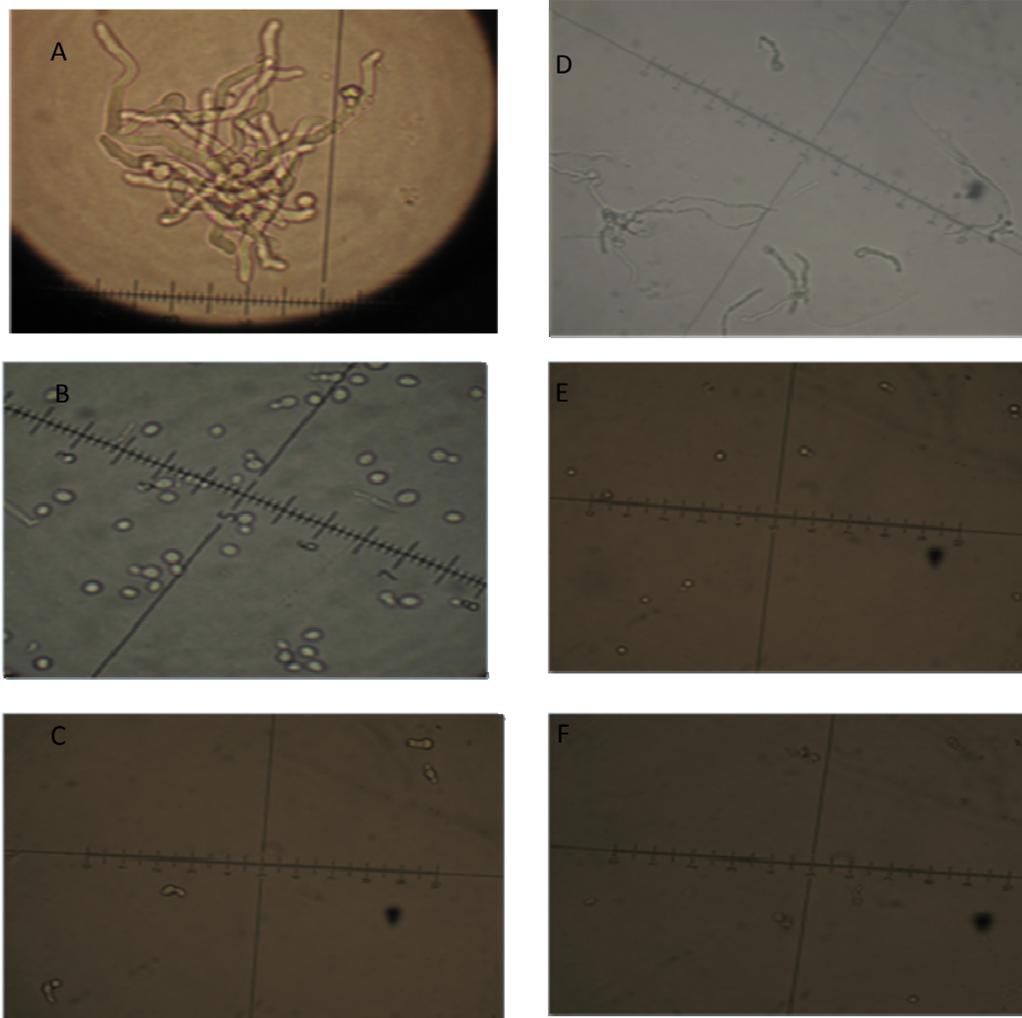


Figura 5.9. Germinación de conidias después de 24 horas de incubación en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniendo: A, NYDA 40%; B, NYDA 40%+antagonista 22^{2-2}_{4a} ; C, NYDA 40%+antagonista 22^{2-2}_{4a} y filtro; D, Jugo al 10%; E, 0 jugo 5%+antagonista 22^{2-2}_{4a} ; F, jugo 5%+antagonista 22^{2-2}_{4a} y filtro.

C) Caso de la cepa 24^{2-2}_{3a}

Quando se colocó al antagonista en contacto directo con el patógeno, en la concentración de jugo a 1% y NYDA a 20%, se observó el 90 y 83% de conidios no germinados, respectivamente, asimismo, el tubo germinativo estaba completamente desarrollado (Tabla 5.12). El antagonista impidió la germinación de los conidios en jugo a

las diferentes concentraciones y redujo en gran medida la germinación en NYDA a 40% (Tabla 5.12) en comparación a cuando las esporas estaban solas en el medio (Tabla 5.7).

Tabla 5.12. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de *P. expansum* expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 24⁻²_{3a} en diferentes medios de cultivo

Tratamiento	Escala de germinación.				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	100	0	0	0	0
20% NYDA+ Antagonista	83	4	13	0	0
40% NYDA+ Antagonista	82	14	2	1	1
1% Jugo+ Antagonista	90	10	0	0	0
5% Jugo+ Antagonista	88	8	1	0	3
10% Jugo+ Antagonista	94	6	0	0	0

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤2, 3 tubo germinativo ≤3, 4 tubo germinativo >4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

Un comportamiento muy parecido a cuando antagonista y patógeno estaban en contacto directo se presentó cuando el antagonista fue separado por una membrana semipermeable, donde las esporas contenidas en agua no presentaron germinación y las conidias contenidas en NYDA germinaron en 23%. Alrededor de 90% de los conidios en jugo, independientemente de la concentración, no presentaron germinación (Tabla 5.13).

Tabla 5.13. Porcentaje de desarrollo de tubos germinativos de conidias de *P. expansum* en cilindros con membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 24⁻²_{3a} en diferentes medios de cultivo

Tratamiento	Escala de germinación.				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	100	0	0	0	0
20% NYDA+ Antagonista	77	12	11	0	0
40% NYDA+ Antagonista	75	11	12	2	0
1% Jugo+ Antagonista	85	12	3	0	0
5% Jugo+ Antagonista	79	9	8	0	4
10% Jugo+ Antagonista	90	10	0	0	0

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤2, 3 tubo germinativo ≤3, 4 tubo germinativo >4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

La Figura 5.10 ilustra el crecimiento del tubo germinativo de esporas de *P. expansum* en diferentes condiciones de cultivo. De la misma forma que para las dos levaduras estudiadas anteriormente, cuando las esporas se encontraban en contacto directo con el antagonista 24^{-2}_{3a} , el índice de germinación de las esporas fue disminuido casi en su totalidad (Figura 5.10 B y E) en comparación a cuando las esporas se encontraban solas en el medio (Figura 5.10 A y D), situación que persistió aun cuando las esporas fueron separadas del antagonista (Figura 5.10 C y F), lo cual se puede deber a la cantidad de nutrientes que se encuentran disponibles en el medio o bien a la mayor capacidad por parte del antagonista para asimilar dichos nutrientes.

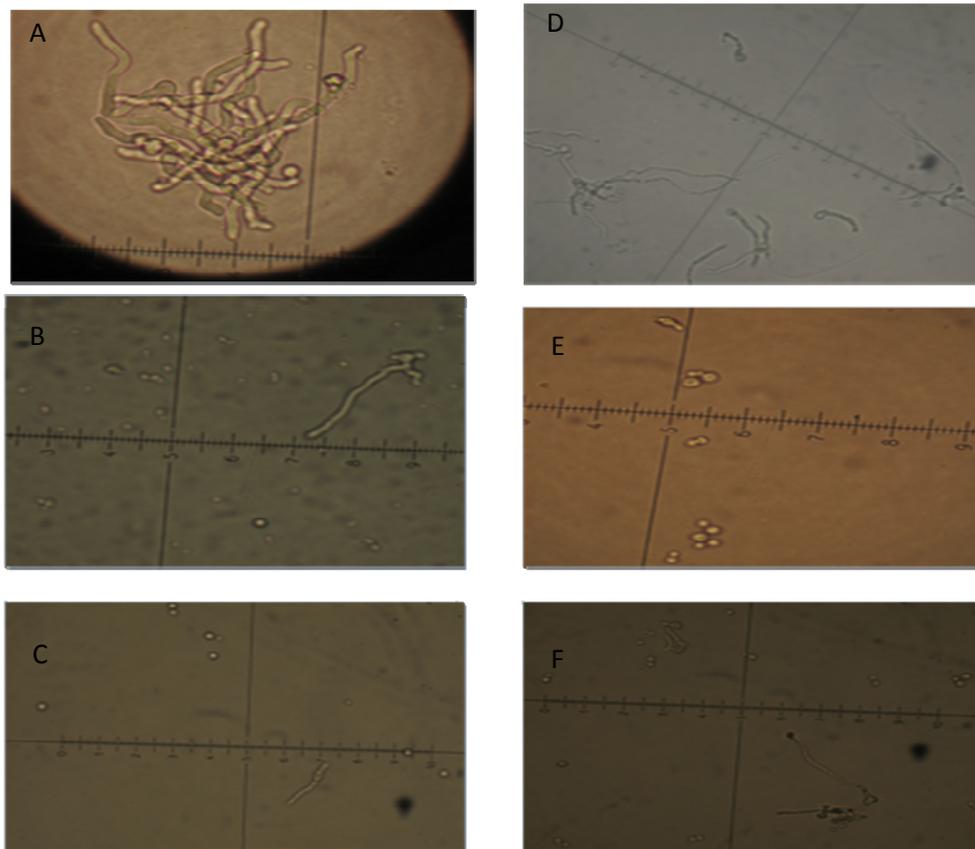


Figura 5.10. Germinación de conidias por 24 h en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniendo: A, NYDA 40%; B, NYDA 40%+antagonista 24^{-2}_{3a} ; C, NYDA 40%+antagonista 24^{-2}_{3a} y filtro; D, Jugo al 10%; E, 0 jugo 5%+antagonista 24^{-2}_{3a} ; F, jugo 5%+antagonista 24^{-2}_{3a} y filtro.

El comportamiento observado en ésta y las dos cepas precedentemente señaladas es sensiblemente el mismo y sugiere que todas ellas son capaces de desarrollar un mecanismo

de acción de competencia por nutrientes. Resultados similares a los observados en este trabajo para estas tres cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* C (cepa 38-432) cepa 24²_{3a} y cepa 22²_{4a}), se presentan en diversos estudios, donde la competición por nutrientes parece jugar un papel importante en el efecto antagónico que se presenta a *P. digitatum* por *Debaryomyces hansenii* (Droby *et al.*, 1989), *B. cinerea* por *Cryptococcus spp.* (Filonow *et al.*, 1996). La exclusión preventiva de los sitios de infección fúngicos por el antagonista fue observada en *Candida oleophila* y *Cryptococcus laurentii* empleadas para el control de *B. cinerea* (Roberts, 1990; Mercier y Wilson, 1995). Estos resultados indican que la competición por nutrientes podría ser el mecanismo involucrado en la supresión de la podredumbre azul para estas tres cepas de levadura.

d) Caso de la cepa 22-111 (*Pichia guillermondii*)

Finalmente, en la Tabla 5.14 se aprecia que el antagonista reduce significativamente en 82% la germinación de los conidios en NYDA en jugo a 5%. En esta misma tabla se aprecia 94% de inhibición de las esporas se presentó en NYDA 20%; de la misma forma el jugo 1% inhibió la germinación a 91%, no presentándose una germinación mayor al 18% en cualquiera de los medios utilizados. Hasta aquí, el comportamiento mostrado por la levadura 22-111 es sensiblemente el mismo del de las tres precedentes.

Tabla 5.14. Porcentaje de desarrollo de tubo germinativo de conidios de *P. expansum* expuestos por 24 h y 26 °C en presencia la cepa 22-111 en diferentes medios.

Tratamiento	Escala de germinación*				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	0	0	0	0	0
20% NYDA+ Antagonista	94	3	2	0	1
40% NYDA+ Antagonista	89	10	0	1	0
1% Jugo+ Antagonista	93	4	1	1	1
5% Jugo+ Antagonista	82	18	0	0	0
10% Jugo+ Antagonista	91	7	2	0	0

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤ 2 , 3 tubo germinativo ≤ 3 , 4 tubo germinativo > 4 tamaño de conidio, 100 co nidias por tratamiento fueron contadas.

Sin embargo, y a diferencia de lo ocurrido con las otras tres cepas de levaduras, cuando el antagonista fue separado del patógeno por una membrana semipermeable, las conidias contenidas en NYDA 40% germinaron el 100% y la mayoría de los conidios en jugo en cualquier concentración (Tabla 5.15). El máximo porcentaje de inhibición observado en jugo a concentraciones de 5 y 10% fue de 27%.

Tabla 5.15. Porcentaje de desarrollo de tubo germinativo de *P. expansum* en cilindros con membranas PTFE expuestos por 24 h y 26°C en presencia de la cepa 22-111 en diferentes medios

Tratamiento	Escala de germinación*				
	0	1	2	3	4
Agua+ Antagonista	0	0	0	0	0
20% NYDA+ Antagonista	8	9	0	1	82
40% NYDA+ Antagonista	0	10	0	0	90
1% Jugo+ Antagonista	1	15	22	20	42
5% Jugo+ Antagonista	23	6	19	20	32
10% Jugo+ Antagonista	27	29	28	14	2

*Escala de germinación: 0= no germinado, 1= tubo germinativo igual a conidio, 2= tubo germinativo ≤ 2 , 3 tubo germinativo ≤ 3 , 4 tubo germinativo > 4 tamaño de conidio, 100 conidias por tratamiento fueron contadas.

Los resultados mostrados en las Tablas 5.14 y 5.15 se ilustran en la Figura 5.11, cuando las esporas se encontraban solas en el medio de cultivo alcanzaban un desarrollo total del tubo germinativo (Figura 5.11 A y D), situación que se vio disminuida cuando fueron incubados en contacto directo casi en su totalidad en medios NYDA 40% y Jugo 10% (Figura 5.11 B y E). Sin embargo, cuando las esporas del hongo fueron separadas del antagonista 22-111 el índice de germinación aumento considerablemente (Figura 5.11 C y F), siendo este índice de germinación similar a cuando las esporas se encontraban solas en el medio de cultivo.

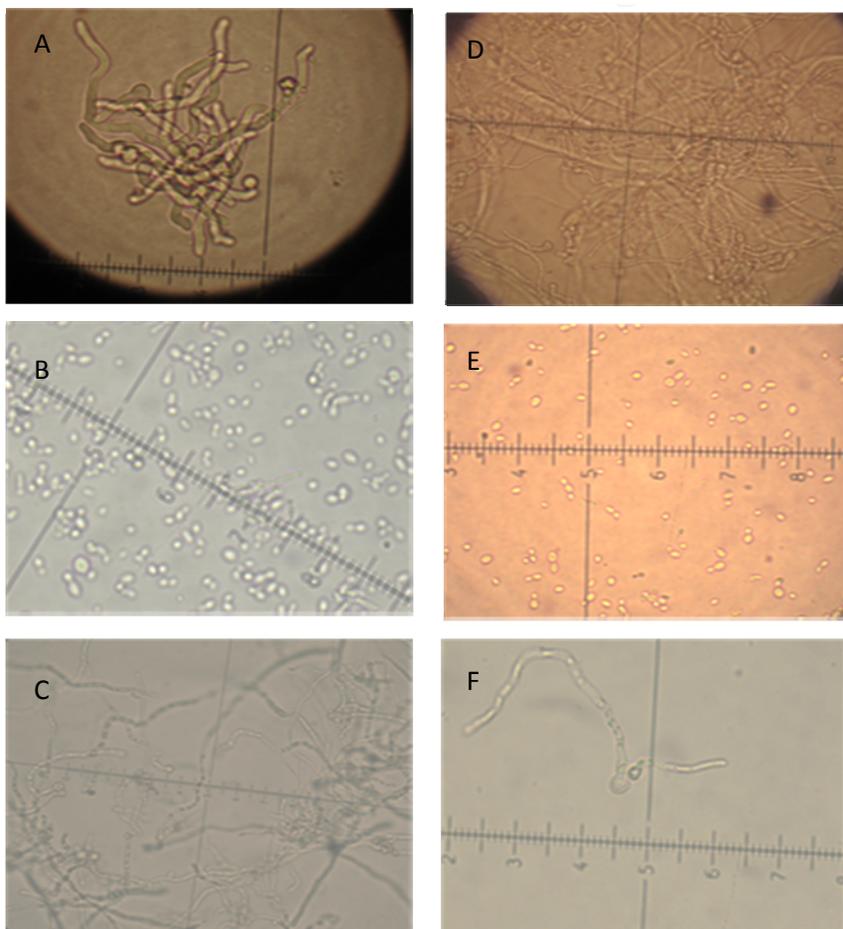


Figura 5.11. Germinación de conidias por 24 h en membranas cortadas de los cilindros que fueron insertados por 24 h en pozos conteniendo: A, NYDA 40%; B, NYDA 40%+antagonista 22-111; C, NYDA 40%+antagonista 22-111 y filtro; D, Jugo al 10%; E, 0 jugo 5%+antagonista 22-111; F, jugo 5%+antagonista 22-111 y filtro.

Los resultados aquí obtenidos muestran que ni la competición por nutrientes, ni la producción de compuestos antifúngicos son los mecanismos responsables de la actividad de biocontrol de la cepa 22-111 contra *P. expansum*, esto debido a que la germinación de las esporas del agente patógeno fue muy elevada (alrededor de 90%) cuándo fueron separados de las células de levaduras físicamente por un filtro, aunque, la inhibición en la germinación de las conidias se presentó cuando existía contacto directo entre célula y célula; cosa que no ocurrió con las otras tres cepas donde los porcentajes de germinación y el desarrollo de los tubos germinativos del hongo se redujeron casi igual que en presencia ó ausencia de la membrana.

Esto coincide con los resultados obtenidos por Bonaterra (2003) quien observó una inhibición importante de germinación conidial y crecimiento de hifas de *Rhizopus stolonifer* y *Monilinia laxa* cuando las esporas fúngicas y las células de *P. agglomerans* fueron cocultivadas sobre un extracto de jugo de naranja. Sin embargo, este efecto no fue detectado cuando el antagonista y las células de agente patógeno fueron separados por la membrana semipermeable que admite físicamente el cruce de nutrientes y de metabolitos. Por lo tanto, la interacción directa entre la cepa del antagonista y las células del agente patógeno son esenciales en la actividad de biocontrol de la cepa antagonista.

VI. CONCLUSIONES

1) Resistencia de genotipos de manzana a *P. expansum*

Existe una gran variabilidad en la tolerancia a *P. expansum* entre los genotipos de manzana evaluados, observándose un grupo de ellos altamente susceptibles al desarrollo de la infección de *P. expansum*, la mayoría de cáscara amarilla destacándose ‘Golden delicious’ y al menos otros dos o tres más (SM1 y ‘Rayada’), lo que explica el que esta variedad sea la más utilizada en ensayos de control biológico.

Se detectó un grupo de genotipos con baja susceptibilidad a *P. expansum*. La mayoría de ellas con cáscara roja, destacando ‘Lourdes’, cultivar de maduración tardía que después de los 10 días de incubación presentó muy bajo desarrollo del hongo. Sería interesante determinar las causas de la tolerancia a *P. expansum* de estos genotipos de manzana.

2) Antagonismo de levaduras contra *P. expansum*

La cepa que propició la mayor inhibición de la severidad de *P. expansum* en frutos incubados a 27°C fue la 38-432 con 90% después de 10 días de almacenamiento. Otras cepas sobresalientes fueron: 22-111, 24⁻²_{3a} y 22⁻²_{4a} con una inhibición del desarrollo de 88, 65 y 75%, respectivamente.

A 4°C las cepas que presentaron el mayor efecto antagónico fueron 22⁻²_{4a} y 8⁻¹_{3c} con un 100% de inhibición del desarrollo del hongo después de los 90 días de almacenamiento. Otras cepas sobresalientes fueron: 22-111, 38-432 y 24⁻²_{3a} con un 98, 96 y 82% de inhibición respectivamente.

De las 50 cepas de levaduras evaluadas inicialmente solo cuatro de ellas presentaron un efecto antagónico significativo contra *P. expansum* a las dos temperaturas de almacenamiento, a saber: cepa 38-432 (*Debaromyces hansenii* C), cepa 22-111 (*Pichia guilliermondii*), cepa 24⁻²_{3a} y cepa 22⁻²_{4a}

3) Correlación del comportamiento de las levaduras a dos temperaturas

Los análisis estadísticos realizados muestran una ausencia de correlación entre el poder antagonico de las levaduras observado en manzanas almacenadas a 27°C y las almacenadas a 4°C. Este resultado sugiere que las levaduras que presenten un elevado poder antagonico deben ser evaluadas a ambas temperaturas.

4) Mecanismos de acción

Ninguna de las 50 levaduras evaluadas mostró ni en los bioensayos *in vitro* ni en los ensayos *in vivo* la producción de sustancias antimicóticas, por lo que se descarta la antibiosis como mecanismo de acción de éstas.

Los resultados obtenidos muestran que en tres de las cuatro levaduras estudiadas (*cepa 38-432*, *cepa 24⁻²_{3a}* y *cepa 22⁻²_{4a}*) son capaces de desarrollar un mecanismo de acción de competencia por nutrientes que les permite tener un efecto antagonico sobre *P. expansum*.

La cepa 22-111, a diferencia de las anteriores, manifiesta un mecanismo de acción basado en la interacción directa (célula a célula) entre patógeno y antagonista.

Recomendaciones

Para futuros trabajos de investigación y para ser mas selectivos en la búsqueda de levaduras antagonicas se recomienda realizar pruebas *in vivo* y a ocho días de incubación a 27°C y con cuatro heridas equidistantes en el fruto, posteriormente probar todas las cepas a temperatura de almacenamiento por 90 días de incubación, y seleccionar aquellas levaduras que presentaron un alto nivel antagonico a ambas temperaturas.

Con base a nuestros resultados se recomienda que las cepas con mayor poder antagonico sean probadas contra otros patógenos y en frutos diferentes.

Se recomienda tratar de identificar los mecanismos físicos y bioquímicos por los que algunos genotipos de manzana como 'Lourdes' presentan una baja susceptibilidad al desarrollo de la infección de *P.expansum*.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aharoni, Y., A. Copel, E. Fallik.** 1993. Hinokitiol (b-thujaplicin), for postharvest decay control on “Galia” melons. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 21, 165-169.
- Álvarez, S.** 1988. *El manzano*. 5ª Ed. Aedos S. A. Barcelona, España. 431 pp.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell,** 1996. *Introductory Mycology*. 4º Ed. John Wiley & Sons, Inc. pp: 273-275.
- Andrews, P.** (1994) The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochemical Journal*, 96, 595-605
- Artés, F., J.A. Tudela, R. Villaescusa.** 2000. Thermal postharvest treatments for improving pomegranate quality and shelf life. *Postharvest Biology Technology*. 3, 245-251.
- Bonattera, A., M. Mari, L. Casalini, and E. Montesinos.** (2003) Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 93–104.
- Borras, A.D and R.V. Aguilar.** 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology* 11: 179-184
- Blakeman, J.P. and D.S. Brodie.**1976. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. *In: Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. C.H. Dickinson y T.F. Preece (Eds.) Academic Press. London. pp: 529-557
- Bui, K. y P. Galzy.** 1990. Food yeast, *In: Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M., Yeast Technology*. 1st edition. Springer Verlag, Berlin. 241p.
- Calderón, A. E.** 1987. *Fruticultura General: El esfuerzo del hombre*. 3ª Ed. Limusa, México, DF. pp. 312-328

- Campbell, R.** 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge EE. UU. 218p.
- Cassone, A., S. Conti, F. De Bernardis & L. Polonelli.** 1997. Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature? *Immunology today* 18, 164-169.
- Castañeda D. D.** 2005, 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 de Maestría Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Querétaro, México. pp. 4, 11, 18,20-23, 40-49,81
- Chalutz, E., S. Droby, C. L. Wilson, M.E. Wisniewski.** 1992. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. *Phytochem. Phytobiol. B.: Biol.* 15, 367.
- Chalutz, E. and C. L. Wilson.** 1989. Postharvest Biocontrol of Green and Blue Mold and Sour Rot of Citrus Fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease* 74, 134 - 137.
- Conway, W.S., W. J. Janisiewicz, J. D. Klein, C. E. Sams.** 1999. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of “Gala” apples. *HortScience* 34, 4, 700-704.
- Cook, J.R. & K. F. Baker.** 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press 539p. EE. UU.
- D’Esclapon, G.** 1976. Nuevo Tratado Práctico de Fruticultura. Ed. Blume. Barcelona, España. pp. 442-445.
- Delahaye, T. et P. Vin.** 1997. Le pommier. Ed Actes Sud, France. pp. 9-14.
- Droby, S, E. Chalutz, C. L. Wilson, and M. E. Winiewski.** 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium igitatum* on grapefruit. *Can. Journal Microbiology.*, 35, 794-800.

- Droby, S.** y E. Chalutz, C. L. Wilson. 1991. Antagonic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News Inform*, 2, 169-173.
- Droby, S.** y E. Chalutz. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. *In: Biological control of postharvest diseases: theory and practice*. Wilson, Ch.L. y Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press Inc., Boca Ratón, EE.UU. pp: 63-75.
- El-Ghaouth, A.,** C. L. Wilson. 1995. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. *Postharvest News and Information* 6:5-11.
- El-Ghaouth, A.,** C. L. Wilson, M. Wisniewski. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88: 282– 291.
- El-Ghaouth, A.,** C. L. Wilson & M. Wisniewski. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology* 93, 344-348.
- Filonow, A.B.,** H. S. Vishniac, J. A. Anderson, W. J. Janisiewicz. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control* 7, 212-220.
- Filonow, A.** 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science and Technology* 8, 243-256.
- Francés, J.,** 2000. Experimental bases for implementation of a rational control of postharvest fungal rots and physiological disorders in pear in Girona cooperatives. PhD thesis, Universidad Pública de Navarra, Navarra Spain. Pp 70-73.
- Ghaouth, A.,** J. Smilanick, E. Brown, A. Ippolito and C. L. Wilson. 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of

apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease* 84: 243-248.

González, H. A., M. R. Fernández, R. F. Aroldo, T. E. Castaño, y P. R. Martínez. 2005. Diversidad genética en poblaciones de manzano en Querétaro, México. Revelada por marcadores RAPD. *Revista Fitotecnia de México.* (28)2: 83-91.

Gueldner, R. C., C. C. Reilly, P. L. Pusey, C. E. Costello, R. F. Arrendale, R. H. Cox, D. S. Himmelsbach, F. G. Crumley And H. G. Cutler. 1988. Isolation and identification of iturines as antifungal peptides in biological control of peach-brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 366-370

Heath, M. 1996. Plant resistance to fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18, 469-475.

Herrero, A. y J. Guardia, “Conservación de frutos. Manual técnico”. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 409 p. (1992).

Huba'lek, Z. (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205–229.

Hussein, H.S., R. I. Mackie, N. R. Merchen, D. H. Baker & C. M. Parsons. 1996. Effects of oleaginous yeast on growth performance, fatty acid composition of muscles, and energy utilization by poultry. *Bioresource Technology* 55, 125-130.

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

Inlandfruit, 2003. Internet. <http://www.inlandfruit.com>. Fecha de consulta: 27 de Junio del 2007.

- Ippolito, A., A. El Ghaouth, C. L. Wilson & M. Wisniewski.** 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology* 19, 265-272.
- Janisiewicz, W.J.** 1987. Postharvest biological control of blue-mold on apples. *Pythopathology* 77: 481-485.
- Janisiewicz, W.J.** 1988. Biological control of diseases of fruit. *en: Biocontrol of plant diseases.* K.G. Mukerji y K.L. Garg (Ed.). Vol II CRC Press, Boca Ratón, FL, EE.UU. p. 153-165.
- Janisiewicz, W.J. and J. Roitman.** 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78: 1697-1700.
- Janisiewicz, W.J.** 1991. Biological control of postharvest fruit diseases. *In: Handbook of Applied Mycology Vol I.* Marcel Dekker, Inc Boca Raton, FL. EE. UU. p.p. 301-325.
- Janisiewicz, W. J., L. Yourman, J. Roitman and N. Mahoney.** 1991. Postharvest control of blue-mold and gray-mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease* 75:490-494.
- Janisiewicz, W.J., W. S. Conway, D. M. Glenn, C. E. Sams.** 1998. Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. *HortScience* 33, 1, 105-109.
- Janisiewicz, W, J.** 1999. Blue Mold, *Penicillium spp.* *In.* Plant- microbe Interaction and biological control, Ed. Marcel Dekker Inc. New York, *In press.* www.caf.wvu.edu/kearnysville/disease_month/bluemold0199.html . Fecha de consulta: 27 de mayo del 2006.
- Janisiewicz, W.J., T. J. Tworkoski & C. Sharer.** 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90, 1196-1200.

- Janisiewicz, W.J. & L. Korsten.** 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual Review of Phytopathology 40, 411-441.
- Janisiewicz, W.J., B. Leverentz, W. S. Conway, R. A. Saftner, A. N. Reed & M. J. Camp.** 2003. Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. Postharvest Biology and Technology 29, 129-143.
- Jijakli, H.M. & P. Lepoivre.** 1998. Characterization of an Exo- β -1,3-Glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. Phytopathology 88, 335-343.
- Kader, A.A.** 1995. Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmospheres. Acta Horticulturae 398:59-70.
- Kader, A.A., S.H. Chavez-Franco.** 1993. Effects of CO₂ on ethylene biosynthesis in 'Bartlett' pears. Postharvest Biol. Technol. 3:183-190.
- Keulemans, J. and R. Eyssen.** 1996. Fruit weight in apple as influenced by seed number and pollinated Act Hort 423: 114-124
- Kurtzman, C.P. & S. Droby.** 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. Systematic and Applied Microbiology 24, 395-399.
- Latorre, B., J. Franck, J. Zoffoli y S. Viertel.** 2002. Pudrición ácida de la vid. Revista Frutícola. 23: 53-58
- MacLaughlin R.J., M. E. Wisniewski, C. L. Wilson y E. Chalut.** 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of Apple with *Candica sp.* Phytopathology 80, 456-461.

- Mercier, J., C. L. Wilson.** 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biol. Control* 4, 138-144.
- Montesinos, E., A. Bonaterra, J. Francés, E. Badosa, J. Cabrefiga.** 2001. Nueva cepa bacteriana biofungicida, procedimiento para su preparación y aplicaciones. Solicitud P200101274. Oficina Española de Patentes y Marcas
- Palou, L., J. L. Smilanick, J. Usall, J. and I. Viñas.** 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Disease* 85: 371-376.
- Palou, L., J. Usall, J.A. Muñoz, J. L. Smilanick and I. Viñas.** 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 24: 93-96.
- Pelczar, M. J., R. D. Reid, and E. C. S. Chan.** 1986. *Microbiology*. 4^o Ed. Mc Graw Hill Book. Co., USA. pp. 271-287
- Paster, N., S. Droby, E. Chalutz, M. Menasherov, R. Nitzan, & C. L. Wilson.** 1993. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Microbiological Research* 97, 1201-1206.
- Pitt, J.** (2000). *A Laboratory guide to common Penicillium species*. Food Science Australia.
- Polonelli, L. & G. Morace.** 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *Journal of Clinical Microbiology* 24, 866-869.
- Plaza, P., J. Usall, R. Torres, N. Lamarca, Asensio and I. Viñas, I.** 2003. Control of green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 28:195-198.

- Plaza, P., A. Sanbruno, J. Usall, N. Lamarca, R. Torres, J. Pons and I. Viñas. 2004a.** Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology*. 34: pp 29-37
- Plaza, P., J. Usall, R. Torres, M. Abadías, J. L. Smilanick and I. Viñas. 2004b.** Using sodium carbonate to improve curing treatments against green and blue molds on citrus fruits. *Pest Management Science*. p.p60, 815-821.
- Pusey, P.L., M. W. Hotchkiss, H. T. Dulmage, R. A. Baumgardner, E. I. Zehr, C. C. Reilly, C.C. y C. L. Wilson. 1988.** Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant disease* 72: 622-626.
- Pusey, L. 1994.** Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. *in: biological control of postharvest diseases*. Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press p. 77-89.
- Ramirez, C. 1982.** Manual and atlas of the Penicillia. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. 874 p.
- Ramírez, H., M. Cepeda. 1993.** El manzano. Editorial Trillas. México D.F. p.p. 11, 13-15, 50-52
- Ramírez, R. H, L. Dennos, Abbott y B. M. Adalberto. 2002.** Fisiología y manejo del Manzano. 1ª Ed. Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. Saltillo, Coahuila. pp.61, 133-135
- Roberts, R.G., 1990.** Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80, 526-530.
- Rodov, V., S. Ben-Yehoshua, D. Fang, G. D'hallewin & T. Castia. 1994.** Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various

postharvest treatments. *Acta Horticulturae*, Natural Phenols in Plant Resistance 381, 517-523.

Sagarpa, 2007. Anuario Estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Sánchez-Ventura S.E., Martínez-Peniche, R. A.*, Castillo, T. J. y Fernández-Escartín E. 2008. Antagonismo de levaduras nativas contra la pudrición azul (*Penicillium expansum* LINK) en manzanas en poscosecha. *Revista Fitotecnia Mexicana*. En prensa.

Smilanick, J. L., D. A. Margosan, F. Mlikota, J. Usall and I. F. Michael. 1997. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* 83:139-145

Smilanick, J.L., D. A. Margosan, F. Mlikota, J. Usall, I. F. Michael. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease* 83: 139-145

Snowdon, A.L., 1990. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Volume 1. Wolfe Scientific, London.

Stringer, D.A. 1982. Industrial development and evaluation of new protein sources: microorganisms. *The Proceedings of the Nutrition Society* 41, 289-300.

Spadaro, D., S. Piano, C. Duverney, M. L. Gullino. 2002. Use of microorganisms, heat treatment, and natural compounds against Botrytis rot on apple. Proc. 2nd International Conference on the alternative control methods against plant pests and diseases, Lille, France 446-453.

Spadaro, D. & M. L. Gullino. 2004. State of the art and future prospects of the biocontrol of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91, 185-194.

- Teixidó, N., J. Usall, L. Palou, A. Asensio, C. Nunes and I. Viñas, 2001.** Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *European Journal of Plant Pathology* 107: 685-694.
- Torres, R., C. Nunes, J. M. García, M. Abadías, I. Viñas, T. Manso, M. Olmo, J. Usall. 2006.** Application of *p. agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases of citrus fruit in several mediterranean locations. *European Journal of Plant Pathology* (en prensa).
- Valentines, E. 2005.** Bases bioquímicas de resistencia a *Penicillium expansum* en poma. Tesis de Doctorado en Ingeniería Agrónoma. Escuela Técnica superior de Ingeniería Agraria. Universidad de Lleida. Lleida, España. pp.19-23
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. 1997.** Nueva cepa de *Candida sake* (Saito&Ota) van uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de postcosecha de frutas. Patente española P2089981. Oficina Española de Patentes y Marcas
- Viñas, I., J. Usall, N. Teixidó and V. Sanchis. 1998.** Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*: 40:9-16.
- Viñas, I., J. Usall, C. Nunes, N. Teixidó. 1999.** Nueva cepa de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck, 1998) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcareck, Izard, Kerstersy De Ley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de frutas. Solicitud P9900612. Oficina Española de Patentes y Marcas
- Viñas, I., J. Usall, N. Teixidó, E. Fons. 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

- Viñas, I.;** N. Teixidó, M. Abadías, J. Costa, Usall. 2002. Producción, formulación y mejora de bacterias y levaduras para su aplicación en el control biológico de enfermedades. *sólida" Phytoma. España* 144:107-113
- Webster, J.** 1986. *Introduction to Fungi.* 2º ed. Cambridge University Press
- Westwood, M. N.** 1993. *Temperate Zone Pomology.* Timber Press, Inc, 3rd Ed. U.S.A. pp. 523
- Willis, R. B. H.,** W. B. MacGlasson D. Graham, T. H. Lee, E. G. Hall. 1989. *Postharvest. An introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables.* U.S.A. 174.
- Willis, R.B.H.,** W.B. McGlasson, D. Graham, T.H. Lee and E. G. Hall. 1997. *Postharvest. An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables.* Ed. BSP Professional Books. London. pp 163
- Wilson, C.L.** and E. Chalutz. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Science Horticulturae* 40: 105-112
- Wilson, C.L.** and M. E. Wisniewski. 1989. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual review of phytopathology.* 27, 425-441.
- Wilson, C.L.,** E. Chalutz. 1991. *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables.* Workshop Proceedings. US GPO, Washington 315-322.
- Wilson, C.L. & P. L. Pusey.** 1996. Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Disease* 69, 375-378.
- Wilson, C.L.,** M. E. Wisniewski, C. L. Biles, R. Mclaughlin, E. Chalutz and S. Droby. 2003. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Alternatives to synthetic fungicides. 10: 172-177.

Wisniewski, M., C. Wilson and W. Hershberger. 1989. Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. *Can. J. Bot.* 67:2317-2323.

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

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