



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

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

**“Modos de acción de agentes de biocontrol y mecanismos de  
resistencia de genotipos de manzana a *Penicillium  
expansum*”**

**TESIS**

*Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:*

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

Presenta

**M. en C. Rocío Aurora Sandoval Chávez**

Dirigido por

**Dr. RAMÓN ÁLVAR MARTÍNEZ PENICHE  
Dra. MA. ROSARIO TORRES SANCHIS**

Santiago de Querétaro, Qro. México, 2015.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Modos de acción de agentes de biocontrol y mecanismos de resistencia de genotipos de manzana a *Penicillium expansum*”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**Presenta:**

M. en C. Rocío Aurora Sandoval Chávez

Dirigido por:

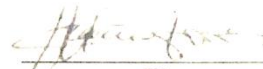
Dr. Ramón Álar Martínez Peniche

Dra. Ma. Rosario Torres Sanchis

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche  
Presidente

  
Firma


Dra. Ma. Rosario Torres Sanchis  
Co-director

  
Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
Vocal

  
Firma

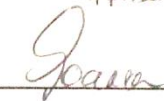
Dr. Gerardo M. Nava Morales  
Suplente

  
Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Suplente

  
Firma

  
M. S. P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca  
Piña  
Director de Investigación y Posgrado

## RESUMEN

El manzano es una de las especies frutícolas de mayor importancia a nivel mundial, pero su fruto se ve afectado durante su almacenamiento por la pudrición azul causada por *Penicillium expansum* Link, por lo que para su control se usan fungicidas de síntesis que resultan tóxicos para el ambiente y el humano. Por ello, en la actualidad se buscan alternativas como el uso de cepas antagónicas o de cultivares tolerantes al patógeno. Los objetivos de esta tesis fueron: i) caracterizar la resistencia a *P. expansum* de genotipos de manzana establecidos en Querétaro, México y; ii) Evaluar la efectividad y modos de acción de cepas de levaduras autóctonas contra este patógeno. Diversos genotipos de manzana se inocularon con *P. expansum*, se midió el desarrollo del hongo y se determinó la correlación de algunas características físicas y químicas de los frutos con la severidad del patógeno; los frutos menos susceptibles al hongo fueron sometidos a estudios de expresión de genes por PCR cuantitativo. Por otro lado, las levaduras con potencial como agentes de biocontrol se sometieron a pruebas de antibiosis en cajas de Petri y de competencia por nutrientes en placas de cultivo con filtros semipermeables. Los resultados mostraron que la susceptibilidad de los genotipos de manzana a *P. expansum* se vio fuertemente influenciada por el año de cosecha (2011 y 2012). En 2012 (año en que los genotipos mostraron menor susceptibilidad), los genotipos menos susceptibles fueron '436' y 'Lourdes' (17.4 y 18.5 mm de diámetro de podredumbre, respectivamente) en comparación contrastando con 'Golden Delicious' (37.9 mm) considerada como genotipo de referencia. Asimismo el estado de madurez de los frutos, más no su época de maduración, influyó en el desarrollo del hongo, siendo los frutos menos maduros los que tuvieron menor infección. Por otro lado, a excepción del contenido de sólidos solubles totales en 2012, ninguna de las variables físicas y químicas evaluadas correlacionó con la susceptibilidad de las manzanas a *P. expansum*. Sin embargo, los genotipos 'Lourdes' y '436' mostraron cambios notables en la expresión de genes relacionados con la ruta de fenilpropanoides, proteínas PR y síntesis de etileno. Con relación a los agentes de biocontrol, se obtuvieron cepas que redujeron considerablemente el desarrollo del hongo en área (de 52.4 a 98.1 %) como 2R, M18/3B, M20/2A, B39, B38, B33 y B34. Finalmente, no se observó producción de antibióticos por ninguno de los antagonistas mencionados, pero seis de ellos inhibieron al hongo estando en contacto directo o no con éste, sugiriendo un modo de acción de competencia por nutrientes con el patógeno. Sin embargo, la cepa B38 disminuye significativamente su efecto sobre el hongo cuando las células se encuentran separadas por el filtro lo que sugiere una modo de acción de competencia por nutrientes y/o interacción directa. Las cepas M18/3B, M20/2A, y B34 fueron identificadas como *Yarrowia lipolytica* y la B33 como *Debaryomyces hansenii*.

**(Palabras clave:** *P. expansum*, genotipos, poscosecha, manzana, susceptibilidad, antagonistas, expresión de genes, modos de acción)

## SUMMARY

Apple tree is one of the most important fruit species worldwide, but its fruit is affected during storage by blue rot caused by *Penicillium expansum* Link. In order to control it fungicides that are toxic for environment and human are commonly used. Therefore, new alternatives are searched as the use of antagonistic strains or tolerant cultivars to fungus. The objectives of this thesis were: i) characterize the resistance to *P. expansum* of apple genotypes established in Querétaro, Mexico and; ii) evaluate the effectivity and modes of action of native yeast strains against this pathogen. Several genotypes of apple were inoculated with *P. expansum*; fungal growth was measured and physical and chemical characteristics of fruit were correlated with the severity of the pathogen; least susceptible fruits were subjected to gene expression studies by quantitative PCR. Moreover, yeasts with potential as biocontrol agents were tested for antibiosis in Petri dishes and for competition for nutrients in culture plates with a semipermeable filter. The susceptibility of apple genotypes to *P. expansum* was strongly influenced by the harvest year (2011 and 2012). In 2012 (year where genotypes showed less susceptibility), the least susceptible genotypes were '436' and 'Lourdes' (17.4 and 18.5 mm of rot diameter, respectively) contrasting with 'Golden Delicious' (37.9 mm) considered as reference genotype. Also, the fruit ripeness, but not its ripening time, influenced the development of the fungus being the fruit less mature the least infected. Furthermore, excluding for the content of total soluble solids in 2012, neither of the physical and chemical parameters evaluated were correlated with the susceptibility of apples to *P. expansum*. However, genotypes 'Lourdes' and '436' showed significant changes in gene expression related to phenylpropanoid metabolism, PR proteins and ethylene synthesis. Regarding biocontrol agents, strains that reduced considerably the fungi growth in area (from 52.4 to 98.1%) were 2R, M18/3B, M20/2A, B39, B38, B33 y B34. Finally, antibiotic production was not observed by any of these antagonists, but six of them inhibited fungus being or not in direct contact with the fungus, suggesting a mode of action by competition for nutrients with the pathogen. However strain B38 reduces the inhibition of fungus when cells are separated by filter suggesting a mode of action by competition for nutrients and/or direct interaction. Strains M18/3B, M20/2A, and B34 were identified as *Yarrowia lipolytica* and B33 as *Debaryomyces hansenii*.

**(Key words:** *P. expansum*, genotypes, postharvest, apple, susceptibility, antagonists, gene expression, modes of action)

## *DEDICATORIA*

*A mi familia porque son lo más importante y lo mejor que tengo*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Autónoma de Querétaro por abrirme las puertas para realizar mis estudios de Doctorado*

*Al consejo nacional de ciencia y tecnología CONACYT por la beca otorgada durante el periodo de realización de mi tesis de Doctorado*

*Al laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas y Hortalizas*

*Al Dr. Ramón Álar Martínez Peniche, no tengo palabras para agradecerle por todo su apoyo en todo momento desde la realización de mi maestría hasta ahora, sé que el camino no ha sido fácil pero lo admiro y respeto por continuar luchando como debe ser.*

*A mis sinodales por todo su apoyo a lo largo de la realización de este proyecto.*

*A los doctores del IRTA que me apoyaron durante mi estancia y desde España: Charo, Neus, Pep, Inma, Maribel, Karla, Rosa Altisent, Jordi Giné*

*A todos mis compañeros del laboratorio: Carmen, Marcos, Dalía, Alex Aldrete, Eunice, Sarahí, Sandy, Laura, Alex Carrasco, Coco.*

*A mis compañeros y amigos en España: Marínes, Lulú, Gemmís, Pilar, Marcía, Laura, María B, María S, Carlos, Celia, Cristina, Robert, Sveta, Angelo, Rosa, Oana, Marta, Ana, Cyndia, Guillermo, Janet, Rogelio, Damí.*

*A mi mamá, Ma. Isabel Chávez Fajardo, gracias por estar siempre, por apoyarme en todas mis decisiones a pesar de que todo este tiempo he estado lejos, sabes que Te amo con todo mi corazón, que eres mi pilar y mi inspiración, y en todo momento de mi vida Te extraño.*

*A mi papá, Samuel Sandoval Cortés, porque a pesar de ya no estar físicamente, has estado en mi corazón y en mi mente inspirándome en muchas ocasiones mediante los recuerdos y enseñanzas que me dejaste. Te amo y te extraño con todo mi ser.*

*A mis hermanos y cuñados que los amo con todo mi corazón y siempre están ahí: Marcos, Emmy, Sammy, Ruth, Isa, Toño, Janis, Alex, Lety, Pancho.*

*A mis sobrinitos que siempre me alegran con sus ocurrencias y me inspiran con su amor: Los amo... Alejandra, Alejandro, Jacob, Pahoran, Ezra, Panchito, Karina, Edson, Emilio, Luis, Ariadne, Andrea, Montse.*

*A Sal: Gracias por tu apoyo y amor siempre y al igual gracias a tu familia por su apoyo. Te amo.*

*A mi tía Carmelita, mis primos y amigos de toda la vida por estar en mis buenos y malos momentos: Esme, Eric, Adri, Selene, Pamela, Brícia, Myrna, Mayra.*

## Índice

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	vi
Índice de tablas.....	x
Índice de figuras.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. El manzano.....	3
2.1.1. Origen y antecedentes.....	3
2.1.2. Importancia.....	3
2.1.3. Taxonomía.....	4
2.1.4. Maduración y cosecha del fruto de manzana.....	5
2.1.5. Fisiología de poscosecha del fruto.....	6
2.1.6. Manejo en poscosecha.....	7
2.1.6.1. Tipos de almacenamiento de manzana.....	8
2.1.6.2. Daños durante el almacenamiento.....	9
2.2. Enfermedades de la manzana en poscosecha.....	9
2.3. <i>Penicillium expansum</i> .....	12
2.3.1. Género <i>Penicillium</i> .....	12
2.3.2. Morfología.....	13
2.3.3. Patogenicidad.....	13
2.4. Métodos de control de enfermedades de poscosecha.....	14
2.4.1. Métodos culturales.....	14
2.4.2. Control químico.....	14
2.4.3. Resistencia genética.....	16
2.4.4. Control biológico.....	17
2.4.4.1. Tipos de microorganismos antagonistas y características deseables.....	18



2.4.4.2. Levaduras como agentes de biocontrol (ABC).....	19
2.4.4.3. Algunos estudios realizados sobre control biológico en poscosecha.....	20
2.5. Mecanismos de resistencia en las interacciones huésped-patógeno.....	22
2.5.1. Resistencia de las plantas a los patógenos.....	22
2.5.2. Defensas constitutivas o no inducidas.....	23
2.5.3. Defensas activadas o inducidas.....	23
2.5.3.1. Respuesta hipersensible.....	24
2.5.3.2. Respuesta sistémica adquirida (SAR).....	27
2.6. Modos de acción de microorganismos antagonistas.....	29
2.6.1. Competencia por espacio y/o nutrientes.....	29
2.6.2. Producción de sustancias antimicrobianas.....	30
2.6.3. Inducción de resistencia en el huésped.....	30
2.6.4. Interacción directa con el patógeno.....	30
2.6.5. Efectos en el pH.....	31
2.6.6. Tolerancia al estrés oxidativo.....	31
OBJETIVOS.....	32
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. Sitio experimental.....	33
3.2. Material biológico.....	34
3.2.1. Manzana.....	34
3.2.2. Cepas de levaduras.....	36
3.2.3. <i>P. expansum</i> Link.....	37
3.3. Preparación de los inóculos.....	38
3.4. Metodología.....	38
3.5. Susceptibilidad y mecanismos de defensa de los genotipos de manzana a <i>P. expansum</i> .....	40
3.5.1. Caracterización física y química de frutos de manzana.....	40
3.5.1.1. Análisis físicos.....	40
3.5.1.2. Análisis químicos.....	40
3.5.2. Evaluación de la tolerancia de genotipos de manzana a <i>P. expansum</i>	41

3.5.3. Análisis de expresión de genes implicados en las respuestas de defensa de las manzanas .....	42
3.5.3.1. Extracción de ARN.....	44
3.5.3.2. Purificación de ARN.....	44
3.5.3.3. Síntesis de ADNc.....	45
3.5.3.4. Análisis de genes por PCR cuantitativo.....	45
3.6. Efectividad y modos de acción de agentes de biocontrol.....	46
3.6.1. Selección de cepas antagónicas.....	46
3.6.2. Evaluación de la capacidad antagónica a <i>P. expansum</i> de diferentes concentraciones de inóculo de ABC en frutos de manzana.....	46
3.6.3. Dinámica poblacional.....	47
3.6.4. Ensayos de modos de acción.....	47
3.6.4.1. Producción de sustancias antimicrobianas (antibiosis).....	47
3.6.4.2. Competencia por nutrientes.....	47
3.7. Identificación de los ABC.....	48
3.7.1. Extracción de ADN.....	48
3.7.2. Amplificación por PCR en punto final.....	48
3.7.3. Purificación del ADN y secuenciación.....	49
3.8. Diseño de los experimentos.....	50
3.8.1. Ensayos de tolerancia a <i>P. expansum</i> .....	50
3.9. Análisis de los datos.....	50
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1. Ensayo de la virulencia de diferentes cepas de <i>Penicillium</i> spp. en frutos de manzana.....	51
4.2. Influencia del estado de madurez en la susceptibilidad a <i>P. expansum</i> de los genotipos de manzana evaluados.....	52
4.3. Susceptibilidad de genotipos de manzana a <i>P. expansum</i> y su correlación con características físicas y químicas de los frutos.....	55
4.3.1. Ensayos realizados en 2011.....	55
4.3.1.1. Comparación de crecimiento del patógeno entre los genotipos.....	55

4.3.1.2. Variables físicas y químicas de los frutos.....	56
4.3.1.3. Análisis de correlación entre la susceptibilidad de los frutos al hongo y sus características de calidad.....	58
4.3.2. Ensayos realizados en 2012.....	60
4.3.2.1. Comparación de crecimiento del patógeno entre los genotipos.....	60
4.3.2.2. Variables físicas y químicas de los frutos.....	64
4.3.2.3. Análisis de correlación entre la susceptibilidad de los frutos al hongo y sus características de calidad.....	65
4.4. Influencia del almacenamiento en frío en la susceptibilidad a <i>P.</i> <i>expansum</i> de diferentes genotipos de manzana evaluados en 2011...	67
4.5. Cambio en la expresión de diferentes genes como respuesta a la infección por <i>P. expansum</i> en genotipos de manzanas.....	70
4.5.1. Expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides .....	70
4.5.2. Expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogenicidad (proteínas PR) .....	80
4.5.3. Expresión de otros genes relacionados con la respuesta de defensa.....	84
4.6. Evaluación de modos de acción de ABC.....	88
4.6.1. Ensayos de antagonismo a <i>P. expansum</i> de distintas levaduras previamente seleccionadas en 2011.....	88
4.6.1.1. Efecto de la cepa de levadura.....	88
4.6.1.2. Efecto de la concentración del inóculo.....	89
4.6.1.3. Interacción levadura x cepa.....	90
4.6.1.4. Dinámica poblacional.....	92
4.6.2. Selección de nuevas cepas de levaduras con potencial antagónico en 2012.....	94
4.6.3. Evaluación de modos de acción de cepas seleccionadas como ABC contra <i>P. expansum</i> .....	97
4.6.3.1. Producción de antimicrobianos.....	97

4.6.3.2. Competencia por nutrientes.....	98
4.6.4. Identificación de los ABC seleccionados.....	102
V. CONCLUSIONES .....	106
VI. PERSPECTIVAS.....	108
VII. LITERATURA CITADA.....	109

### Índice de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
2.1	Principales estados productores de manzana en México en 2013.....	4
2.2	Taxonomía del manzano.....	4
3.1	Denominación, origen, color del fruto, época de maduración y año de evaluación de genotipos de manzano establecidos en Querétaro y usados en este estudio.....	34
3.2	Cepas de levaduras utilizadas a lo largo de este estudio.....	36
3.3	Cepas de <i>Penicillium</i> spp. evaluadas en este estudio.....	38
3.4	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión de genes relacionados con mecanismos de defensa en genotipos de manzana.....	43
4.1	Sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT), firmeza, pH y color de frutos de 18 genotipos de manzana evaluados en 2011.....	57
4.2	Temperaturas medias mensuales (°C) y precipitación total mensual (mm) en el sitio experimental en 2011 y 2012.....	63
4.3	Sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT), pH y color de genotipos de manzana evaluados en 2012.....	64
4.4	Crecimiento diametral e incidencia de <i>P. expansum</i> en manzanas tratadas con diferentes cepas antagónicas en diferentes condiciones de almacenamiento.....	89

4.5	Crecimiento diametral (mm) de <i>P. expansum</i> en manzana en presencia de levaduras a diferentes concentraciones y condiciones de almacenamiento.....	90
4.6	Incidencia (%) de <i>P. expansum</i> en manzana en presencia de levaduras a diferentes concentraciones y condiciones de almacenamiento.....	92
4.7	Diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en función de levaduras utilizadas como ABC (Ensayo 1).....	94
4.8	Diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en función de levaduras utilizadas como ABC (Ensayo 2).....	96
4.9	Germinación de esporas de <i>P. expansum</i> en medio NYDB 40%, Jugo infusión de manzana y agua.....	99
4.10	Longitud del tubo germinativo de conidios de <i>P. expansum</i> en presencia de los ABC en medio NYDB 40%.....	101
4.11	Longitud del tubo germinativo de conidios de <i>P. expansum</i> en presencia de los ABC en medio Jugo Infusión de Manzana (JIM)....	102
4.12	Cepas de ABC identificadas.....	104

### Índice de figuras

Figura	Título	Página
2.1	Moho azul causado por <i>Penicillium expansum</i> en 'Golden Delicious' ....	12
3.1	Ubicación de la huerta "El suspiro" Cadereyta, Qro.....	33
3.2	Metodología general.....	39
4.1	Crecimiento diametral de diferentes cepas de <i>Penicillium</i> spp. en frutos de manzana a dos tiempos de incubación a $25 \pm 2$ °C.....	52
4.2	Crecimiento diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas de 10 genotipos a menor grado de madurez inoculados y almacenados a 26 °C por 4 d en 2011.....	53

4.3	Crecimiento diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas de 10 genotipos a menor grado de madurez inoculados y almacenados a 26 °C por 8 d en 2011.....	54
4.4	Diámetro de desarrollo de <i>P. expansum</i> en 10 genotipos de manzana en función de su estado de madurez.....	55
4.5	Crecimiento diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas de 18 genotipos inoculados y almacenados a 26 °C por 8 d en 2011.....	56
4.6	Segregación de 18 genotipos de manzana establecidos en Quéretaro, México, de acuerdo con sus características de calidad y su sensibilidad a <i>P. expansum</i> determinadas por análisis de componentes principales (ACP) en la cosecha de 2011.....	59
4.7	Crecimiento diametral de <i>P. expansum</i> en manzanas de 23 genotipos inoculados y almacenados a 26 °C por 8 d en 2012.....	60
4.8	Pudrición causada por <i>P. expansum</i> en genotipos inoculados e incubados a 26 °C por 8 d en 2012.....	61
4.9	Segregación de 23 genotipos de manzana establecidos en Quéretaro, México, de acuerdo con sus características de calidad y su sensibilidad a <i>P. expansum</i> determinadas por análisis de componentes principales (ACP) en la cosecha de 2012.....	66
4.10	Diámetro ecuatorial de <i>P. expansum</i> en distintos genotipos de manzana cosechados en 2011 que fueron almacenados por un tiempo prolongado a 4 °C. Condiciones de ensayo: 25 °C; 8 d.....	68
4.11	Correlación entre crecimiento diametral (mm) de <i>P. expansum</i> en genotipos al momento de la cosecha y almacenados a 4 °C.....	69
4.12	Niveles de expresión relativa del gen <i>PAL1</i> (Fenilalanina amonioliasa 1) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	72
4.13	Niveles de expresión relativa del gen <i>POX64</i> (peroxidasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	73

4.14	Niveles de expresión relativa del gen <i>COMT2</i> (ácido cafeico O-metiltransferasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	74
4.15	Niveles de expresión relativa del gen <i>CAD1</i> (cinamil alcohol deshidrogenasa 1) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	76
4.16	Niveles de expresión relativa del gen <i>CAD6</i> (cinamil alcohol deshidrogenasa 6) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	77
4.17	Niveles de expresión relativa del gen <i>CPR</i> (NADPH citocromo p450 reductasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	79
4.18	Niveles de expresión relativa del gen <i>acChit</i> (endoquitinasa ácida) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	81
4.19	Niveles de expresión relativa del gen <i>Mal d 1.03E</i> en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	83
4.20	Niveles de expresión relativa del gen <i>CAT</i> (Catalasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	85
4.21	Niveles de expresión relativa del gen <i>ACO</i> (Acc oxidasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con <i>P. expansum</i> (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación.....	86
4.22	Interacción entre el nivel de inóculo de cuatro cepas de levaduras y la severidad de <i>P. expansum</i> a 30 d de almacenamiento a $4 \pm 2$ °C.....	91

4.23	Comportamiento de cepas de levaduras inoculadas en heridas de manzanas incubadas a $25 \pm 2$ °C por siete días.....	93
4.24	Comportamiento de cepas de levaduras inoculadas en heridas de manzanas incubadas a $4 \pm 2$ °C por 45 d.....	93
4.25	Ausencia de producción de sustancias antimicrobianas de tres ABC a <i>P. expansum</i> en medio APD.....	98
4.26	Tubo germinativo de <i>P. expansum</i> desarrollado en medio NYDB 40% a 24 h de incubación.....	99
4.27	Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con bandas de amplificación (D1/D2 del gen 26S) de las cepas de levaduras identificadas como ABC.....	103



## INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de pérdidas en poscosecha de la manzana es la presencia de hongos que causan podredumbres durante su almacenamiento (Narayanasamy, 2006). De éstos, se atribuye 80% a *Penicillium expansum* que ha desarrollado resistencia a algunos fungicidas de síntesis química utilizados para su control (Baraldi *et al.* (2003). Además, el uso de estos productos propicia problemas de contaminación ambiental (Leverentz *et al.*, 2003). Por esta razón las agencias regulatorias han establecido ciertas restricciones para su uso (Palou *et al.*, 2009).

Es por ello que en los últimos años se han realizado múltiples investigaciones en la búsqueda de métodos alternos de control al uso de los productos químicos. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos no son de amplio espectro; es decir, no resultan igualmente efectivos en diferentes frutos y frente a diversos patógenos (Janisiewicz *et al.*, 2008b).

La obtención de variedades de plantas resistentes a enfermedades siempre ha sido un pilar importante en los programas de mejoramiento genético de la manzana (Janick *et al.*, 1996), sin embargo, poca atención se ha puesto en la resistencia de los frutos a los patógenos de poscosecha (Sansavini *et al.*, 2004). Aunque no fuese posible la obtención de variedades resistentes, un incremento en la tolerancia de éstas a los patógenos podría mejorar la efectividad de otros tratamientos alternativos (Janisiewicz *et al.*, 2008a).

Existen pocos estudios que evalúan la tolerancia a enfermedades en los frutos, éstos incluyen trabajos realizados en durazno (Gradziel, 1994), arándano (Smith *et al.*, 1996), nuez pecanera (Vázquez *et al.*, 2001) y manzana (Spotts *et al.*, 1999).

Se piensa que los rasgos heredados como la composición química, firmeza de la fruta, grosor de la epidermis, patrón de maduración, entre otros, pueden afectar la habilidad de los diferentes cultivares para detener el ataque del patógeno (Johnston *et al.*, 2009). Sin embargo, estas características pueden verse modificadas por el medio ambiente o por el estado de madurez del fruto (Anttonen *et al.*, 2006).

Por otro lado, el control biológico es una opción viable que se fundamenta en el poder antagonico que algunos microorganismos presentan sobre los patógenos (Teixidó *et al.*, 2011).

A nivel mundial se han realizado diversos estudios relacionados con el control biológico de enfermedades en poscosecha y se han encontrado géneros como *Aureobasidium*, *Bacillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Pantoea*, *Pichia*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula* y *Trichoderma* que han mostrado antagonismo sobre patógenos en diversas frutas, principalmente manzanas y cítricos (Liu *et al.*, 2013). En México se han aislado y evaluado distintas levaduras aplicadas individualmente o en combinación con otros tratamientos en manzana contra *P. expansum* Link (Castañeda, 2005; Sánchez *et al.*, 2008; Soto y Martínez, 2009).

A pesar de los numerosos estudios sobre estrategias de control alternativas a los fungicidas de síntesis que se han realizado en frutos, poco se conoce sobre las respuestas que dichos frutos pudieran ser capaces de manifestar frente a los patógenos de poscosecha. Por lo tanto, es importante considerar el papel activo que tiene el fruto, ya que puede presentar mecanismos de defensa genéticamente programados que reconocen y/o rechazan microorganismos o sus productos.

En paralelo con lo anterior, es importante comprender el modo de acción de los antagonistas para mantener/mejorar su efectividad a través del desarrollo de formulaciones que permitan la expresión de sus características útiles, así como para poder implementar estrategias para la búsqueda de nuevos antagonistas potenciales (Castoria *et al.*, 2001b). Los principales modos de acción reportados en la bibliografía incluyen la producción de sustancias antimicrobianas, interacción directa, competencia por espacio y/o nutrientes, inducción de resistencia, efectos en el pH y tolerancia al estrés oxidativo (Teixidó *et al.*, 2011).

Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron: i) caracterizar la resistencia de diferentes genotipos de manzana producidos en la Sierra de Querétaro a *P. expansum* y algunos de los mecanismos que pudieran estar involucrados en ésta y; ii) estudiar la efectividad y modos de acción de agentes de biocontrol autóctonos contra el principal patógeno de manzana en poscosecha.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. El manzano

#### 2.1.1. Origen y antecedentes

Se cree que el centro de origen del manzano es el Suroeste de Asia, al sur de las montañas del Cáucaso entre el mar Caspio (Jones y Aldwinckle, 2002). El manzano fue introducido en España por los pueblos del norte de África y durante el proceso de romanización de la península ibérica (Infoagro, 2002). En el siglo XVII el manzano fue traído por primera vez a América desde Europa por colonizadores, siendo los españoles quienes se encargaron de difundirlo en México (Ramírez y Cepeda, 1993 ).

#### 2.1.2. Importancia

El manzano es una de las especies frutales de mayor difusión a escala mundial, cultivándose principalmente en China, Estados Unidos (EE.UU.), Italia y Turquía. México aporta cerca de 1% de la producción mundial con 630 533 ton en 2011 mientras España que tuvo una producción de 670 264 ton en el mismo año (FAO, 2011).

A nivel nacional, el estado de Chihuahua se ubica en el primer lugar (Tabla 2.1) con una producción de 684,669.91 ton en 2013, seguido de Durango, Coahuila y Puebla (SIAP, 2014).

En el estado de Querétaro existen algunas zonas que presentan microclimas apropiados para el cultivo del manzano, principalmente las partes serranas. Éstas, se encuentran generalmente en laderas con pendientes importantes en alturas superiores a 2,000 m.s.n.m., temperaturas medias anuales de alrededor de 15 °C y precipitaciones que varían entre 500 a 1,500 mm (Martínez y Pérez, 1997). Querétaro cuenta con 605 ha establecidas con una producción en 2013 de 1,066 toneladas (SIAP, 2014). Los principales cultivares establecidos son ‘Golden Delicious’ y ‘Red Delicious’, además de un gran número de criollos, variedades e híbridos de reciente introducción, los cuales se ha evaluado durante los últimos años (Mendoza *et al.*, 2008).

Tabla 2.1. Principales estados productores de manzana en México en 2013

Estado	Superficie plantada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor Producción (Miles de Pesos)
1.Chihuahua	28,410.30	26,882.10	684,669.91	25.47	3,238,484.36
2.Durango	10,101.50	9,763.00	65,596.96	6.72	397,778.68
3.Coahuila	7,028.00	7,018.00	39,969.64	5.70	276,383.13
4.Puebla	8,897.61	8,571.98	35,857.30	4.18	141,554.35
12.Querétaro	605.00	575.50	1,065.60	1.85	4,608.62

Fuente: SIAP, 2014

### 2.1.3. Taxonomía

El manzano pertenece a la familia *Rosaceae* y al género *Malus* (Tabla 2.2). La especie cultivada (*Malus domestica* Borkh), es considerada un híbrido de diversas especies, predominando *M. sieversii* así como *M. orientalis* Uglitzk (Cáucaso), *M. sylvestris* (Europa), *M. baccata* (Silberia) y *M. prunifolia* (China) (Sánchez, 2001).

Tabla 2.2. Taxonomía del manzano

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

(Fuente: Ramírez y Cepeda, 1993)

Actualmente se conocen múltiples cultivares de manzano, lo cual refleja una gran variabilidad genética al interior de la especie. Sin embargo, éstos resultan en su generalidad derivados de ‘Golden Delicious’ y ‘Red Delicious’. Esta última ha servido como fuente para la selección de algunos mutantes que dominan el mercado de las manzanas rojas como ‘Red Ace’, ‘Starking’, ‘Starkrimson’, entre otras. ‘Golden Delicious’, por su parte ha sido utilizada para la selección de semilla de ‘Gala’, ‘Mutsu’ y ‘Jonagold’ y por mutación de ‘Agua Nueva II’, ‘Fuji’ y ‘Empire’ (Parra, 1999).

En México, más de 50% de la producción de manzana proviene de ‘Golden Delicious’ y sus mutantes; 40% de los cultivares ‘Delicious’ como ‘Red Delicious’, ‘Starking’, ‘Red Ace’, ‘Red Chief’, ‘Oregon Spur’ y ‘Well Spur’ y el 10% restante de cultivares, como ‘Rome Beauty’, ‘Gala’, ‘Arkansas Black’ y materiales criollos (Parra, 1999).

#### **2.1.4. Maduración y cosecha del fruto de manzana**

##### *a) Maduración*

Durante la maduración la tasa respiratoria del fruto declina y continúa estable hasta el climaterio donde se eleva (Salunkhe y Desai, 1986). La maduración representa una serie de cambios químicos y físicos que llevan al fruto a adquirir características deseables para ser consumido. En esta etapa los almidones se transforman en azúcares simples, se sintetizan ésteres y aldehídos que proporcionan aromas, así como colorantes y pigmentos sobre una base de color primaria verde o amarilla que presenta el fruto, la cual se determina por la clorofila o la xantofila (Calderón, 1987).

En el caso de las manzanas rojas el color se determina principalmente por las cantidades relativas de pigmentos en la epidermis (antocianinas, clorofilas y carotenoides). Para las manzanas amarillas el cambio de color de verde a amarillo se asocia a una disminución en la concentración de clorofila y un ligero incremento en carotenoides.

## *b) Cosecha*

El momento de cosecha se determina de acuerdo con el destino de la fruta ya que no es lo mismo si será destinada a un consumo inmediato o no. Hoy en día las frutas son almacenadas o transportadas a lugares lejanos, por lo que estos factores deben ser previstos. El punto de corte de la manzana se basa en diversos índices entre los que destaca el contenido de azúcares, la acidez, el color, la firmeza y la cavidad peduncular. Los frutos cosechados se seleccionan, se lavan, enceran y se clasifican con base en su forma, tamaño y color (Recasens y Schotsmans, 2013).

Al momento de la cosecha de la manzana se toman en cuenta la madurez fisiológica o de cosecha que es el estado de desarrollo del fruto que asegura que el proceso de maduración continuará una vez desprendido del árbol y obtendrá las óptimas condiciones de consumo y la madurez comercial o de consumo donde el fruto presenta las condiciones adecuadas para ser consumido (Childers *et al.*, 1995).

Durante la cosecha se deben tener los cuidados necesarios para que el fruto no sufra daños por magulladuras, rasguños, cortes y/o golpes, ya que éstos debilitan la pared celular, provocan pérdida de firmeza, se incrementa la actividad metabólica acelerando el envejecimiento del fruto y se hace más vulnerable al ataque por patógenos (Trincherro *et al.*, 1999).

### **2.1.5. Fisiología de poscosecha del fruto**

Una vez cosechados, los frutos del manzano continúan su metabolismo, para lo cual requieren energía. En la respiración se da una degradación de compuestos, principalmente azúcares y ácidos orgánicos a moléculas más simples como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La velocidad de respiración es un buen indicador de la actividad metabólica del tejido, por lo que da una idea de la vida de anaquel de los frutos (Wills *et al.*, 1988). En el caso de las frutas climatéricas, como la manzana, se presenta un aumento en la respiración, seguido por una declinación gradual de la misma; el climaterio es inducido por el etileno. Caso contrario ocurre con las frutas no climatéricas donde la respiración disminuye hasta llegar a la senescencia del fruto (Weichmann, 1987).

### 2.1.6. Manejo en poscosecha

- a) **Selección:** Al llegar los frutos de la huerta deben seleccionarse, separando los frutos magullados, podridos, heridos, deformes, afectados por roña o moteado, los cuales se destinan para la elaboración de sidras, jugos, etc.
  
- b) **Limpieza:** Las manzanas se lavan con agua, se cepillan y se enjuagan para posteriormente aplicar ceras con la finalidad de mejorar su presentación y calidad. En este paso es posible la aplicación de fungicidas que sirven para proteger al fruto contra las enfermedades durante la conservación (Thompson *et al.*, 2007).
  
- c) **Clasificación:** Los frutos se clasifican por tamaño, forma y color. En cuanto al tamaño las manzanas se clasifican normalmente por su diámetro logrando así una uniformidad en el empaque. Usualmente el fruto de mayor tamaño es considerado de primera calidad. En cuanto al color, conforme el fruto madura éste cambia y se relaciona puede relacionar con alteraciones en la composición, el aroma, firmeza, susceptibilidad a enfermedades y respiración (Montero y Gordas, 2002).
  
- d) **Empaque:** Los contenedores facilitan el transporte de los frutos de la planta hasta los puntos de venta (Thompson *et al.*, 2007). Las cajas deben tener un medio de ventilación para evitar fermentaciones y pudrición de los frutos. Los contenedores más convencionales incluyen cajas de madera o plástico, bandejas de pulpa de papel o cartones corrugados de fibra de madera (FAO, 2008).
  
- e) **Almacenamiento:** Tiene como objetivo controlar la velocidad de respiración y transpiración de frutas y hortalizas sin causar daño por frío, disminuir el crecimiento de microorganismos, preservar al producto en una forma aceptable para el consumidor, así como extender la disponibilidad de éste en el mercado (vida útil), de tal manera que permita contarse en el mercado con manzana en una época en la cual no se produce en el campo (Salunkhe *et al.*, 1991).

Entre los principales factores que se consideran para un óptimo almacenamiento de los frutos se encuentran: la temperatura que en el caso de las manzanas es de -1 a 3 °C, en función de la variedad (Westwood, 1993); la humedad relativa para el almacenamiento de las manzanas oscila entre 85 y 98% con la finalidad de conservar la turgencia y evitar el envejecimiento prematuro del fruto. Humedades altas también favorecen el desarrollo de mohos. Otro factor es la composición atmosférica, es importante mantener una fuente de ventilación para evitar una saturación por etileno producido por la propia fruta que podría acelerar a su vez la maduración. La composición atmosférica puede ser controlada mediante la adición de gases o por la remoción física o química de éstos. Ahora bien, es importante evitar la exposición prolongada de los frutos a la luz ya que esto puede acelerar también el proceso de senescencia (Hall y Salas, 1968).

#### *2.1.6.1. Tipos de almacenamiento de manzana*

Cámara frigorífica: Como ya se mencionó, las condiciones óptimas para la conservación de la manzana en cámaras son de -1 a 3 °C y 85 a 90% de humedad relativa. El frío es producido artificialmente por instalaciones automáticas que trabajan con gas cloruro de metilo, freón o amoníaco. La temperatura y la humedad relativa se controlan mediante termómetros e higrómetros colocados en la paredes de la cámara (Álvarez, 1996).

Atmósferas controladas: Este sistema permite conservar las manzanas durante más tiempo y en mejores condiciones en comparación con las que se almacenan en cámaras convencionales. Éste se basa en el uso de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) y la disminución del oxígeno (O<sub>2</sub>). Las concentraciones que se utilizan de este gas deben cambiar en función de la variedad a conservar, sin embargo, una vez que la fruta es almacenada en este tipo de cámaras no se debe abrir sino hasta la salida para su venta (Álvarez, 1996).



Almacenamiento hipobárico: Consiste en reducir la presión atmosférica a una humedad y temperatura determinadas. Sin embargo su uso no está muy extendido debido a que se necesitan equipos muy costosos (Salunkhe *et al.*, 1991).

Cámaras de maduración acelerada: La manzana se cosecha anticipadamente y se almacena en cámaras con una atmosfera acondicionada para la maduración de la fruta. Se utiliza etileno con nitrógeno en proporción de 5 y 95% respectivamente. La temperatura en estos casos se encuentra entre 22 y 25 °C (Álvarez, 1996).

Congelación: Los frutos se someten a temperaturas por debajo de 0 °C con la finalidad de conservarlos durante meses. Con esta práctica se minimizan los daños causados por microorganismos, no obstante; se pueden formar cristales de hielo en el interior de los tejidos del fruto, lo que puede provocar que éste pierda rigidez (Gambhir *et al.*, 2005).

#### 2.1.6.2. *Daños durante el almacenamiento*

Durante su conservación, los frutos de manzana se ven expuestos a diversas alteraciones, algunas de las cuales son el resultado del medio ambiente, o bien de procesos naturales de senescencia, lesiones químicas, daños mecánicos o físicos, agrietamiento, desordenes fisiológicos, así como al ataque de microorganismos causantes de pudriciones, fundamentalmente hongos (Van Zeebroeck *et al.*, 2007). Dentro de estos últimos, las principales enfermedades en la manzana durante su almacenamiento se atribuyen a los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Monilinia* y *Penicillium* (Edney, 1983).

## 2.2. **Enfermedades de la manzana en poscosecha**

### a) *Pudrición de corazón mohoso*

Esta enfermedad es causada por los géneros *Alternaria* spp.; *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. y las variedades rojas son generalmente las más susceptibles, observándose con menor frecuencia en las del grupo de las galas. Existen dos tipos de

síntomas que se manifiestan a causa de esta enfermedad: corazón mohoso seco (CMS) y corazón mohoso húmedo (CMH). El CMS se observa como una pudrición seca que afecta a las semillas, los carpelos y la pulpa que se encuentra alrededor de éstos. El signo más común es la aparición de micelio gris oscuro sobre las semillas y cubriendo los carpelos. El CMH, en contraste, provoca una pudrición blanda y acuosa de color marrón claro. A diferencia del CMS, después de necrosar los carpelos ésta pudrición avanza hacia la pulpa con un crecimiento rápido que termina por afectar al fruto completo. Pueden aparecer zonas huecas asociando este síntoma a la presencia de *Penicillium* spp. El inóculo se encuentra comúnmente en el campo, infectando desde la floración. El hongo avanza desde los restos florales al interior del tubo calicinal hasta los carpelos, afectando a las semillas y posteriormente a la pulpa de la manzana. Aún no existe un manejo eficiente que disminuya la presencia del corazón mohoso. El portainjerto parece influir en la severidad de la enfermedad (Viñas *et al.*, 2013).

#### b) *Moho gris*

El agente causal de esta enfermedad es *Botrytis cinerea*. Se presenta una pudrición color marrón y textura firme. Sobre ésta pueden observarse estructuras de esporulación color gris que surgen de las lenticelas. No es posible separar el tejido afectado del sano. Los frutos se contagian por contacto y en ocasiones se observa la producción de micelio blanquecino. Cuando el síntoma se desarrolla a partir de la zona calicinal se denomina pudrición calicinal. Todas las variedades son susceptibles a esta enfermedad. El patógeno posee una elevada capacidad saprofítica que sobrevive en cualquier suelo o sobre restos orgánicos. Los conidios son dispersados por viento o salpicado de agua. El hongo puede penetrar a los frutos a través de heridas producidas durante la cosecha y empaquetado, o bien puede invadir pedúnculos y avanzar necrosando esta zona. Para el manejo de esta enfermedad deben controlarse las malezas en el campo y favorecer la circulación del aire y el rápido secado de la fruta. Si existen condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad resulta conveniente realizar aplicaciones de fungicidas en precosecha. Durante el proceso de cosecha y poscosecha deben evitarse golpes y la producción de heridas en los frutos, separar áreas limpias de sucias, no cosechar en días de alta humedad o lluviosos, bajar la temperatura de la fruta

cosechada lo más rápido posible. Si la fruta se va a conservar más tiempo se puede recurrir a la aplicación de algún producto autorizado (Viñas *et al.*, 2013).

c) *Pudrición café*

Enfermedad causada por el hongo *Monilinia fructicola*. En ésta se desarrolla una pequeña mancha circular color café. En condiciones muy húmedas favorables para el patógeno, éste puede propiciar rompimientos en la piel y formar círculos concéntricos alrededor del punto de infección. El hongo requiere de luz Para formar esporas, la cuales son de color gris-café. Asimismo, éste puede ocasionalmente infectar frutos viejos en almacenamiento y penetrar por heridas (Snowdon, 1990).

d) *Podredumbre blanda*

*Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* y *Mucor* spp son los agentes causales de esta enfermedad, a la cual todas las variedades son susceptibles. La pudrición es de color marrón, muy blanda y desarrolla rápidamente descomponiendo internamente al fruto. De la zona afectada se produce un exudado con un olor ácido que contiene enzimas, las cuales sirven para la propagación del hongo a otros frutos. Como en la mayoría de los casos, la infección proviene de campo (principalmente de la tierra) penetrando a los frutos por heridas y posteriormente, ya durante el almacenamiento, se generan infecciones secundarias contagiando a los frutos sanos vecinos. Las esporas y el micelio del hongo pueden sobrevivir adheridas a la madera y en las cámaras frigoríficas si éstas no son correctamente desinfectadas. Para el control de esta enfermedad es necesario mantener en estricta higiene y buenas prácticas, tanto el campo como en las centrales hortofrutícolas, desinfectar las cámaras de almacenamiento, los embalajes e instalaciones, evitar producción de heridas, aplicar fungicidas permitidos en poscosecha, así como lograr un buen control de la calidad del agua que estará en contacto con la fruta (Viñas *et al.*, 2013).

e) *Pudrición azul*

Causada por *Penicillium expansum* Link. La pudrición azul (Figura 2.1) representa el mayor problema durante el almacenamiento de manzanas ya que a ésta se

atribuyen más de 80% de las pérdidas en poscosecha causadas por hongos (Spotts *et al.*, 1999).



Figura 2.1. Moho azul causado por *Penicillium expansum* en 'Golden Delicious'  
(Fuente: Janisiewicz, USDA)

### 2.3. *Penicillium expansum*

#### 2.3.1. Género *Penicillium*

*Penicillium* spp. incluye especies mitospóricas cuyas formas perfectas pertenecen a la familia *Trichocomaceae*, del orden *Eurotiales*, perteneciente al *Phylum Ascomycota*. Estos teleomorfos se engloban en los géneros *Eupeniillium* y *Talaromyces* (Pitt *et al.*, 2000). Éste género ha sido dividido en varios subgéneros como el *Biverticillium* que se relaciona con el teleomorfo *Tallaromyces*. El subgénero *Penicillium* no tiene forma telemórfica, es característico por la ausencia de reproducción sexual, la poca resistencia de las esporas a luz ultravioleta y su habilidad para crecer a bajas temperaturas y poca humedad. Muchas de sus subespecies se utilizan para la obtención de alimentos como quesos siendo el *Penicillium roquefortii* o *Penicillium camembertii* ejemplos de éstos, y en contraste, existen otras especies que son patógenas de frutas como *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

### 2.3.2. Morfología

Dentro del género *Penicillium* se encuentran morfologías muy variadas, no obstante, éstas presentan algunas características en común como micelio vegetativo, septado, estrecho, hialino y, cuando se cultiva en medio, crece en forma algodonosa. Este género además presenta conidióforos en una estructura ramificada semejante a un pincel, éstos se sitúan perpendicularmente al desarrollo del micelio aéreo y terminan en células conidiógenas llamadas fiálides (Webster, 1986). Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado, si hay dos biverticilado y si tiene tres niveles de ramificación se le llama terverticilado.

En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende el extremo apical que posteriormente se estrangula separando a la espora y permitiendo la formación de cadenas (Heath, 1996).

Los filamentos o hifas alcanzan entre 2 y 3  $\mu\text{m}$ , presentan septos con un poro central que no se distingue al microscopio óptico. Las paredes del estípote, las ramas o las méticas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa y pueden tener forma casi cilíndrica con la porción apical en forma de cono, su tamaño máximo es de 15  $\mu\text{m}$  y la parte terminal de 3  $\mu\text{m}$  de largo. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos y su pared es lisa o rugosa dependiendo de la especie (Heath, 1996).

Dos características importantes para la identificación de *P. expansum* son el olor característicos a tierra húmeda o a moho y la formación de conidios en la superficie cuando se observa al microscopio estereoscópico (Janisiewicz, 1999).

### 2.3.3. Patogenicidad

Las esporas pueden llegar a sobrevivir durante largas temporadas en los contenedores de madera, paredes, techos de los frigoríficos, etc. donde el hongo puede crecer y reproducirse (Snowdon, 1990).

*P. expansum* es un hongo 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 (Vilanova, 2014). El hongo penetra en los frutos a través heridas en el epicarpio, magulladuras, daños por insectos, grietas por picaduras de uñas, tejido necrosado o canales de abertura normales del cáliz, así como por sitios de infección por otros hongos, e incluso a través de las lenticelas (Buron, 2014).

Una vez que el patógeno ha penetrado, los frutos atacados manifiestan un olor a humedad y las zonas de lesión consisten de masas blandas. Posteriormente el hongo sigue su desarrollo y produce esporas, las cuales se diseminan fácilmente contaminando a frutos sanos (Janisiewicz, 1999).

## **2.4. Métodos de control de enfermedades de poscosecha**

### **2.4.1. Métodos culturales**

Se pueden implementar diferentes métodos a nivel de planta y en poscosecha con el objeto de reducir enfermedades causadas por hongos. En el caso de la planta se usa la rotación de cultivos o bien, se eliminan las partes que muestran síntomas de enfermedad. En el caso de poscosecha se trata de minimizar las pérdidas con prácticas cuidadosas de manejo de las frutas y/u hortalizas durante la cosecha y almacenamiento, con la finalidad de minimizar la producción de heridas, las cuales constituyen una entrada de microorganismos patógenos. Por otra parte se usa el saneamiento para reducir al máximo a los agentes que causan enfermedad. Éste consiste en la inmersión de los frutos en agua caliente, o bien en soluciones que contengan algún agente desinfectante. Sin embargo, todas estas medidas no resultan eficientes para el control de enfermedades por lo que se recurre al uso de otros métodos de control como fungicidas sintéticos mediante baños o por aspersión (Vero y Mondino , 1999).

### **2.4.2. Control químico**

Para controlar las enfermedades de las plantas en el campo y el invernadero, y a veces en el almacén, se recurre con frecuencia a compuestos químicos de síntesis, que

son tóxicos para los patógenos. Éstos inhiben la germinación, el crecimiento o la reproducción del patógeno, o también pueden ser letales para éste. A estos compuestos se les conoce como “parasitocidas” (fungicidas, bactericidas, nematocidas, virucidas o herbicidas, dependiendo del tipo de patógeno que afecten). La mayoría de los compuestos químicos afectan a un solo tipo de patógeno, aunque también existen aquellos de amplio espectro que tienen efecto sobre un mayor número de éstos. Los fungicidas y los bactericidas se aplican en la superficie de las plantas como una medida preventiva de la infección que los patógenos pueden ocasionar. Éstos impiden la germinación de esporas o las destruyen una vez que hayan germinado. También se han fabricado fungicidas sistémicos que penetran a través del tejido vegetal y que tienen un efecto directo sobre los patógenos que ya han invadido las hojas, frutos o tallos de la planta (efecto curativo). Estos productos actúan erradicando al hongo o pueden inhibir la esporulación sin destruir al hongo. Algunos fungicidas sistémicos, los inhibidores del esterol, triadimefón, fenarimol y metalaxyl, son eficaces al aplicarse después de las infecciones, y pueden utilizarse como tratamientos de rescate de los cultivos (Agrios, 2006).

Los productos que se han desarrollado específicamente para ser usados en poscosecha se elaboran como soluciones diluidas en las que se sumergen los frutos y hortalizas, previo a su almacenamiento. También existen fungicidas que se utilizan como soluciones para limpiarlos o hidrogenarlos inmediatamente después de la cosecha (Valverde y Pérez, 2001).

Entre los compuestos que se utilizan para el control de las enfermedades en poscosecha se encuentran el bórax, bifenilo, orto-fenilfenato de sodio, benomil, tiabendazol, elmazalil, etc. Algunos de ellos como el azufre elemental, dióxido de azufre, diclorán, captán y ácido benzoico, se han utilizado ampliamente en el control de las pudriciones de los frutos como plátanos, uvas, fresas, melones, papas, etc., durante su almacenamiento (Agrios, 2006).

Sin embargo, el uso de fungicidas para controlar las pudriciones cada vez es menos aceptado debido a la limitación de ingredientes activos autorizados, a la toxicidad de los productos y la posible aparición de cepas del hongo resistentes a estos productos (Francés *et al.*, 2006); aun así, existen ciertos productos permitidos por las normas

internacionales, como fecunda® (imazalil) (Ghosoph *et al.*, 2007). Otros productos utilizados frecuentemente en poscosecha incluyen el benomil y el triadimefon, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir el crecimiento del patógeno (Montero y Cerdas, 2005); no obstante, algunos países han restringido su uso debido a la toxicidad que presentan. Esta situación obliga a la investigación y desarrollo de métodos alternativos de control y/o complementarios al control químico (Wilson *et al.*, 1994).

### **2.4.3. Resistencia genética**

La mejora genética ha producido un gran número de variedades e híbridos de una gran variedad de especies de plantas que han contribuido a incrementar el rendimiento, la calidad, la estabilidad y el mejoramiento del campo (Vallejo, 2002).

En el caso concreto de la resistencia genética de las plantas a las enfermedades, es importante señalar que muchas enfermedades que tuvieron importancia económica fueron controladas por medio de variedades resistentes: ejemplos de ello son la roya en el trigo, el mal de Panamá en el banano y el mosaico de la caña de azúcar. Entre los casos más sobresalientes de plantas resistentes a enfermedades podemos destacar los de resistencias a virus en tabaco, patata, tomate, pimiento, calabacín, soja, papaya, alfalfa y albaricoquero (Hansen y Wright, 1999). En otros casos como el tizón tardío de la papa, la quema por *Pyricularia* del arroz y la gomosis de los cítricos, la enfermedad no se controló totalmente, pero se redujeron los daños producidos por el hongo. Sin embargo, en ningún cultivo se ha logrado obtener resistencia a todas las enfermedades de importancia (González y González, 1985).

En el caso de organismos genéticamente modificados, la mayoría de los genes resistentes a hongos, virus, bacterias y nemátodos se han derivado del tomate. La resistencia ha sido efectiva para al menos 24 enfermedades y se han incorporado a variedades comerciales obteniendo avances espectaculares (García and Lozoya, 2004).

En el caso de la resistencia a enfermedades de frutos, Vázquez *et al.* (2001) determinaron la sensibilidad de la almendra de diversos genotipos de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) al ataque por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* toxigénicos a distintas actividades de agua, observando diferencias significativas en la sensibilidad al interior de



los genotipos, la cual se encuentra correlacionada con la concentración de taninos en la almendra.

Por lo que respecta en concreto a la tolerancia de la manzana enfermedades desarrolladas durante el cultivo, Ramírez *et al.* (2007) evaluaron la susceptibilidad a la roña (*Venturia inaequalis*) de tres variedades de manzano en hojas y frutos, observando que 'Golden Delicious' mostró más susceptibilidad seguida de 'Red Delicious' y 'Rayada'.

Diferencias en la susceptibilidad de frutos de manzana a enfermedades en poscosecha se reportaron también en un estudio realizado por Spotts *et al.* (1999) durante varios años en donde la variedad 'Royal Gala' mostró menor susceptibilidad a *P. expansum*, *M. piriformis* y *B. cinerea*, mientras 'Fuji' y 'Oregon Spur II' fueron resistentes a *Pezizula malicorticis*. Janisiewicz *et al.* (2008a) encontraron dos accesiones inmunes (GMAL3610.i y GMAL 3682.c) y cuatro resistentes (GMAL 3684.c, GMAL3689.e, GMAL 4286.g, y GMAL 3614.c) a *P. expansum* en una banco de germoplasma de manzana.

En investigaciones realizadas en México, se demostró que la variedad de manzana 'Red Delicious' resultó consistentemente más resistente al ataque de *P. expansum* en poscosecha que 'Golden Delicious' (Soto y Martínez, 2009).

Ahmadi-Afzadi *et al.* (2013) evaluaron la susceptibilidad de 127 variedades de manzana a *P. expansum* y *C. gloeosporioides*, encontrando diferencias en su respuesta y una correlación de entre el desarrollo de los patógenos con la fecha de cosecha y la firmeza de los frutos.

#### **2.4.4. Control biológico**

En 1988, Nigam y Mukerji definieron al control biológico como “la reducción en la concentración de microorganismos patógenos o de la actividad productora de enfermedad del patógeno, debido a uno o más organismos”. En la actualidad, se sabe que la enfermedad en un huésped no se debe solo a un organismo sino que es un proceso. En este proceso intervienen diferentes factores como el patógeno, el huésped y el ambiente. Por esta razón Droby *et al.* (2009) mencionan que además del uso de algún organismo se encuentra involucrado el uso de un proceso biológico o el producto de un proceso biológico.

Entre las ventajas de los métodos de control biológico para combatir patógenos en comparación con los productos químicos se encuentran que pueden resultar menos dañinos, más persistentes en el fruto, no alteran el metabolismo de las especies patógenas; y pueden ser compatibles con otros sistemas de control. No obstante, el uso del control biológico implica un reto importante ya que al aplicarlo en condiciones controladas se puede perder el equilibrio en la interacción huésped-patógeno favoreciendo al antagonista (Liu *et al.*, 2013).

En los últimos años el control biológico ha sido objeto de múltiples estudios, ya que ha demostrado ser efectivo en el combate de enfermedades de poscosecha, siendo la superficie del fruto el mejor lugar para aislamiento de microorganismos antagonistas, los cuales tienen la capacidad de frenar el desarrollo de la enfermedad en el fruto (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Como se mencionó anteriormente, una gran ventaja del control biológico es que puede combinarse con otros tratamientos, como la aplicación de baños con agua caliente, rayos ultravioleta (Chalutz *et al.*, 1992), productos naturales (Aharoni y Copel, 1993), infiltraciones de calcio (Janisiewicz *et al.*, 1998), bicarbonato de sodio (Soto y Martínez, 2009) o etanol (Spadaro *et al.*, 2002). La combinación de ABC (agentes de biocontrol) con otros métodos alternativos de control puede ser un enfoque prometedor para superar algunos inconvenientes y así mejorar su actividad y eficacia (Droby *et al.* 2009; Liu *et al.* 2013).

Las frutas y hortalizas que se almacenan en cámaras frigoríficas representan una buena oportunidad para la evaluación del control biológico debido a que se encuentran bajo condiciones controladas como humedad relativa, temperatura y concentración de gases (Usall *et al.*, 2001). Por esta razón es importante evaluar la capacidad de los microorganismos patógenos para desarrollar e inhibir a los patógenos en condiciones de almacenamiento que se emplean en la industria.

#### 2.4.4.1. *Tipos de microorganismos antagonistas y características deseables*

Los microorganismos antagonistas pueden ser bacterias, levaduras y hongos, éstos pueden ser capaces de ejercer un control biológico sobre diversos patógenos de

interés como hongos y se han empleado para el control de enfermedades en frutas y hortalizas (DeCosta y Erabadupitiya, 2005).

Las levaduras resultan microorganismos con un gran potencial para actuar como antagonistas, ya que son capaces de crecer a bajas temperaturas y por tiempos prolongados (Usall *et al.*, 2001).

Entre las principales características deseables de un microorganismo antagonista, tenemos las siguientes (Barkai-Golan, 2001): a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos y persistir en ellas, b) mayor habilidad que el patógeno para obtener los nutrientes y c) capacidad de sobrevivencia a diferentes condiciones ambientales.

Además de estos aspectos, un microorganismo antagonista debe tener estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, que no sea exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivencia a las condiciones del medio ambiente, efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de frutos y hortalizas, que se mantenga en una formulación durante un largo periodo de vida, facilidad de aplicación sin producir metabolitos secundarios tóxicos para el hombre, resistente a fungicidas y compatible con los procedimientos comerciales y no patogénico sobre el hospedero (Spadaro y Gullino, 2004).

#### 2.4.4.2. *Levaduras como agentes de biocontrol (ABC)*

Las levaduras se presentan predominantemente en estado unicelular y se pueden aislar de la superficie de plantas de donde obtienen nutrientes de manera natural sin dañar al huésped o se mantienen en zonas dañadas o seniles de las plantas. También abundan en frutos y flores; sin embargo, la superficie de las hojas es el hábitat más común (Carlile y Watkinson, 1994).

Estos microorganismos, tienen la capacidad de crecer en condiciones aerobias y anaerobias cuando se suministra una fuente de carbono metabolizable, nitrógeno, minerales y vitaminas. La mayoría de las especies pueden crecer en medios sintéticos simples. Para un crecimiento óptimo de las levaduras se necesita un pH de entre 4.5 y 6.5 y temperaturas desde -2 °C hasta 49 °C, con una óptima de 25 °C para algunas especies (Kirsop y Kurtzman, 1988).

Las levaduras son más utilizadas que las bacterias para el control de las enfermedades de poscosecha y, en menor grado, los hongos. Las levaduras han mostrado efecto antifúngico sobre diferentes patógenos de poscosecha, aunque los mecanismos de acción que éstos ejercen no han sido del todo clarificados (Teixidó *et al.*, 2011a).

#### 2.4.4.3. Algunos estudios realizados sobre control biológico en poscosecha

En tomates, el contacto entre microorganismos antagonistas y frutas infestadas ha sido muy útil para la represión de agentes patógenos como *B. cinerea*, *R. stolonifer* y *A. alternata* (Chalutz *et al.*, 1988).

Wilson y Chalutz (1989) evaluaron el efecto de más de 100 microorganismos antagonistas (bacterias y levaduras) contra *P. digitatum* y *P. italicum*, agentes causales de la pudrición de los cítricos y se encontró que las levaduras *Debaromyces hansenii* (Zopf) Lodder y Kreger-Van Rij y *Aureobasidium pullulans* de Bary y las bacterias *Pseudomonas cepacia* Van Hall y *P. syringae* Van Hall resultaron más efectivas. *P. cepacia* resultó ser la mejor mediante producción de antibióticos.

Roberts (1990) obtuvo resultados muy prometedores con cuatro cepas del género *Cryptococcus*, recuperadas de hojas, frutos de manzanas y peras que conservan su capacidad antagónica en atmósferas controladas. Además, dos cepas del género *Candida* presentaron cierta capacidad inhibitoria sobre *B. cinerea* pero casi nula sobre *P. expansum* (McLaughlin *et al.*, 1990).

Las levaduras *Rhodotorula glutinis* (Fres) Harrison (aislado LS-11) y *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner (aislamiento LS-28), mostraron diferentes niveles de actividad antagonista contra diversos patógenos en poscosecha; su posible mecanismo de acción, al parecer se relaciona con la competencia por nutrientes (Castoria *et al.*, 2003).

Asimismo, se han realizado diversos estudios con cepas de antagonistas en combinación con diferentes tratamientos físicos o químicos. Recientemente Casals *et al.* (2010) encontraron que la combinación de un tratamiento con agua caliente (60 °C, 40 s) y el antagonista *Bacillus subtilis* CPA-8 ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>), redujo significativamente la pudrición café causada por *Monilinia* spp. en duraznos.

Osman *et al.* (2011) evaluaron una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* en frutos de papaya en poscosecha pretratadas con 1-metil-ciclopropano (1-MCP) y observaron que este ABC solo o en combinación con 1-MCP redujo la incidencia y severidad de la enfermedad (10°C, 85% HR, 14 d, y después maduración a 25 °C); además, se mantuvieron las características de calidad del fruto (color, firmeza, etc.).

Entre los múltiples trabajos realizados por Usall *et al.*, en 2000 evaluaron la levadura *Candida sake* contra *P. expansum* en manzanas y observaron que la levadura colonizó rápidamente la superficie del fruto inhibiendo al hongo.

En México se han aislado, seleccionado e identificado levaduras antagonicas contra hongos en manzanas y se ha evaluado su efectividad biológica actuando por sí solas (Sánchez *et al.*, 2008) o en combinación con bicarbonato de sodio a 2% en distintos cultivares de manzana observándose que potencializa el efecto antagonico de los ABC ante *P. expansum* (Soto y Martínez, 2009).

Recientemente, Teixidó *et al.* (2011a) han descrito una lista de ABC evaluados para el control de enfermedades de poscosecha de naranja y manzana, entre los que se incluyen: *Candida oleophila*, *Pichia anomala* (Lahlali *et al.*, 2004), *Bacillus subtilis* (Leelasuphakul *et al.*, 2008), *Wickerhamomyces anomalus* (Platania *et al.*, 2012) y *Cystofilobasidium infirmominiatum* (Vero *et al.*, 2013) para el control de *P. digitatum* en naranja; y *Candida sake* (Viñas *et al.*, 1998), *Pantoea ananatis* (Torres *et al.*, 2005), *Cryptococcus laurentii* (Li y Tian, 2006), *Metschnikowia fructicola* (Spadaro *et al.*, 2013), y más recientemente, *Pichia caribbica* (Cao *et al.*, 2013) como efectivos antagonistas de *P. expansum* en manzanas.

A pesar del gran número de investigaciones que se han estado durante muchos años a la fecha en este ámbito, pocos son los microorganismos que han desembocado en un producto disponible en el mercado para su aplicación en poscosecha. Entre estos productos se encuentran: Biosave (*Pseudomonas syringae*) (Janisiewicz y Jeffers, 1997) desarrollado en EE.UU. y registrado por Jet Harvest Solutions (utilizado en la agricultura orgánica) BoniProtect (*Aureobasidium pullulans*) desarrollado en Alemania y registrado por bio-ferm (descrito como fortificante), YieldPlus (*Cryptococcus albidus*) desarrollado en Sudáfrica, registrado por Anchor Biotechnologies y actualmente comercializado por LALLEMAND Plant Care Unit y Nexy (*Candida oleophila*) desarrollado en Bélgica y

recientemente registrado por BioNext. Finalmente, existen dos microorganismos que han sido aislados y desarrollados por el grupo de Patología de Poscosecha (IRTA y Universidad de Lleida): Uno es la levadura *Candida sake* CPA-1, efectiva en el control de enfermedades de pomáceas (Usall *et al.*, 2001; Viñas *et al.*, 1998), y el otro, la bacteria *Pantoea agglomerans* CPA-2, efectiva en pomáceas (Nunes *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2002) y cítricos (Teixidó *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2007). Ambos productos están completamente preparados para ser utilizados pero no se están comercializando. Este reducido número de productos comerciales disponibles es debido en parte a la dificultad y al elevado costo que implica su registro, especialmente en la Unión Europea (U.E.), con una normativa muy restrictiva para este tipo de productos, en clara contraposición con otros países como los EE.UU. o Israel, con una normativa que favorece el registro de microorganismos. Y también al hecho de que el mercado de la poscosecha es muy pequeño en relación al mercado de los agentes de biocontrol de campo y hasta el momento, las empresas han tenido poco interés en este sector (Vilanova, 2014).

## **2.5. Mecanismos de resistencia en las interacciones huésped-patógeno**

### **2.5.1. Resistencia de las plantas a los patógenos**

Las plantas constantemente se encuentran interactuando con microorganismos que se encuentran en el ambiente, pero la mayoría de ellos no son capaces de producir infección (Ferreira *et al.*, 2006). Según Agrios (2005), la resistencia es la habilidad de un organismo para excluir o vencer (parcial o completamente) el ataque de algún patógeno o factor de patogenicidad. Las plantas se defienden del ataque de patógenos mediante múltiples mecanismos de defensa (Hutcheson, 1998). Estas defensas pueden ser barreras físicas o estructurales que impiden la entrada del patógeno (Moerschbacher y Mendgen, 2000), barreras químicas como compuestos fenólicos, taninos, compuestos derivados de ácidos grasos (Jackson y Taylor, 1996; Osbourn, 1996) y defensas inducidas que inician con un reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos desencadenando señales a nivel celular que regulan la transcripción coordinada de genes ligados a las respuestas de defensa (Nürnberger *et al.*, 2004).

### 2.5.2. Defensas constitutivas o no inducidas

Este tipo de defensas pueden dividirse en a) *Estructurales*, suponen barreras físicas capaces de detener el avance de los patógenos, como la presencia de capas gruesas de cutícula formadas por cutina y ceras, o de tricomas, entre otros; y b) *Químicas*, consisten en la presencia de compuestos tóxicos que se encuentran en su forma activa, tales como alcaloides, fenoles, polifenoles, aceites esenciales, terpenos, etc (Madriz, 2002).

En el caso de frutos se ha observado un comportamiento similar de defensa contra los patógenos. Algunos ejemplos son la mayor concentración de taninos en la nuez pecanera 'Wichita' que la hace más resistente a *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Vázquez *et al.*, 2001), el 5-*n*-pentadecil resorcinol y 5-*n*-heptadecenil resorcinol encontrados en variedades de mango como factores de resistencia a la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Hassan *et al.*, 2007), o bien la presencia de una mayor cantidad de compuestos fenólicos en chiles inmaduros en comparación con frutos maduros (*Capsicum annuum* L.), que los hace menos susceptibles a *C. capsici* y *Alternaria alternata* (Anand *et al.*, 2009).

### 2.5.3. Defensas activadas o inducidas

La forma más común de defensas activadas es la denominada resistencia horizontal o no específica (también conocida como "no-huésped", poligénica o cuantitativa); en ésta, el patógeno es incapaz de producir enfermedad en un huésped debido a que éste es inmune a todas las cepas del mismo, siendo la resistencia controlada por diversos genes (Nürnberg y Lipka, 2005). Este tipo de resistencia se ha clasificado en dos tipos (Mysore y Ryu, 2004). En la *Tipo I* no se presenta necrosis en las células, ya que el patógeno no es capaz de superar los mecanismos de defensa como la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (del inglés PR-proteins), y/o los componentes de la respuesta sistémica adquirida (SAR) que son inducidos por elicitores del patógeno. En la *Tipo II* el patógeno es capaz de superar las respuestas de defensa del huésped probablemente gracias a la producción de

enzimas de detoxificación, dando lugar a una necrosis localizada. Por su parte el huésped reconoce elicitores específicos del patógeno y activa defensas que conducen a la respuesta hipersensible (HR).

Otro tipo de resistencia es la vertical o específica (modelo gen-gen), basada en el reconocimiento genético y/o interacción entre el producto de un gen de avirulencia (*avr*) en el patógeno y un gen de resistencia (R) en la planta o fruto. Cuando ocurre este evento se denomina *interacción incompatible*. Es importante tener en cuenta que el huésped sólo será resistente a los patógenos que sean portadores del gen *avr*. Por el contrario, cuando el patógeno es capaz de causar infección en el huésped se conoce como *interacción compatible* (Tao *et al.*, 2003). La resistencia o susceptibilidad depende del tiempo que tarde el huésped en reconocer al patógeno y la rapidez con la que éste active sus mecanismos de defensa (Nimchuk *et al.*, 2003).

#### 2.5.3.1. Respuesta hipersensible (HR)

La HR tiene lugar durante los primeros minutos de la interacción en el punto de entrada del patógeno y en las células adyacentes. Ésta ocurre como un programa “suicida”, activo y organizado, y no como consecuencia de un colapso celular pasivo producido por el ataque del patógeno o por toxinas derivadas de éste (Gilchrist, 1998). En este proceso celular se activan enzimas del tipo protein-quinasas y fosfatasas, y además hay cambios en la permeabilidad de la membrana y en la concentración de iones intracelulares (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Zhao *et al.*, 2005). Paralelamente ocurre una rápida activación de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés “Reactive oxygen species”) que incluye la producción de sustancias como el superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) responsables de la explosión oxidativa indicadora de que el huésped ha reconocido exitosamente al patógeno. Ésta transcurre en dos fases: la *Fase I* es transitoria e inespecífica, ocurriendo en los primeros minutos de la interacción; mientras que la segunda (*Fase II*) aparece horas después del ataque del patógeno y se encuentra asociada con el establecimiento de las defensas (Grant y Loake, 2000).

Las ROS están asociadas con las respuestas de defensa, desempeñando un papel variado y complejo (Torres, 2010); pueden causar directamente toxicidad a los



patógenos, como por ejemplo el radical  $\text{OH}^-$  que es más reactivo que las demás especies oxidativas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ) (Chen y Schopfer, 1999). Se observó que frutos inmaduros de aguacate fueron capaces de activar la producción de ROS como respuesta a la infección por *C. gloeosporioides*, resultando más resistentes al patógeno, a diferencia de lo ocurrido con frutos maduros (Beno-Moualem y Prusky, 2000).

Las enzimas NADPH oxidasas de la membrana plasmática y las peroxidasas (POXs) de la pared celular son probablemente las principales fuentes bioquímicas de producción de ROS (Torres *et al.*, 2006). La subunidad enzimática gp91<sup>phox</sup> de las NADPH oxidasas es la responsable de transferir electrones al oxígeno molecular para la generación del superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Lambeth, 2004). Mientras tanto, las peroxidasas catalizan la oxidorreducción de diferentes sustratos usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y dependiendo del pH también pueden ser una fuente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de un reductor libre (Bolwell *et al.*, 1998). En manzanas inmaduras 'Golden Delicious' se observó un aumento en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como respuesta a la infección por *P. expansum* (Torres *et al.*, 2003). Por otro lado, Macarisin *et al.* (2007) observaron que la inoculación con *Penicillium digitatum* suprimió la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en frutos cítricos (interacción compatible); mientras que su inoculación con *P. expansum* estimuló 63 veces más la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (interacción no-huésped).

Las ROS también pueden formar barreras físicas en el sitio de infección por entrecruzamiento de glicoproteínas de la pared celular o vía entrecruzamiento oxidativo de precursores durante la biosíntesis de polímeros como lignina y suberina (Torres, 2010). Dichos polímeros también pueden ser directamente tóxicos degradando la pared de hongos y bacterias (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Vilanova *et al.* (2012a) observaron la producción de lignina en manzanas inmaduras infectadas con *P. expansum* (interacción compatible) o *P. digitatum* (interacción no-huésped) un día después de la inoculación, mientras en naranjas inmaduras el incremento de lignina ocurrió después de 48 h con ambos patógenos, decreciendo en frutos maduros (Vilanova *et al.*, 2012b). También manzanas tratadas con compuestos inductores de ROS, como guayacol, mostraron un aumento en la producción de lignina, lo cual redujo la incidencia de *P. expansum* (Valentines *et al.*, 2005).

Debido a que la explosión oxidativa ocurre como un programa activo y organizado, los frutos disponen de varios sistemas de detoxificación de ROS mediante enzimas como las ascorbato peroxidases (APX), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasas (SOD) y catalasas (CAT), que mantienen la homeostasis en diferentes compartimentos de la célula restringiendo el daño provocado por las ROS y/o activando señales de transducción (Mittler *et al.*, 2004). Valentines *et al.* (2005) observaron en manzanas inmaduras infectadas con *P. expansum* un mayor potencial de oxidación, siendo menos susceptibles que frutos maduros, lo cual sugiere que la POX está involucrada en la resistencia al patógeno. También se ha observado que naranjas infectadas con *P. digitatum* reducen los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD y CAT después de 72 h, lo que confirma el papel del patógeno en la desactivación de los mecanismos de producción de ROS de la fruta (Torres *et al.*, 2011).

Es evidente que las ROS también son importantes activadoras de genes de defensa (Levine *et al.*, 1994). Éstas pueden codificar para enzimas que participan en la síntesis de fitoalexinas, metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas que pueden acumularse en respuesta a los patógenos (Paxton, 1981). La mayoría de estos metabolitos procede de la ruta de los fenilpropanoides como flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, estilbenos, dihidrofenantrenos y otros fenoles. En aguacates inmaduros se observó un importante incremento en los niveles de epicatequina después de seis horas de haberse infectado con *C. gloeosporioides* (Beno-Moualem y Prusky, 2000).

Otra fitoalexina, la escaparona, fue encontrada en frutos cítricos inoculados con *P. digitatum* y tratados con agua caliente o radiación UV (Ben-Yehoshua *et al.*, 1992). Se sabe que los niveles de escaparona aumentan como respuesta al estrés, causando un ambiente hostil al patógeno, lo que disminuye la incidencia y severidad de la enfermedad (Ballester *et al.*, 2010). También se observó un incremento de flavonas polimetoxiladas (PMFs), de ácido clorogénico (CGA del inglés "Chlorogenic acid"), didimina y escaparona en naranjas infectadas con *P. digitatum* (Ballester *et al.*, 2013).

El ácido cafeico (CA) y el CGA también han sido propuestos como factores de resistencia en durazno contra la pudrición café causada por *Monilinia fructicola* (Bostock *et al.*, 1999). El CA es capaz de afectar la virulencia de este patógeno a través de la regulación celular redox, incrementando la actividad de la glutatión reductasa que a su

vez puede mantener una alta proporción de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) en la célula (Chiu *et al.*, 2012). Estos compuestos también son capaces de inhibir la expresión de genes de virulencia como el *mfcut1* y el *mfpq1* (que codifican respectivamente para una cutinasa y una poligalacturonasa), además de inhibir la formación de apresorios (Lee y Bostock, 2006).

Asimismo la producción de fitoalexinas se ha asociado a una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI) (Madriz, 2002; Vilanova, 2014). En naranjas se observó que la expresión de los genes *fpal1* y *pox1*, así como las actividades enzimáticas PAL y POX incrementaron tras la infección con *P. digitatum* y un tratamiento posterior con calor como método de control (3 d, 37 °C) (Ballester *et al.*, 2010).

Este mismo comportamiento de los genes *pal1* y *pox1* fue observado en naranjas infectadas con *P. digitatum* y *P. expansum* después de 24 h de incubación; mientras que, a 48 h, la expresión de *pal1*, *pox1*, *comt1* y *sad* incrementó como respuesta a la herida y decreció como respuesta a *P. digitatum*, demostrando que dicho patógeno tiene la habilidad de suprimir la expresión de genes de defensa (Vilanova *et al.*, 2013). Por su parte, Ballester *et al.* (2013) observaron en el flavedo de naranjas un incremento en el nivel de expresión de diez genes relacionados con la ruta de los fenilpropanoides después de 48 h de haber sido infectadas con *P. digitatum*.

#### 2.5.3.2. Respuesta sistémica adquirida (SAR)

Es una respuesta de amplio espectro que protege a la planta o al fruto, incluso en zonas alejadas al sitio de penetración del patógeno, de una segunda infección por el mismo u otro agente patógeno con un efecto prolongado (Hammerschmidt, 1999). La manifestación de SAR implica la existencia de un sistema capaz de transmitir señales a través de los tejidos local y sistémico, involucrando procesos que incluyen las síntesis del ácido salicílico (SA) (Durrant y Dong, 2004), además del ácido jasmónico (JA) y el etileno (Pieterse y Van Loon, 1999).

Zeng *et al.* (2006) observaron un incremento en los niveles de POX, PPO, PAL,  $\beta$  1,3 glucanasa y ROS (concretamente  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ ) en mangos tratados con SA y

posteriormente inoculados con *C. gloeosporioides*, con la consecuente disminución del daño por el hongo. La SAR también está asociada con la acumulación de proteínas PR de bajo peso molecular (Durrant y Dong, 2004), resistentes a las proteasas, que se localizan extracelularmente y son estables a niveles de pH bajos (Van Loon *et al.*, 1994). Estando la pared celular de los hongos compuesta de glucanos, quitinas, ácidos grasos, etc., la fruta puede presentar mecanismos para degradar estos compuestos mediante proteínas como las PR-2 ( $\beta$ -1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas), por lo que una alta expresión de estos genes resulta importante para la defensa contra patógenos que contienen esos sustratos (Madriz, 2002; Buron-Moles, 2014). La expresión de *pdpr5-1* (codifica para taumatina) aumenta durante la maduración del ciruelo (*Prunus domestica*) y se sobreexpresa en cultivares menos susceptibles a *M. fructicola*. Asimismo, las proteínas PR-5 pueden contribuir indirectamente a otros mecanismos de defensa como en las rutas de fenilpropanoides y fitoalexinas (El-kereamy *et al.*, 2011). Ballester *et al.* (2010) observaron un aumento en la actividad de los genes *gns1* y *chi1* que codifican para las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas en frutos de naranja inoculados con *P. digitatum* y tratados por calor (3 d, 37 °C). Casado *et al.* (2006) detectaron un incremento en la expresión de diversos genes que codifican para proteínas-PR, ROS, proteínas ricas en leucinas, glucanasas y quitinasas en fresas infectadas con *C. acutatum* menos susceptibles al patógeno.

Buron-Moles *et al.* (2015) observaron cambios en el proteoma y oxi-proteoma de manzanas infectadas con *P. expansum* y *P. digitatum* como respuesta al estrés causado por estos patógenos en las primeras horas de interacción. Además, se observaron cambios en la expresión de los genes *APX*, *HSP*, *ACO*, *Mal d 1.03E*, *NAC* y *EF-Tu* en función del tratamiento aplicado.

Por otra parte, se ha reportado la inducción de la producción de etileno y la expresión de genes involucrados con su síntesis en interacciones con frutos cítricos y *P. digitatum* (Marcos *et al.*, 2005). De igual forma se observó un incremento en los niveles de etileno en naranjas tratadas con calor e inoculados con *P. digitatum* (González *et al.*, 2010; Ballester *et al.*, 2011). Sin embargo, el papel del etileno en las respuestas de defensa es complejo, dependiendo del tipo de interacción (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

En el caso del JA las respuestas de defensa no se asocian con muerte celular, por lo que representa una alternativa en la aplicación de tratamientos contra hongos necrótrofos (McDowell y Dangl, 2000). Se ha observado que la aplicación de metil jasmonato en guayaba (*Psidium guajava*) resulta efectiva para el control de *C. gloeosporioides* mediante la estimulación de las actividades enzimáticas de la lipooxigenasa (LOX) y PAL (González-Aguilar *et al.*, 2004).

## **2.6. Modos de acción de microorganismos antagonistas**

Los antagonistas pueden controlar a los patógenos en poscosecha por medio de varios mecanismos de acción que incluyen la producción de sustancias antimicrobianas o antibiosis, parasitismo, competencia por espacio y nutrientes, inducción de resistencia y oposición al estrés oxidativo (Teixidó *et al.*, 2011). En general más de un mecanismo puede estar involucrado en el efecto de biocontrol (Janisiewicz y Korsten, 2002). Es importante conocer dichos mecanismos de los antagonistas y tener bases para la selección de nuevos antagonistas potenciales.

### **2.6.1. Competencia por espacio y/o nutrientes**

La competencia por nutrientes se considera como el más importante modo de acción por el que los ABC (agentes de biocontrol) afectan a los patógenos, particularmente las levaduras y bacterias como *Aureobasidium pullulans* (Bencheqroun *et al.*, 2007), *Pantoea agglomerans* (Poppe *et al.*, 2003), *Metschnikowia pulcherrima* (Spadaro *et al.*, 2002), *Candida fumata* (Arras, 1996), *Pichia guilliermondii* (Droby *et al.*, 1992) y *Cryptococcus laurentii* (Roberts, 1990). Los antagonistas se adaptan mejor que los patógenos a las condiciones del medio, mostrando un rápido crecimiento, ya que presentan mayor capacidad para utilizar los nutrientes en bajas concentraciones, de manera que sobreviven y se desarrollan bien en la superficie del fruto o en el lugar de la infección a bajas temperaturas y pH o en condiciones no favorables para el patógeno (Teixidó *et al.*, 2011). Es importante mencionar que los antagonistas inhiben al patógeno, pero no lo destruyen (Droby y Chalutz, 1994).

### **2.6.2. Producción de sustancias antimicrobianas**

La producción de antibióticos puede considerarse como el principal modo por el que las bacterias suprimen a los patógenos de frutos en poscosecha, sin embargo; en muchos trabajos el papel de los antibióticos producidos por estos antagonistas es incierto (Janisiewicz, 1998). Aunque la antibiosis es un efectivo modo de acción para controlar daños en poscosecha, es importante el desarrollo de antagonistas no productores de antibióticos para evitar que los patógenos generen resistencia a éstos (ElGhaouth *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2009).

### **2.6.3. Inducción de resistencia en el huésped**

Los ABC pueden inducir resistencia en el huésped a los patógenos por la presencia de diferentes compuestos que pueden ser tóxicos para estos. La actividad antagónica de *A. pullulans* a *P. expansum* en manzanas fue atribuida al incremento en la concentración de enzimas como glucanasa, peroxidasa y quitinasa (Ippolito *et al.*, 2000; Castoria *et al.*, 2001). El uso de herramientas moleculares permitió la identificación de 50 genes expresados diferencialmente (que codifican para la quitinasa, glucanasa, manitol, dehidrogenasa, quinasa y receptores de etileno) después de la aplicación con *C. laurentii* en tomate ‘Cherry’ mostrando el papel que juegan estas proteínas en el incremento de la resistencia del fruto a la infección por patógenos (Jiang *et al.*, 2009).

La formación de compuestos como la epicatequina por la aplicación de *Colletotrichum magna* en frutos de aguacate (Prusky *et al.*, 1994) y la acumulación de fitoalexinas en cítricos (Rodov *et al.*, 1994) también han sido descritos como otros mecanismos de defensa inducida.

### **2.6.4. Interacción directa con el patógeno**

La adhesión del antagonista a las hifas de los patógenos ha sido descrita por *Enterobacter cloacae* contra *Rhizopus stolonifer* en durazno (Wisniewski *et al.*, 1989) y *P. guilliermondii* contra *P. italicum* en cítricos (Arras *et al.*, 1998). La producción de

enzimas líticas como la glucanasa que degrada la pared celular de los patógenos se ha reportado en *Pichia anomala* (Jijakli y Lepoivre, 1998). Al parecer, debido a esta interacción directa, los microorganismos antagonistas compiten más eficientemente por los nutrientes que los patógenos en el sitio de infección y posteriormente previenen la germinación de esporas y el crecimiento de dichos patógenos (Teixidó *et al.*, 2011).

#### **2.6.5. Efectos en el pH**

Se ha observado que algunos antagonistas producen ácidos, con la consecuente modificación del pH; lo cual puede resultar desfavorable para el crecimiento de los patógenos (Wilson *et al.*, 1991). Se sabe que éstos necesitan diferentes niveles de pH para activar sus factores de virulencia, como en el caso de *P. expansum*, requiere pH entre 4 y 5 para activar el gen *PG* que codifica para la poligalacturonasa responsable de la degradación de los tejidos del fruto, por lo que la capacidad de modificar estos rangos por los antagonistas puede afectar el óptimo desarrollo de los patógenos (Prusky y Lichter, 2008).

#### **2.6.6. Tolerancia al estrés oxidativo**

Las ROS presentes en el fruto pueden resultar tóxicas a los patógenos por lo que la habilidad de tolerar altos niveles de dichas ERO puede atribuirse a otro modo de acción que mejora la eficacia de las levaduras antagónicas contra *B. cinerea* y *P. expansum* (Castoria *et al.*, 2003). Además, se han observado cambios en las actividades de enzimas prooxidantes y antioxidantes después de la inoculación con *C. laurentii* en frutos de duraznos (Wang *et al.*, 2004), y en algunas proteínas de defensa en cerezas tratadas con *Pichia membranaefaciens* (Xu y Tian, 2008) las cuales pueden estar involucradas en el control o reducción del patógeno.

## OBJETIVOS

### Generales

- Determinar algunos mecanismos de resistencia a *P. expansum* de diversos genotipos de manzana.
- Evaluar la efectividad y modos de acción de ABCs contra *P. expansum* en manzanas en poscosecha.

### Específicos

#### Mecanismos de defensa

1. Determinar la tolerancia de diferentes genotipos de manzana al ataque por *P. expansum*.
2. Evaluar la relación de los grados de tolerancia de los frutos al patógeno con las características físicas y químicas de los frutos.
3. Analizar el cambio en la expresión de algunos genes relacionados con la defensa de los genotipos contra el hongo.

#### Modos de acción

4. Seleccionar ABCs contra *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious'.
5. Realizar la identificación de las cepas sobresalientes seleccionadas a nivel especie.
6. Estudiar modos de acción de cepas de levaduras contra el patógeno.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas y Hortalizas de la Universidad Autónoma de Querétaro y en el laboratorio de Patología de Poscosecha del IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) de Lleida, España.

Los frutos utilizados en el presente trabajo se obtuvieron en una huerta semicomercial ubicada en la comunidad “El suspiro” ubicada en el municipio de Cadereyta, Qro., localizada a 20° 51’ LN, 99° 35’ LO y a una elevación de 2495 m.s.n.m. (Figura 3.1). La temperatura y precipitación media anual son de 13.1°C y 812.5 mm, respectivamente (SMN, 2014).

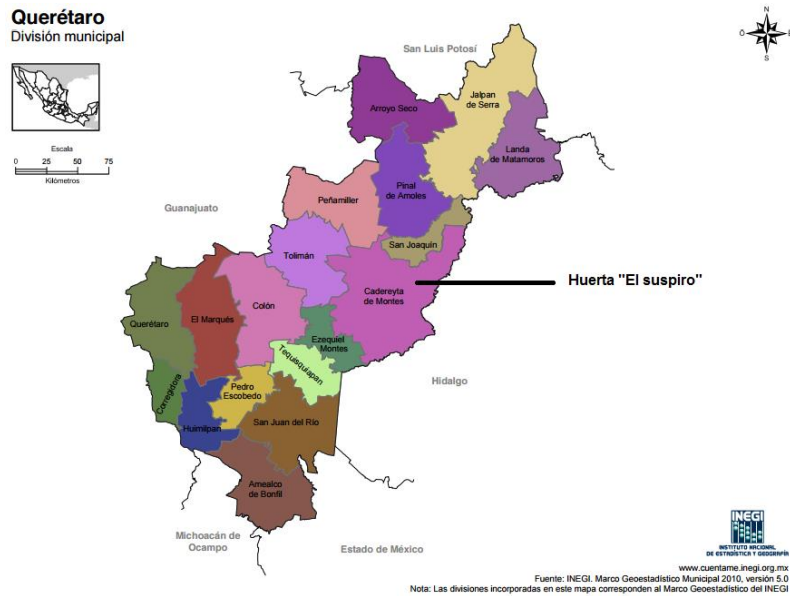


Figura 3.1. Ubicación de la huerta “El suspiro” Cadereyta, Qro.

## 3.2. Material biológico

### 3.2.1. Manzana

En total se evaluaron 28 genotipos de maduración temprana, intermedia o tardía, incluyendo cultivares, criollos e híbridos de bajo requerimiento de frío. Éstos fueron introducidos a la región de Querétaro en 2001 por medio de injertos realizados en arboles ‘Golden Delicious’ de 25 años de edad a su vez injertados sobre el portainjerto clonal ‘MM-111’. En 2011 se evaluaron 18 genotipos, mientras que en 2012 se evaluaron 23, de éstos, 13 fueron evaluados en ambos años de estudio. Además, 10 genotipos fueron cosechados en dos diferentes estados de madurez (comercial y sobremaduros) en 2011. Algunas de las principales características de los genotipos empleados en este estudio se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Denominación, origen, color del fruto, época de maduración y año de evaluación de genotipos de manzano establecidos en Querétaro y usados en este estudio

Genotipo	Origen	Color del fruto	Época de maduración*	EM <sup>1</sup>	Año de evaluación	
					2011	2012
‘Rayada’	Criollo de la Esperanza Querétaro	Rojo estriado	Temprana	X	X	X
403	Desconocido	Chapeada	Temprana			X
418	‘Anna’ x CLR9T10	Amarillo chapeado	Temprana		X	
424	‘Anna’ x ‘Princesa’ <sup>R</sup>	Amarillo chapeado	Temprana	X	X	X
441	‘Anna’ x ‘Gala’	Amarillo chapeado	Temprana			X
442-9	‘Anna’ x CLR9T10	Amarillo chapeado	Temprana			X

Continuación Tabla 3.1....

Genotipo	Origen	Color del fruto	Época de maduración*	EM <sup>1</sup>	Año de evaluación	
					2011	2012
449	'Anna' x 'CLR9T10	Rojo estriado	Temprana	X	X	X
SM6	Desconocido	Rojo estriado	Temprana			X
SMA	Desconocido	Rojo chapeado	Temprana			X
'Golden Delicious'	'Golden Reinette' x 'Grimes Golden'	Amarillo	Intermedia	X	X	X
'Red Delicious'	Selección de Madison, EE.UU.	Rojo estriado	Intermedia	X	X	X
411	'Anna x 'Gala'	Rojo	Intermedia			X
428	'Anna' x 'Gala' <sup>R</sup>	Chapeado	Intermedia	X	X	X
429A	'Anna' x CLR9T10	Rojo liso	Intermedia			X
429B	'Anna' x CLR9T10	Rojo	Intermedia			X
436	'Anna' x 'Gala' <sup>R</sup>	Amarillo chapeado	Intermedia		X	X
468	'Anna' x 'Liberty' <sup>R</sup>	Rojo	Intermedia	X	X	X
488	Desconocido	Rojo	Intermedia	X	X	
SM1	Desconocido	Rojo liso	Intermedia		X	
SM2	Desconocido	Rojo liso	Intermedia		X	
SM3	Desconocido	Rojo	Intermedia		X	X

SMB	Desconocido	Rojo estriado	Intermedia	X	X	
SME	Desconocido	Amarillo chapeado	Intermedia		X	X
Criolla	Desconocido	Chapeado	Intermedia			X
'Lourdes'	Desconocido	Chapeado rojo-verde	Tardía		X	X
419	'Golden 650' x 'Gala'	Rojo estriado- chapeado	Tardía	X	X	X
443	Einsheimer' x 'Princesa'	Rojo chapeado	Tardía			X

\*Época de maduración: (a) Temprana, en julio; (b) Intermedia, en agosto; (c) Tardía, en septiembre.

<sup>1</sup>EM= Genotipos evaluados en 2011 en estado de madurez comercial y sobre-maduro.

### 3.2.2. Cepas de levaduras

Se trabajó con las cepas 5vtt (*Candida incomunis*) obtenida de velos de vino, 22<sup>2</sup><sub>5b</sub> y 18<sup>-1</sup><sub>x</sub> de manzanas (Sánchez *et al.*, 2008) y 3d RMA<sub>3</sub> de pimiento (Sandoval *et al.*, 2011); sin embargo, a lo largo del trabajo se observó un comportamiento errático de éstas por lo que se incluyeron nuevas cepas que se seleccionaron durante este estudio a partir de manzanas en almacenamiento prolongado por mostrar capacidad antagónica contra *P. expansum* (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Cepas de levaduras utilizadas a lo largo de este estudio

Cepa	Fuente	Efecto antagónico
<i>Candida incomunis</i> (5vtt)	Velos de vino	En manzana redujo el crecimiento de <i>P. expansum</i> 23% y en pimiento 47% el de <i>Fusarium stilboides</i> .
3d RMA <sub>3</sub>	Pimiento	Redujo 45% la severidad en pimiento de <i>F. stilboides</i> .

22 <sup>-2</sup> <sub>5b</sub>	Manzana	Evaluada en manzana contra <i>P. expansum</i> y en pimiento contra <i>F. stilboides</i> reduciendo 63% la severidad.
18 <sup>-1</sup> <sub>x</sub>	Manzana	Evaluada en manzana contra <i>P. expansum</i> y en pimiento contra <i>F. stilboides</i> reduciendo 54% la severidad.
2R	Manzana	Redujo 68.3% en área el diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en manzana.
M18/3B	Manzana	Redujo 95.4% en área el diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en manzana.
M20/2A	Manzana	Redujo 98.1% en área el diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en manzana.
B33	Manzana	Redujo 84.5% en área el diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en manzana.
B34	Manzana	Redujo 54.2% en área el diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en manzana.
B38	Manzana	Redujo 52.4% en área el diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en manzana.
B39	Manzana	Redujo 75.7% en área el diámetro de crecimiento de <i>P. expansum</i> en manzana.

(Sánchez *et al.*, 2008; Sandoval *et al.*, 2011; Carrasco, 2014)

### 3.2.3. *P. expansum* Link

Para seleccionar la cepa del patógeno a ser usada en este estudio, se evaluó la patogeneicidad de cinco cepas de *Penicillium* spp. aisladas de diferentes fuentes (Tabla 3.3.). Finalmente se utilizó la cepa de *P. expansum* Link CFNL2016 seleccionada por su alta virulencia en manzanas 'Golden Delicious' en almacenamiento (Sánchez *et al.*, 2008).

Tabla 3.3. Cepas de *Penicillium* spp. evaluadas en este estudio

Cepa	Origen
SMG2	Sidra
Manzana2	Manzana
SMG1	Sidra
aislada manzana	Manzana
<i>P. expansum</i> CFNL2016	Manzana

### 3.3. Preparación de los inóculos

#### a) Levaduras antagónicas

Las levaduras se activaron en NYDB (caldo nutritivo dextrosa para levaduras) realizando dos transferencias sucesivas cada 72 h. Las células de la última resiembra obtenidas por centrifugación (12 000 rpm, 10 min) se lavaron y resuspendieron en diluyente de peptona. Posteriormente se realizaron diluciones, las cuales se sembraron por extensión en superficie en cajas con medio agar nutritivo dextrosa para levadura (NYDA) y se incubaron durante 48 h a  $24 \pm 1$  °C. Finalmente se realizaron recuentos y la suspensión se ajustó a la concentración requerida para cada ensayo.

#### b) *P. expansum*

La suspensión de esporas se preparó recuperándolas por barrido con solución tween 80 sobre un cultivo extendido en placa de ocho días a  $24 \pm 1$  °C, en medio agar papa dextrosa (APD) (Cermeño y Torres, 1998). La suspensión de esporas se filtró y se sembró por la técnica de vaciado en placa en APD adicionado de rosa de bengala y ampicilina y se incubó durante 48 h a  $24 \pm 1$  °C. Después del recuento, la concentración se ajustó a  $2 \times 10^4$  esp mL<sup>-1</sup>.

### 3.4. Metodología

En la Figura 3.2. se muestra la metodología general que se siguió durante la realización de este proyecto de tesis. Éste se dividió en dos partes: la primera consistió

en el estudio de los mecanismos de defensa contra *P. expansum* de los diferentes genotipos mediante estudios previos de susceptibilidad seguidos de estudios de correlación entre dicha susceptibilidad y características de calidad y finalmente un estudio de expresión de genes relacionados con la defensa a patógenos en poscosecha. La segunda parte consistió en realizar experimentos con agentes de biocontrol (ABC) desde la selección de cepas que inhibieran el desarrollo de *P. expansum* en manzanas y posteriormente se realizaron ensayos para conocer algunos modos de acción contra el patógeno. Finalmente, se realizó la identificación a nivel especie de las cepas seleccionadas como ABC.

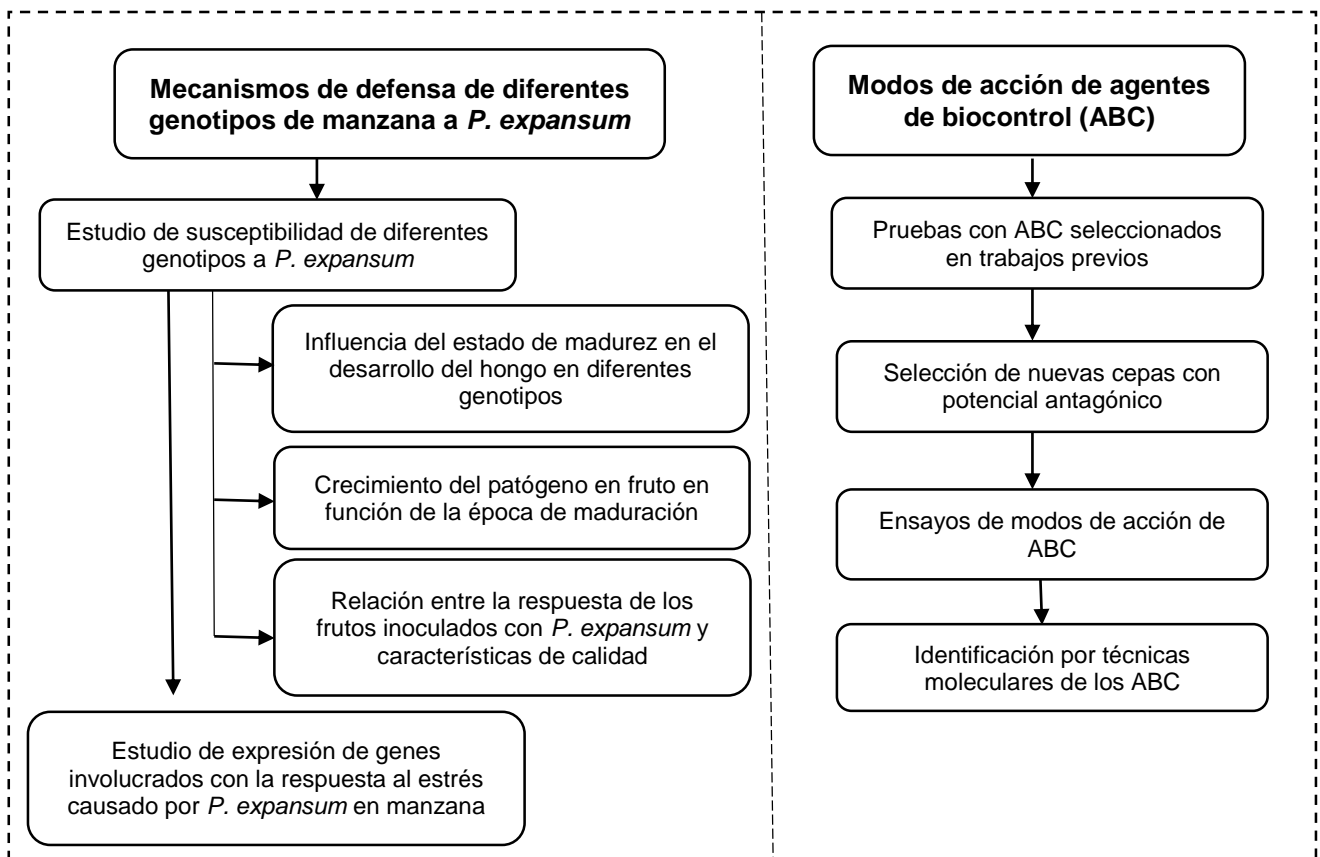


Figura 3.2. Metodología general

### **3.5. Susceptibilidad y mecanismos de defensa de los genotipos de manzana a *P. expansum***

#### **3.5.1. Caracterización física y química de frutos de manzana**

##### *3.5.1.1. Análisis físicos*

###### a) Color

Se determinaron las coordenadas de color “L”, “a” y “b” con ayuda de un colorímetro marca HunterLab con iluminante A y observador 10 ° en tres puntos equidistantes del fruto entre el cáliz y el pedúnculo. Se utilizaron cinco frutos de cada variedad y se consideró el promedio de las lecturas.

###### b) Firmeza

Esta prueba consistió en la medición de la resistencia del fruto a la punción empleando un texturómetro marca TA-HD. Se utilizó una sonda de 5 mm de diámetro con una distancia de penetración de 8 mm y una velocidad de descenso de 1 mm s<sup>-1</sup> (Zavala *et al.*, 2006). Se realizaron tres mediciones por fruto en puntos ecuatoriales diferentes. Se tomaron cinco frutos por variedad y se reportó el promedio de las lecturas en Newtons.

##### *3.5.1.2. Análisis químicos*

###### a) Sólidos solubles totales (SST)

Se determinó a partir de tres gotas de jugo extraído mediante un refractómetro manual marca Atago y se tomó el valor de tres mediciones obtenidas a partir de tres frutos.

###### b) Acidez total titulable

Se extrajo el jugo de cinco manzanas por unidad experimental con cuatro repeticiones. Se tomó una alícuota de 5 mL y se agregaron 45 mL de agua destilada, con la adición de tres gotas de fenolftaleína. Finalmente se tituló con NaOH 0.1 N hasta observar el vire (color rosa) expresándose en g L<sup>-1</sup> (Alayón *et al.*, 2005).



La acidez total se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Acidez\ total = \frac{(mL\ de\ NaOH)(N)(F)(1000)}{mL\ de\ muestra}$$

Donde:

mL de NaOH = cantidad en mL de NaOH gastados en la titulación.

N = la normalidad de NaOH empleada.

F= Factor meq de ácido málico=0.067

mL de muestra= 5 mL

### c) pH

El pH se determinó en 50 mL de jugo extraído de cinco manzanas mediante un pH-metro digital CONDUCTRONIC pH10, calibrado con soluciones estándar de pH 4 y 10. Se realizaron tres repeticiones.

### 3.5.2. Evaluación de la tolerancia de genotipos de manzana a *P. expansum*

Como se mencionó anteriormente, los ensayos de tolerancia al patógeno con los diferentes genotipos se llevaron a cabo durante 2011 y 2012 con diferente número de genotipos evaluados de acuerdo a la disponibilidad de los frutos. Los ensayos se dividieron en diferentes grupos conforme se fueron cosechando, dependiendo si se trataba de variedades tempranas, intermedias o tardías.

El día del ensayo las manzanas se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio durante 30 s y se dejaron secar durante una hora bajo una campana de flujo laminar. Posteriormente en cada fruto se realizaron tres perforaciones equidistantes (3 x 3 x 3 mm) en la zona ecuatorial, con ayuda de un punzón. Cada herida se inoculó con 20 µL de la suspensión de esporas de *P. expansum* a una concentración de 10<sup>4</sup> esporas mL<sup>-1</sup> y los frutos inoculados se dejaron secar por 30 min. Finalmente los frutos se incubaron a 25 ± 1 °C por ocho días y se midió la severidad del daño causado por el patógeno, que corresponde al diámetro de crecimiento del hongo en mm medido con un vernier. Los

genotipos se evaluaron a menor (en su madurez fisiológica aparente) y mayor grado de madurez (sobremaduro) con diferencia de 3 a 4 °Brix entre ellos.

Al final del periodo de cosecha, se realizó nuevamente un ensayo de tolerancia con todos los genotipos de todas las épocas de maduración y se realizó un análisis de correlación entre el comportamiento de los frutos evaluados inmediatamente después de ser cosechados y aquellos evaluados al final de la cosecha.

### **3.5.3. Análisis de expresión de genes implicados en las respuestas de defensa de las manzanas**

Se seleccionaron dos genotipos sobresalientes con base en los resultados obtenidos de tolerancia de los genotipos a *P. expansum* durante 2011 y 2012. Además, se utilizó la variedad con mayor susceptibilidad para ser utilizado como control.

Previamente, los frutos fueron inoculados con el patógeno e incubados de la forma descrita con anterioridad (3.5.2); después de 0, 24, 48 y 72 h se tomó 1 cm de diámetro del tejido infectado con ayuda de un sacabocados. El tratamiento control consistió en frutos heridos e inoculados con una solución de Tween 80 (0.05%) sin el patógeno. Se tomaron 50 heridas por fruto y se utilizaron tres repeticiones biológicas. Las muestras extraídas fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas con la finalidad de eliminar el agua sin afectar sus propiedades. Los tratamientos seleccionados para realizar el estudio de mecanismos de defensa fueron los siguientes: 1) frutos control 0 h, 2) frutos control 24 h, frutos inoculados con *P. expansum* 24 h, frutos control 48 h y 3) frutos inoculados con *P. expansum* 48 h.

Finalmente, a partir del tejido de manzana se estudiaron en total 10 genes que incluyeron el *PAL1*, *COMT2*, *POX64*, *CAD1*, *CAD6*, *CPR*, *acChit*, *CAT*, *Mal d 1.03E* y *ACO*, usando como gen de referencia al *EF1 $\alpha$* . Las secuencias de los oligonucleótidos de los genes se consignan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión de genes relacionados con mecanismos de defensa en genotipos de manzana

Gen	Descripción	“Foward”(5´ a 3´)	“Reverse”(5´ a 3´)
<i>PAL1</i>	Fenilalanina amonio liasa 1	TTTGTGAGGGAGGAGTTGG	GTTGAATGTGAAGGAATGCAG
<i>COMT2</i>	Ácido cafeico O-metiltransferasa	TGTGCAAACCTCTACAAACCTC	TGAGCTCCAAAAGCCTTG
<i>POX64</i>	Peroxidasa 64	CCTCCTCAAACAAGCGTTC	CACAGCACACACAAACAATTTTC
<i>CAD1</i>	Cinamil alcohol deshidrogenasa 1	ACAAGGCATTTGAGAGAATGGAA	CTTCCGGCTACATCCAGGAC
<i>CAD6</i>	Cinamil alcohol deshidrogenasa 6	CCGGACAAAATCAACGAGGC	AGGCTCGCAAGTTTGAAGA
<i>CPR</i>	NADPH citocromo P450 reductasa	CAAAGCAGAGAGCCTGGTGA	TACCAAACGTCGCAGATA
<i>acChit</i>	Quitinasa ácida	AGAATTCGCCCAAGTACGGAG	TTCAAAGGTAAGGAATGATGCGT
<i>Mal d 1.03E</i>	Proteína PR Mal d 1	CCAGCCACTACCATACCA	CCAATTACAAGCCAAAACAC
<i>CAT</i>	Catalasa	GTCAAAAACCTGGCGTCTCGT	ATTGGCATCGCCCTCAAATG
<i>ACO</i>	Acc oxidasa	GTGTGCTTAGAGGGGAAAT	TTGTTTTCCGACCCTCTT
<i>*EF1α</i>	Factor de elongación 1α	GACATTGCCCTGTGGAAGTT	GGTCTGACCATCCTTGAAA

\*Gen de referencia

(Vilanova *et al.*, 2013; Buron-Moles *et al.*, 2015)

### 3.5.3.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó de acuerdo con Vilanova *et al.* (2013) con modificaciones partiendo de 1 g de tejido de manzana liofilizado con la adición de 10 mL de solución reguladora (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 M NaCl, 25 mM EDTA, pH 8.0, 2% (p/v) bromuro de cetiltrimetilamonio, 2% polivinilpirrolidona 40, 500 mg L<sup>-1</sup> espermidina y 2% β-mercaptoetanol). Las muestras fueron homogenizadas con ayuda de un politron PT 10/55 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) por un min. El extracto se incubó (65 °C, 15 min) y se enfrió en hielo para posteriormente adicionar 10 mL de clorformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v). El homogenizado se centrifugó (10 000 x g, 15 min, 4 °C) y el sobrenadante fue reextraído repitiendo la adición del Cloroformo-alcohol isoamílico y la centrifugación. El sobrenadante (10 mL aprox. por muestra) fue transferido a varios tubos Eppendorf (cinco tubos aproximadamente por muestra) con 7.5 M de cloruro de litio para obtener los ácidos nucleicos por precipitación a 4 °C durante una noche.

Al día siguiente, los tubos se centrifugaron (12 000 x g, 30 min, 4 °C) y el precipitado se lavó con etanol a 70% y se resuspendió en 80 µL de agua y después las muestras se reagruparon por repetición en un solo tubo. Se adicionó un volumen igual (400 µL aprox.) de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y el homogenizado se centrifugó. La fase acuosa fue reextraída con ½ de volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y centrifugada nuevamente a 12 000 x g por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó un volumen 1/10 de acetato de sodio y 2.5 de etanol (70%). Las muestras se guardaron 30 min a -20 °C y se centrifugaron (12 000 x g, 30 min). El precipitado se lavó con etanol 70% y se centrifugó dos veces a alta velocidad durante un min. El precipitado se disolvió en 100 µL de agua.

La concentración de ARN se cuantificó usando un espectrofotómetro ND-1000 Nanodrop (Thermo Scientific, DE, USA) y la integridad del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa a 0.8%, tiñendo con GelRed.

### 3.5.3.2. Purificación de ARN

El ARN purificó con el paquete NucleoSpin rDNAasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Para remover las impurezas de las muestras se adicionó ½ volumen de 10 M de acetato de amonio y tres volúmenes de etanol a 70% y éstas se guardaron una

hora a -20 °C después de lo cual se centrifugaron a 12 000 x g por 30 min a 4 °C y finalmente los sedimentos se disolvieron en 20 µL de agua.

#### 3.5.3.3. Síntesis de ADNc

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó mediante la enzima transcriptasa reversa con los reactivos de Invitrogen Superscript III First-Strand Synthesis System siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### 3.5.3.4. Análisis de genes por PCR cuantitativo

La variación en los niveles de expresión de 10 genes relacionados con las respuestas de defensa de frutos a enfermedades de poscosecha fueron determinados en los diferentes genotipos de interés usando PCR cuantitativo.

El ADNc fue diluido a una concentración de 10 ng µL<sup>-1</sup>, colocado en placas de 96 pozos y analizado utilizando el sistema de PCR cuantitativo 7500 (Applied Biosystems Foster City, CA). Los iniciadores se ajustaron a una concentración de 400 nM y, para evitar la amplificación de otros genes de la misma familia fueron diseñados en la región UTR 3' y además se verificó que no hubiera amplificación derivada de *P. expansum*. Para conocer la temperatura óptima para cada par de oligonucleótidos se elaboró una curva estándar.

Cada reacción de PCR cuantitativo (10 µL) constó de:

- a) 2 µL de agua,
- b) 0.4 µL de cada oligo (F "Forward" y R "Reverse"),
- c) 5 µL de mezcla SYBR (Kappa biosystems)
- d) 0.2 µL de ROX Low y
- e) 2 µL de ADNc.

Las condiciones del PCR cuantitativo se fijaron de acuerdo a lo descrito por Vilanova *et al.* (2013), a saber: desnaturalización 95 °C por 5 min seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 1 min a 60 °C además de un paso de disociación. Se utilizaron tres replicas técnicas de la misma muestra para cada repetición biológica.

Para el análisis de expresión de genes se utilizó el modelo  $\Delta\Delta\text{Ct}$  descrito por Pfaffl (2001), donde el radio del gen de estudio se expresa en una muestra frente a un control

en comparación con un gen de referencia, tomando en cuenta las eficiencias de la qPCR tanto para los genes en estudio como para el gen de referencia (EF1 $\alpha$ , AJ223969.1). Las manzanas no inoculadas con el hongo al tiempo cero fueron designadas como punto de calibración establecido como la unidad para calcular los niveles de expresión relativa.

### **3.6. Efectividad y modos de acción de agentes de biocontrol**

#### **3.6.1. Selección de cepas antagónicas**

Se utilizaron manzanas del cultivar 'Golden Delicious'. Los frutos se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) a 1800 ppm durante 30 s y se enjuagaron con agua destilada estéril. Una vez secos, se realizaron 3 heridas en la epidermis de cada uno de los frutos donde se inoculó con 25  $\mu$ L de la suspensión de levadura ( $10^7$  UFC mL $^{-1}$ ) y 20  $\mu$ L del patógeno ( $10^4$  esp mL $^{-1}$ ). La unidad experimental fue una manzana con tres heridas y se repitió tres veces. Los frutos se incubaron por 8 d a  $25 \pm 1$  °C y  $85 \pm 5\%$  de humedad relativa (HR) y se midió el diámetro de lesión en mm. Se seleccionaron las cepas que mostraron la mayor reducción del daño provocado por el patógeno.

#### **3.6.2. Evaluación de la capacidad antagónica a *P. expansum* de diferentes concentraciones de inóculo de ABC en frutos de manzana**

Se realizó un ensayo para verificar las menores concentraciones de inóculo efectivas de los ABC seleccionados de trabajos previos contra *P. expansum*. Tal experimento se realizó inoculando frutos 'Golden Delicious' de la misma forma que se describió en el apartado anterior aplicando 25  $\mu$ L de soluciones ajustadas a  $10^5$ ,  $10^6$  o  $10^7$  UFC mL $^{-1}$  y posteriormente se aplicó el inóculo con el patógeno. Los frutos se almacenaron a 25 y 4 °C.

### 3.6.3. Dinámica poblacional

Con la finalidad de evaluar la supervivencia de los ABC seleccionados de trabajos anteriores, se hizo una dinámica poblacional en manzanas 'Golden Delicious'. Para ello, se realizaron heridas en el epicarpio de los frutos en la forma descrita previamente. Se inoculó un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión del antagonista a  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  y los frutos se incubaron a 25 o 4 °C y después se llevaron a cabo recuperaciones de las cepas a partir de las heridas después de uno, dos, tres, cuatro y siete días de almacenamiento a 25 °C y a los 3, 7, 15, 20, 30, 45 d de aquellos almacenados a 4 °C. El tejido se removió con un sacabocados (1 cm de diámetro por 1 cm de profundo) y se molió a mano en un mortero en 1 mL de solución reguladora de fosfato 0.05 M (pH 6.8). Posteriormente, se realizaron diez diluciones decimales y de cada una, 0.1 mL se sembró por extensión en superficie en placas de NYDA. Éstas se incubaron a 25 °C por 48 h y se realizaron recuentos de las colonias. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento.

### 3.6.4. Ensayos de modos de acción

#### 3.6.4.1. Producción de sustancias antimicrobianas (*antibiosis*)

A partir de colonias de 48 h de crecimiento se realizaron dos estrías paralelas a 2.5 cm de distancia del centro de la placa en medio APD y se colocó en el centro una fracción de hongo de 0.25  $\text{cm}^2$  de un cultivo de ocho días (Khamna *et al.*, 2009). Las placas se incubaron a 24 °C durante ocho días y se observó la presencia (producción de sustancias antimicrobianas) o ausencia de un halo de inhibición del crecimiento del hongo (Poppe *et al.*, 2003).

#### 3.6.4.2. Competencia por nutrientes

Se utilizaron tres tratamientos (Janisiewicz *et al.*, 2000): 1) Testigo: *P. expansum* (patógeno) sin levadura; 2) El patógeno y el antagonista separados por un filtro semipermeable hidrofílico de politetrafluoroetileno (PTFE), y; 3) El patógeno y el antagonista sin filtro. Cada tratamiento se efectuó en pozos de 1 mL incluidos en microplacas de poliestireno conteniendo NYDB 40% o Jugo Infusión de Manzana (JIM),

ajustando las concentraciones del inóculo a  $10^4$  esp mL<sup>-1</sup> para el patógeno y a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> para las levaduras. Las microplacas se incubaron a 24 °C durante 24 h, evaluando el índice de germinación del hongo (0 = no germinado; 1 = Longitud del tubo germinativo (LTG) ≤ un conidio; 2 = LTG de uno a dos conidios; 3 = LTG de dos a cuatro conidios y 4 = LTG ≥ cuatro veces el tamaño del conidio) en base a 100 conidios contados al azar.

### **3.7. Identificación de los ABC**

Para realizar la identificación de los ABC se utilizó la amplificación de la región D1/D2 del gen ARN 26S.

#### **3.7.1. Extracción de ADN**

Para realizar la extracción de ADN de las cepas seleccionadas previamente (2R, B33, B38, B39, B34, M18/3B y M20/2A) se utilizó el paquete de reactivos QIAamp DNA Stool Mini Kit. Se partió de un cultivo puro preenriquecido por 24 h en NYDB del cual se tomó 1 mL. Posteriormente se siguió el procedimiento descrito por la empresa proveedora de los reactivos que consistió en varios pasos de centrifugación e incubación hasta obtener el ADN de cada una de las cepas. Finalmente el ADN obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro ND-1000 Nanodrop (Thermo Scientific, DE, USA) y la integridad se corroboró por electroforesis en gel de agarosa a 1%.

#### **3.7.2. Amplificación por PCR en punto final**

Para la amplificación de la región D1/D2 del gen ARN 26S se siguió la metodología descrita por Cano *et al.* (2004), usando los iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAC-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Se utilizó el Gotaq Master Mix de PROMEGA para la mezcla de reacción siendo ésta de 50 µL y se preparó como sigue:

- a) Gotaq Master Mix 25 µL



- b) NL1 a 10  $\mu$ M            5  $\mu$ L
- c) NL4 a 10  $\mu$ M            5  $\mu$ L
- d) Template (muestra) 5  $\mu$ L
- e) H<sub>2</sub>O                        10  $\mu$ L

Posteriormente las reacciones se procesaron por PCR punto final bajo las siguientes condiciones:

- 95 °C 1 min
  - 95 °C 30 seg
  - 51 °C 1 min
  - 72 °C 1 min
  - 72 °C 7 min
- } 35 ciclos

Finalmente, las reacciones fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa a 1.5%. Como control positivo se utilizó la cepa *Saccharomyces bayanus* y se incluyeron controles sin muestra de levadura.

### 3.7.3. Purificación del ADN y secuenciación

La purificación del ADN se realizó a partir del gel de electroforesis previamente obtenido mediante el paquete “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas fueron cortadas y colocadas en un tubo de 1.5 mL a partir del cual se partió para realizar los pasos subsecuentes.

La purificación del ADN se realizó a partir del gel de electroforesis previamente obtenido mediante el paquete “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas fueron cortadas y colocadas en un tubo de 1.5 mL a partir del cual se partió para realizar los pasos subsecuentes.

Finalmente, las muestras de las diferentes cepas de ABC fueron colocadas en tubos para PCR y se enviaron a secuenciar a la Unidad de síntesis y secuenciación de ADN (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **3.8. Diseño de los experimentos**

#### **3.8.1. Ensayos de tolerancia a *P. expansum***

**Diseño experimental:** Completamente al azar con tres repeticiones

**Factores de estudio:**

- Cultivares de manzana
- Estados de madurez
- Épocas de maduración

**Variables evaluadas:** Severidad del patógeno a 8 d de incubación.

**Unidad experimental:** Tres manzanas con tres heridas en el diámetro ecuatorial del fruto.

### **3.9. Análisis de los datos**

Para el análisis de los datos se aplicó el análisis de varianza y la prueba de medias de “LSD” utilizando el programa estadístico “Statgraphics Centurion 16.1”.

Además, se realizó un análisis de componentes principales considerando la susceptibilidad de los genotipos con las características de los frutos utilizando el programa “Unscrambler versión 6.1”.

En diferentes casos se aplicaron análisis de correlación simple por pares de Pearson.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Ensayo de la virulencia de diferentes cepas de *Penicillium* spp. en frutos de manzana

Cabe recordar que, dado que la cepa de *P. expansum* con que se contaba en nuestro laboratorio mostró un comportamiento errático con relación a su patogenicidad en manzanas 'Golden Delicious', se realizaron pruebas tendientes a evaluar la virulencia de otras cepas aisladas de manzanas en almacenamiento prolongado sin ningún tratamiento, así como cepas provenientes de otros productos. En la Figura 4.1 se observa el comportamiento de cinco cepas de *Penicillium* spp. aisladas de diferentes fuentes, las cuales fueron denominadas como "SMG2", "Manzana 2", "SMG1", "aislada manzana" y "*P. expansum* CFNL2016". Esta última ya se encontraba en el laboratorio y es la que se ha utilizado a lo largo de los diferentes estudios realizados previamente (Sánchez *et al.*, 2008). Se observó que la cepa "SMG2" no desarrolló en el fruto a ninguno de los tiempos de incubación. Esto pudiera deberse a que se trata de una cepa no compatible la manzana, es decir, pudiera tratarse de una especie diferente a *P. expansum* y por lo tanto no patógena para este fruto. Por otro lado, la cepa "Manzana 2" no mostró desarrollo alguno a cuatro días (4 d) de incubación, mientras que a 8 d presentó un crecimiento diametral de 9.9 mm. Mientras tanto, "SMG1", "Aislada manzana" y "*P. expansum*", mostraron la mayor virulencia a 4 d (8.4, 10.1 y 10.3 mm, respectivamente) y 8 d de incubación (28.1, 31 y 30.5 mm, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en diferentes trabajos anteriores, encontrando crecimientos de diámetro similares de *P. expansum* CFNL2016 a 8 d de incubación de 3.3 (Soto, 2009), 3.5 (Sánchez *et al.*, 2008), 3.2 (Castañeda, 2005), y 3.2 mm (Rivera, 2009). A la luz de estos resultados se decidió trabajar en adelante con la cepa previamente registrada (*P. expansum* CFNL2016) al no haberse revelado pérdida alguna de su virulencia.

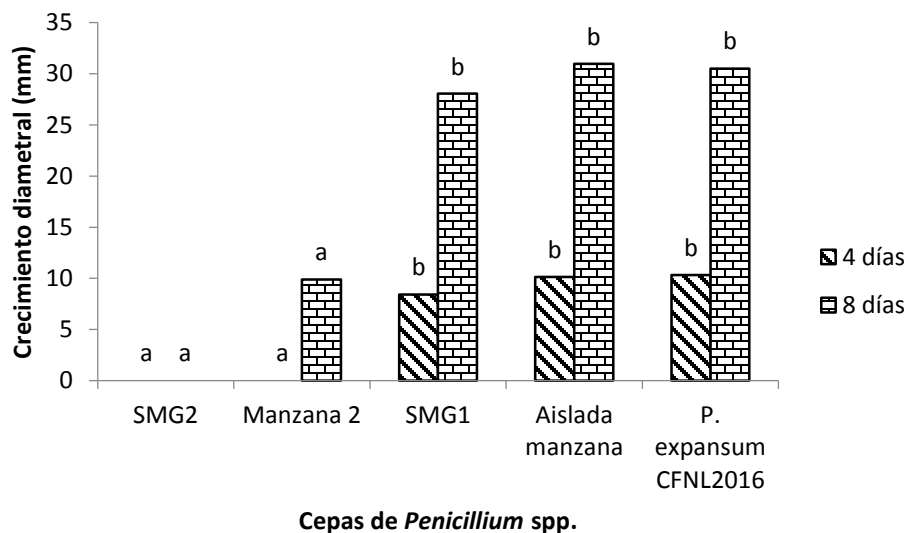


Figura 4.1. Crecimiento diametral de diferentes cepas de *Penicillium* spp. en frutos de manzana a dos tiempos de incubación a  $25 \pm 2$  °C

Diferencia Mínima Significativa (DMS)= 5.1 (4 d); 14.7 (8 d); Valor "F"=23.5\*\*\*; 20.1\*\*\* Coeficiente de Variación (CV)=33; 27.4.

#### 4.2. Influencia del estado de madurez en la susceptibilidad a *P. expansum* de los genotipos de manzana evaluados

En la Figura 4.2 se muestra la evaluación de la susceptibilidad a *P. expansum* de 10 genotipos en estado de madurez comercial después de 4 d de incubación. En esta condición, la variedad '449' mostró menor susceptibilidad al patógeno contrastando con '424' (10.7 mm vs. 15.4 mm, respectivamente). Asimismo, se observa que esta última resultó estadísticamente igual a la variedad 'Golden Delicious' la cual se considera como altamente susceptible a la pudrición azul.

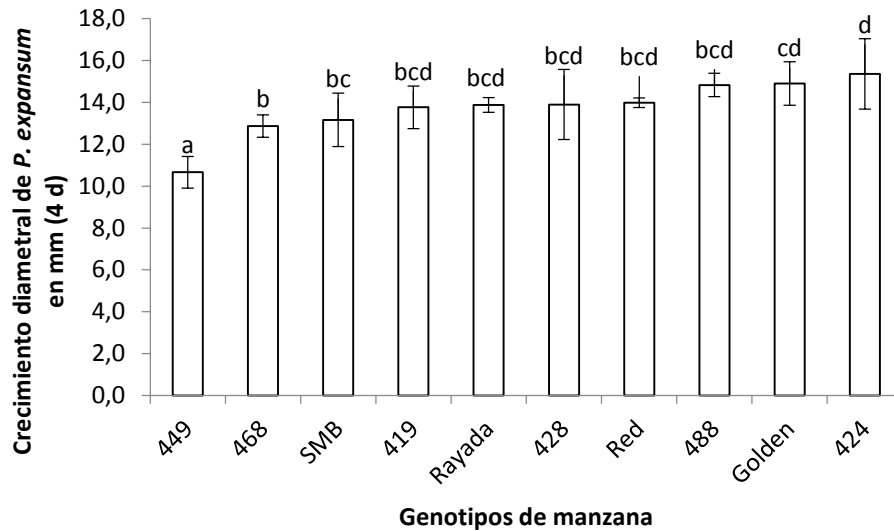


Figura 4.2. Crecimiento diametral de *P. expansum* en manzanas de 10 genotipos a menor grado de madurez inoculados y almacenados a 26 °C por 4 d en 2011

Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos de acuerdo con LSD ( $P \leq 0.05$ ); Cada columna representa la media de 27 datos individuales (tres repeticiones con nueve lesiones cada una). Valor  $F = 3.6^{**}$ . Diferencia mínima significativa = 2.0;  $^{**}$ Diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ).

Sorprendentemente, a los 8 d de incubación, '424' de haber resultado ser la más susceptible a 4 d mostró la menor susceptibilidad (28.9 mm) en comparación con 'Red Delicious', '488', '419', 'Golden Delicious' y 'Rayada' que mostraron diámetros de crecimiento del hongo de 36.5, 36.1, 35.2, 35.2 y 34.0 mm, respectivamente (Figura 4.3). Pudiera ser que este genotipo ('424') responde en horas posteriores limitando el desarrollo del patógeno. Asimismo, observamos que 'Red Delicious' se clasificó en este caso en las variedades altamente susceptibles, contrastando con Soto y Martínez (2009) que señalan que ésta es menos susceptible en comparación con 'Golden Delicious'. Lógicamente, el coeficiente de correlación entre los resultados obtenidos al día 4 y al día 8 después de la inoculación no es significativo ( $r = -0.4235$ ), debido a los resultados cambiantes de un tiempo a otro.

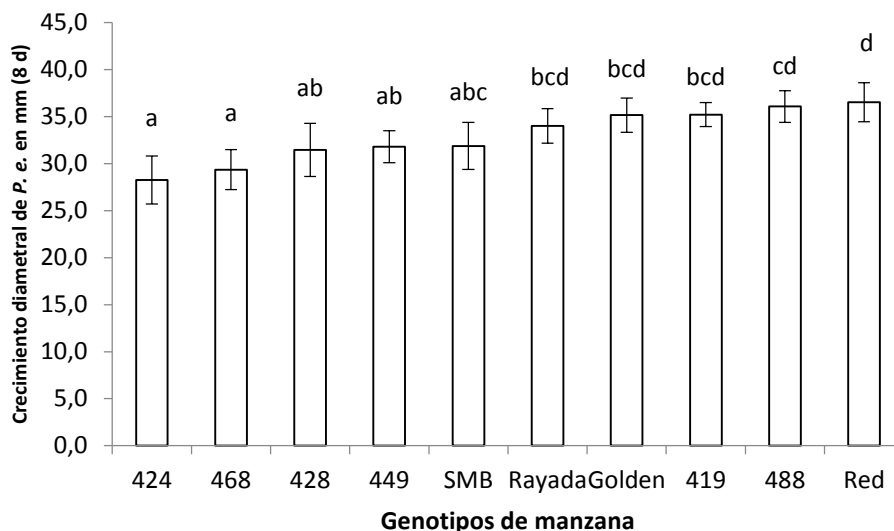


Figura 4.3. Crecimiento diametral de *P. expansum* en manzanas de 10 genotipos a menor grado de madurez inoculados y almacenados a 26 °C por 8 d en 2011

Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos de acuerdo con LSD ( $P \leq 0.05$ ); Cada columna representa la media de 27 datos individuales (tres repeticiones con nueve lesiones cada una).

Valor F = 3.7\*\*. Diferencia mínima significativa = 4.2; \*\*Diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ).

De manera general en la Figura 4.4 se observa el comportamiento con respecto a la severidad en frutos a menor y mayor grado de madurez inoculados con *P. expansum*. Claramente se observa que los frutos con un grado elevado de madurez muestran un mayor crecimiento del patógeno al mismo tiempo de incubación (17% más desarrollo en promedio). A los 4 d de incubación se observó el mismo comportamiento, obteniendo un coeficiente de correlación igual a 1 entre los resultados obtenidos al tiempo 4 d y 8 d. Estos resultados confirman que conforme el proceso de maduración va avanzando los frutos tenderán a ser más susceptibles al desarrollo del patógeno.

La mayor susceptibilidad de las manzanas con mayor grado de madurez obtenida en este estudio coincide con estudios realizados por Torres *et al.* (2003) con frutos de la variedad 'Golden Delicious'. Estas diferencias en susceptibilidad pueden deberse a cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración como pérdida de firmeza y aumento en la concentración de azúcares los cuales favorecen el desarrollo de los hongos. Beno-moualem y Prusky (2000) observaron el mismo comportamiento con aguacates, siendo los inmaduros más resistentes a *Colletotrichum gloeosporioides*.

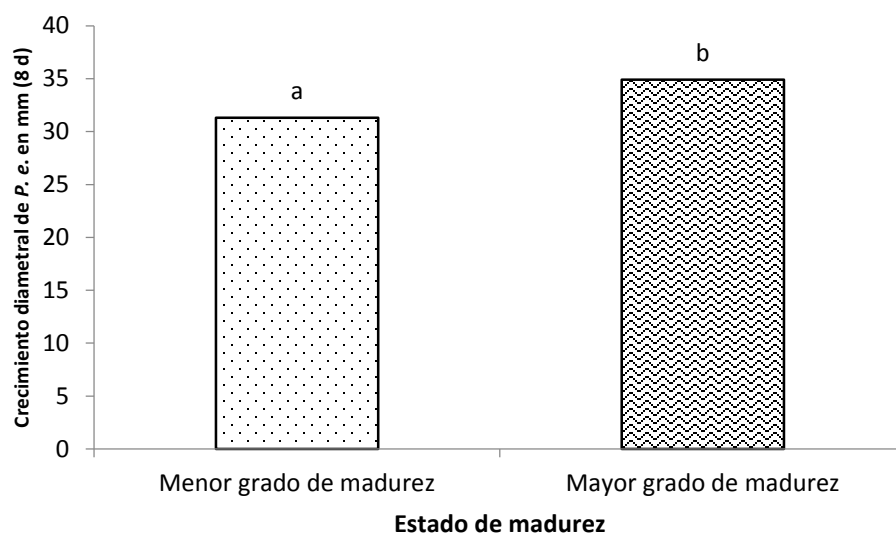


Figura 4.4. Diámetro de desarrollo de *P. expansum* en 10 genotipos de manzana en función de su estado de madurez

Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos de acuerdo con LSD ( $P \leq 0.05$ ); Cada columna representa la media de 270 datos individuales (tres repeticiones con nueve lesiones cada una por genotipo). Valor  $F = 14.9^{**}$ . Diferencia mínima significativa = 2.0;  $^{**}$ Diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ).

### 4.3. Susceptibilidad de genotipos de manzana a *P. expansum* y su correlación con características físicas y químicas de los frutos

#### 4.3.1. Ensayos realizados en 2011

##### 4.3.1.1. Comparación de crecimiento del patógeno entre los genotipos

Los genotipos que mostraron la menor susceptibilidad a *P. expansum* en 2011 fueron 'SM3', '468' y '424' (con desarrollos diametrales respectivos de 26.0 mm, 31.2 mm y 31.9 mm, respectivamente) contrastando con 'Golden Delicious' (37.9 mm) y otros genotipos, como 'SM2', '436' y 'SM1' (Figura 4.5). Diferencias en la sensibilidad a enfermedades en frutos de manzano han sido ya reportadas por Spotts *et al.* (1999) quienes en un estudio de varios años observaron que la variedad 'Royal Gala' resultó poco susceptible a *P. expansum*, *M. piriformis* y *B. cinerea*, mientras que 'Fuji' y 'Oregon

Spur II' fueron las más resistentes a *Pezicula malicorticis*; o por Janisiewicz *et al.* (2008) quienes evaluaron el grado de tolerancia a *P. expansum* de 83 accesiones al interior de un banco de germoplasma de manzana, encontrando dos inmunes (GMAL 3610.i y GMAL 3682.c) y cuatro resistentes (GMAL 3684.c, GMAL 3689.e, GMAL 4286.g y GMAL 3614.c).

Asimismo, en trabajos previos estos genotipos habían sido evaluados por Rivera (2009) y Soto (2009). En éstos se había observado un comportamiento interesante para el genotipo 'Lourdes' que había resultado ser resistente a *P. expansum*; no obstante, en esta nueva evaluación se observa que el hongo desarrolló ampliamente en éste. Estos comportamientos erráticos pueden deberse a las condiciones climáticas en las que se encuentran sujetos los frutos en el campo a través de los distintos años.

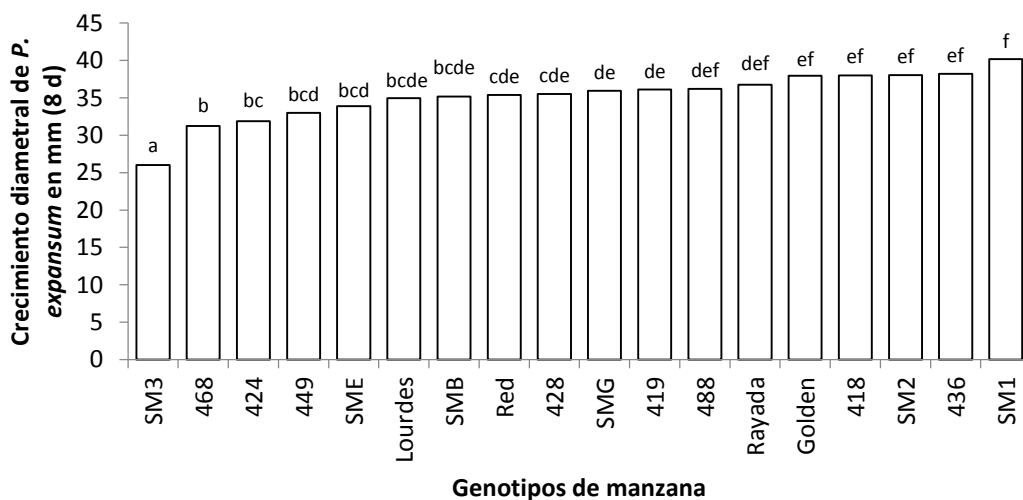


Figura 4.5. Crecimiento diametral de *P. expansum* en manzanas de 18 genotipos inoculados y almacenados a 26 °C por 8 d en 2011

Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos de acuerdo con LSD ( $P \leq 0.05$ ); Cada columna representa la media de 27 datos individuales (tres repeticiones con nueve lesiones cada una).

Valor F = 5.5\*\*. Diferencia mínima significativa = 4.0; \*\*Diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ).

#### 4.3.1.2. Variables físicas y químicas de los frutos

Los genotipos evaluados mostraron diferencias altamente significativas para todas las variables de calidad consideradas (Tabla 4.1). Con respecto a los SST, '468', 'SMB' y 'Red Delicious' presentaron valores de 11.5 a 13.3, contrastando con '418', 'SMG'



y '428' (16.9 a 17.1). Mendoza *et al.* (2008) obtuvieron valores similares a los de este estudio para 'Red Delicious' (12.7) y '428' (16.3). Por otro lado, 'SMG', 'Golden Delicious' y 'Rayada' mostraron los mayores valores de ATT (6.8, 6.2 y 5.9 g L<sup>-1</sup>, respectivamente), mientras los valores de pH variaron desde 2.9 para 'SMG' a 4.5 para '436'. Finalmente, la mayor firmeza se encontró en los genotipos '488' (42.1 N) y '436' (39.9 N), contrastando con 'SME' (20.0 N) y '449' (14.0).

Tabla 4.1. Sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT), firmeza, pH y color de frutos de 18 genotipos de manzana evaluados en 2011.

GENOTIPO	SST	ATT (g L <sup>-1</sup> de ác. málico)	FIRMEZA (N)	pH	Coordenadas de color		
					L	a	b
468	11.5 a	3.0 jk	30.4 defg	3.2 i	48.0 cd	3.6 cd	17.6 c
SMB	13.1 b	2.9 kl	32.9 cde	3.7 de	22.3 i	13.9 c	3.7 g
R. Delicious	13.3 b	2.4 m	27.2 fg	3.8 b	18.4 i	14.2 c	4.3 g
SME	14.5 c	4.8 cde	20.0 ij	3.4 gh	57.0 bc	-0.7 ef	22.7 c
488	14.5 c	3.9 efg	42.1 a	3.5 ef	28.0 g	17.6 ab	9.5 e
Rayada	14.7 cd	5.9 b	25.9 ghi	3.6 de	44.1 ef	17.8 ab	23.3 b
449	14.3 cd	5.2 cd	14.0 j	3.2 i	31.1 f	31.6 a	16.0 c
419	15.1 cd	4.5 cdef	38.8 bc	3.4 h	27.4 gh	23.9 a	9.8 e
Lourdes	15.2 cde	3.5 gh	32.6 def	3.5 ef	46.9 de	2.6 cde	18.7 c
SM2	15.3 de	3.7 fg	31.0 defg	3.6 ef	42.6 f	14.4 b	14.6 de
SM3	15.4 def	3.3 ij	28.6 efg	3.7 cd	24.7 hi	21.1 ab	8.8 g
424	15.5 def	5.5 bc	35.2 cd	3.4 fg	67.4 ab	-1.7 g	43.8 a
G. Delicious	15.9 efg	6.2 b	26.8 fgh	3.3 hi	56.4 bc	-0.3 def	24.0 b
436	16.2 fgh	1.2 n	39.9 b	4.5 a	36.6 f	18.2 ab	14.7 cd
SM1	16.3 ghi	4.2 def	29.9 defg	3.5 fg	28.7 g	24.3 a	9.2 f
418	16.9 hi	3.4 hi	23.1 hij	3.8 bc	69.9 a	-1.3 f	43.0 a
SMG	17.1 i	6.8 a	31.1 defg	2.9 j	64.6 abc	3.1 cd	41.6 b
428	17.1 i	2.4 lm	34.0 cd	3.9 b	60.0 bc	5.0 c	35.6 b
Valor F	25.2**	62.8**	74.8**	13.5**	43.1**	27.3**	73.2**
CV	3.3	8.3	0.2	1.8	10.2	30.0	13.2
DMS	0.8	0.5	0.1	5.4	7.3	5.7	4.4

Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos de acuerdo con LSD ( $P \leq 0.05$ ); Promedios obtenidos de 27 datos individuales; DMS = Diferencia mínima significativa; CV = Coeficiente de variación; \*\*Significancia estadística ( $P \leq 0.01$ ).

En el caso de las coordenadas de color, los menores valores de “L” (correspondientes a la luminosidad, de 18.4 a 28.0) mayores de “a” (- verde, + rojo, 17.6 a 31.6) y menores de “b” representan frutos con coloración roja como ‘Red Delicious’, ‘SMB’, ‘SM3’, ‘419’ y ‘488’, mientras que, los mayores valores de “L”, menores de “a” y mayores de “b” (- azul, + amarillo, de 24.0 a 43.0) corresponden a las variedades amarillas y chapeadas (‘Golden Delicious’, ‘SME’ y ‘418’). Felicitti y Schrader (2009) obtuvieron un valor de 68.2 para la coordenada de color “L” en la variedad ‘Golden Delicious’, el cual resulta similar al obtenido en este estudio.

Con respecto a la correlación entre las variables de calidad, se observó una correlación positiva entre los SST y la coordenada de color “b” ( $r= 0.6$ ) siendo que a mayores valores de “b” mayores valores de SST por lo que las variedades amarillas tienden a ser más dulces. Asimismo, dos correlaciones negativas ( $r= -0.5$ ) indicaron que a menores valores de las coordenada de color “L” y “b” hay mayores valores de pH, lo que indica que las variedades rojas tienden a ser menos ácidas.

#### *4.3.1.3. Análisis de correlación entre la susceptibilidad de los frutos al hongo y sus características de calidad*

Los componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) explican 60% del total de la variación obtenida en la población (Figura 4.6).

Se observa que el CP1 está influenciado mayoritariamente por el color, con un fuerte peso del vector “a” en el lado positivo (0.4), donde se encuentran los genotipos que presentan frutos de color rojo, como ‘Red Delicious’, ‘SMB’, ‘SM3’ y ‘419’, mientras que en el lado negativo tienen un peso importante los vectores “L” (-0.5) y “b” (-0.5), los cuales a su vez se encuentran fuertemente correlacionados entre ellos y se ubica cerca de donde están presentes la mayoría de los frutos amarillos como ‘Golden Delicious’, ‘424’ y ‘SMG’. Este tipo de correlaciones entre las coordenadas de color han sido observadas en otros estudios realizados en manzana (Altisent *et al.*, 2009) y otras frutas, como la nuez pecanera (Gutiérrez y Martínez, 2004).

El CP2 se encuentra mayormente determinado por la severidad del daño del hongo (0.9), encontrándose a proximidad de este vector dos genotipos que mostraron una elevada susceptibilidad (‘SM1’ y ‘436’) y, en el lado opuesto, genotipos evaluados

como menos sensibles ese año, como ‘SM3’, ‘449’ y ‘468’. No hay una correlación positiva clara entre la severidad del daño por el hongo y las características físicas y químicas del fruto.

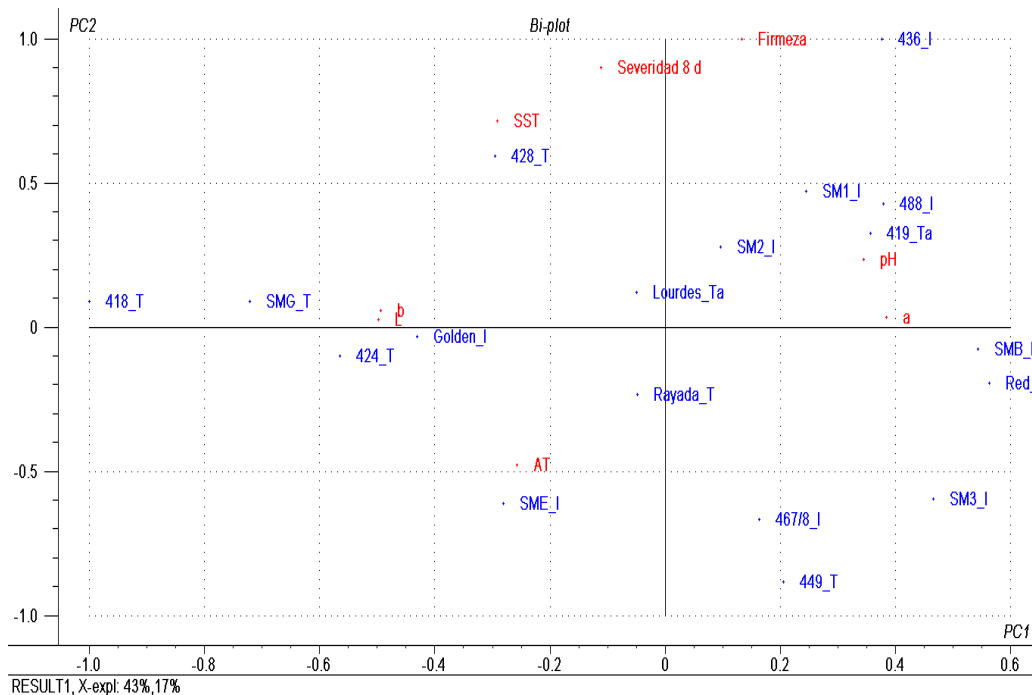


Figura 4.6. Segregación de 18 genotipos de manzana establecidos en Quéretaro, México, de acuerdo con sus características de calidad y su sensibilidad a *P. expansum* determinadas por análisis de componentes principales (ACP) en la cosecha de 2011 PC1 (43%) en el eje de las “X’s” y PC2 (17%) en el eje de las “Y’s”.

Por otro lado, se observa que el vector de ATT se encuentra opuesto a pH, lo cual es lógico si consideramos que el pH está determinado fundamentalmente por la concentración de los ácidos presentes (Sinha *et al.*, 2012). Además, este vector se encuentra considerablemente alejado de la severidad, lo cual parecería indicar que a menor acidez en los frutos mayor sensibilidad a *P. expansum*. En ese sentido, Konstantinou *et al.* (2011) encontraron que la variedad ‘Granny Smith’, que se había revelado como poco susceptible a *P. expansum*, fue la que mostró la mayor ATT, contrastando con ‘Red Delicious’, ‘Golden Delicious’ y ‘Fuji’; sin embargo, en nuestro caso, la relación entre ambas variables no es muy clara, ya que solamente ‘SME’, que no fue la menos susceptible al hongo, se encuentra asociada a la ATT.

### 4.3.2. Ensayos realizados en 2012

#### 4.3.2.1. Comparación de crecimiento del patógeno entre los genotipos

En la cosecha 2012 se observaron mayores diferencias en la sensibilidad de los genotipos a *P. expansum* que el año precedente. Todas las variedades mostraron diámetros de lesión menores que 'Golden Delicious' (34.2 mm), siendo ahora '436' (17.4 mm), '442-9' (17.5 mm), '441' (17.6), 'SME' (18.2 mm) y 'Lourdes' (18.5 mm) las menos afectadas por el patógeno. Asimismo, se observó que 'Red Delicious' fue menos susceptible al hongo que 'Golden Delicious' (Figura 4.7), lo que coincide con lo reportado por Soto y Martínez (2009).

Llama la atención el comportamiento irregular de algunos genotipos, como '436', que se había mostrado altamente susceptible al patógeno en 2011, pero que en estudios realizados previamente (datos no publicados) resultó poco sensible.

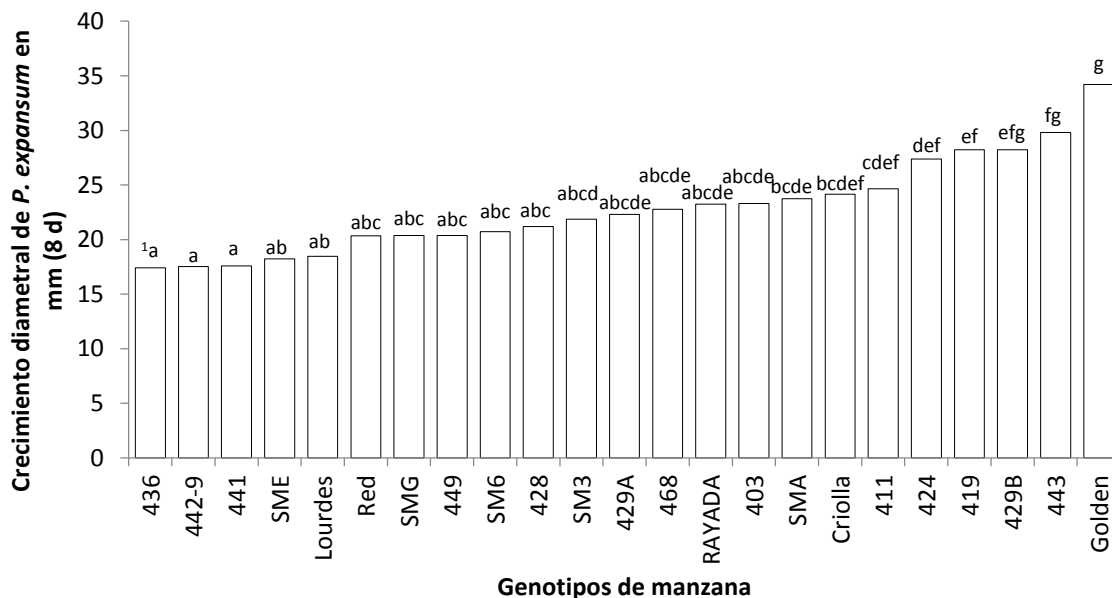


Figura 4.7. Crecimiento diametral de *P. expansum* en manzanas de 23 genotipos inoculados y almacenados a 26 °C por 8 d en 2012

Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos de acuerdo con LSD ( $P \leq 0.05$ ); Cada columna representa la media de 27 datos individuales (tres repeticiones con nueve lesiones cada una).

Valor F = 4.2\*\*. Diferencia mínima significativa = 6.0; \*\*Diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ).

Con respecto a 'Lourdes', la tolerancia a *P. expansum* mostrada en 2012 resultó muy superior a la obtenida en 2011 (con porcentajes de crecimiento diametral del hongo de 92.3% en 2011 y de 54.1% con relación a 'Golden Delicious' en 2012) (Figura 4.8). En estudios realizados en años anteriores (Soto, 2009; Rivera, 2009) esta variedad había mostrado un altísimo grado de resistencia al patógeno (1.8% de crecimiento diametral con respecto a 'Golden Delicious'). 'Lourdes' es una variedad de maduración tardía, con un buen potencial para almacenamiento en poscosecha (Mendoza *et al.*, 2008), además de ser resistente a oídio (Paz *et al.*, 2014).

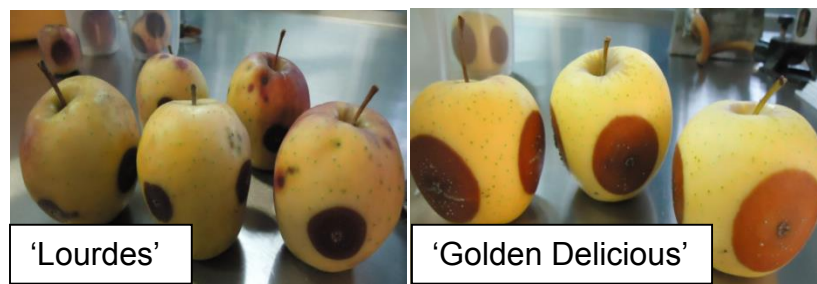


Figura 4.8. Pudrición causada por *P. expansum* en genotipos inoculados e incubados a 26 °C por 8 d en 2012

Si comparamos los valores del diámetro de lesión del hongo para la generalidad de los genotipos en cada una de las cosechas, observamos una muy baja correlación ( $r = 0.11^{NS}$ ), que confirma el comportamiento irregular de éstos, lo cual pudiera deberse a factores del medio ambiente a los que se encontraron expuestas las plantas y los frutos en el campo en invierno y durante la estación de crecimiento en un año y en otro, como el estrés hídrico, la luz, etc. (Jurick *et al.*, 2011). La precipitación media anual en 2011 (942.4 mm) resultó superior a la de 2012 (809.7 mm), además de que en 2011, dicha precipitación fue muy abundante en el mes de junio (446.5 mm) (Tabla 4.2). Por otro lado, aunque las temperaturas medias anuales fueron similares en los dos años de evaluación (13.4 °C vs. 14.0 °C, respectivamente), en 2011 se presentaron menores temperaturas durante el invierno, con diferencias de 3.7 °C tanto en enero como en febrero. Todas estas variantes pueden resultar en diferencias en las variables de calidad y por lo tanto en diferentes respuestas a los patógenos. Este tipo de situaciones, en las que se obtienen datos contradictorios de la tolerancia de frutos a enfermedades a través de los años, se

da muy a menudo, como lo señalan Jurick *et al.*, (2011) para *P. expansum* en manzana y Calenge y Durel (2006) para oídio en la misma especie. Contrariamente, Biggs y Miller (2001) evaluaron varios genotipos de manzanas en dos años sucesivos y encontraron una correlación positiva entre ambos estudios cuando las frutas fueron inoculadas con *Colletotrichum acutatum*, pero sin herirlas, ya que no se observó la misma situación cuando la fruta fue herida antes de ser inoculada.

El estudio continuo de la susceptibilidad de genotipos de manzana a *P. expansum* puede permitir la detección de materiales sobresalientes para su implementación en programas de mejoramiento genético, tal como ocurrió en el caso de la variedad de durazno 'Bolinha', identificada como resistente a *M. fructicola* (Gradziel, 1994).

Tabla 4.2. Temperaturas medias mensuales (°C) y precipitación total mensual (mm) en el sitio experimental en 2011 y 2012.

Variable climática	Año	Mes												Anual
		E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Temperatura media en °C	2011	9.6	11.4	12.3	16.2	17.2	14.3	13.4	14.5	12.8	16.0	11.8	11.3	13.4 <sup>1</sup>
	2012	13.3	15.1	15.4	14.6	15.5	15.5	14.2	15.2	16.2	11.9	11.0	10.4	14.0 <sup>1</sup>
Precipitación (mm)	2011	8.3	2.0	8.7	12.1	6.3	446.5	205.7	65.1	111.7	590.9	13.7	2.4	942.4 <sup>2</sup>
	2012	19.7	73.1	8.5	2.5	10.7	155.2	175.3	182.2	125.9	20.6	35.0	1.0	809.7 <sup>2</sup>

Datos proporcionados por el SMN [Sistema Meteorológico Nacional], Querétaro (2014); 1 = Temperatura media anual; 2 = Precipitación total anual.

#### 4.3.2.2. Variables físicas y químicas de los frutos

Las variedades ‘Criolla’, ‘SMG’, ‘SM3’ y ‘Red Delicious’ mostraron la menor concentración de SST con valores de 12.0 a 12.1 contrastando con ‘403’, ‘449’ y ‘424’ que obtuvieron valores desde 15.9 a 16.8. En el caso del pH la variedad ‘Lourdes’ obtuvo el menor valor (3.2), en contraste con ‘436’ (4.7). Finalmente, los genotipos más ácidos fueron ‘Rayada’ y ‘Criolla’ y las menos ácidas ‘436’, ‘441’ y ‘428’ (Tabla 4.3). Con respecto al color, nuevamente las variedades amarillas y chapeadas como ‘443’, ‘Criolla’, ‘Golden Delicious’, ‘Lourdes’ y ‘436’ mostraron los mayores valores de “L” y “b”, mientras las variedades rojas como ‘Rayada’ y ‘419’, mostraron los mayores de “a”.

Tabla 4.3. Sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT), pH y color de genotipos de manzana evaluados en 2012

Genotipo	SST	ATT	pH	Coordenadas de color		
				L	a	b
‘Criolla’	12.0 a	8.5 n	3.3 b	68.0 lm	-3.3 a	38.8 lm
SMG	12.1 a	3.9 g	3.8 i	62.7 kl	-5.5 a	42.5 mn
SM3	12.1 a	3.4 ef	3.7 h	24.5 a	23.3 ef	9.0 ab
‘Red’	12.1 ab	2.9 cd	4.0 j	24.1 a	19.3 de	7.3 a
411	12.3 b	3.3 ef	4.3 l	49.1 fg	24.5 ef	29.4 fghi
‘Golden’	12.9 c	3.3 ef	3.5 d	66.7 lm	-1.7 ab	31.3 ghij
436	13.1cd	1.7 a	4.7 o	58.0 hijk	5.0 b	30.5 fghij
429A	13.3 de	6.5 kl	3.5 d	25.5 ab	23.9 ef	9.1 ab
429B	13.4 ef	5.5 i	3.7 fg	32.7 bcd	25.6 efg	12.0 abc
‘Lourdes’	13.6 fg	3.5 f	3.2 a	67.5 lm	-2.9 a	46.5 n
441	13.8 gh	1.5 a	4.6 n	51.0 gh	13.6 cd	25.9 fg
442-9	13.9 h	6.2 jk	3.4 c	60.5 jkl	1.5 ab	37.3 klm
468	14.0 hi	2.9 cd	4 j	29.4 abc	30.0 fg	13.5 bc
SMA	14.0 hi	5.4 i	3.8 i	41.7 ef	29.7 fg	17.7 cd
428	14.2 ij	2.1 b	4.4 m	53.7 ghij	20.1 de	28.1 fgh
SME	14.2 ij	6.1 j	3.6 e	58.8 ijk	4.9 b	34.3 ijkl
419	14.3 jk	3.5 ef	3.4 c	47.7 fg	23.0 ef	25.3 ef
SM6	14.5 k	4.9 h	3.7 gh	38.0 de	30.3 fg	17.9 cd
‘Rayada’	14.8 l	8.4 n	3.3 b	32.6 bcd	30.2 fg	15.2 cd
443	15.3 m	3.2 de	3.3 b	73.3 m	5.8 bc	45.0 n
403	15.9 n	2.7 c	4.2 k	52.3 ghi	21.7 e	32.3 hijk
449	16.1 n	7.2 m	3.6 ef	33.5 cd	33.0 g	19.6 de



424	16.8 o	6.7	3.5 d	63.9 kl	1.4 ab	35.6 jkl
Valor F	224.8**	372.8**	413.0**	35.4**	22.4**	32.9**
CV	1.1	4.1	0.8	9.5	31.0	13.8
DMS	0.3	0.3	0.1	7.5	7.8	6.0

Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos, (LSD,  $P \leq 0.05$ ); Promedios obtenidos de tres datos individuales; DMS=Diferencia mínima significativa; CV=Coeficiente de variación; \*\*Significancia estadística a una  $P \leq 0.01$ .

Comparando las variables de calidad entre 2011 y 2012 se encontraron coeficientes de correlación significativos de 0.8, 0.8 y 0.7 para las coordenadas de color “L” “a” y “b”, respectivamente. De igual manera se encontraron coeficientes significativos de 0.6 y 0.7 para ATT y pH entre un año y otro y por el contrario, se observó un coeficiente no significativo para los SST ( $r=0.2$ ) lo cual pudiera deberse a diferencias en las variables climáticas obtenidas en cada uno de los años en cuestión. Esto último resulta de suma importancia ya que pudiera ser un factor determinante en la respuesta de los frutos al patógeno.

#### *4.3.2.3. Análisis de correlación entre la susceptibilidad de los frutos al hongo y sus características de calidad*

El CP1 explica esta vez 40% de la variación (Figura 4.11), y una vez más está fuertemente influenciado por el color, aunque ahora “L” y “b” se encuentran en el lado positivo, nuevamente muy correlacionadas entre ellas. Cerca de dichas coordenadas se agrupan varios genotipos de color amarillo, como ‘424’, ‘SMG’, ‘Golden Delicious’ y, en el lado opuesto de la Figura se ubica la coordenada “a”, alrededor de la cual se concentran una serie de genotipos de color rojo, como ‘Red Delicious’, ‘429’ y ‘SM6’.

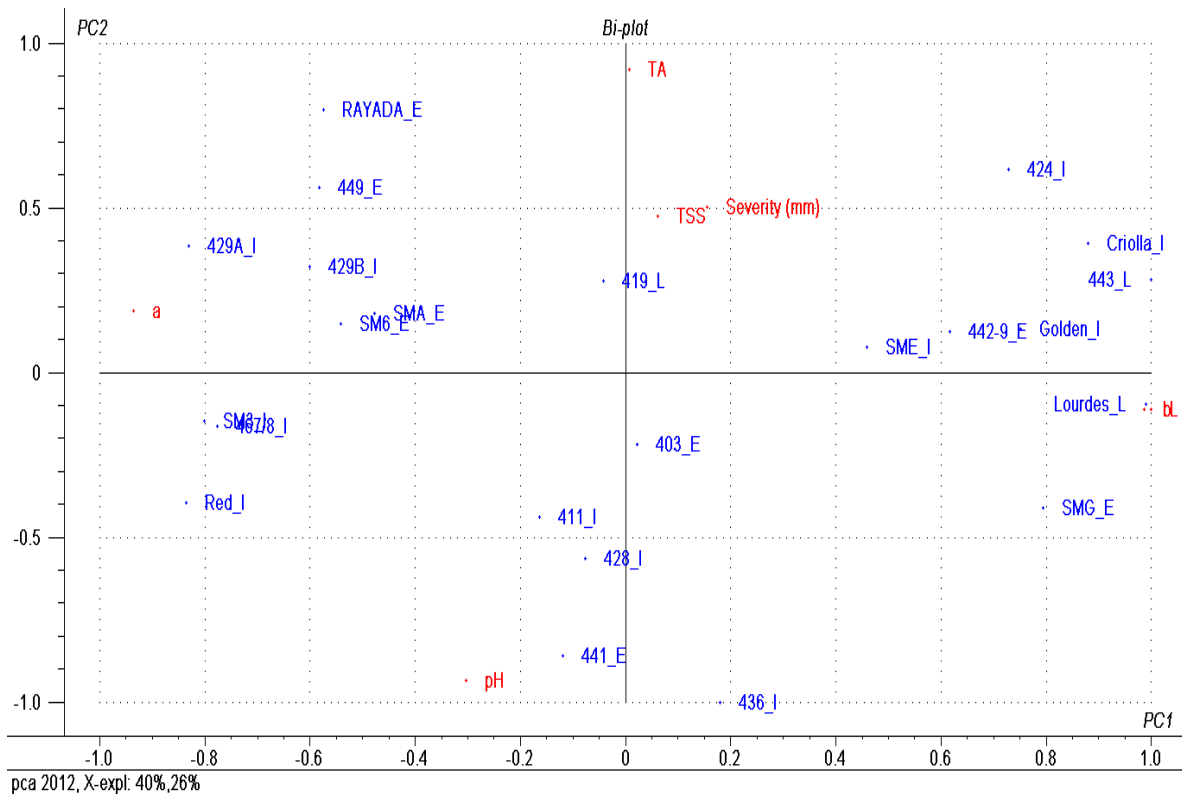


Figura 4.9. Segregación de 23 genotipos de manzana establecidos en Quéretaro, México, de acuerdo con sus características de calidad y su sensibilidad a *P. expansum* determinadas por análisis de componentes principales (ACP) en la cosecha de 2012 PC1 (40%) en el eje de las “X’s” y PC2 (26%) en el eje de las “Y’s”.

El CP2, por su parte, explica 26% de la variabilidad de los genotipos (66% entre los dos componentes principales) y se ve influenciado mayoritariamente por la ATT (con el pH en el extremo opuesto). Este componente se encuentra influenciado en menor medida por la severidad del daño del hongo y los SST, variables a su vez fuertemente correlacionadas entre ellas, lo que probablemente se debe a que el patógeno, al encontrar mayor disponibilidad de azúcares, tiene mayor capacidad de desarrollar sobre el huésped. Éste fue el caso para algunos de los frutos con mayores niveles de SST, como ‘424’, ‘419’ y ‘Criolla’. Lo anterior coincide con Torres *et al.* (2003), quienes observaron que frutos de manzana cosechados antes de su madurez comercial (con una menor concentración de SST) resultaron menos susceptibles a *P. expansum*.

El hecho de que ninguno de los otros atributos de calidad de la fruta haya mostrado alguna relación con el desarrollo del hongo pudiera deberse a que, además de

las propiedades intrínsecas de la manzana, existen otros factores, como por ejemplo las respuestas constitutivas o inducidas, que pueden determinar la sensibilidad de los frutos al patógeno (Vilanova *et al.*, 2013; Buron-Moles *et al.*, 2014). Este planteamiento coincide con Biggs y Miller (2001) quienes observaron que el daño causado por *C. acutatum* en diferentes cultivares de manzana no se vio influenciado por los atributos de calidad. Contrariamente a lo observado en este estudio, Ahmadi-Afzadi *et al.* (2013) encontraron que mientras menor fue la firmeza en los frutos de manzana, mayor resultó la severidad del ataque por patógenos, lo cual se atribuyen a una mayor facilidad en la penetración de los mismos para posteriormente iniciar la infección.

#### **4.4. Influencia del almacenamiento en frío en la susceptibilidad a *P. expansum* de diferentes genotipos de manzana evaluados en 2011**

Al final de la cosecha 2011 se realizó una prueba confirmatoria de la sensibilidad al patógeno de los genotipos disponibles al momento (Figura 4.12), evaluándolos en simultáneo. 'Red Delicious', 'Lourdes' y 'SM3' fueron los genotipos más sobresalientes con los menores diámetros de crecimiento del hongo (19.1, 19.3 y 19.6 mm, respectivamente), contrastando nuevamente con la variedad de referencia 'Golden Delicious' con 31.5 mm resultados que coinciden plenamente con los estudios realizados previamente con reducciones de 39.4, 38.7 y 37.8% respectivamente.

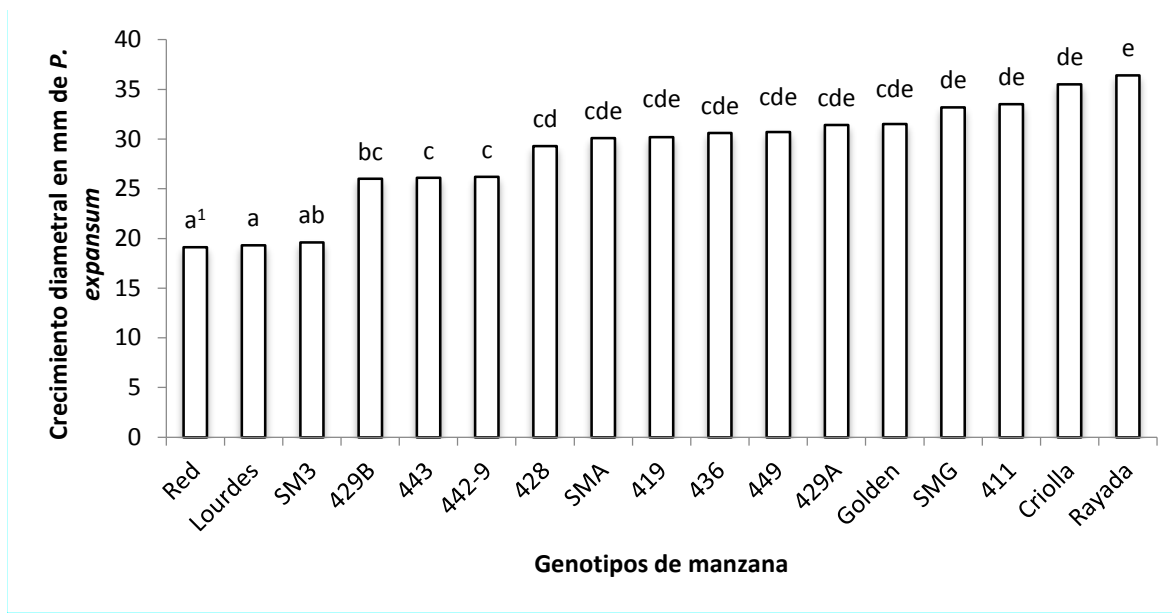


Figura 4.10. Diámetro ecuatorial de *P. expansum* en distintos genotipos de manzana cosechados en 2011 que fueron almacenados por un tiempo prolongado a 4 °C.

Condiciones de ensayo: 25 °C; 8 d

<sup>1</sup>Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos Student ( $P \leq 0.05$ ); Diferencia mínima significativa: 6.5; Coeficiente de variación: 17.8; Promedios obtenidos de 20 datos individuales (cinco repeticiones con cuatro lesiones cada una);  $F: 5.5^{***}$

Debido a que en la prueba confirmatoria se incluyeron genotipos que tenían de tres semanas a un mes de haber sido cosechados, se realizó un análisis de correlación entre los evaluados al momento que fueron cosechados y los que se evaluaron después de cierto tiempo almacenados a 4 °C (Figura 4.11). Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.31, lo que indica que varios genotipos cambiaron su respuesta al patógeno por el tiempo que estuvieron en almacenamiento. Esto contrasta con estudios realizados por Rivera (2009), donde en su mayoría los genotipos mostraron la misma tolerancia/susceptibilidad al hongo ( $r=0.77$ ). No obstante hubo variedades tales como 'SM3', 'SMA', '411' y 'Rayada', que fueron contundentes en su respuesta al patógeno a pesar del tiempo que estuvieron almacenadas a bajas temperaturas, por lo que se podría pensar que de ser capaces de desarrollar mecanismos de resistencia a *P. expansum*, podrían mantener sus características aun estando sometidas a ciertos tipos de estreses.

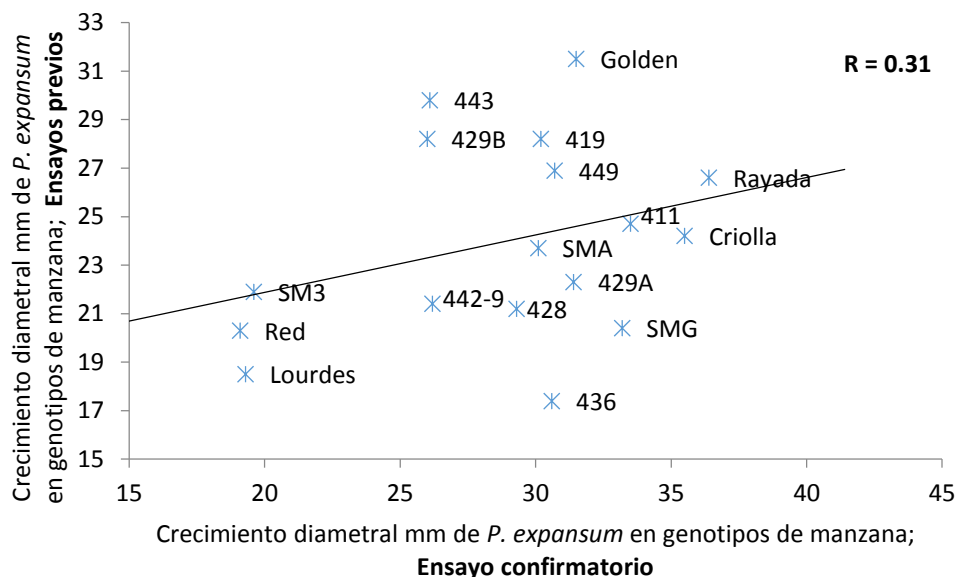


Figura 4.11. Correlación entre crecimiento diametral (mm) de *P. expansum* en genotipos al momento de la cosecha y almacenados a 4 °C

En resumen, a lo largo de este estudio se encontraron diversas variedades sobresalientes como '436', '442-9', 'Lourdes', 'Red Delicious', 'SM3', '429A' y '429B' con crecimientos diametrales del patógeno significativamente inferiores a 'Golden Delicious', aunque en ningún momento podemos hablar de resistencia y mucho menos inmunidad, simplemente se trata de diferencias en la sensibilidad del genotipo frente al patógeno.

En general, en 2012 se encontró en varios genotipos un menor diámetro de crecimiento del patógeno que en la evaluación realizada en 2011. Específicamente los genotipos que fueron catalogados como menos susceptibles a *P. expansum* en 2011: 449 (33 mm), 424 (31.9 mm), 468 (31.2 mm) y SM3 (26 mm) exhibieron incluso un mejor comportamiento en 2012 con diámetros de crecimiento inferiores (de 20.4, 27.4, 22.8 y 21.9 mm, respectivamente). Se piensa que estas diferencias de un año a otro pueden deberse a la estacionalidad cambiante y contrastes en el desarrollo del fruto durante los diferentes años de evaluación. Un ejemplo es la evaluación realizada por Soto en 2009 donde la variedad 'Lourdes' mostró un alto grado de tolerancia al patógeno, divergiendo de estudios realizados en 2011; no obstante, en estudios repetidos en 2012 este genotipo resultó tolerante al hongo, por lo que es importante continuar estudios para elucidar los mecanismos que pudiera activar éste al estar en contacto con *P. expansum*.

#### **4.5. Cambio en la expresión de diferentes genes como respuesta a la infección por *P. expansum* en genotipos de manzanas**

*P. expansum* es uno de los patógenos que causan considerables pérdidas en manzanas durante la poscosecha a nivel mundial. Por esta razón, recientemente se han realizado diferentes trabajos que lleven a desarrollar nuevas estrategias para combatir este tipo de enfermedades. Para lograr este objetivo es necesario conocer los mecanismos de defensa que los frutos pueden desarrollar una vez que se enfrentan a estreses tanto bióticos como abióticos (Buron-Moles *et al.*, 2015).

Partiendo de trabajos precedentes, en este trabajo se estudiaron 10 genes que han sido reportados como parte de las respuestas de defensa de los frutos a enfermedades en poscosecha y se observaron diferencias en su expresión a diferentes tiempos de incubación y entre tres diferentes genotipos con diferente grado de susceptibilidad a *P. expansum* ('436', 'Lourdes' menos susceptibles y 'Golden Delicious' más susceptible). Dichos genes fueron seleccionados y evaluados previamente por los grupos de investigación de Patología de la poscosecha del IRTA de Lleida, España (Vilanova *et al.*, 2013; Buron *et al.*, 2015) y del IATA de Valencia, España (Ballester., *et al* 2011). En primera instancia se evaluó la respuesta de los frutos al estrés biótico causado por el patógeno y en segunda, la respuesta a un estrés abiótico por la producción de heridas en las manzanas.

##### **4.5.1. Expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides**

En la Figura 4.12 se observa la diferencia en la expresión del gen *PAL1* en diferentes genotipos de manzana inoculados (PE 24h y PE 48h) y sin inocular (C 0h, C 24h, C 48h) con *P. expansum* a diferentes tiempos de incubación. Se detectan diferencias significativas entre los distintos tiempos de incubación, así como entre los tratamientos control con los inoculados con el patógeno. El genotipo '436' mostró la mayor expresión de *PAL1* en presencia del hongo después de 24 y 48 hpi (horas posteriores a la inoculación) de 4 y 11.5 veces más respectivamente con respecto al control lo cual podría

interpretarse como una activación de mecanismos de defensa en las primeras horas como respuesta al estrés biótico, recordemos que este genotipo fue el que mostró la menor susceptibilidad al hongo en los estudios realizados en 2012.

Por su parte, 'Lourdes' (cultivar poco susceptible al hongo) mostró un aumento en la expresión de *PAL1* a las 48 hpi (cuatro veces más con respecto al control), lo que podría indicar una activación tardía de este mecanismo en comparación con '436'. Se sabe que la fenilalanina amonioliasa está involucrada en el primer paso en la ruta de los fenilpropanoides y entre otras funciones, está involucrada en la formación de compuestos que refuerzan la pared celular como la lignina (Dixon *et al.*, 2002). Ballester *et al.* (2013) observaron un incremento en la expresión del gen *PAL1* de 20 veces más con respecto al tratamiento control en el flavedo de frutos de naranja como respuesta de defensa en frutos inoculados con *P. digitatum*. Vilanova *et al.* (2013) observaron un comportamiento similar en el nivel de expresión del gen *PAL1*, siendo mayor en manzanas 'Golden Delicious' en estado de maduración comercial e inoculadas con *P. digitatum* (interacción incompatible) que en aquellas que fueron inoculadas con *P. expansum* (interacción compatible) a 24 hpi, lo que sugiere que este último es capaz de suprimir las respuestas de defensa del fruto. A diferencia del estudio de Vilanova *et al.* (2013), en nuestro caso no se observó expresión del gen *PAL1* en la variedad 'Golden Delicious' en ninguno de los tiempos evaluados, lo que puede deberse a diferentes atributos de calidad de los frutos con base en las diferentes regiones donde se cosechan éstos, además del estado de madurez, sensibilidad de la variedad por cuestiones agronómicas, etc. Sin embargo, en nuestro estudio, dicha variedad mostró una alta sensibilidad al patógeno, pudiendo ser la razón por la que no se observa alguna activación de mecanismos de defensa contra el patógeno en comparación con los otros genotipos.

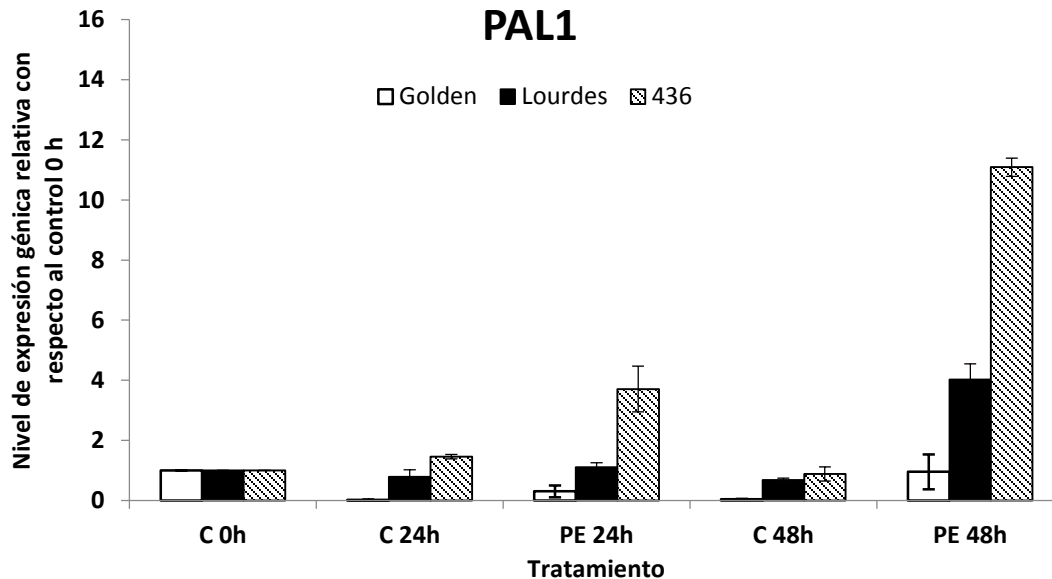


Figura 4.12. Niveles de expresión relativa del gen *PAL1* (Fenilalanina amonioliasa 1) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

En el caso del gen *POX64* (Figura 4.13) se observó un comportamiento similar al del gen *PAL1*, siendo que '436' mostró un aumento en la expresión de dicho gen a las 24 hpi (de cinco veces más) y a las 48 hpi (de 15 veces más) con respecto al tratamiento control. Se sabe que el gen *POX64* codifica para la enzima peroxidasa, la cual se encuentra principalmente relacionada con el estrés oxidativo pero también tiene funciones en la ruta de los fenilpropanoides para la síntesis de lignina (Vance *et al.*, 1980).

Vilanova *et al.* (2013), notaron un incremento en la expresión del gen *POX64* en manzanas 'Golden Delicious' como respuesta a *P. expansum* (compatible) y a *P. digitatum* (no-huésped). Asimismo, Ballester *et al.* (2013) observaron un incremento en la expresión del gen *POX1* en el flavedo de naranja como respuesta a la infección por *P. digitatum*.

Por el contrario, se observa una represión de la expresión de *POX64* en 'Lourdes' y 'Golden Delicious', tanto para los controles como para los tratamientos inoculados con



*P. expansum*, por lo que no podría atribuirse totalmente ésta represión a la interacción con el patógeno.

En nuestro caso podría ser que el gen *POX64* juega un papel importante en el mecanismo de defensa del genotipo '436' ya sea como parte del mecanismo oxidante o bien para la cicatrización por la formación de lignina.

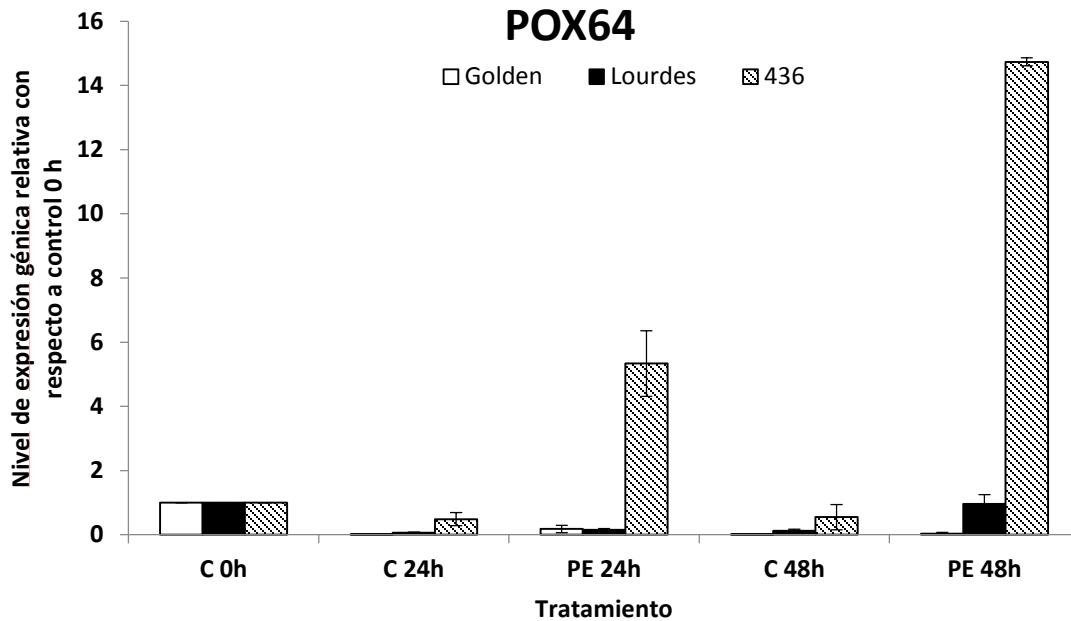


Figura 4.13. Niveles de expresión relativa del gen *POX64* (peroxidasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

Contrariamente a los resultados obtenidos para los genes *PAL1* y *POX64*, el gen *COMT2* fue suprimido en la mayoría de los tratamientos, excepto en '436' inoculadas con *P. expansum* a 24 y 48 hpi (Figura 4.14). En este caso no se observa una diferencia clara entre los tratamientos control y los inoculados con el hongo. A diferencia de lo ocurrido en este estudio Vilanova *et al.* (2013) encontraron una ligera sobreexpresión del gen *COMT2* en manzanas colectadas a una madurez comercial e inoculadas con *P. expansum* a diferencia de aquellas que fueron colectadas antes de su madurez comercial con un incremento de 40 veces más en la expresión de dicho gen a 48 hpi en comparación

con el control. Se sabe que los frutos cosechados antes de su madurez comercial son capaces de producir mayores niveles de lignina al ser expuestos a un estrés abiótico, como lo es la producción de una herida (Vilanova *et al.*, 2012a).

Por otro lado, Ballester *et al.* (2013) no observaron expresión del gen *COMT2* en el flavedo de frutos de naranja inoculados con *P. digitatum*, lo que coincide sensiblemente con este estudio. Sin embargo, si observaron un incremento en la expresión del gen *COMT1* después de 48 hpi.

Se sabe que el gen *COMT2* codifica para la enzima ácido cafeico O-metiltransferasa y se encuentra directamente involucrada con la producción de lignina.

Con respecto a este estudio, podría ser que otros genes de la familia de *OMT* (O-metiltransferasas) sean los que estén interviniendo en este metabolismo, o bien que en este caso no se centren los mecanismos de defensa en la producción de lignina.

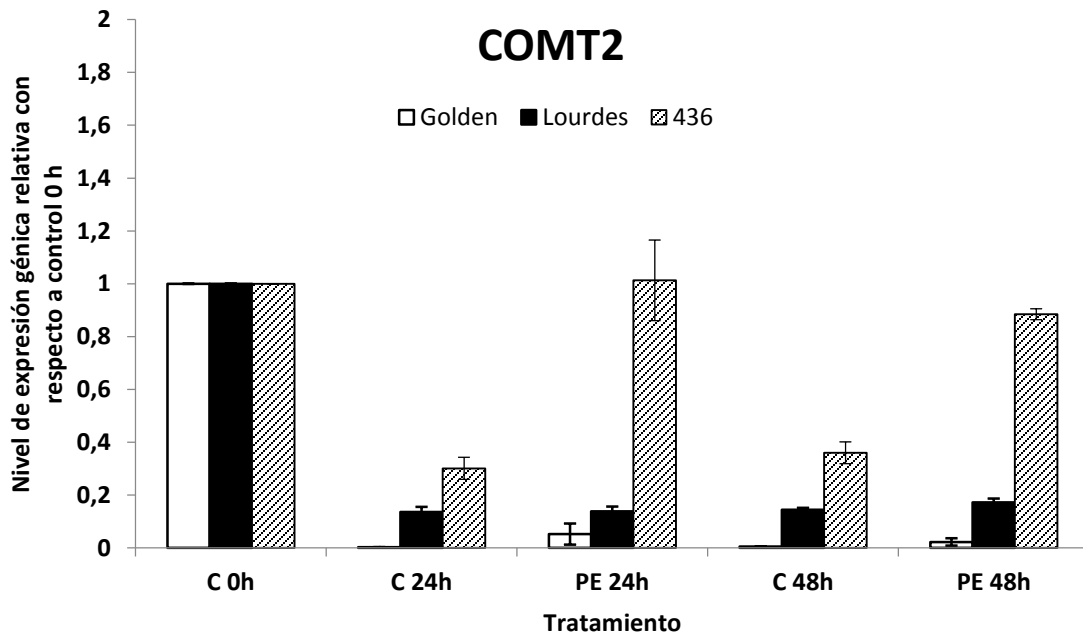


Figura 4.14. Niveles de expresión relativa del gen *COMT2* (ácido cafeico O-metiltransferasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

En la Figura 4.15 se muestran los resultados para la expresión del gen *CAD1* que codifica para la enzima cinamil alcohol deshidrogenasa. Se notaron diferencias entre los tratamientos inoculados con el patógeno y los que fueron únicamente inoculados con Tween 80 (0.05%). A las 24 hpi '436' mostró la mayor respuesta con siete veces más, seguido de 'Lourdes' con seis veces más en comparación con el tratamiento control. A las 48 hpi se observó un importante incremento en la expresión del gen, siendo esta vez 'Lourdes' la que mostró la mayor expresión (45 veces más con respecto al control 0 h) seguido de '436' (25 veces más en comparación con el control 0 h).

Entre otras funciones, la lignificación del tejido juega un papel importante en las respuestas de defensa de los frutos ante estreses bióticos y abióticos. La lignificación es un proceso complejo que involucra la participación de compuestos intermediarios como la enzima CAD (cinamil alcohol deshidrogenasa). Ésta enzima cataliza el paso final en la biosíntesis de la lignina (Jin *et al.*, 2014).

Ballester *et al.* (2013) no observaron incremento en la expresión del gen *CAD1* en la interacción naranja-*P. digitatum*. Sin embargo, si se dió un incremento en la expresión de los genes *CAD2* y *CAD3*.

Vilanova *et al.* (2013) no observaron sobreexpresión del gen *CAD1* en las manzanas que fueron inoculadas con *P. expansum* pero sí en aquellas inoculadas con *P. digitatum*. Esto podría deberse a que en interacciones compatibles el patógeno es capaz de suprimir la expresión de este gen. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, donde no se observó una inducción de este gen en la variedad 'Golden Delicious' y difirieron de los obtenidos con 'Lourdes' y '436' donde se indujo este gen a las 48 hpi coincidentemente con un menor desarrollo del patógeno en estos dos frutos.

## CAD1

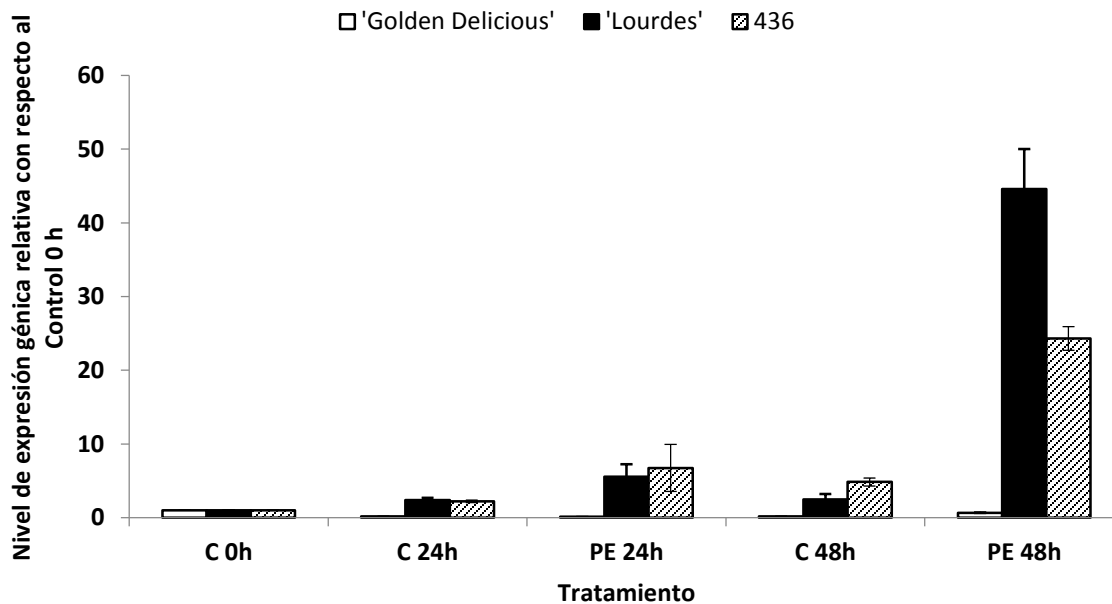


Figura 4.15. Niveles de expresión relativa del gen *CAD1* (cinamil alcohol deshidrogenasa 1) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación. Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

A diferencia del gen *CAD1*, la expresión del gen *CAD6* fue reprimida en todos los tratamientos, inoculados o no con *P. expansum* (Figura 4.16). En este caso, no se podría atribuir al patógeno la supresión de este gen.

El gen *CAD* es codificado por una familia multigénica y estos genes están distribuidos en diferentes clases de acuerdo con su árbol filogenético (Jin *et al.*, 2014). En diferentes trabajos se ha observado la expresión diferencial de estos genes de un sistema a otro de acuerdo con las funciones que desempeñan en las respuestas de defensa (Vilanova *et al.*, 2013; Ballester *et al.*, 2013).

## CAD6

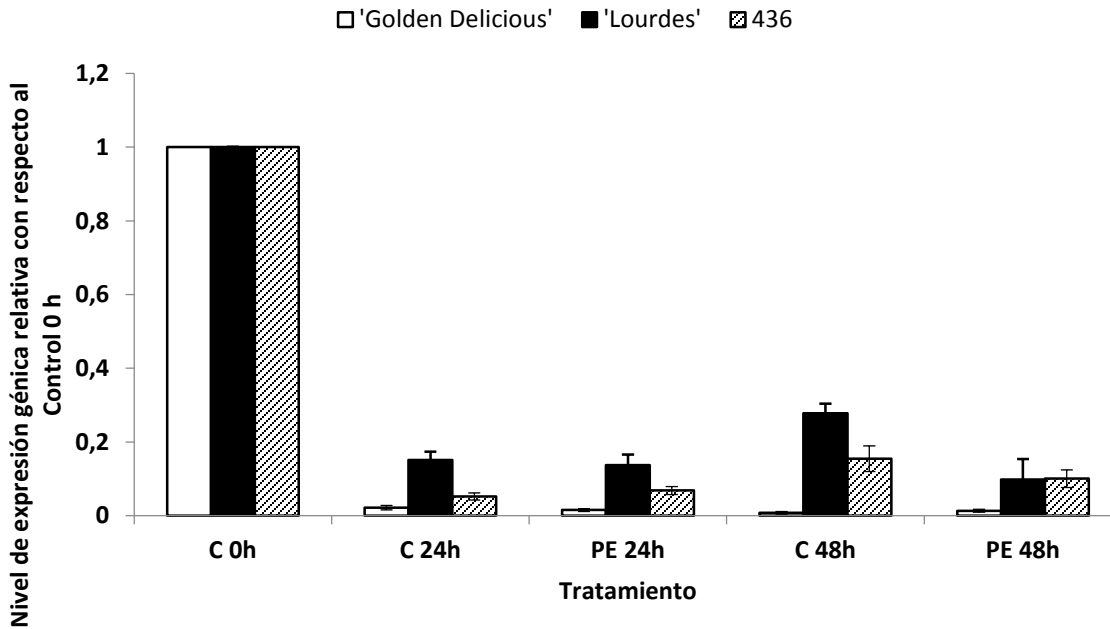


Figura 4.16. Niveles de expresión relativa del gen *CAD6* (cinamil alcohol deshidrogenasa 6) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

En este estudio observamos una ligera inducción del gen *CPR* en los tratamientos inoculados con el patógeno de 1.2 veces más que el control para 'Golden Delicious' y '436' y de 3.4 veces más para 'Lourdes' a 48 hpi. En los demás tratamientos por el contrario se observó la represión de la expresión de *CPR* (Figura 4.17).

El gen *CPR* codifica para la enzima NADPH citocromo P450 reductasa. El sistema de monooxigenasas conocido como citocromo P450 (CYP450) es un grupo de proteínas que presentan un grupo hemo y se caracterizan por utilizar el NADPH ó NADP<sup>+</sup> para reducir el oxígeno molecular, hasta H<sub>2</sub>O y la incorporación de un átomo de O<sub>2</sub> al sustrato (Omura y Sato, 1964).

En plantas, la familia del CYP450 está involucrada en el metabolismo oxidante de compuestos endógenos tales como fenilpropanoides y glucósidos cianogénicos, los cuales tienen una función en interacciones planta-patógeno (Durst, 1991). Por ello, el

complejo enzimático del CYP450 juega un importante papel en la tolerancia de las plantas a factores bióticos y abióticos.

Un ejemplo de la función de las enzimas del CYP450 en las plantas es la participación de la familia del CYP73 en la formación de monómeros de lignina así como otros compuestos de defensa (Schoch *et al.*, 2003). En este sentido, estudios sobre los genes CYP73A5, CYP73A9v1 y CYP82A1v1 presentes en plantas de *Arabidopsis* sp. y *Pisum sativum* (chícharo), señalan su participación en la biosíntesis de los fenilpropanoides, estimulando la síntesis *de novo* de fitoalexinas y lignina, lo que incrementa la resistencia y tolerancia a patógenos (Urban *et al.*, 1997; Whitbred y Schuler 2000).

Además, trabajos realizados por Schopfer y Ebel (1998) en plantas de soya (*Glycine max*) demostraron la participación de diversos genes que codifican para enzimas del CYP450, las cuales participan en la síntesis de la enzima cinamato-4-hidrolasa (CH4), que regula la conversión de ácido trans-cinámico a ácido p-cumárico y que es precursor de la gliceolina, compuesto fenólico de defensa contra patógenos.

En el caso de frutos, Ballester *et al.* (2011) observaron una inducción de los genes *CitocromoP450-79A2*, *CYP81E8* y *CYP82C1p* en naranjas tratadas con agua caliente y después inoculadas con *P. digitatum*, demostrando que estos genes juegan un importante papel como precursores para la formación de compuestos relacionados con la defensa en la ruta de los fenilpropanoides.

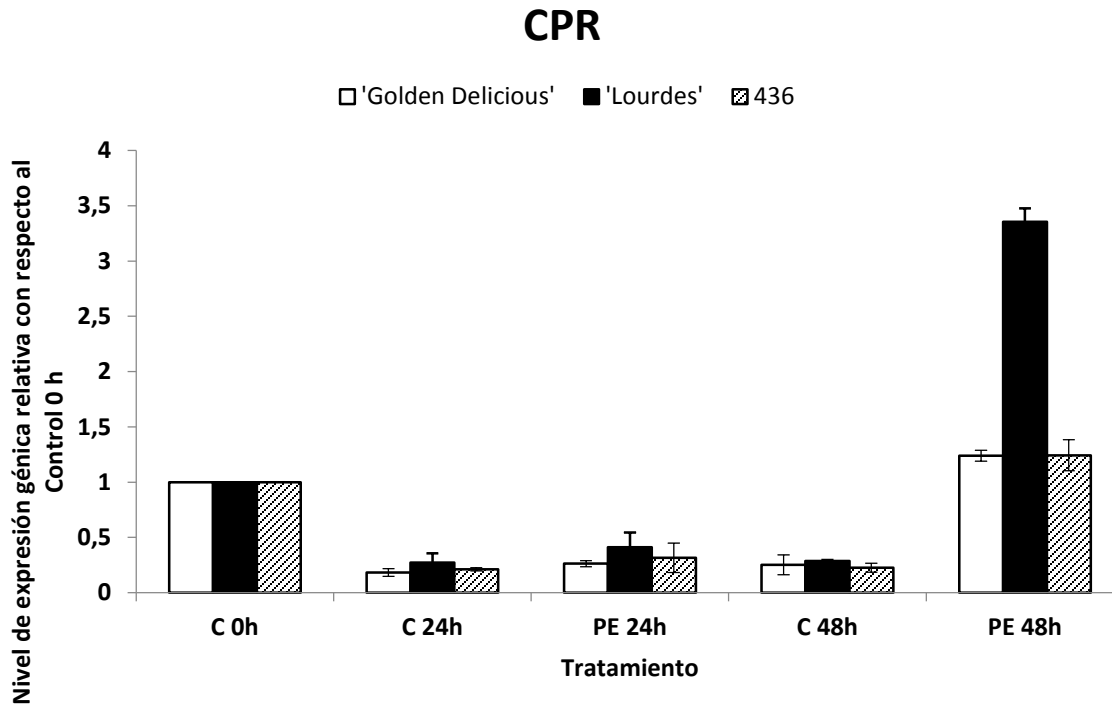


Figura 4.17. Niveles de expresión relativa del gen *CPR* (NADPH citocromo p450 reductasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

De manera general, se observó que la expresión los genes relacionados con la ruta de los fenilpropanoides incluidos en este estudio es reprimida en la interacción 'Golden Delicious'-*P. expansum*, lo que concuerda con la susceptibilidad al patógeno reportada en múltiples ensayos realizados previamente. Asimismo, se observan incrementos importantes en la expresión de los genes *PAL1*, *POX64*, *CAD1* y *CPR* para '436' y 'Lourdes' siendo mayor a las 48 hpi. Estos resultados nos dan idea de que estos dos últimos genotipos son capaces de desencadenar mecanismos de defensa una vez que detectan la presencia del patógeno en las primeras horas. No obstante, a pesar de este proceso, el patógeno es capaz de superar estas defensas y en horas posteriores termina por infectar exitosamente al fruto. La susceptibilidad o resistencia en una interacción huésped-patógeno puede estar determinada por el tiempo y la intensidad de las respuestas de defensa del huésped (Tao *et al.*, 2003).

#### 4.5.2. Expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogenicidad (proteínas PR)

En la Figura 4.18 se muestran los cambios observados en la expresión del gen *acChit* en los diferentes genotipos evaluados. La mayor expresión se encontró en los tratamientos inoculados con el hongo a las 24 hpi. A este tiempo, '436' mostró la mayor expresión del gen (11 veces más con relación al tratamiento control 0 h), sin embargo, en los frutos que fueron tratados con Tween 80 se observó también un incremento a las 24 hpi (10 veces más con relación al control 0 h), por lo que este resultado debería tomarse con reserva. Sorpresivamente, a las 48 hpi en este genotipo se observó un decremento en la expresión de este gen con relación al tiempo anterior, siendo sólo cinco veces mayor en comparación con el tratamiento control.

Con respecto a 'Lourdes', a las 24 hpi el gen se expresó 3.5 veces y a las 48 hpi seis veces más con respecto al control en los frutos que fueron inoculados con el hongo. Por otro lado, en los frutos de la variedad 'Golden Delicious' se observó la represión del gen.

Ballester *et al.* (2010) observaron un aumento en la actividad de la enzima glucanasa en flavedos de frutos de naranja inoculados con *P. expansum* seguidos de un tratamiento por curado a 37 °C durante tres días.

Quaglia *et al.* (2011) detectaron una inducción del transcrito *CHI* (quitinasa) en naranjas, y de *TAU* (taumatina) en manzanas tratadas con los ABC y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, respectivamente. Por su parte, Hershkovitz *et al.* (2012) observaron la inducción del gen *CHI* en toronjas inoculadas con *Metschnikowia fructicola*. Por otro lado, Vilanova *et al.* (2013) observaron que la inoculación con *P. expansum* en manzanas induce la expresión de genes que codifican para un gran número de proteínas PR en comparación con los frutos inoculados con *P. digitatum*. Estos incluyeron CHI, EGL (endoglucanasa), TAU y DEFL (por sus siglas en inglés "Defensin-like protein 2"). Finalmente, Buron-Moles *et al.* (2014) encontraron una correlación entre el incremento en la cantidad de taumatina y la respuesta de frutos de manzana heridos.

Se sabe que las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas presentan la capacidad de degradar la pared celular de hongos que está compuesta principalmente por  $\beta$ -1,3-



glucano y quitina Van Loon *et al.* ( 2006). Las proteínas PR tienen una localización celular dual: aquellas de carácter ácido son proteínas extracelulares y las básicas se encuentran dentro de las vacuolas, siendo estas últimas las que presentan mayor efecto inhibitorio contra los patógenos (Joosten *et al.*, 1995). La producción de este tipo de enzimas puede jugar un importante papel en la reducción de la incidencia de los hongos que causan pérdidas en poscosecha.

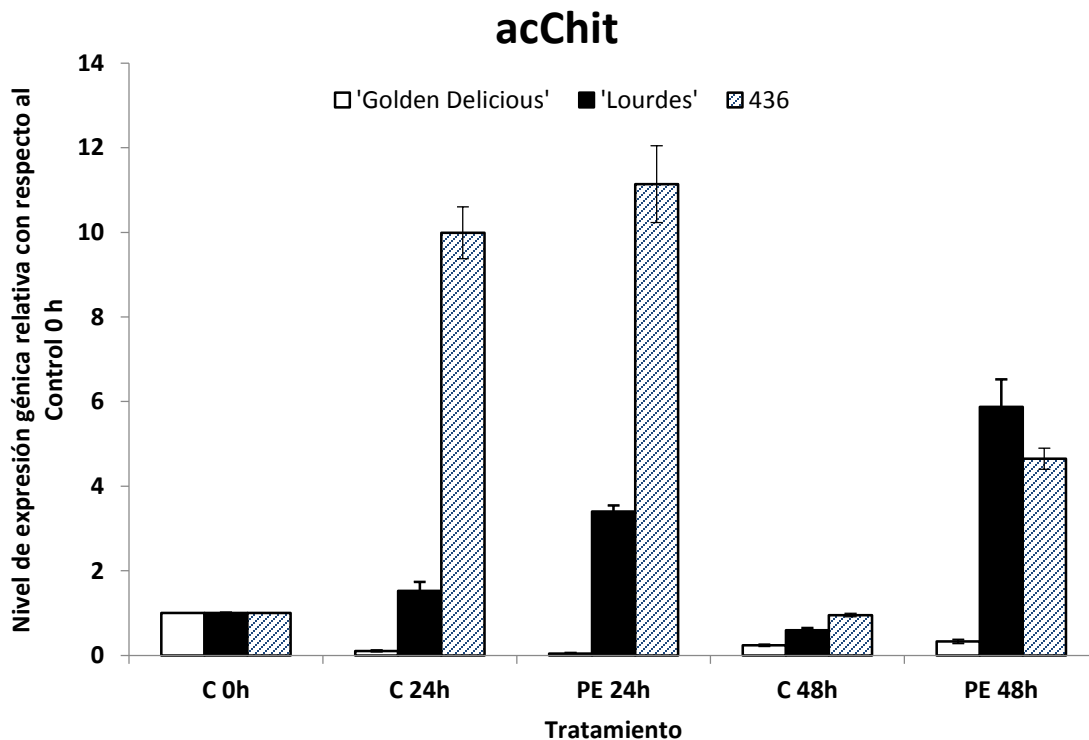


Figura 4.18. Niveles de expresión relativa del gen *acChit* (endoquitinasa ácida) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

Se sabe que el gen *Mal d 1.03E* pertenece a una familia de multigenes que codifican para proteínas relacionadas con muchos procesos principalmente de estreses, tanto bióticos como abióticos en las plantas. En general se observan diferencias entre los tratamientos que fueron inoculados con *P. expansum* y los inoculados con Tween 80

(Figura 4.19). La mayor expresión del gen *Mal d 1.03E* se observa a las 48 hpi en los tratamientos inoculados con el hongo.

En el caso de 'Golden Delicious' (variedad susceptible) nuevamente no se observó inducción alguna del gen *Mal d 1.03E* como respuesta a ninguno de los dos tipos de estrés (biótico o abiótico); mientras que en 'Lourdes' se observa una sobreexpresión de siete veces más que el control a las 24 hpi, misma que se incrementó de manera notable a las 48 hpi con 35 veces más que el control.

La variedad '436' mostró la mayor expresión de *Mal d 1.03E* aumentando nueve veces más que el control a 24 hpi y 17.3 veces más a las 48 hpi.

En estudios de proteómica en manzana, Buron-Moles *et al.* (2015) observaron que la proteína Mal d 1.03E fue inducida específicamente en respuesta a la inoculación con *P. digitatum* a las 48 hpi; mientras que, en estudios de expresión por RT-qPCR el gen *Mal d 1.03E* fue inducido desde que el fruto fue herido y en respuesta a *P. expansum* y *P. digitatum*. Sin embargo, la mayor expresión fue observada por estos autores cuando los frutos fueron inoculados con *P. digitatum*. Lo que sugiere que este gen se encuentra asociado con interacciones no-huésped.

En el caso de la manzana, la proteína Mal d 1 forma parte de una familia compleja de multigenes que incluye al menos 20 diferentes. Estos genes se han clasificado en cuatro subfamilias basándose en la presencia o ausencia de intrones y su longitud (Gao *et al.*, 2005). Por esta razón, diferentes genes que codifican para proteínas *Mal d 1* se expresan en diferentes tipos de estreses, por lo que se requieren más estudios encaminados a elucidar el papel que juegan estas proteínas en las respuestas de defensa de la manzana.

## Mal d

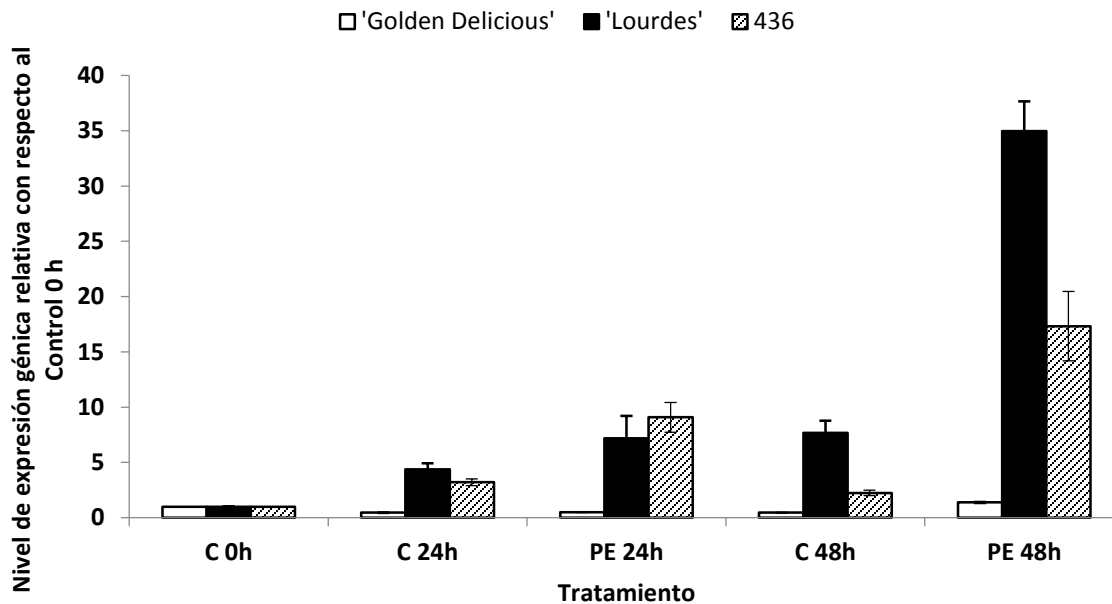


Figura 4.19. Niveles de expresión relativa del gen *Mal d 1.03E* en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

Con respecto a las proteínas PR, se observó el mismo comportamiento descrito anteriormente para 'Golden Delicious' donde no hubo inducción de ninguno de los genes descritos mientras que '436' y 'Lourdes' mostraron sobreexpresión de éstos a las 24 y 48 hpi. Estos resultados muestran una regulación diferencial de genes que han sido reportados en respuestas de defensa que codifican para proteínas PR en función de los genotipos evaluados. Las proteínas PR han sido definidas como parte de organismos vegetales que son activadas específicamente en situaciones de patogenicidad o situaciones similares. Las proteínas PR de plantas son representadas por 17 familias que incluyen glucanasas, quitinasas, taumatinas, peroxidasas y defensinas algunas de las cuales han sido mencionadas anteriormente (Van Loon y Van Strien, 1999).

### 4.5.3. Expresión de otros genes relacionados con la respuesta de defensa

El gen *CAT* codifica para la síntesis de la enzima catalasa, relacionada con el mecanismo antioxidante. En general, se ha observado que esta enzima puede estar involucrada en el proceso de interacción fruto-patógeno, degradando  $H_2O_2$  producido a oxígeno y agua durante la primera fase de la infección. Se sabe que una de las primeras respuestas en este tipo de interacciones es la explosión oxidativa donde se producen ROS y a su vez este mecanismo está regulado por diferentes enzimas entre las que se encuentra la *CAT*. En este estudio no se observó una actividad importante de este gen en el proceso infeccioso a los tiempos de incubación evaluados (Figura 4.20). Sólo en los frutos de 'Lourdes' se observó una ligera sobreexpresión de *CAT* (1.3 veces más comparada con el tratamiento control a 48 hpi). En la mayoría de los tratamientos se observa por el contrario la represión de la expresión del gen comparados con el control. No obstante, si observamos a detalle, a las 24 hpi se advierten mayores valores para 'Golden Delicious' y '436' en los frutos inoculados con Tween 80, lo que sugiere que el patógeno está ejerciendo algún mecanismo determinado encaminado a reprimir la desintoxicación, lo cual le resulta conveniente para su desarrollo si recordamos que *P. expansum* es un hongo necrótrofo que se alimenta del material putrefacto.

Torres *et al.* (2003) observaron un incremento en la actividad de las enzimas *CAT* y *APX* en frutos de manzana provenientes de una cosecha tardía heridos o inoculados con *P. expansum*, mientras que frutos provenientes de cosecha temprana (menos susceptibles al hongo) mostraron mayores niveles de  $H_2O_2$  y *SOD*.

En naranjas inoculadas con *P. digitatum* e incubadas durante cinco días a 20 °C, se observó una mayor actividad de las enzimas *CAT* y *APX* en el flavedo sano, misma que disminuyó conforme avanzó la infección con el hongo (Ballester *et al.*, 2006).

Vilanova *et al.* (2013) observaron un incremento en la expresión de genes que codifican para enzimas desintoxicantes de ROS como *SOD*, *APX* y *POX* en manzanas inoculadas con *P. expansum*. El balance entre los niveles de ROS y de enzimas desintoxicantes es crucial para el control en la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  (Mittler *et al.*, 2004).

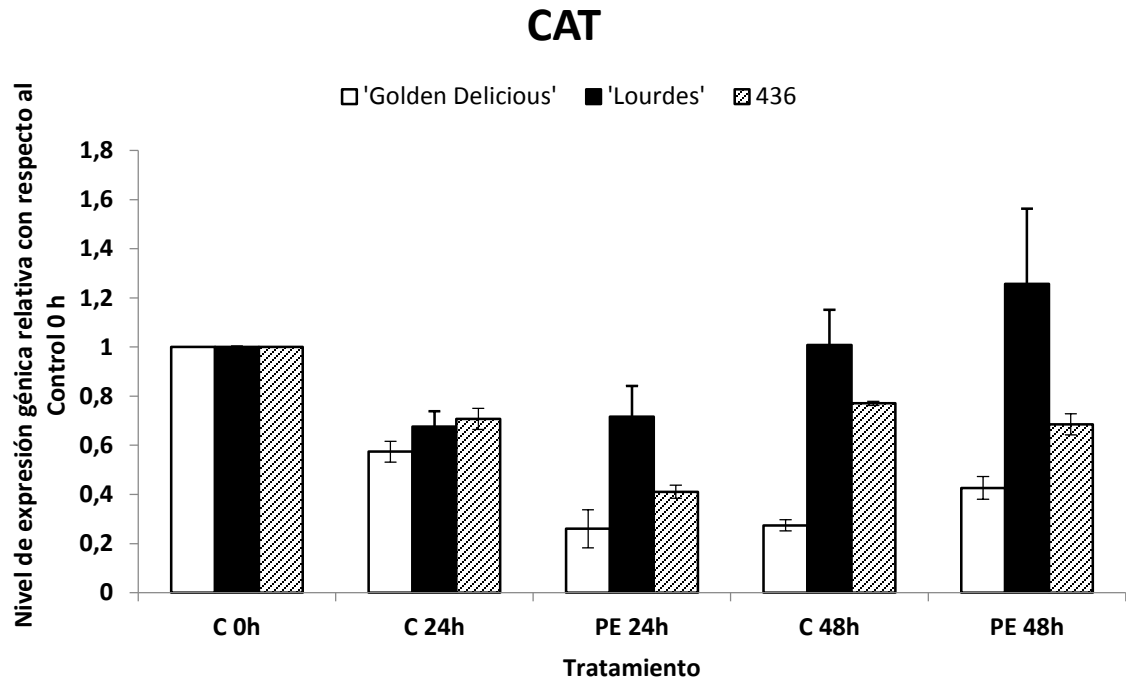


Figura 4.20. Niveles de expresión relativa del gen *CAT* (Catalasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

Finalmente, en este estudio se evaluó la expresión del gen *ACO* (Figura 4.21) que codifica para la enzima ACC oxidasa, la que a su vez cataliza el último paso en la biosíntesis de etileno. En este caso para 'Golden Delicious' y '436' se observó que en todos los tratamientos la expresión de este gen fue reprimido.

Sin embargo, en la variedad 'Lourdes' se observó una ligera expresión de 1.3 veces más que el control a las 24 hpi, pero éste no fue superior en comparación con el tratamiento con Tween 80 a este mismo tiempo, el cual mostró una expresión de 2.3 veces más que el control. Sin embargo, a las 48 hpi se observa un incremento notable en la expresión del gen *ACO* en los frutos que fueron inoculados con el hongo de cinco veces más en comparación con el control.

El etileno regula la inducción de genes relacionados con las respuestas de defensa contra patógenos, entre éstos se encuentran varios que codifican para  $\beta$ -1,3-

glucanasas y quitinasas básicas, PR-1 y proteínas ricas en hidroxiprolinas (Ecker, 1995). En trabajos previos se demostró que la infección de frutos cítricos con *P. digitatum* induce la producción de etileno y la expresión de genes involucrados en la síntesis de dicho compuesto, así como de fenilpropanoides (Achilea *et al.*, 1985a; Marcos *et al.*, 2005). En frutos infectados, el etileno producido proviene tanto del fruto como del patógeno (Achilea *et al.*, 1985a,b). En este estudio se observa una sobreexpresión del gen ACO únicamente en 'Lourdes' a diferencia de '436' que resultó ser la menos susceptible en los ensayos de patogeneicidad con el hongo.

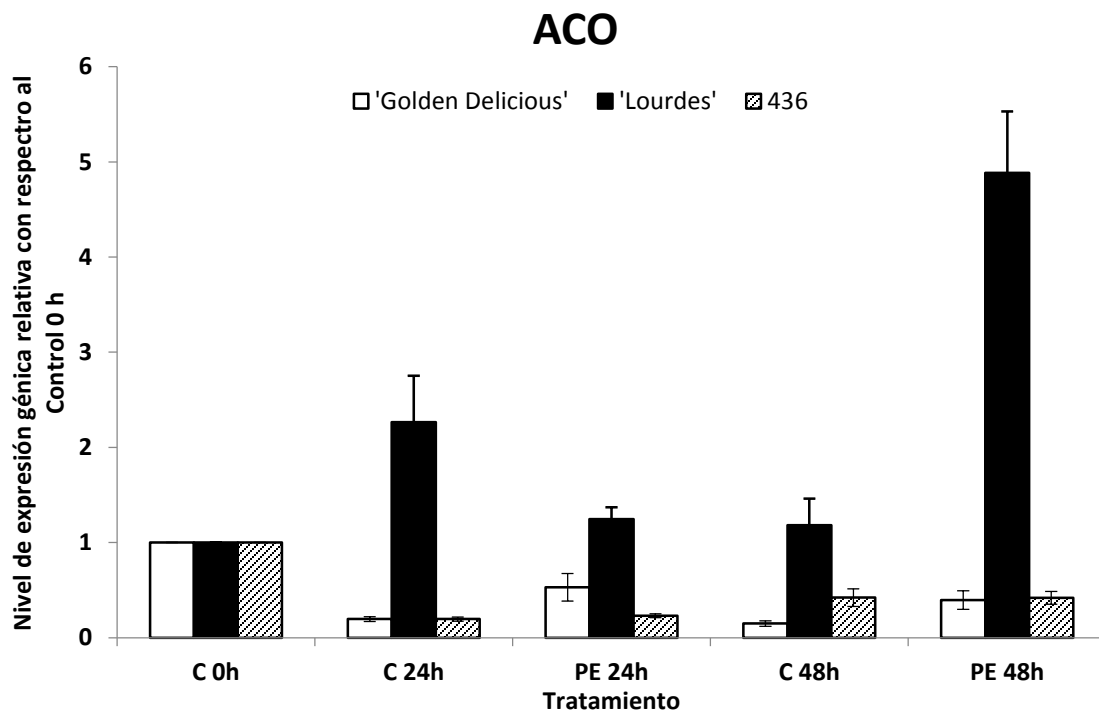


Figura 4.21. Niveles de expresión relativa del gen *ACO* (Acc oxidasa) en diferentes genotipos de manzana inoculados con *P. expansum* (PE) o Tween 80 a 0.05% (C) en diferentes tiempos de incubación

Los valores son relativos al nivel de expresión de las muestras control a 0 h definido como 1. Las líneas verticales representan el error estándar de tres replicas biológicas.

Las interacciones planta-patógeno suelen ser complejas y constituyen la expresión de múltiples genes que determinan la habilidad de los patógenos para causar

enfermedad, o los que son capaces de impedir el desarrollo de tales patógenos (Zhang *et al.*, 2013). En este estudio se observó la expresión diferencial entre '436' o 'Lourdes', lo que puede deberse a que en un sistema se expresan ciertos genes, pudiendo no ser los mismo que se expresan en el otro en las primeras 48 hpi. Con los resultados mostrados podría pensarse que la susceptibilidad que muestra la variedad 'Golden Delicious' en este trabajo puede deberse a que es incapaz de desencadenar mecanismos de defensa efectivo durante las primeras horas. Se sabe que la efectividad de los mecanismos de defensa depende del tiempo y la amplitud de su activación (Pozo *et al.*, 2004).

## 4.6. Evaluación de modos de acción de ABC

### 4.6.1. Ensayos de antagonismo a *P. expansum* de distintas levaduras previamente seleccionadas en 2011

En 2011 se realizaron nuevas pruebas para las cepas que previamente se habían seleccionado de trabajos anteriores por mostrar comportamiento antagónico sobresaliente a *P. expansum* en manzana (*C. incomunis*, 18<sup>-1</sup><sub>x</sub>, 22<sup>-2</sup><sub>5b</sub>) y a *F. stilboides* en frutos de pimiento (3dRMA<sub>3</sub>) (Sánchez *et al.*, 2008; Sandoval *et al.*, 2011).

#### 4.6.1.1. Efecto de la cepa de levadura

Para el ensayo que se realizó a 25 °C no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las diferentes cepas evaluadas; sin embargo, a 0 °C la cepa 3dRMA<sub>3</sub> inhibió 61% el desarrollo del patógeno (10.8 mm vs 27.7 mm en el testigo) (Tabla 4.8) seguido de la cepa *C. incommunis* que lo inhibió en 28% (20.1 mm) después de 30 d de incubación.

Sánchez *et al.* (2008) reportaron que a 26 °C, *C. incommunis* inhibió el crecimiento diametral del hongo en 23% después de 12 d de incubación, mientras que en pimiento redujo la infección causada por *F. stilboides* en 53% a 12 d (Sandoval, 2011).

En la Tabla 4.4 también se aprecia que para el caso de la incidencia, al igual que con la severidad a 25 °C no se observaron diferencias significativas mientras que, a temperatura de almacenamiento (4 °C) 3dRMA<sub>3</sub> tuvo la menor incidencia del daño por el patógeno (15.3%) en comparación con las demás cepas y con el testigo (80.6%).



Tabla 4.4. Crecimiento diametral e incidencia de *P. expansum* en manzanas tratadas con diferentes cepas antagónicas en diferentes condiciones de almacenamiento

Cepa	Severidad (mm)		Incidencia (%)	
	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C
<b>22<sup>-2</sup><sub>5b</sub></b>	34.0 a	24.6 b	100 a	64.5 b
<b>18<sup>-1</sup><sub>x</sub></b>	33.6 a	25.2 c	99.8 a	74.8 b
<b>3dRMA<sub>3</sub></b>	34.8 a	10.9 a	99.5 a	15.3 a
<b><i>C. incomunis</i></b>	35.2 a	20.1 ab	100 a	67.5 b
<b>Testigo</b>	36.32	27.78	100	80.6
<sup>3</sup> CV	6.03	18.74	8.1	23.1
Valor "F"	1.11 NS	27.54***	0.7 NS	20.9***
<sup>2</sup> DMS	2.69	4.92	9.3	14.5

<sup>1</sup>Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos Tukey ( $P \leq 0.05$ ); <sup>2</sup>Diferencia mínima significativa; <sup>3</sup>Coeficiente de variación; Para el análisis de la incidencia los promedios se transformaron a grados angulares ( $\arcsen \sqrt{x}$ ) en la tabla se expresan en términos de la variable original; Promedios obtenidos de 36 datos individuales (tres repeticiones con doce lesiones cada una); \*\*\*Significancia estadística a una  $P \leq 0.001$ ; \*\* Significancia estadística a una  $P \leq 0.01$ ; \* Significancia estadística a una  $P \leq 0.05$ ; NS No significativo.

#### 4.6.1.2. Efecto de la concentración del inóculo

A cuatro días de incubación a 25 °C la concentración del patógeno de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> propició una mayor inhibición en el diámetro de crecimiento del patógeno en comparación con los demás niveles evaluados ( $10^6$  y  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>), siendo ésta de 17% con respecto al testigo (16.8 mm vs 20.4 mm) (Tabla 4.5). A 8 d no se encontraron diferencias entre tratamientos.

En condiciones de almacenamiento convencional (4 °C), nuevamente el tratamiento con las diferentes cepas a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> inhibió más al patógeno que  $10^6$  y  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> y con relación al testigo (18.4 mm vs 27.8 mm) a 30 d de incubación.

Estos resultados indican que a mayor concentración del inóculo menor crecimiento del patógeno. Zhang *et al.* (2011) probaron diferentes niveles de inóculo

de *P. guilliermondii* contra *Botrytis cinerea* y observaron que a  $10^7$  células mL<sup>-1</sup> el diámetro de lesión fue de 17.6 mm mientras que a  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> se inhibió completamente el desarrollo del hongo.

Tabla 4.5. Crecimiento diametral (mm) de *P. expansum* en manzana en presencia de levaduras a diferentes concentraciones y condiciones de almacenamiento

Nivel de inóculo (UFC mL <sup>-1</sup> )	25 °C		4 °C
	4 d	8 d	30 d
<b>10<sup>7</sup></b>	16.8 <sup>1</sup> a	33.1 a	18.4 a
<b>10<sup>6</sup></b>	18.1 ab	34.9 a	19.2 ab
<b>10<sup>5</sup></b>	18.4 b	35.2 a	22.9 b
<b>Testigo</b>	20.4	36.3	27.8
<sup>3</sup> CV	8.3	6.0	18.7
<sup>2</sup> DMS	1.5	2.1	3.9
Valor “F”	3.9*	3.5 NS	4.7*
Valor “F” LxN	1.3 NS	0.4 NS	5.2**

<sup>1</sup>Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos Tukey ( $P \leq 0.05$ ); <sup>2</sup>Diferencia mínima significativa; <sup>3</sup>Coefficiente de variación; Promedios obtenidos de 36 datos individuales (tres repeticiones con doce lesiones cada una); \*\*\*Significancia estadística a una  $P \leq 0.001$ ; \*\* Significancia estadística a una  $P \leq 0.01$ ; \* Significancia estadística a una  $P \leq 0.05$ ; NS No significativo.

#### 4.6.1.3. Interacción levadura x cepa

En la Figura 4.22 se observa el comportamiento del crecimiento diametral de *P. expansum* en función de distintas levaduras a diferentes niveles de inóculo. Las levaduras 18<sup>-1</sup><sub>x</sub>, 22<sup>-2</sup><sub>5b</sub> y *C. incomunis* tuvieron sensiblemente el mismo efecto sobre *P. expansum* en las tres dosis aplicadas, mientras que 3dRMA<sub>3</sub> tuvo un mayor efecto antagónico a  $10^6$  y  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

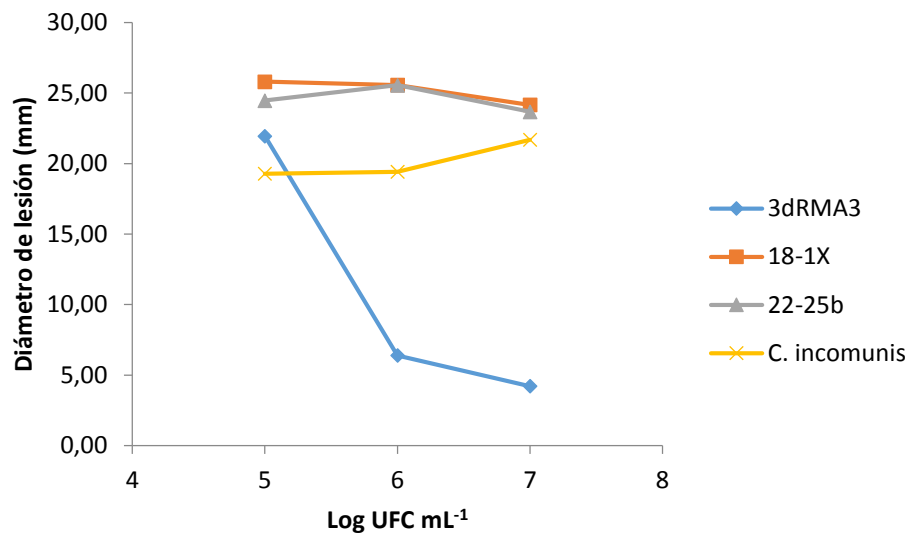


Figura 4.22. Interacción entre el nivel de inóculo de cuatro cepas de levaduras y la severidad de *P. expansum* a 30 d de almacenamiento a  $4 \pm 2$  °C

Valor "F"=5.22\*\*

Con respecto a la incidencia no se encontraron diferencias entre los diferentes niveles de inóculo evaluados a 25 y 4 °C, lo que implica que en todos los frutos desarrolló el patógeno (Tabla 4.6). Sin embargo haciendo una comparación con el testigo los tratamientos redujeron la incidencia en 19.3% a  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, 35.1% a  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> y 39.3% a  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Tabla 4.6. Incidencia (%) de *P. expansum* en manzana en presencia de levaduras a diferentes concentraciones y condiciones de almacenamiento.

Nivel de inóculo (UFC mL <sup>-1</sup> )	25 °C		4 °C
	4 d	8 d	30 d
10 <sup>7</sup>	99.7 <sup>1</sup> a	99.9 a	48.9 a
10 <sup>6</sup>	100 a	100 a	52.3 a
10 <sup>5</sup>	99.7 a	99.7 a	65 a
<b>Testigo</b>	100	100	80.6
<sup>3</sup> CV	9.4	8.1	23.1
<sup>2</sup> DMS	8.5	7.3	11.3
Valor "F"	0.5 NS	0.5 NS	2.4 NS
Valor "F" LxN	1.2 NS	1.2 NS	1.8 NS

<sup>1</sup>Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos Tukey (P≤0.05); <sup>2</sup>Diferencia mínima significativa; <sup>3</sup>Coeficiente de variación; Para el análisis de la incidencia los promedios se transformaron a grados angulares ( $\arcsen\sqrt{x}$ ) en la tabla se expresan en términos de la variable original; Promedios obtenidos de 36 datos individuales (tres repeticiones con doce lesiones cada una); \*\*\*Significancia estadística a una P≤0.001; \*\* Significancia estadística a una P≤0.01; \* Significancia estadística a una P≤0.05; NS No significativo.

#### 4.6.1.4. Dinámica poblacional

La población de las levaduras (almacenadas a 25 ± 2 °C) 22<sup>-2</sup><sub>5b</sub>, 18<sup>-1</sup><sub>x</sub> y 5vtt se redujo gradualmente desde el primer día de incubación, disminuyendo hasta 2 logaritmos en el caso de la primera, mientras que la población de 3dRMA<sub>3</sub> se incrementó en el primer día, reduciéndose en los días siguientes (Figura 4.23); sin embargo, ninguna de las levaduras mostró el comportamiento antagónico que se esperaba, contrastando con los resultados obtenidos por Viñas *et al.* (1998) con una cepa de *Candida sake* que incrementó durante los primeros días hasta dos logaritmos. En este caso puede ser que las levaduras no se adaptaron a las condiciones evaluadas y no hubo reproducción de la población. Sin embargo fueron capaces de sobrevivir hasta 7 d de incubación por lo que se les podría atribuir cierta estabilidad en cuanto a condiciones de almacenamiento.

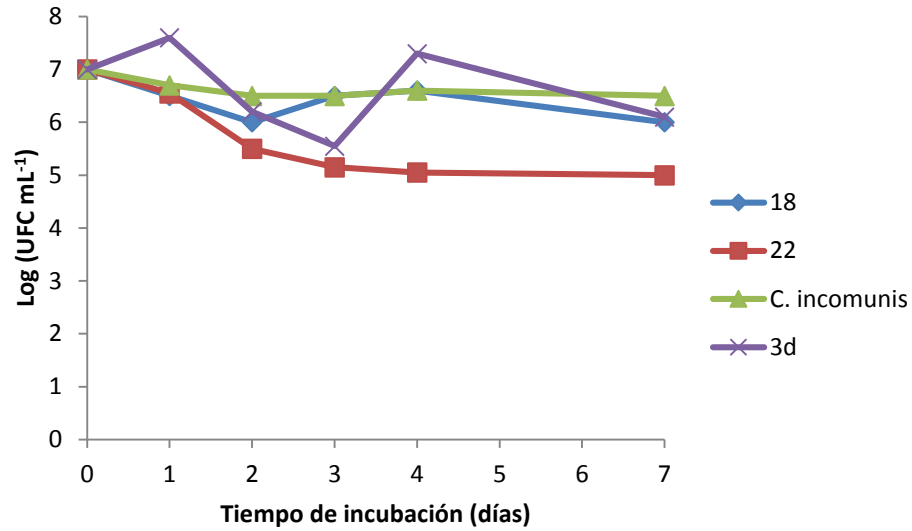


Figura 4.23. Comportamiento de cepas de levaduras inoculadas en heridas de manzanas incubadas a  $25 \pm 2$  °C por siete días

En el caso de las manzanas inoculadas con las cepas y almacenadas a  $4 \pm 2$  °C se observó un comportamiento inestable de las cepas destacando 18<sup>-1</sup>x y 5vt que a 45 d de incubación incrementaron drásticamente su población (Figura 4.24).

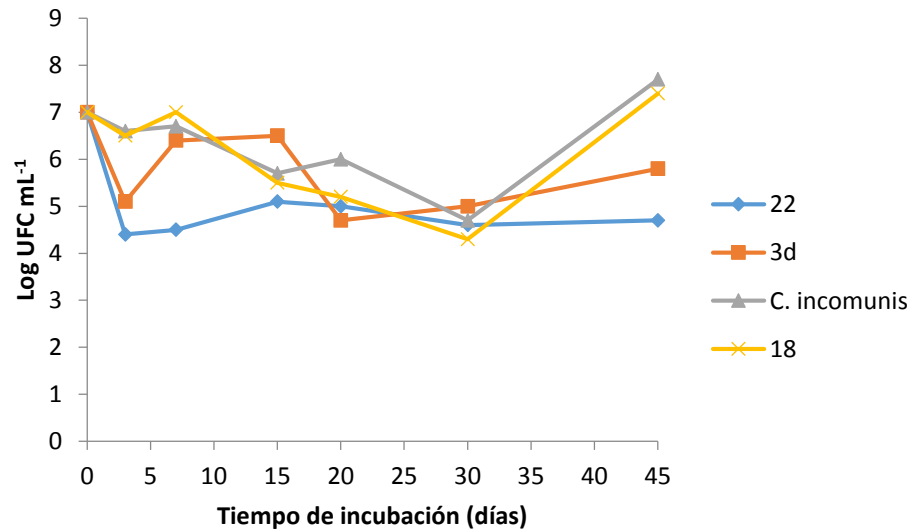


Figura 4.24. Comportamiento de cepas de levaduras inoculadas en heridas de manzanas incubadas a  $4 \pm 2$  °C por 45 d

#### 4.6.2. Selección de nuevas cepas de levaduras con potencial antagónico en 2012

Debido a que las cepas de levaduras con la que se estuvo trabajando no mostraron el mismo potencial antagónico por el cual se habían seleccionado en estudios previos, se decidió realizar una nueva selección. Ésta se realizó a partir de frutos que se mantuvieron en condiciones de almacenamiento convencional durante un año, seleccionando aquellos frutos que mostraran los menores daños.

Se aisló un total de 420 cepas, de las cuales se probaron 388 en distintos experimentos en frutos contra *P. expansum* y al final se seleccionaron 71 para una prueba confirmatoria que se llevó a cabo en dos partes.

En la Tabla 4.7 se muestran los resultados del primer ensayo confirmatorio. Se encontraron varias cepas con una relativamente elevada capacidad antagónica al patógeno, entre ellas 2R, B54, B30, B33, B39, M18/3B, H03, M18/3A, B38 y A99 que inhibieron desde 40.5 a 56.7% el crecimiento diametral del hongo en comparación con el testigo y de 64.6 a 81.3% en área.

Tabla 4.7. Diámetro de crecimiento de *P. expansum* en función de levaduras utilizadas como ABC (Ensayo 1)

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm <sup>2</sup> )	% de Inhibición en área
2R	13.6 a	56.7	144.6	81.3
B54	15.5 ab	50.5	189.5	75.5
B30	16.0 abc	49.1	200.2	74.1
B33	16.3 abcd	47.9	209.5	72.9
B39	16.8 abcde	46.4	221.7	71.3
M18/3B	17.6 abcde	44.0	242.4	68.6
H03	17.9 abcdef	42.9	251.7	67.4
M18/3A	18.1 abcdef	42.3	257.3	66.7
B38	18.1 abcdef	42.2	258.3	66.6
A99	18.7 bcdef	40.5	273.7	64.6
M12 A	19.3 bcdefg	38.5	292.6	62.1
A27	19.9 bcdefgh	36.7	310.0	59.9
M11/2B	20.6 cdefghi	34.4	332.2	57.0

M16/2A	20.6	cdefghi	34.3	333.3	56.9
B34	20.7	cdefghij	34.0	336.5	56.4
Mora	20.9	defghij	33.3	344.2	55.5
M75 B	21.1	defghij	32.6	350.8	54.6
M15/4A	21.5	efghijk	31.6	361.9	53.2
B86	22.7	fghijkl	27.7	403.5	47.8
B35	22.7	fghijkl	27.5	405.9	47.5
B32	23.7	ghijklm	24.5	439.9	43.1
D34	23.7	ghijklm	24.4	441.2	42.9
A60	23.8	ghijklmn	24.0	446.1	42.3
B37	23.8	ghijklmn	24.0	446.1	42.3
B36	23.9	ghijklmn	23.9	447.4	42.1
H99	24.0	ghijklmn	23.5	452.4	41.5
D53	24.4	hijklmn	22.1	468.9	39.3
A25	24.8	ijklmn	20.9	483.1	37.5
A94	24.9	ijklmn	20.7	485.7	37.2
M53	25.0	ijklmn	20.3	490.9	36.5
A20	25.4	ijklmn	19.1	505.4	34.6
A22	25.5	jklmn	18.7	510.7	33.9
H55	26.1	klmn	16.9	533.7	30.9
33	26.1	klmn	16.7	536.4	30.6
H94	26.2	klmn	16.4	540.5	30.1
M20/A	26.3	klmn	16.3	541.9	29.9
H39	27.4	lmno	12.8	588.2	23.9
A24	28.0	mno	10.8	614.3	20.5
B31	28.6	no	8.7	643.9	16.7
Testigo	31.4	o	-	772.7	-

<sup>2</sup>DMS (Student) 5.8

Valor "F" : 1.96\*

<sup>1</sup>Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos Student ( $P \leq 0.05$ ); Promedios obtenidos de 12 datos individuales (tres repeticiones con cuatro lesiones cada una).

Asimismo, en el ensayo confirmatorio 2 (Tabla 4.8.), las cepas H54, H10, H28, H50, H25 y A32 inhibieron el diámetro de crecimiento del patógeno con porcentajes de 40.9 a 45.9 y 65 a 70.7 en área con respecto al testigo. Por lo anterior, se puede considerar a estas levaduras como agentes de biocontrol para ser utilizadas en estudios posteriores.

Tabla 4.8. Diámetro de crecimiento de *P. expansum* en función de levaduras utilizadas como ABC (Ensayo 2)

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm <sup>2</sup> )	% de Inhibición en área
H54	17.4 a	45.9	237.8	70.7
H10	17.8 ab	44.7	247.9	69.4
H28	17.9 ab	44.3	251.2	69.0
H50	18.3 abc	42.9	264.0	67.4
H25	19.0 abcd	41.0	282.5	65.2
A32	19.0 abcd	40.9	283.5	65.0
H40	19.9 abcde	38.2	310	61.8
81	20.9 abcdef	34.9	344.2	57.6
H57	21.3 abcdef	33.7	356.9	56.0
M20/2A	21.4 abcdef	33.3	360.5	55.5
A31	21.8 abcdefg	32.2	373	54.0
M17/1A	21.8 abcdefg	32.2	373.3	54.0
H52	21.9 abcdefg	32.0	375.5	53.7
H56	22.1 abcdefg	31.2	383.6	52.7
D25	22.2 abcdefg	31.0	385.6	52.4
H53	22.2 abcdefg	30.9	387.1	52.3
B86	22.3 bcdefg	30.5	391.2	51.8
H27	22.6 bcdefgh	29.6	402.3	50.4
A35	22.9 cdefgh	28.6	413.1	49.1
M15/1A	23.0 cdefgh	28.4	415.8	48.7
H86	23.3 defghi	27.5	426.4	47.4
H65	24.4 efghij	24.2	466.3	42.5
M18/2B	25.3 fghijk	21.4	501.4	38.2
D08	25.4 fghijk	21.1	504.7	37.8
A30	26.5 ghijk	17.5	552.2	31.9
H76	27.3 hijkl	15.1	583.9	28.0
H60	27.3 hijkl	15.0	585.7	27.8
D01	27.3 hijkl	14.9	586.8	27.6
H84	28.2 ijkl	12.3	623.1	23.2
H62	28.5 jkl	11.2	639.4	21.2
A56	29.6 kl	7.9	688.1	15.1
H61	30.1 kl	6.3	711.6	12.3
Testigo	32.1 l	-	811	-
<sup>2</sup> DMS (Student) 7.62				
Valor "F" : 1.86*				

<sup>1</sup>Promedios con letras diferentes son estadísticamente significativos Student (P≤0.05); Promedios obtenidos de 12 datos individuales (tres repeticiones con cuatro lesiones cada una).



#### **4.6.3. Evaluación de modos de acción de cepas seleccionadas como ABC contra *P. expansum***

Para los ensayos de modos de acción, se seleccionaron las siete mejores cepas evaluadas previamente (2R, M18/3B, M20/2A, B33, B34, B38 y B39) tomando en cuenta, tanto los ensayos previos, como los confirmatorios para que, además de elegir cepas sobresalientes, se viera si su comportamiento fue reproducible en ambos ensayos.

##### *4.6.3.1. Producción de antimicrobianos*

En la Figura 4.25 se observa que aparentemente ninguna de las siete cepas evaluadas mostró alguna producción de sustancias antimicrobianas estando en contacto con *P. expansum*, lo cual se considera positivo debido a que, si ése fuera el caso, los patógenos sometidos a antagonistas que desarrollen ese modo de acción, con el tiempo podrían generar resistencia a este tipo de compuestos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Janisiewicz *et al.* (2000) con la cepa *Aureobasidium pullulans* que no manifiesta la producción de antimicrobianos contra *P. expansum* o los obtenidos por Rivera *et al.* (2012) con cuatro cepas de levaduras antagónicas. Por el contrario existen otros estudios que reportan el modo de acción de antibiosis en ciertas cepas como *Lactobacillus brevis* CG1 que presenta un efecto sobre *Candida albicans* y *Penicillium citrinum* (Adebayo y Aderiye, 2011).

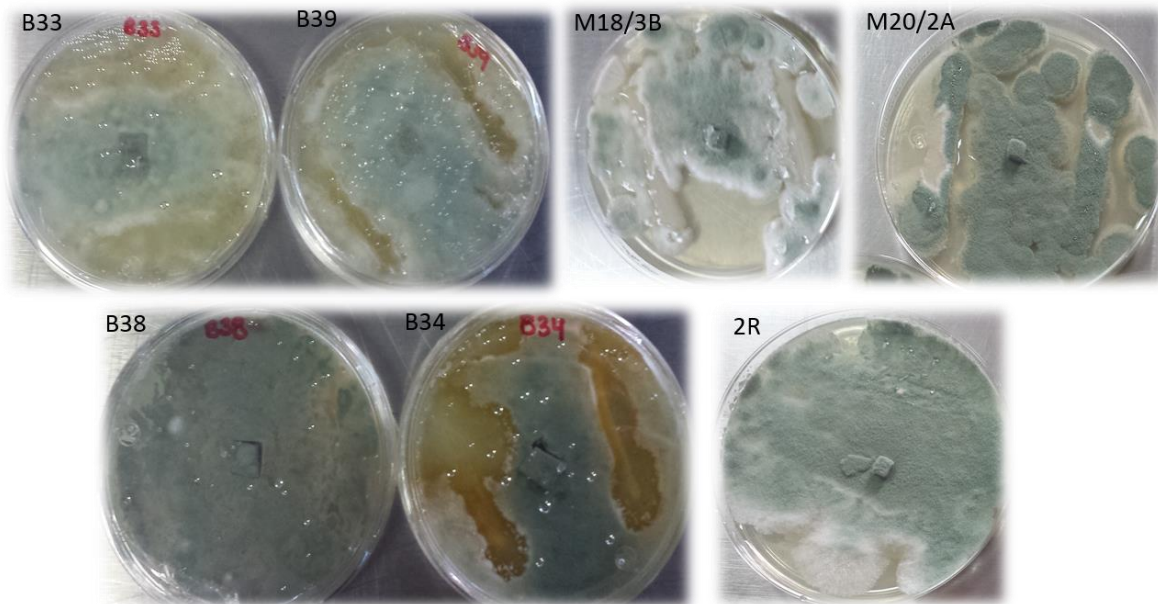


Figura 4.25. Ausencia de producción de sustancias antimicrobianas de tres ABC a *P. expansum* en medio APD

#### 4.6.3.2. Competencia por nutrientes

En el caso de los tratamientos testigo, no se observó germinación del hongo cuando se incubó en agua. Por el contrario en el medio NYDB 40% (Figura 4.26) y en el de jugo infusión de manzana (JIM) todos los conidios germinaron y los tubos germinativos mostraron un crecimiento superior a cuatro veces el tamaño del conidio (Tabla 4.9). Estos medios ya habían sido previamente evaluados por Rivera *et al.* (2012) y Carrasco (2013) coincidiendo con los resultados de este trabajo.

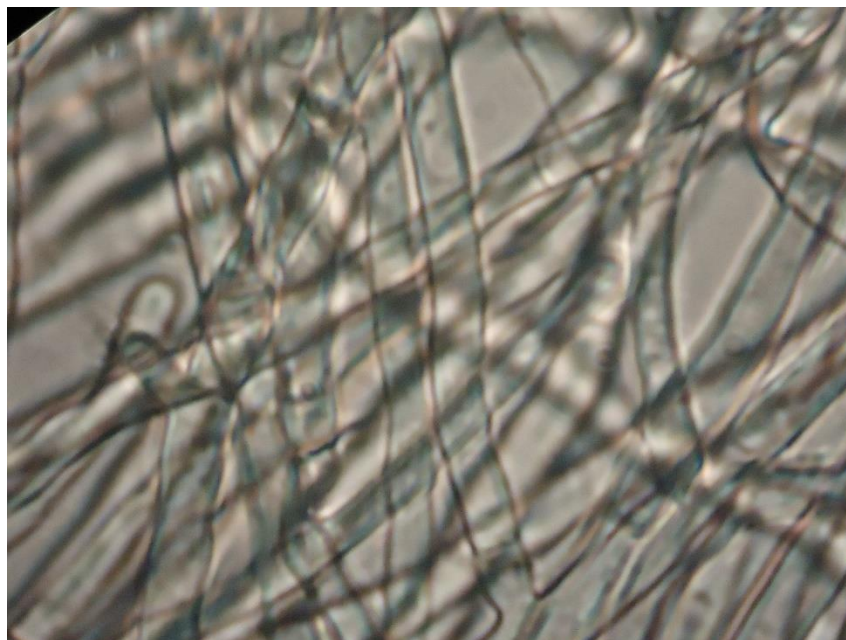


Figura 4.26. Tubo germinativo de *P. expansum* desarrollado en medio NYDB 40% a 24 h de incubación

Tabla 4.9. Germinación de esporas de *P. expansum* en medio NYDB 40%, Jugo infusión de manzana y agua

*Testigos	<sup>2</sup> Índice de germinación de <i>P. expansum</i>				
	0	1	2	3	4
<b>AGUA</b>	<sup>1</sup> 100	0	0	0	0
<b>NYDB 40%</b>	0	0	0	0	100
<b>Jugo infusión</b>	0	0	0	0	100

<sup>1</sup>Promedio obtenido de tres lecturas. <sup>2</sup>Índice de germinación de conidios: 0 = no germinado, 1= Longitud del tubo germinativo (LTG)  $\leq$  un conidio; 2= LTG de uno a dos conidios; 3= LTG de dos a cuatro; 4= LTG  $\geq$  cuatro veces el tamaño de conidio. \*Medios utilizados para los tratamientos testigos, sin presencia de ABC. Se contaron 100 conidios por tratamiento.

En las Tabla 4.10 se muestran las frecuencias de geminación del patógeno en presencia de las cepas seleccionadas en medio NYDB 40%. Se observó una inhibición significativa de la germinación de *P. expansum* cuando las levaduras se pusieron en contacto directo o no con éste, con coeficientes de correlación con relación al testigo (la sola presencia del patógeno) desde -0.27 hasta 0.51, lo que

demuestra el poder antagónico de estas cepas. Asimismo, comparando entre las células en contacto directo o con el filtro se observaron altos coeficientes de correlación de 0.96 hasta 1.00 para las cepas M20/2A, M18/3B, B34, B33 y B39 indicando que éstas son capaces de inhibir de manera similar la germinación de *P. expansum* en ambos tratamientos de filtro. Estos resultados coinciden con Rivera *et al.* (2012) que evaluó los modos de acción para cuatro ABC encontrando tres cepas que actuaron tanto en contacto directo como también con el filtro. Los resultados aquí obtenidos son compatibles con un modo de acción por competencia por nutrientes.

En el caso de B38 en presencia del filtro se contaron 51.3 esporas sin germinar; y al ponerla en contacto directo con el patógeno la capacidad de inhibir la germinación de éste aumentó considerablemente (91.7 esporas sin germinar) por lo que podría presumirse como su principal modo de acción la interacción directa o bien ambos modos (interacción directa y competencia por nutrientes).

Por otro lado la cepa 2R no pudo ser evaluada en presencia del filtro debido a que las células resultaron ser de un tamaño menor a  $0.4 \mu\text{m}$ , así, no fue posible separarlas de las del patógeno. Por lo anterior, es probable que este ABC sea una bacteria. Sin embargo, al igual que las anteriores, al estar en contacto con el patógeno muestra un efecto inhibitorio importante en comparación con el testigo ( $r = 0.03$ ).

Tabla 4.10. Longitud del tubo germinativo de conidios de *P. expansum* en presencia de los ABC en medio NYDB 40%

Tratamiento	<sup>2</sup> Índice de germinación										
	Contacto directo					Separados por filtro					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	r
<b>M20/2A</b>	<sup>1</sup> 91.2	0	0	0.9	7.9	74.1	2.2	2.2	1.3	20.1	0.98
<b>M18/3B</b>	77.1	3.7	0.9	1.9	17.4	61.3	3.4	1.8	2.9	30.6	0.96
<b>2R</b>	71.6	2	2	2.9	21.4						
<b>B34</b>	86	2.7	0.7	1.7	9	77.7	2	2.3	0.3	17.7	0.99
<b>B33</b>	91.3	2.3	5.7	0	0.7	91.3	2	1	0.3	5.3	1.00
<b>B38</b>	91.7	1	2.3	0.7	4.3	51.3	2.3	2.7	1	42.7	0.73
<b>B39</b>	94.3	1.3	0	0.3	4	90.3	1	0.3	0.7	7.7	1.00

<sup>1</sup>Promedio obtenido de tres lecturas. <sup>2</sup>Índice de germinación de conidios: 0 = no germinado, 1= Longitud del tubo germinativo (LTG) ≤ un conidio; 2= LTG de uno a dos conidios; 3= LTG de dos a cuatro; 4= LTG o ≥ cuatro veces el tamaño de conidio. Se contaron 100 conidios por tratamiento. r = coeficiente de correlación entre el tratamiento con filtro y en contacto directo.

En la Tabla 4.11 se observa la evaluación de tres cepas en Jugo Infusión de Manzana (JIM) a 24 h de incubación. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con el medio NYDB 40% con coeficientes de correlación de 0.99, 0.96 y 0.98 para M20/2A, M18/3B y 2R respectivamente. Por lo anterior, de igual forma para las cepas M20/2A y M18/3B se confirma la competencia por nutrientes como modo de acción y también se observa un efecto inhibitorio de interacción directa para la cepa 2R (59.1 esporas sin germinar de *P. expansum* de 100 contadas).

Rivera *et al.* (2012) obtuvieron un bajo coeficiente de correlación de los índices de germinación del hongo ( $r = -0.303$ ) con la cepa 22-111 (*Pichia guilliermondii*) entre los dos tratamientos (contacto directo y con filtro), lo que supone una interacción directa del antagonista con el hongo. Por el contrario, con las cepas 38-432, 24<sup>-2</sup><sub>3a</sub> y 22<sup>-2</sup><sub>4a</sub> el índice de germinación de *P. expansum* resultó muy similar al obtenido cuando éstas se encontraban en contacto directo con los conidios ( $r = 0.989$ ,  $r = 0.999$  y  $r = 0.995$ , respectivamente), lo que sugiere que la competencia por nutrientes es su principal modo de acción.

Janisiewicz *et al.* (2000), evaluaron esta técnica para verificar la competencia por nutrientes del ABC *Aureobasidium pullulans* contra *P. expansum* encontrando un efecto inhibitorio de la germinación del patógeno en jugo a las 24 h de incubación. Asimismo, durante varios años se han realizado innumerables estudios para determinar tanto los modos como los mecanismos de acción de diferentes ABC de patógenos en poscosecha. Entre los más recientes se encuentra el realizado por Rivera *et al.* (2012) mencionado anteriormente determinando el modo de acción de cuatro cepas de levaduras aplicadas en manzana contra *P. expansum*. Zhou *et al.* (2011) obtuvieron reducciones en la tasa de germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer* con *Bacillus subtilis* y Zhang *et al.* (2011) observaron la reducción de la germinación de *B. cinérea* con el ABC *Pichia guilliermondii* M8 reportando la competencia por nutrientes como su modo de acción.

Tabla 4.11. Longitud del tubo germinativo de conidios de *P. expansum* en presencia de los ABC en medio Jugo Infusión de Manzana (JIM)

Tratamiento	<sup>2</sup> Índice de germinación										r
	Contacto directo					Separados por filtro					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	
<b>M20/2A</b>	<sup>1</sup> 97	1.3	0.8	0.1	0.8	77.0	3.7	1.9	0.5	16.9	0.98
<b>M18/3B</b>	80.9	1.4	0.6	0.9	16.1	84.7	0.6	0.7	0.3	13.9	0.99
<b>2R</b>	59.1	3.2	4.3	5.2	28.1						

<sup>1</sup>Promedio obtenido de tres lecturas. <sup>2</sup>Índice de germinación de conidios: 0 = no germinado, 1= Longitud del tubo germinativo (LTG) ≤ un conidio; 2= LTG de uno a dos conidios; 3= LTG de dos a cuatro; 4= LTG o ≥ cuatro veces el tamaño de conidio. Se contaron 100 conidios por tratamiento. r = coeficiente de correlación entre el tratamiento con filtro y en contacto directo.

#### 4.6.4. Identificación de los ABC seleccionados

En la Figura 4.27 se muestran las bandas de amplificación de las distintas muestras evaluadas en la parte de modos de acción. Para comparar se utilizó el marcador de 100pb así como controles positivo (Sc) y negativo (NTC). En dicha figura se observa la confirmación de las cepas M18/3B, M20/2A, B33, B34, B38 y

B39. No obstante observamos la falta de banda para la 2R la cual como se mencionó en estudios anteriores se tenía la sospecha de que por su tamaño no se trata de una levadura sino más bien de una bacteria.

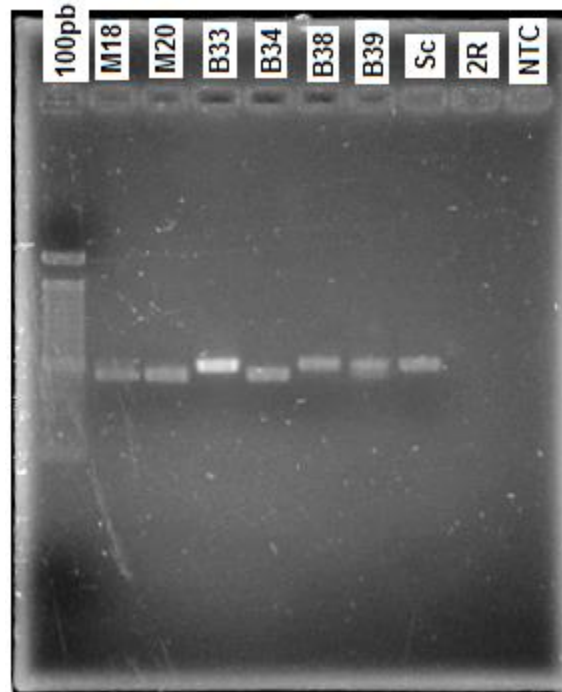


Figura 4.27. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con bandas de amplificación (D1/D2 del gen 26S) de las cepas de levaduras identificadas como ABC  
100pd=Marcador molecular de 100pb; Sc= control positivo; NTC= control negativo

De las siete cepas que fueron evaluadas para modos de acción, cuatro pudieron ser identificadas satisfactoriamente a nivel de especie. En la Tabla 4.12 se observa que tres de estas cepas fueron identificadas como la misma especie (*Yarrowia lipolytica*) mientras que una de ellas (B33) fue identificada como *Debaryomyces hansenii*.

Tabla 4.12. Cepas de ABC identificadas

Cepa	Identificada como	Porcentaje de similitud	Clave
M18/3B	<i>Yarrowia lipolytica</i>	96	JX649972.1
M20/2A	<i>Yarrowia lipolytica</i>	96	JQ680462.1
B33	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100	FN667855.1
B34	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99	JQ689945.1

*Yarrowia lipolytica* es una levadura que ha sido extensamente estudiada. Se trata de un microorganismo aerobio estricto perteneciente a la familia *Dipodascaceae*, capaz de producir metabolitos importantes como ácido cítrico, sabor durazno, biodiesel, biosurfactantes así como de secretar ciertas proteínas (proteasas, ARNasas, lipasas) en cantidades importantes para la industria. Esta capacidad ha incrementado el interés en utilizar esta levadura para fines industriales (como biocatalizador), en biología molecular y en estudios genéticos. Este microorganismo es considerado como no-patógeno y varios procesos que lo involucran son clasificados como seguros (GRAS) por la FDA (Por sus siglas en inglés "Food and Drug Administration"). Sil *et al.* (2013), evaluaron seis cepas de *Y. lipolytica* y reportaron la cepa ATCC 18943 como productora de biosurfactante, la SO678 como productora de lípidos y la IMUFRJ 50682 como productora de lipasa y ácido cítrico.

Además *Y. lipolytica* es considerada como un modelo para estudios de dimorfismo en levaduras, ya que cuenta con un eficiente sistema de transformación genética y es fácil de distinguir entre sus formas morfológicas. El dimorfismo es la capacidad de diferentes hongos para crecer en forma de levadura o en forma de micelio en función de las condiciones del medio en que se encuentra. Se piensa que el dimorfismo de las levaduras está relacionado con mecanismos de defensa ante condiciones adversas, como cambios de temperatura y/o nutrientes (Coelho *et al.*, 2010).

Debido a estas propiedades, es de esperarse que *Y. lipolytica* tenga un potencial como ABC pudiendo generar compuestos que sean tóxicos o no permitan el desarrollo de los patógenos mediante interacción directa; no obstante, al parecer



no ha sido reportado como tal.

Por otro lado la cepa identificada como *Debaryomyces hansenii*, pertenece a la familia *Saccharomycetaceae* y se caracteriza por crecer en medio de cultivo mediante colonias de color blanco a cremosas en las primeras horas de incubación. Presenta estado sexual y reproducción vegetativa por gemación. Posee más de 70 sinónimos entre los más conocidos: *Saccharomyces hansenii*, *Debaryomyces klockeri* Guillermond, *Candida anómala*, *Rhodotorula minor* y *Torulaspota hansenii* (Barnett *et al.*, 1990).

Como ABC, *D. hansenii* ha sido reportada en diferentes frutos y contra diferentes patógenos, por lo que se considera un microorganismo de amplio espectro de acción (Tabla 4.22). Wilson y Chalutz (1989) reportaron a *D. hansenii* con un potencial antagónico contra la pudrición causada por *Rhizopus* spp. en duraznos. Droby *et al.* (1989) reportaron como modo de acción contra *P. digitatum* en uva en poscosecha la competencia por nutrientes coincidiendo con este estudio.

Sánchez *et al.* (2008) evaluaron una cepa de *D. hansenii* (38-432) aplicada en manzana en poscosecha contra *P. expansum* y observaron que inhibió 60, 40 y 26% a los cuatro, ocho y 12 d de incubación el desarrollo de dicho patógeno. Asimismo, Rivera *et al.* (2012) reportaron el modo de acción de esta cepa por competencia por nutrientes coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo.

Finalmente, al igual que *Y. lipolytica*, la levadura *D. hansenii* es importante a nivel industrial ya que se ha observado su potencial en la producción de ciertos metabolitos de interés como lípidos, enzimas líticas, entre otros. Además esta especie es halotolerante pudiendo adaptarse por osmorregulación a condiciones de alta salinidad (Breuer y Harms, 2006).

## V. CONCLUSIONES

### 1. Susceptibilidad y mecanismos de defensa de los genotipos contra el patógeno

- Ⓢ El estado de madurez del fruto afectó la sensibilidad a *P. expansum*, siendo las manzanas con menor grado de madurez las menos susceptibles.
- Ⓢ La época de maduración de los frutos de los genotipos evaluados no influyó sobre su sensibilidad al patógeno.
- Ⓢ La susceptibilidad de los genotipos a *P. expansum* se vio fuertemente influenciada por el año de cosecha. Así, en 2011, 'SM3', '468' y '424' resultaron los menos susceptibles al patógeno, mientras que, en 2012, lo fueron '436' y 'Lourdes', no habiendo una correlación significativa en el comportamiento de los diversos genotipos en los dos distintos años.
- Ⓢ 'Golden Delicious' resultó como una de las variedades más susceptibles a *P. expansum* en los dos años de estudio.
- Ⓢ A excepción del contenido de sólidos solubles en el fruto en 2012, ninguna de las variables físicas y químicas evaluadas se encontró correlacionada con la susceptibilidad de las manzanas a *P. expansum*.
- Ⓢ Las variedades '436' y 'Lourdes' mostraron cambios diferenciales en la expresión de algunos genes relacionados con la ruta de los fenilpropinoides, con proteínas PR así como de la biosíntesis de etileno, lo que indica la capacidad de activar mecanismos de defensa como respuesta al estrés biótico. No obstante en horas posteriores el patógeno logra sobrepasar tales mecanismos y la enfermedad termina por desarrollarse.

- Ⓢ En todos los genes estudiados, 'Golden Delicious' (variedad susceptible) no mostró inducción alguna en los diferentes tiempos evaluados ni frente a factores bióticos y abióticos, demostrando su incapacidad para activar mecanismos de defensa efectivos.

## 2. Agentes de biocontrol y modos de acción

- Ⓢ La concentración inicial de inóculo de ABC en frutos de manzana tiene un efecto sobre el desarrollo de *P. expansum*, siendo que a mayor concentración ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) se presenta mayor inhibición del patógeno.
- Ⓢ En las dinámicas poblacionales de ABC inoculados en frutos de manzana se observó un comportamiento estable de las levaduras a través del tiempo en condiciones de almacenamiento durante 45 días manteniendo concentraciones de entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.
- Ⓢ Cinco de las siete cepas de ABC (M20/2A, M18/3B, B33, B34 y B39) mostraron un comportamiento ante *P. expansum* compatible con el modo de acción de competencia por nutrientes.
- Ⓢ La cepa B38 mostró un efecto inhibitorio principalmente en contacto directo (interacción directa) o menor cuando se encontraba separada por el filtro (por competencia por nutrientes) contra *P. expansum* y la cepa 2R mostró un efecto importante por contacto directo.
- Ⓢ Pudieron identificarse a nivel de especie cuatro ABC, tres de ellas (M18/3B, M20/2A y B34) correspondieron a la cepa *Yarrowia lipolytica* y una (B33) a la cepa *Debaryomyces hansenii* siendo sólo esta última reportada previamente como agente de biocontrol.

## VI. PERSPECTIVAS

Partiendo de la evaluación previa de diferentes genotipos de manzana, establecidos en la región de Querétaro, y que habían mostrado un comportamiento diferencial cuando se inoculaban artificialmente con *P. expansum*, en este trabajo se realizó una primera aproximación al estudio de los mecanismos de defensa involucrados en la respuesta a la infección por el patógeno. No obstante, este el punto de partida de futuros trabajos en los que se necesitará evaluar otros genes involucrados en otras rutas metabólicas para llegar a elucidar tales mecanismos. Este tipo de estudios van encaminados hacia la obtención de variedades resistentes a patógenos o bien hacia la creación de tratamientos que desencadenen en la activación de las defensas en las primeras horas del reconocimiento de los patógenos y por lo tanto, hacia la reducción de las pérdidas que se tienen en poscosecha. Sin embargo, no es camino fácil ya que estos tratamientos tienen que ser formulaciones estables, redituables, de amplio espectro y además que no resulten dañinos para los frutos y para el consumidor. Asimismo, en el mejoramiento genético se deben hacer consideraciones importantes y múltiples estudios antes de llegar a un resultado favorable.

Por otro lado durante muchos años, en diferentes partes del mundo se han realizado múltiples estudios con ABC, pero hasta la fecha existen pocos productos patentados derivados de estos. En este trabajo se han obtenido diferentes cepas con potencial antagonico, sin embargo estos reducen el desarrollo del hongo pero no impiden que se presente, por lo que se necesita trabajar continuamente en el aislamiento de microorganismos que pudieran tener un potencial en la región, así como en el desarrollo de formulaciones de ABC que pudieran aplicarse en los frutos en la etapa de poscosecha.

## VII. LITERATURA CITADA

- Achilea, O., Chalutz, E., Fuchs, Y., Rot, I. 1985a. Ethylene biosynthesis and related physiological changes in *Penicillium digitatum* infected grapefruit (*Citrus paradisi*). *Physiology Plant Pathology*. 26: 125–134.
- Achilea, O., Fuchs, Y., Chalutz, E., Rot, I. 1985b. The contribution of host and pathogen to ethylene biosynthesis in *Penicillium digitatum*-infected citrus fruit. *Physiology Plant Pathology*. 27: 55–63.
- Adebayo, C., Aderiye, B. 2011. Suspected mode of antimycotic action of brevicin SG1 against *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*. *Food control*. 22: 1814-1820.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5ta ed. Academic Press. New York, USA. p. 922
- Agrios, G.N. 2006. Protección directa mediante métodos de control químico. *In: Fitopatología* 2da ed. Limusa. D. F. México. pp. 209-234.
- Ahmadi-Afzadi, M., Tahir, I., Nybom, H. 2013. Impact of harvesting time and fruit firmness on the tolerance to fungal storage diseases in an apple germplasm collection. *Postharvest Biology and Technology*. 82: 51-58.
- Alayón, U., Rodríguez, P., Martínez, V.A. 2005. Evaluación y caracterización de la calidad de fruta de diferentes combinaciones cultivar–portainjerto de manzanos (*Malus domestica* Borkh) producidos en corrientes. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, p. 8.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4ta ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 868.
- Altisent, R., Echeverría, G., Lara, I., López, M.L., Graell, J. 2009. Shelf-life of 'Golden Reinders' apples after ultra low oxygen storage: Effect on aroma volatile compounds, standard quality parameters, sensory attributes and acceptability. *Food Science and Technology International*. 15: 481-493.
- Álvarez, R.S. 1996. *El manzano*. 4ta ed. Publicaciones de Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. p. 159.

- Anand, T., Bhaskaran, R., Raguchander, T., Samiyappan, R., Prakasam, V., Gopalakrishnan, C. 2009. Defence responses of chilli fruits to *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata*. *Biologia Plantarum*. 53: 553-559.
- Anttonen, M.J., Hoppula, K.I., Nestby, R., Verheul, M.J., Karjalainen, R.O. 2006. Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 2614-2620.
- Arras, G., De Vicco, V., Arru, S., Lima, G. 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology*. 73: 413-418.
- Arras, G., Demontis, S. 1996. Characterization of Yeasts (*Pichia guilliermondii* and *Rhodotorula glutinis*) Antagonistic to *Penicillium digitatum*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 46: 285-298.
- Ballester, A.R., Izquierdo, A., Lafuente, M.T., González-Candelas, L. 2010. Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 56: 31-38.
- Ballester, A.R., Lafuente, M.T., Forment, J., Gadea, J., De Vos, R.C.H., Bovy, A.G., González-Candelas, L. 2011. Transcriptomic profiling of citrus fruit peel tissues reveals fundamental effects of phenylpropanoids and ethylene on induced resistance. *Molecular Plant Pathology*. 12: 879-897.
- Ballester, A.R., Lafuente, M.T., González-Candelas, L. 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology*. 39: 115-124.
- Ballester, A.R., Lafuente, M.T., González, C.L. 2013. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part II: Gene expression and metabolite accumulation in the response of fruits to *Penicillium digitatum* infection. *Food Chemistry*. 136: 285-291.

- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., Patrella, G.C. 2003. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology*. 52: 362-370.
- Barkai-Golan, R. 2001. *Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control*. Elsevier Sciences. Amsterdam, The Netherlands. p. 417.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd ed. Cambridge University Press New York, U.S.A. p. 1150.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J.J., Carmeli, S. 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1217-1221.
- Bencheqroun, S.K., Bajji, M., Massart, S., Labhilili, M., El Jaafari, S., Jijakli, M.H. 2007. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology*. 46: 128-135.
- Beno-Moualem, D., Prusky, D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology*. 90: 553-559.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R. 2002. Constitutive expression of ethylene-response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*. 29: 23-32.
- Biggs, A.R., Miller, S.S. 2001. Relative susceptibility of selected apple cultivars to *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. 85: 657-660.
- Bolwell, G.P., Davies, D.R., Gerrish, C., Auh, C.K., Murphy, T.M. 1998. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology*. 116: 1379-1385.
- Bostock, R.M., Wilcox, S.M., Wang, G., Adaskaveg, J.E. 1999. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 54: 37-50.
- Breuer, U., Hauke, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*. 23: 415–437.

- Buron-Moles, G., Torres, R., Amoako-Andoh, F., Viñas, I., Teixidó, N., Usall, J., Keulemans, W., Davey, M.W. 2014. Analysis of changes in protein abundance after wounding in 'Golden Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*. 87: 51-60.
- Buron-Moles, G., Wisniewski, M., Viñas, I., Teixidó, N., Usall, J., Droby, S., Torres, R. 2015. Characterizing the proteome and oxi-proteome of apple in response to a host (*Penicillium expansum*) and a non-host (*Penicillium digitatum*) pathogen. *Journal of Proteomics*. 114: 136-151.
- Buron, G. 2014. Molecular, biochemical and pathological approaches to unravel the defence responses of apples and oranges against *Penicillium* spp. Tesis de Doctorado. Universidad de Lleida. Lleida, España. p. 297
- Calderón, A.E. 1987. *Fruticultura General: El esfuerzo del hombre*. 3a ed. Limusa. México, DF. p. 763.
- Calenge, F., Durel, C.E. 2006. Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments. *Molecular Breeding*. 17: 329-339.
- Cano, J., Guarro, J., Gene, J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 2450–2454.
- Cao, J., Zhang, H.Y., Yang, Q.Y., Ren, R. 2013. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *International Journal of Food Microbiology* 162: 167-173.
- Carlile, M.J., Watkinson, C.S. 1994. *The fungi*. Academic Press Harcourt Brace & Company Publishers New York. p. 482.
- Carrasco, R.J.A. 2013. Antagonismo de levaduras aisladas de manzanas en almacenamiento prolongado contra *Penicillium expansum* Link en poscosecha. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. p. 97
- Casado-Díaz, A., Encinas-Villarejo, S., de los Santos, B., Schilliró, E., Yubero-Serrano, E.M., Amil-Ruíz, F., Pocovi, M.I., Pliego-Alfaro, F., Dorado, G., Rey, M., Romero, F., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L. 2006. Analysis of strawberry genes



- differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiological Plantarum*. 128: 633-650.
- Casals, C., Teixido, N., Vinas, I., Silvera, E., Lamarca, N., Usall, J. 2010. Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *European Journal of Plant Pathology*. 128: 51-63.
- 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). Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro.
- Castoria, R., Caputo, L., De Cicco, V. 2001a. Resistance to oxidative stress and antagonism of biocontrol yeasts against postharvest pathogens. *Biological control of Fungal and bacterial Plant Pathogens IOBC*. 24: 303-307.
- Castoria, R., Caputo, L., De Curtis, F., De Cicco, V. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. *Phytopathology*. 93: 564-572.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S., De Cicco, V. 2001b. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 22: 7-17.
- Cermeño, V.J.R., Torres, R.J.M. 1998. Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. *Revista Iberoamericana Micología*. 15: 155-157.
- Coelho, M.A.Z., Amaral, P.F.F., Belo, I. 2010. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhouse. . *In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Mendez-Vilas, A. (Eds.). FORMATEX. pp. 930-944.
- Chalutz, E., Droby, S., L., W.C. 1988. Microbial protection against postharvest diseases of citrus fruit. *Phytoparasitica* 16: 195-196.

- Chalutz, E., Droby, S., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 1992. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 15: 367-374.
- Chen, S., Schopfer, P. 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*. 260: 726-735.
- Childers, N.F., Morris, J.R., Sibbett, G.S. 1995. *Modern Fruit Science: Harvesting, packing and processing apples*. Horticultural Publications. Florida, USA.
- Chiu, C.M., You, B.J., Chou, C.M., Yu, P.L., Yu, F.Y., Pan, S.M., Bostock, R.M., Chung, K.R., Lee, M.H. 2012. Redox status-mediated regulation of gene expression and virulence in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *Plant Pathology*. 62: 809-819.
- De Costa, D.M., Erabadupitiya, H.R.U.T. 2005. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of Burkholderia cepacia complex. *Postharvest Biology and Technology*. 36: 31-39.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.S., Wang, L.J. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 3: 371-390.
- Droby, S., Chalutz, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. *In: Biological Control of Postharvest Diseases- Theory and Practice*. C.Wilson, M.Wisniewski. (Ed.). pp. 63-75.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 794-800.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica*. 20: 149-153.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52: 137-145.
- Durrant, W.E., Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 45: 185-209.

- Durst, F. 1991. Biochemistry and physiology of plant cytochrome P-450. *In: Microbial and plant cytochromes P-450. Biochemical characteristics, genetic engineering and practical implications* Ruckpaul, K., Rein, H. (Ed.). Akademie-Verlag. Berlin. pp. 191-232.
- Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*. 268 667–675.
- Edney, K.L. 1983. Top fruit. *In: Post-Harvest Pathology of Fruits and Vegetables*. Dennis, C. (Eds.). Academic Press. New York. USA. pp. 43-71
- El-kereamy, A., El-sharkawy, I., Ramamoorthy, R., Taheri, A., Errampalli, D., Kumar, P., Jayasankar, S. 2011. *Prunus domestica* Pathogenesis-Related Protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. *PLoS ONE*. 6: e17973.
- El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. *In: Diseases of Fruit and Vegetables*. Naqvi, S.A.M.H. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 511-535.
- FAO. 2008. FAOSTAT.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Felicetti, D.A., Schrader, L.E. 2009. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. I. Chlorophylls and carotenoids. *Plant Science*. 176: 78-83.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A., Teixeira, A.R. 2006. Fungal Pathogens: The battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25: 505-524.
- Francés, J., Bonaterra, A., Moreno, M.C., Cabrefiga, J., Badosa, E., Montesinos, E. 2006. Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*. 39: 299-307.
- Gambhir, P.N., Choi, Y.J., Slaughter, D.C., Thompson, J.P., McCarthy, M.J. 2005. Proton spin-spin relaxation time of peel and flesh of navel orange varieties exposed to freezing temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 2482-2486.

- Gao, Z.S., van de Weg, W.E., Schaart, J.G., Schouten, H.J., Tran, D.H., Kodde, L.P., van der Meer, I.M., van der Geest, A.H., Kodde, J., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Bosch, D., Gilissen, L.J. 2005. Genomic cloning and linkage mapping of the *Mal d 1* (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). . Theoretical Applied Genetics 111: 171–183.
- García, P.E., Lozoya, G.E. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 22: 414-422.
- Ghosoph, J.M., Schmidt, L.S., Margosan, D.A., Smilanick, J.L. 2007. Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the *PdCYP51* promoter region of *Penicillium digitatum*. Postharvest Biology and Technology. 44: 9-18.
- Gilchrist, D.G. 1998. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. Annual Reviews. 36: 393-414.
- González-Aguilar, G.A., Tiznado-Hernández, M.E., Zavaleta-Gatica, R., Martínez-Tellez, M.A. 2004. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. Biochemical and Biophysical Research Communications. 313: 694–701.
- González-Candelas, L., Alamar, S., Sánchez-Torres, P., Zacarías, L., Marcos, J.F. 2010. A transcriptomic approach highlights induction of secondary metabolism in citrus fruit in response to *Penicillium digitatum* infection. BMC Plant Biology. 10: 194-211.
- Gradziel, T.M. 1994. Changes in susceptibility to brown rot with ripening in three clingstone peach genotypes. Journal of American Society Horticultural Science. 119: 101-105.
- Grant, J., Loake, G. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiology. 124: 21-30.
- Gutiérrez, A.E., Martínez, P.R.A. 2004. Evolución del color de la almendra de genotipos nativos de nuez pecanera en almacenamiento acelerado. Sapere. 1: 14-22.
- Hall, C.W., F., S.A. 1968. Equipo para procesamiento de productos agrícolas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Lima, Perú.

- Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? . *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55: 77-84.
- Hammond-Kosack K. E., G., J.J.D. 2000. Responses to plant pathogens. *In: Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Ed.). American Society of Plant Physiologists. Rockville–Maryland–USA. pp. 1102-1156.
- Hansen, Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*. 4: 226-230.
- Hassan, M.K., Dann, E.K., Irving, D.E., Coates, L.M. 2007. Concentrations of constitutive alk(en)ylresorcinols in peel of commercial mango varieties and resistance to postharvest anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 158-165.
- Heath, M. 1996. Plant resistance to fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18: 469-475.
- Hershkovitz, V., Ben-Dayan, C., Raphael, G., Pasmanik-Chor, M., Liu, J., Belausov, E., Aly, R., Wisniewski, M., Droby, S. 2012. Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Molecular Plant Pathology*. 13: 338-349.
- Hutcheson, S.W. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Reviews of Phytopathology*. 36: 59-90.
- Infoagro. 2002. Toda la agricultura en manzanas.
- Ippolito, A., Ghaouth, A.E., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*. 19: 265-272.
- Jackson, A.O., Taylor, C.B. 1996. Plant-Microbe interactions: Life and death at the interface. *The Plant Cell*. 8: 1651-1668.
- Janick, J., Cummins, J.N., Brown, S.K., Hemmat, M. 1996. Apples. *In: Fruit breeding, Volume I: Tree and tropical fruits*. Janick, J., Moore, J.N. (Ed.). John Wiley & sons, Inc. New York. p. 632p.

- Janisiewicz, W.J. 1998. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits: Challenges and opportunities. *In: Plant–Microbe Interactions and Biological Control*. Boland, J., Kuykendall, L.D. (Ed.). Dekker, New York. pp. 171–198.
- Janisiewicz, W.J. 1999. Blue Mold *Penicillium* spp. *In: Plant-microbe interaction and biological control*. Boland, G.J.K., L. D. . (Eds.). Marcel Dekker Inc. . New York. USA. pp. 171-198.
- Janisiewicz, W.J., Conway, W.S., Glenn, D.M., Sams, C.E. 1998. Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. *Hortscience*. 33: 105-109.
- Janisiewicz, W.J., Jeffers, S.N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two fungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*. 16: 629-633.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review Phytopathology*. 40: 411-441.
- Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Conway, W.S., Forsline, P.L. 2008a. Preliminary evaluation of apple germplasm from Kazakhstan for resistance to postharvest blue mold in fruit caused by *Penicillium expansum*. *Horticultural Reviews (American Society for Horticultural Science)*. 43: 420-426.
- Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Conway, W.S., Yoder, K.S. 2008b. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*. 49: 374-378.
- Janisiewicz, W.J., Tworkoski, T.J., Sharer, C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*. 90: 1196-1200.
- Jiang, F., Chen, J., Miao, Y., Krupinska, K., Zheng, X. 2009. Identification of differentially expressed genes from cherry tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*) after application of the biological control yeast *Cryptococcus laurentii*. *Postharvest Biology and Technology*. 53: 131-137.

- Jijakli, M.H., Lepoivre, P. 1998. Characterization of an exo-1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*. 88: 335-343.
- Jin, Y., Zhang, C., Liu, W., Qi, H., Chen, H., Cao, S. 2014. The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in melon (*Cucumis melo* L.): Bioinformatic analysis and expression patterns. *Plos One*. 9(7): e101730.
- Johnston, J.W., Gunaseelan, K., Pidakala, P., Wang, M., Schaffer, R.J. 2009. Coordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *Journal of Experimental Botany*. 60: 2689-2699.
- Jones, A.L., Aldwinckle, H.S. 2002. *lagas y enfermedades del manzano y del peral*. Mundi Prensa. Madrid, España. p. 101.
- Joosten, M.H.A.J., Verbakel, H.M., Nettekoven, M.E., van Leeuwen, J., van der Vossen, R.T.M., De Wit, P.J.G.M. 1995. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase defence proteins of its host tomato. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 46: 45–59.
- Jurick, W.M., Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Vico, I., Gaskins, V.L., Park, E., Forsline, P.L., Fazio, G., Conway, W.S. 2011. Identification of wild apple germplasm (*Malus* spp.) accessions with resistance to the postharvest decay pathogens *Penicillium expansum* and *Colletotrichum acutatum*. *Plant Breeding*. 130: 481-486.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberly, J.F., Lumyong, S. 2009. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. Isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology*. 6: 143-147.
- Kirsop, E.B., Kurtzman, P.C. 1988. *Yeasts. Living Resources for Biotechnology*. Cambridge University Press. New York, USA. p. 234.
- Konstantinou, S., Karaoglanidis, G.S., Bardas, G.A., Minas, I.S., Doukas, E., Markoglou, A.N. 2011. Postharvest fruit rots of apple in Greece: pathogen incidence and relationships between fruit quality parameters, cultivar susceptibility, and patulin production. *Plant Disease*. 95: 666-672.

- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H. 2004. Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in Morocco. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 69: 601-609.
- Lambeth, J.D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*. 4: 181-189.
- Lee, M.H., Bostock, R.M. 2006. Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. *Phytopathology*. 96: 1072-1080.
- Leelasuphakul, W., Hemmaneea, P., Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 48: 113-121.
- Leverentz, B., Conway, W., Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Camp, M.J. 2003. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*. 27: 221-233.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79: 583-593.
- Li, B.Q., Tian, S.P. 2006. Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 854-861.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 167: 153-160.
- Macarasin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M., Droby, S. 2007. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue infection of citrus fruit. *Phytopathology*. 97: 1491-1500.
- Madriz, O.K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 22-32.
- Marcos, J.F., González-Candelas, L., Zacarías, L. 2005. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium*



- digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany*. 56: 2183-2193.
- Martínez, P.R., Pérez, M.M. 1997. La planta de manzano. Efecto de la época de trasplante del portainjerto y de la fecha de injertación sobre la calidad de la planta de manzano propagada en maceta. Querétaro, Querétaro. *Tiempo Nuevo*. 138: 42-46.
- McDowell, J.M., Dangl, J.L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*. 25: 79-82.
- McLaughlin, R.J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., Chalutz, E. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology*. 80: 456-461.
- Mendoza, G.S. 2007. Evaluación de la época de floración, maduración, calidad y potencial de almacenamiento de genotipos de manzana establecidos en Cadereyta, Qro. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México p. 101
- Mendoza, G.S., Martínez, P.R.A., Fernández, M.R., Rumayor, F.A., Castillo, C.E. 2008. Época de maduración y calidad del fruto de genotipos de manzana en Cadereyta, Qro. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14: 71-78.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9: 490-498.
- Moerschbacher B., K., M. 2000. Structural aspects of defense. *In: Mechanisms of resistance to plant diseases*. SlusarenkoA, FraserRSS, LoonLC. (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 231–277.
- Montero, C.M., M., C.A. 2005. Guías técnicas del manejo poscosecha de piña para el mercado fresco. MAG. San José, CR. pp. 46.
- Montero, C.M., M., G.A. 2000. Manejo poscosecha del mango para el mercado fresco. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Universidad de Costa Rica. pp. 220.
- Mysore, K.S., Ryu, C.M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*. 9: 97-104.

- Narayanasamy, P. 2006. Biocontrol agents for disease management. *In*: Postharvest Pathogens and Disease Management. Narayanasamy, P. (Eds.). John Wiley & Sons Hoboken. pp. 282-291.
- Nicholson, R.L., Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 30: 369-389.
- Nigam, N., Mukerji, K.G. 1988. Biological control. Concepts and practice. *In*: Biocontrol of Plant Diseases. Mukerji, K.G.y.G., K. L. . (Eds.). CRC Press. Boca Ratón. Florida.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B.F., L., D.J. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* 37: 579-609.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Abadias, M., Viñas, I. 2001. Improved control of postharvest decay of pears by the combination of *Candida sake* (CPA-1) and ammonium molybdate. *Phytopathology*. 92: 281-287.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. 2002. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Bacteriology*. 92: 247-255.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Pater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunology Reviews*. 198: 249-266.
- Nurnberger, T., Lipka, V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*. 6: 335-345.
- Omura, T., Sato, R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: II. Solubilization, purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*. 239: 2379-2385.
- Osbourn, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*. 8: 1821-1831.
- Osman, M.S., Sivakumar, D., Korsten, L. 2011. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. *Crop Protection*. 30: 173-178.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H. 2009. Evaluation of Food Additives as Alternative or Complementary Chemicals to Conventional Fungicides for the

- Control of Major Postharvest Diseases of Stone Fruit. *Journal of Food Protection*. 72: 1037-1046.
- Parra, Q.R. 1999. Crecimiento, relaciones hídricas y nutrimentales en portainjertos de manzana. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados Montecillo, México. pp. 16-19
- Paxton, J.D. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology Z.* 101: 106-109.
- Paz, C.A., Guzmán, P.L.E., Martínez, P.R.A., Caltzontzin, F.K.K., Pacheco, A.J.R., Arvizu, M.S.M. 2014. Evaluation of the susceptibility of apple genotypes in Queretaro, Mexico to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). *Scientia Horticulturae*. 170: 53-60.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29: e45.
- Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C. 1999. Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science*. 4: 52-58.
- Pitt, J.L., Samson, R.A., Frivad, J.C. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: *Integration of modern taxonomic for Penicillium and Aspergillus classification* 1ra ed. Harwood Publisher. Amsterdam, Holanda. pp. 9-49.
- Platania, C., Restuccia, C., Muccilli, S., Cirvilleri, G. 2012. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiology*. 30: 219-225.
- Poppe, L., Vanhoutte, S., Höfte, M. 2003. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 963-973.
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. 2004. Jasmonates-Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 23: 211-222.
- Prusky, D., Lichter, A. 2008. Mechanisms modulating fungal attack in postharvest pathogen interactions and their control. *European Journal of Plant Pathology*. 121: 281-289.

- Prusky, D., Treeman, S., Rodríguez, R.J., Keen, N.T. 1994. A nonpathogenic mutant strain of *Colletotrichum magna* induces resistance to *C. gloeosporioides* in avocado fruit. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 7: 326-333.
- Quaglia, M., Ederli, L., Pasqualini, S., Zizzerini, A. 2011. Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 59: 307-315.
- Ramírez, L.M.R., Jacobo, C.J.L., Zacatenco, G.M.G., Parra, Q.R.A., Ávila, M.M.R. 2007. Susceptibilidad de tres cultivares de manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. domestica (Borkh.) Mansf.] y manejo de la roña del manzano [*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.] en sistemas de producción del estado de Hidalgo, México. . *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25: 143-151.
- Ramírez, R.H., Cepeda, M. 1993. El manzano. Trillas. México. p. 208.
- Recasens, G.D.I., Schotsmans, W. 2013. Importancia de la recolección. Índices. *In: Poscosecha de manzana, pera y melocotón*. Viñas, I., Recasens, G.D.I., usall, J., Graell, J. (Ed.). Mundi Prensa. España. pp. 41-59.
- Rivera, Á.S. 2009. Capacidad antagonica a 4 °c y mecanismos de acción de levaduras nativas contra *Penicillium expansum* Link en manzana en poscosecha. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. p. 98
- Rivera, Á.S., Martínez, P.R.Á., Soto, M.L., Chávaro, O.M.S. 2012. Modos de acción de cuatro cepas de levaduras antagonicas contra *Penicillium expansum* Link en manzana. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 18: 227-238.
- Roberts, R.G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*. 80: 526-530.
- Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Albaglis, R., Fang, D. 1994. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruit subjected to various postharvest treatments. *Acta Horticulturae*. 381: 517-523.
- Salunkhe, D.K., Bolin, H.R., Reddy, N.R. 1991. Storage, Processing and Nutritional Quality of fruits and vegetables. 2da ed. CRC Press, Inc.
- Sánchez, V.S.E. 2001. Evaluación de la calidad y la evolución en almacenamiento de variedades de manzana (*Malus spp*) establecidas en Cadereyta, Qro. .Tesis

de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México. pp. 47-56

- Sánchez, V.S.E., Martínez, P.R.A., Castillo, T.J., Fernández, E.E. 2008. Antagonismo de levaduras nativas contra la pudrición azul (*Penicillium expansum* Link) en frutos de manzana. Revista Fitotecnia Mexicana. 31: 359-366.
- Sandoval, C.R.A. 2011. Evaluación de tratamientos de control biológico y químico contra la infección por *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. p. 87
- Sandoval, C.R.A., Martínez, P.R.A., Hernández, I.M., Fernández, E.E., Arvizu, M.S., Soto, M.L. 2011. Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. Revista Chapingo Serie Horticultura. 17: 161-172.
- Sansavini, S., Donati, F., Costa, F., Tartarini, S. 2004. Advances in apple breeding for enhanced fruit quality and resistance to biotic stresses: new varieties for the European market. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 12 Special ed.: 13-52.
- Schoch, G.A., Attias, R., Le Ret, M., Werck-Reichhart, D. 2003. Key substrate recognition residues in the active site of a plant cytochrome P450, CYP73A1. Homology model guided site-directed mutagenesis. European Journal of Biochemistry. 270: 3684-3695.
- Schopfer, C.R., Ebel, J. 1998. Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. Molecular General Genetics. 258: 315-322.
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological control. 50: 205-221.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Sil, J., Das, S., Oliveira, G.R., Amaral, F.F.P., Coelho, Z.M.A. 2013. Screening six potential *Yarrowia lipolytica* strains for best lipid citric acid, biosurfactant and

- lipase production. . *In*: 2nd International Conference on Environment, Energy and Biotechnology Press, I. (Eds.). Singapore, pp. 117-121.
- Sinha, N., Sidhu, J., Barta, J., Wu, J., Cano, M.P. 2012. Handbook of fruits and fruit processing. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, p. 748.
- Smith, J.B., Magee, B.J., Gupton, L.C. 1996. Susceptibility of rabbiteye blueberry cultivars to postharvest diseases. *Plant Disease*. 80: 215-218.
- SMN. 2014. Servicio Meteorológico Nacional.
- Snowdon, A.L. 1990. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Volume 1: General introduction and fruits. p. 302.
- Soto, M.L. 2009. Efecto de levaduras antagónicas en combinación con bicarbonato de sodio sobre el control de la pudrición azul (*Penicillium expansum* Link) en variedades de manzana producidas en Cadereyta, Qro. .Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Querétaro Querétaro, México. p. 115.
- Spadaro, D., Gullino, M.L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *In*: International Journal of Food Microbiology. [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro) ed, pp. 185-194.
- Spadaro, D., Lore, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L. 2013. A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest Biology and Technology*. 75: 1-8.
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M.L. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*. 24: 123-134.
- Spotts, R.A., Cervantes, L.A., Mielke, E.A. 1999. Viability in postharvest decay among apple cultivars. *The American Phytopathological Society*. 83: 1051-1054.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F. 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*. 15: 317-330.

- Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I., Abadias, I., Usall, J. 2011a. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. *In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Lacroix, C. (Eds.). Woodhead Publishing Limited. pp. 364-402.
- Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I., Abadias, M., Usall, J. 2011. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. *In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Christophe Lacroix. Woodhead publishing series in food science technology and nutrition. Great Abington, Cambridge. pp. 364-402.
- Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C., Viñas, I. 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.
- Thompson, J.F., Mitcham, E.J., Gordon, M.F. 2007. Preparación para el Mercado en Fresco. *In: Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas*. Kader, A. (Eds.) 3ra ed. Universidad de California Davis, Estados Unidos. pp. 77- 92.
- Torres, M.A. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*. 138: 414-429.
- Torres, R., Nunes, C., García, J.M., Abadias, M., Viñas, I., Manso, T., Olmo, M., Usall, J. 2007. Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations. *European Journal of Plant Pathology*. 118: 73-83.
- Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Abadias, M., Mir, N., Larrigaudiere, C., Viñas, I. 2011. Anti-oxidant activity of oranges after infection with the pathogen *Penicillium digitatum* or treatment with the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Biological control*. 57: 103-109.
- Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Abadias, M., Viñas, I. 2005. Post-harvest control of *Penicillium expansum* on pome fruits by the bacterium *Pantoea ananatis* CPA-3. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 80: 75-81.
- Torres, R., Valentines, M.C., Usall, J., Viñas, I., Larrigaudiere, C. 2003. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms

- in 'Golden Delicious' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 27: 235-242.
- Trincherro, G.D., Sozzi, G.O., Cerri, A.M., Vilella, F., Frascina, A.A. 1999. Ripening-related changes in the ethylene production, respiration rates and cell-wall enzyme activity in 'Golden berry'. *Postharvest Biology and Technology*. 16: 139-145.
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., Pompon, D. 1997. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 19176-19186.
- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. 2000. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 58: 83-92.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., Ochoa de Eribe, X., Viñas, I. 2001. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 21: 147-156.
- Valentines, M.C., Vilaplana, R., Torres, R., Usall, J., Larrigaudière, C. 2005. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*. 36: 227-234.
- Valverde, V.J.L., J., P.d.G.C.J. 2001. Manual de toxicología medioambiental forense. Centro de Estudios Ramón Areces. España
- Vallejo, C.F.A. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Univ. Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. p. 323.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12: 245-264.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defenselated proteins in infected plants. *Annual Reviews of Phytopathology*. 44: 135-162.
- Van Loon, L.C., Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55: 85-97.



- Van Zeebroeck, M., Van linden, V., Ramon, H., De Baerdemaeker, J., Nicolai, B.M., Tijssens, E. 2007. Impact damage of apples during transport and handling. *Postharvest Biology and Technology*. 45: 157-167.
- Vance, C.P., Kirk, T.K., Sherwood, R.T. 1980. Lignification as a Mechanism of Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 18: 259-288.
- Vázquez, B.M.E., Martínez, P.R.A., Fernández, E.E. 2001. Development of toxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on kernels of native pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] genotypes under different water activities. 89. 2.
- Vero, M.S., Mondino, P. 1999. Control Biológico Postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*. 26: 29-36.
- Vero, S., Garmendia, G., Garat, M.F., De Aurrecoechea, I., Wisniewski, M. 2013. *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. *In: International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities*. pp. 169-180.
- Vilanova, L. 2014. Interacción fruta-patógeno: factores de virulencia de *Penicillium* spp. y mecanismos de defensa de naranjas y manzanas. Tesis de Doctorado. Universidad de Lleida. Lleida, España. p. 223
- Vilanova, L., Teixidó, N., Torres, R., Usall, J., Viñas, I. 2012a. The infection capacity of *P. expansum* and *P. digitatum* on apples and histochemical analysis of host response. *International Journal of Food Microbiology*. 157: 360-367.
- Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Jauset, A.M., Teixidó, N. 2012b. Infection capacities in the orange-pathogen relationship: Compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions. *Food Microbiology*. 29: 56-66.
- Vilanova, L., Wisniewski, M., Norelli, J., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Phillips, J., Droby, S., Teixidó, N. 2013. Transcriptomic Profiling of Apple in Response to Inoculation with a Pathogen (*Penicillium expansum*) and a Non-pathogen (*Penicillium digitatum*). *Plant Molecular Biology Reporter*.
- Viñas, I., Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Torres, R. 2013. Aspectos Básicos de la Patología de la Poscosecha. *In: Poscosecha de manzana, pera y melocotón*.

- Viñas, I., Usall, J., Echevarría, G., Graell, J., Lara, I., Recasens, I. (Ed.). Mundi Prensa. Madrid, España. p. 335.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. International Journal of Food Microbiology. 40: 9-16.
- Wang, Y., Tian, S., Xu, Y., Qin, G.Z., Yao, H. 2004. Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated with *Cryptococcus laurentii* or *Penicillium expansum* at 0° or 20°C. Postharvest Biology and Technology. 34: 21-28.
- Weichmann, J. 1987. Postharvest physiology of vegetables. Dekker. Nueva York. pp. 305, 319.
- Westwood, N.M. 1993. Temperate-Zone Pomology. 3ra ed. Timber Press. Singapur. Asia. pp. 65-425.
- Whitbred, J.M., Schuler, M.A. 2000. Molecular characterization of *CYP73A9* and *CYP82A1* P450 genes involved in plant defense in pea. Plant Physiology. 124: 47-58.
- Wilson, C.L., Chalutz, E. 1989. Postharvest of biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeast and bacteria. Scientia Horticulturae. 40: 105-112.
- Wilson, C.L., Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J.Y., Khan, V.a.A. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. Plant Disease. 78: 837-844.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Biles, C.L., Mclaughlin, R., Chalutz, E., S., D. 1991. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Alternative to synthetic fungicides. Crop Protection. 10: 172-177.
- Wills, R.B., Mc Glasson, W.B., Graham, D., Lee, T.H. 1988. Postharvest. Avi. China. pp. 16, 27, 34-36.
- Wisniewski, M., Wilson, C.L., Hershberger, W. 1989. Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. Canadian Journal of Botany. 67: 2317-2323.

- Xu, X.B., Tian, S.P. 2008. Reducing oxidative stress in sweet cherry fruit by *Pichia membranaefaciens*: a possible mode of action against *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 1170-1177.
- Zavala, I., Martínez, P.R., Fernández, R. 2006. Effect of thinning on size of 'Golden Delicious' and 'Red Delicious' apples established in central Mexico. *Acta Horticulturae*. 727: 451-455.
- Zeng, K., Cao, J., Jiang, W. 2006. Enhancing disease resistance in harvested mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Matisu') fruit by salicylic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 694-698.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, L.M. 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biological control*. 57: 193–201.
- Zhang, T.Y., Sun, X.P., Xu, Q., González-Candelas, L., Li, H.Y. 2013. The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 9087-9098.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23: 283-333.
- Zhou, X., Lu, Z., Lv, F., Zhao, H., Wang, Y., Bie, X. 2011. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Food Science*. 76: M254–M259.