



Efecto de levaduras de origen marino y ulvan en el control poscosecha de *Penicillium italicum* agente causal del moho azul en limón persa

Effect of marine yeasts and ulvan on the postharvest control of *Penicillium italicum* causal agent of blue mold in Persian lemon

María Luisa Vázquez-Vázquez¹, Roberto Gregorio Chiquito-Contreras¹, Gabriela Sanchez-Viveros¹, Juan José Reyes-Pérez², María de Jesús Martínez-Hernández¹, Luis Guillermo Hernández-Montiel^{3*}

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Xalapa. Universidad Veracruzana. Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán S/N. Zona Universitaria. 91090. Xalapa, Veracruz, México.

² Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito. km 1.5. Vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. 23096. La Paz, Baja California Sur, México.

RESUMEN

Penicillium italicum es un hongo que causa el moho azul en los cítricos. Su control es con fungicidas sintéticos, sin embargo, levaduras de origen marino y ulvan son una alternativa a los agro-productos sintéticos. El objetivo del estudio fue determinar el antagonismo *in vitro* de levaduras hacia *P. italicum* y su efecto con ulvan en el control del moho azul en frutos de limón persa. Se evaluó el efecto de ulvan sobre *P. italicum* y levaduras, para esto se determinó el antagonismo *in vitro* por confrontación entre levadura-fitopatógeno y competencia por carbohidratos. Se evaluó la protección de frutos con levaduras y ulvan hacia *P. italicum* y se determinó severidad e incidencia de la enfermedad y expresión de SOD, POX y CAT. No hubo efecto de ulvan sobre los microorganismos. *In vitro* las levaduras inhibieron al fitopatógeno. Los carbohidratos disminuyeron con levaduras y *P. italicum* y se inhibió la germinación de esporas del fitopatógeno. La incidencia de *P. italicum* en los frutos fue disminuida por levaduras y ulvan. POX, CAT y SOD se incrementó en los frutos con levaduras y ulvan. La aplicación de levaduras de origen marino más ulvan puede ser una opción en el control del moho azul en frutos de limón persa.

Palabras clave: Mecanismos antagónicos; control biológico; frutos; enzimas de defensa.

ABSTRACT

Penicillium italicum is a fungus that cause the blue mold on citrus fruits. Its control is with synthetic fungicides, however, marine yeasts and ulvan are an alternative to synthetic agro-products. The objective of this study was to determine *in vitro* antagonism of yeasts against *P. italicum* and its effect with ulvan in the control of blue mold in Persian lemon fruits. The effect of ulvan on *P. italicum* and yeasts was evaluated, for this *in vitro* antagonism was determined by confrontation between yeast-phytopathogen and competition for carbohydrates. The protection of fruits with yeasts and ulvan against *P. italicum* was evaluated and the severity and incidence of the disease and the expression of SOD, POX and CAT were determined. There was no effect of ulvan on microorganisms. *In vitro*, yeasts inhibited the phytopatho-

gen. Carbohydrates decreased with yeast and *P. italicum*, and spore germination of the phytopathogen was inhibited. The incidence of *P. italicum* in the fruits was decreased by yeast and ulvan. POX, CAT and SOD increased in fruits with yeast and ulvan. The application of marine yeasts and ulvan may be an option for the control of blue mold in Persian lemon fruits.

Keyword: Antagonistic mechanisms; biological control; fruit; defense enzymes.

INTRODUCCIÓN

El limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka), es un cítrico comercializado por su alto contenido de vitamina C y aceites esenciales (Pérez-Nájera *et al.*, 2013; Fathollahi *et al.*, 2021). México ocupa el primer lugar a nivel mundial en la producción de limón (FAO, 2019). Sin embargo, existen pérdidas en poscosecha cercana al 50 % de la producción debido a hongos fitopatógenos. El hongo *Penicillium italicum*, es el agente causal del moho azul en los cítricos, afectado drásticamente la calidad del fruto y vida de anaquel (Jing *et al.*, 2020). Los fungicidas sintéticos son los productos más utilizados convencionalmente para el control de *P. italicum* en poscosecha de cítricos (Chen *et al.*, 2020). Sin embargo, han resultado ser ineficientes debido a que favorecen el desarrollo de fitopatógenos resistentes, además de presentar efectos negativos a la salud humana, animal y ambiental (Leyva-Acuña *et al.*, 2020; Ons *et al.*, 2020).

En la actualidad, la aplicación de microorganismos antagónicos como agentes de control biológico hacia fitopatógenos es una alternativa al uso de agro-productos sintéticos (Sui *et al.*, 2020; Cerna-Chávez *et al.*, 2021; Sánchez-Espinosa *et al.*, 2021). Las levaduras aisladas de planta, suelo o fruto han sido eficientes en el control de enfermedades en poscosecha, sin embargo, existen levaduras aisladas de ambientes marinos, las cuales, han demostrado tener mayor capacidad antagónica que las aisladas de ambientes terrestres e incluso de fungicidas sintéticos (Rivas-García *et al.*, 2018). Dentro de los mecanismos antagónicos de levaduras hacia los fitopatógenos están; competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas, compuestos orgánicos

*Autor para correspondencia: Luis Guillermo Hernández Montiel
 Correo electrónico: lhernandez@cibnor.mx

Recibido: 01 de febrero de 2021
Aceptado: 11 de mayo de 2021

volátiles, inducción de resistencia en el hospedero, entre otros (Mukherjee *et al.*, 2020). Generalmente, se determina la capacidad antagonista de una levadura sobre frutos infectados por un fitopatógeno, sin embargo, en la actualidad, los consorcios microbianos han mostrado una mayor capacidad de inhibición debido a que se potencializan sus mecanismos de acción, además de incrementar su adaptación al hospedero (Palmieri *et al.*, 2017).

Por otra parte, el alga verde marina *Ulva* sp. por la actividad de sus polisacáridos ha sido estudiada como antioxidante, antibacteriano, larvicida, anticoagulante, promotora del crecimiento vegetal, inductor de resistencia en el hospedero, entre otros (Li *et al.*, 2020). El polisacárido ulvan protege a las plantas debido a su capacidad de inducir la resistencia sistémica adquirida, aumentando diversos compuestos como peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, proteínas relacionadas con la patogénia (PR), entre otros, las cuales, le confieren una mayor tolerancia al hospedero hacia la infección por fitopatógenos (Abouraicha *et al.*, 2015).

La aplicación de microorganismos antagonistas más el polisacárido ulvan ha sido evaluado en el control de enfermedades en frutos (Rivas-García *et al.*, 2018; Chiquito-Contreras *et al.*, 2019), sin embargo, el efecto de levaduras de origen marino y ulvan no ha sido evaluado en el control de *P. italicum* en frutos de limón persa, lo cual, podría potenciar el control del moho azul, disminuyendo el uso de fungicidas sintéticos. Por lo anterior, en este estudio se determinó la capacidad antagonista *in vitro* de levaduras de origen marino hacia *P. italicum* y su efecto con ulvan en el control del moho azul sobre frutos de limón persa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Levaduras de origen marino

Las levaduras de origen marino fueron donadas por la colección de microorganismos perteneciente al CIBNOR y están identificadas como: *Debaryomyces hansenii* (cepa ECP4 y L1), *Cryptococcus laurentii* (cepa IRIICB) y *Rhodotorula minuta* (cepa IR4CF). Cada levadura se cultivó en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA, Difco™) a 25 °C por 48 h. Posteriormente, se colectó la biomasa y con una solución salina (0.85%) se ajustó su concentración a 1×10^6 células·mL⁻¹ con ayuda de un hematocitómetro.

Polisacárido ulvan

Ulvan (#ULV010, OligoTech®, Elicityl Ltd., Crolles, Francia) se preparó a 2 mg·mL⁻¹ usando agua desionizada estéril.

Muestreo

Se colectaron frutos de limón persa de una empacadora del Municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, México, con signos y síntomas de moho azul, y se etiquetaron para su posterior procesamiento.

Aislamiento y patogenicidad de hongos poscosecha

Se cortaron cuatro trozos del exocarpo (de 0.5 cm²) enfermo de cada fruto. Las muestras se lavaron con hipoclorito de sodio al 5 % por 3 min y después se hicieron dos lavados con agua destilada estéril. Los trozos se dejaron secar y se colocaron en placas con PDA más Bactrol® al 0.05 % y se incubaron a 28 °C por 7 días. Los aislamientos fueron resembrados hasta obtener cultivos puros y se mantuvieron en placas con PDA y tubos inclinados a 4 °C.

Para la prueba de patogenicidad se usó la metodología de Navarta *et al.* (2014). Frutos de limón persa fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 5 % por 3 min, se enjuagaron en agua destilada estéril y secados en una campana de flujo laminar. Posteriormente, a cada fruto se le realizaron dos heridas de 2 mm con un bisturí estéril y se inoculó cada herida con un taquete 0.5 cm² de diámetro proveniente de un cultivo en PDA de 7 días de cada aislamiento de *Penicillium* sp. Un grupo de frutos fue inoculado con agua destilada estéril como control. Los frutos se almacenaron a 27 °C y 90 % HR en recipientes de plástico estériles por 7 días. Se cuantificó diámetro de lesión (mm) y la incidencia de la enfermedad (%DI) (Saravanakumar *et al.*, 2016), mediante la fórmula: %DI = FI/TF × 100. Donde: FI, es el número de frutos infectados y TF, es el total de frutos. Para confirmar los postulados de Koch cada hongo fue re-aislado de los frutos en placas con PDA. Se utilizaron 10 frutos por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Identificación morfológica y molecular de hongos poscosecha

Los hongos fitopatógenos fueron identificados a través de sus características morfológicas utilizando claves taxonómicas (Agrios, 2005) y por técnicas moleculares utilizando la región ITS1-5,8s-ITS-2 del ADN.

Efecto de ulvan sobre el crecimiento de levaduras de origen marino y *Penicillium italicum*

Fue seleccionada la cepa C2T de *P. italicum* por ser la más patogénica y se cultivó en placas con PDA a 25 °C por 7 días. Las esporas se cosecharon en una solución salina al 0.85 % con Tween 80, ajustando su concentración a 1×10^4 esporas·mL⁻¹ con ayuda de un hematocitómetro (Tian *et al.*, 2002).

Efecto de ulvan sobre el crecimiento de levaduras de origen marino y *P. italicum*

Matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio YPD se inocularon con 1 mL de la suspensión ajustada previamente de cada levadura y 2 µL de ulvan. Los matraces se incubaron a 25 °C y 125 rpm. Se recolectaron alícuotas de 10 µL a las 6, 12, 18, 24 y 30 h para determinar el crecimiento de las levaduras de origen marino, con y sin, ulvan utilizando un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 620 nm. Se realizaron lecturas por triplicado por tratamiento en cada intervalo de tiempo y el experimento se repitió dos veces.

Para *P. italicum*, matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio de cultivo Caldo Papa y Dextrosa (Difco, Detroit, USA), se inocularon con 1 mL de la suspensión ajustada previamente del hongo y 2 µL de ulvan. Los matraces se

incubaron a 25 °C y 125 rpm. Se colectaron alícuotas de 10 µL cada 6, 12, 18 y 24 h, colocándolas en un portaobjetos para ser observadas en un microscopio óptico. Se determinó la germinación de esporas, contabilizando 100 esporas y considerando una espora germinada, cuando el tubo germinativo fue igual o mayor al tamaño de la espora. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Antagonismo *in vitro* de levaduras de origen marino hacia *P. italicum*

Los ensayos de confrontación antagonista-fitopatógeno se llevaron a cabo en placas con PDA. Se estría una línea de 4 cm de cada levadura y la combinación de ellas en el centro de la placa, posteriormente a 2 cm de distancia se colocó una alícuota de 20 µL de la suspensión ajustada del fitopatógeno (1×10^4 esporas·mL⁻¹). Un grupo de placas se inoculó con el fitopatógeno y 30 µL de un fungicida sintético (Benomyl 50°, a una concentración de 1000 ppm) y otro grupo solo fue inoculado con *P. italicum* (tratamiento control). Las placas fueron incubadas a 25 °C por 7 días. Se cuantificó el diámetro de crecimiento (mm) del fitopatógeno y se calculó la reducción del crecimiento micelial con la fórmula I (%) = $DC-DT/DC \times 100$. Donde: DC, es el micelio cuantificado en el tratamiento control y DT, es el diámetro del hongo en el tratamiento con levaduras de origen marino. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Competencia *in vitro* por nutrimentos entre levaduras de origen marino y *P. italicum*

Medio de cultivo a base de flavedo de limón persa

El medio de cultivo se elaboró utilizando frutos de limón persa previamente lavados con agua del grifo, agua destilada y pelados con un bisturí estéril. Para preparar el medio a base de limón se utilizó 47.6 g de flavedo que se depositó en un matraz de 1 L con 680 mL de agua destilada. Se esterilizó el medio a 120 °C por 15 min y se vació 10 mL del sobrenadante en tubos falcón.

Desarrollo experimental

En cada tubo falcón, se depositaron 800 µL de la suspensión ajustada previamente de cada levadura y cuando fue en combinación se depositaron 200 µL de cada levadura más 800 µL de la suspensión ajustada previamente de *P. italicum*. Los tubos falcón se incubaron a 25 °C y 150 rpm por 24 h. Se tomaron alícuotas de 3 mL para determinar; carbohidratos totales, sacarosa, glucosa y fructosa, y de 1 mL para determinar el número de esporas germinadas del hongo. Se consideró a una espora germinada cuando el tubo de germinación era igual o mayor al tamaño de la espora. Se observaron 100 esporas por tratamiento y se realizaron tres repeticiones. El experimento se repitió dos veces.

Determinación de carbohidratos

Para la determinación del contenido de glucosa se utilizó el método GOD-PAD de Barham y Trinder (1972), utili-

zando el kit Randox (Randox México S.A. de C.V). Se mezclaron 5 mL de la muestra con 50 mL de la solución reactiva. Después de incubar 30 min se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm. Los valores se expresaron en mg·mL⁻¹. La fructosa se cuantificó por el método de Taylor (1995). Se adicionaron 5 mL de muestra, 20 mL triptamida-HCl y 600 mL de HCl concentrado. Los tubos se mezclaron y calentaron a 60 °C en baño maría por 15 min y se enfriaron en agua por 40 min. Finalmente, se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 518 nm. Las concentraciones se obtienen interpolando las absorbancias obtenidas con una curva de calibración de fructosa y sus valores se expresaron en mg/mL. La sacarosa se cuantificó con el método de Bruner (1964). Se mezclaron 2 mL de muestra y 4 mL de HCl 3 M, posteriormente se calentó a 100°C en baño maría por 15 min. Para neutralizar se añadieron 10 mL de KOH 5N y 600 mL de DNS (3,5-Dinitro ácido salicílico). La mezcla se calentó a 100 °C por 10 min en baño maría y se enfrió en agua con hielo. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. El resultado se interpoló con una curva de calibración y los valores se expresaron en mg·mL⁻¹.

Antagonismo *in vivo* de levaduras de origen marino en frutos de limón persa con *P. italicum* y ulvan

Frutos de limón se lavaron con agua destilada estéril y desinfectados con hipoclorito de sodio al 5 % por 1 min (Yao *et al.*, 2004). Se enjuagaron en agua destilada estéril y se dejaron secar por 1 h en una campana de flujo laminar. Posteriormente, a cada fruto se le realizaron dos heridas de 2 mm de profundidad con una aguja estéril y en cada una se inocularon 20 µL de la suspensión ajustada previamente del fitopatógeno. Después, cada herida fue inoculada de manera individual o combinada con 20 µL de la suspensión ajustada previamente de cada levadura y ulvan. Un grupo de frutos fueron inoculados con el fitopatógeno más 15 µL del fungicida sintético Benomyl 50°. Otro grupo fue inoculado con el fitopatógeno y ulvan y un grupo control solo con *P. italicum*.

Los frutos se colocaron en recipientes de plástico estériles a 25 °C y 90 % HR por 7 días. Se cuantificó diámetro de lesión (mm) y la incidencia de la enfermedad (%DI) (Saranakumar *et al.*, 2016) mediante la fórmula: %DI = $FI/TF \times 100$. Donde: FI, es el número de frutos infectados y TF, es el total de frutos. Para confirmar los postulados de Koch se aisló cada hongo de los frutos enfermos en placas con PDA. Se utilizaron cinco frutos por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Inducción de resistencia en frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino, *P. italicum* y ulvan

Muestra

Para determinar la inducción de resistencia de frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino, *P. italicum* y ulvan se cuantificó la actividad enzimática en los frutos a las 24 h después de la inoculación de cada tratamiento. Se hizo una mezcla compuesta de cada tratamiento colectado (1 g de tejido) de cada fruto. Las muestras fueron almacenadas a -40°C para su respectivo análisis.

Sobrenadante

De la mezcla compuesta se pesó 0.1 g de tejido y se colocó en un tubo eppendorf, después se le agregaron 2 mL de buffer de fosfato y se colocaron en un homogeneizador durante 60 s. Posteriormente, se centrifugaron a 10000xg por 13 min a 5°C. Transcurrido el tiempo, el sobrenadante se recuperó y se colocó en un tubo eppendorf y se almacenó a -40°C para su posterior análisis. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Actividad enzimática

La actividad catalasa (CAT) se determinó en microplacas de 96 pozos, a cada uno se le agregaron 10 µL de buffer de fosfato 100 nM (pH 7.0), más 20 µL del extracto y se incubaron por 6 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 20 µL de peróxido de hidrógeno 8.82 M y se les incubó por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 30 µL de hidróxido de potasio (KOH) 10 M, más 30 µL de reactivo Purlpad (23.5 M) y se les incubó por 10 min. Por último, se añadieron 10 µL de Peryodato de potasio 0.5 M en KOH 0.5 M, y se les volvió a incubar por 5 min. Finalmente, se hicieron lecturas a 540 nm en un espectrofotómetro. Para determinar la actividad de superóxido dismutasa (SOD), se utilizó una microplaca de 48 pozos, donde se colocaron 600 µL de buffer de fosfato. Posteriormente, se les agregaron 20 µL del extracto, se adicionaron 20 µL de xantina oxidasa y, se agregaron otros 600 µL de buffer de fosfato. Se hicieron lecturas a una absorbancia de 560 nm, cada 30 s durante 5 min. La actividad de peroxidasa (POX), se determinó en placas de 96 pozos colocando 10 µL del extracto, después se les adicionaron 50 µL de solución de guaiacol y la muestra se cuantificó a 436 nm en un espectrofotómetro. Los valores fueron expresados en U/g de proteína.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software STATISTICA 10.0 (paquete de software StatSoft, Tulsa, OK) y se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la separación de medias. Antes del análisis de varianza, los porcentajes se transformaron en arco seno-raíz cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, identificación y patogenicidad de hongos aislados de frutos de limón persa

Se aislaron siete hongos de frutos de limón persa identificados como *Penicillium* spp. En la prueba de patogenicidad, de los aislamientos catalogados como; CV2T, C2T, NFC, VFC, 2FC, CVMT y BFC, solo los primeros dos tuvieron una incidencia del 100 % y el resto de los hongos no ocasionaron enfermedad sobre los frutos. El aislamiento C2T fue el que mayor daño ocasionó sobre los frutos con un diámetro de lesión de 49 mm seguido de CV2T con 39 mm. Los hongos CV2T y C2T fueron re-aislados de los frutos confirmando los postulados de Koch. A través de la región ITS1-5.8s-ITS-2 del ADN, los siete hongos fueron identificados como *Penicillium*

italicum mostrando una identidad del 100 % según la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov).

El limón ocupa dentro de los cítricos el segundo lugar en importancia, tanto por su consumo en fresco como por su uso industrial. Dentro del contexto mundial, México está considerado como el principal país productor en las variedades persa y mexicano (SADER, 2019). Después de la cosecha, el limón se almacena y manipula en plantas de embalaje con el fin de mantener su vida y calidad poscosecha, así como reducir la descomposición debido a la infección por fitopatógenos (Papoutsis *et al.*, 2019). Sin embargo *P. italicum*, agente causal del moho azul, es uno de los principales hongos que causan pérdidas económicas de hasta el 80 % de la producción de cítricos a nivel mundial (El-Otmani *et al.*, 2011).

En México, *P. italicum* es uno de los principales fitopatógenos que causan pérdidas poscosecha cercanas al 50 % de la producción que incluye limón, naranja y mandarina (Ochoa *et al.*, 2007). Debido a la gran cantidad de esporas que produce *P. italicum*, infecta rápidamente a las heridas de los frutos por lo que su control debe ser durante y después de la cosecha, para evitar grandes pérdidas de fruta (Kellerman *et al.*, 2016). La rápida identificación de los fitopatógenos en poscosecha es fundamental para el manejo de las enfermedades en los cítricos limitando las pérdidas de fruta y manteniendo su calidad organoléptica (Kanashiro *et al.*, 2020).

Efecto de ulvan sobre *P. italicum* y levaduras de origen marino

La presencia de ulvan no influyó sobre la germinación de esporas de *P. italicum* (Figura 1). En relación a las levaduras de origen marino, no existió un efecto de ulvan sobre el crecimiento de los microorganismos (Figura 2). La dinámica de crecimiento fue similar entre todos los tratamientos.

Las algas marinas han recibido una gran atención durante los últimos años, debido a la química natural de sus productos (Pankiewicz *et al.*, 2016), principalmente a los polisacáridos que presentan diversas actividades biológicas como anticoagulantes, antivirales, antibacterianas, antitumorales, antiproliferativas, inmunomoduladoras, entre otras (Berri *et al.*, 2016). *Ulva* sp. es un alga verde marina que está

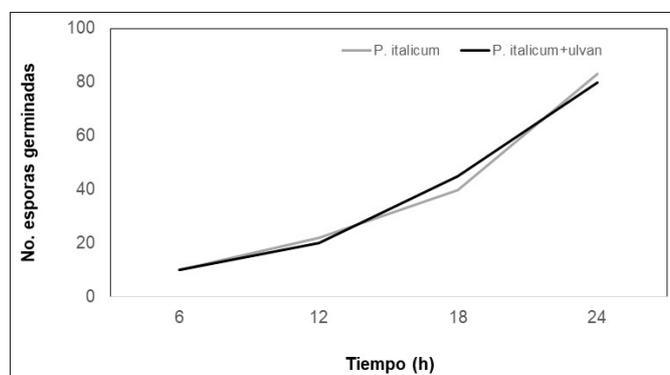


Figura 1. Dinámica de germinación de esporas de *P. italicum* con ulvan.
Figure 1. Spore germination dynamics of *P. italicum* with ulvan.

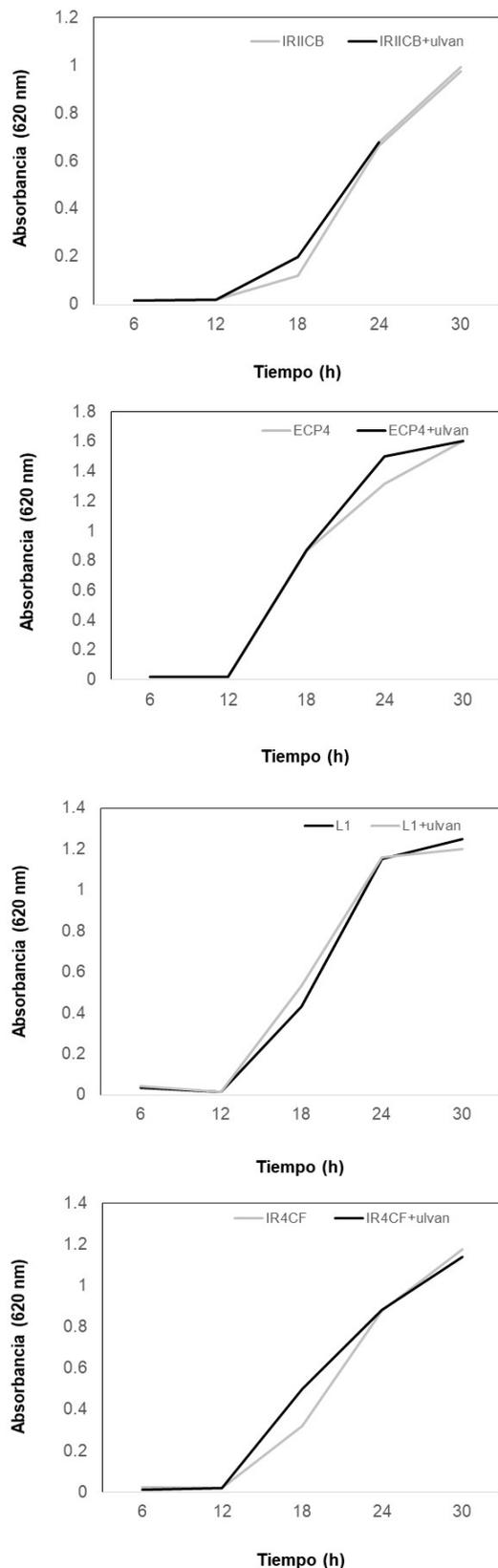


Figura 2. Dinámica de crecimiento de levaduras de origen marino con ulvan. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*.
Figure 2. Growth dynamics of marine yeasts with ulvan. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*.

recibiendo una gran atención, debido a sus propiedades físico-químicas y biológicas de posible interés para aplicaciones en diversas áreas como la cosmetología, medicina, agrícola, entre otras (Berri *et al.*, 2016).

Ulvan es un polisacárido aislado de *Ulva* sp. que presenta actividad antiviral, antibacteriano, antioxidante, antiparasitario, entre otros (Chiquito-Contreras *et al.*, 2019). En la agricultura, se ha utilizado como promotor del crecimiento vegetal e inductor de resistencia en las plantas, sin embargo, no presenta una acción antimicrobiana directa sobre los microorganismos (Rivas-García *et al.*, 2018). Su principal función en las plantas es inducir la producción de enzimas de defensa como la catalasa (CAT), peroxidasa (POX), polifenol oxidasa, superóxido dismutasa (SOD), compuestos fenólicos, proteínas relacionadas con la patogenia (PR), entre otros (Khedea *et al.*, 2020; Moenne *et al.*, 2020).

Antagonismo *in vitro* de levaduras de origen marino hacia *P. italicum*

Las levaduras de origen marino inhibieron el crecimiento micelial del fitopatógeno *in vitro* (Figura 3). La inhibición que ejercieron las levaduras de manera individual o en consorcio hacia *P. italicum* fue entre 21 y 38 %. El fungicida sintético Benomyl 50° solo limito a 3 % el crecimiento de *P. italicum*.

Existen diversos reportes sobre la capacidad antagonista de levaduras hacia fitopatógenos, Taqarort *et al.* (2008) evaluaron el biocontrol de *P. digitatum* mediante el uso de las levaduras *Pichia anomala* y *D. hansenii*. Por su parte, Zhang *et al.* (2007) y Droby *et al.* (2009) observaron una disminución del moho azul por la acción de la levadura *Cryptococcus laurentii*. Sin embargo, la acción antagonista de los microorganismos puede potenciarse si se utilizan consorcios microbianos, los cuales pueden tener un mayor espectro de actividad, por lo tanto, pueden reducir la presencia de los fitopatógenos eficazmente en comparación con su aplicación de manera individual (Palmieri *et al.*, 2017). La eficiencia de los consorcios microbianos podría resultar no solo de la actividad de las especies individuales, sino también de su acción sinérgica que suprimirá el crecimiento de un fitopatógeno a través de diferentes mecanismos de acción (Panebianco *et al.*, 2015). La aplicación de consorcios microbianos ha mejorado la eficiencia del control biológico de enfermedades en muchos sistemas agrícolas (Jain *et al.*, 2020).

Por otra parte, el uso de fungicidas sintéticos sigue siendo la primera opción en el control de fitopatógenos de importancia agrícola (Zhu *et al.*, 2020). Para el control de *Penicillium* sp. se recomienda el uso de diversos fungicidas sintéticos, entre ellos el Benomyl 50°, sin embargo, han perdido eficiencia en el control del fitopatógeno debido a la resistencia que presentan algunas cepas de diversas especies de *Penicillium* (Moussa *et al.*, 2021).

Competencia por carbohidratos entre levaduras de origen marino y *P. italicum*

El contenido de fructosa, glucosa y sacarosa disminuyó significativamente en presencia de levaduras de origen ma-

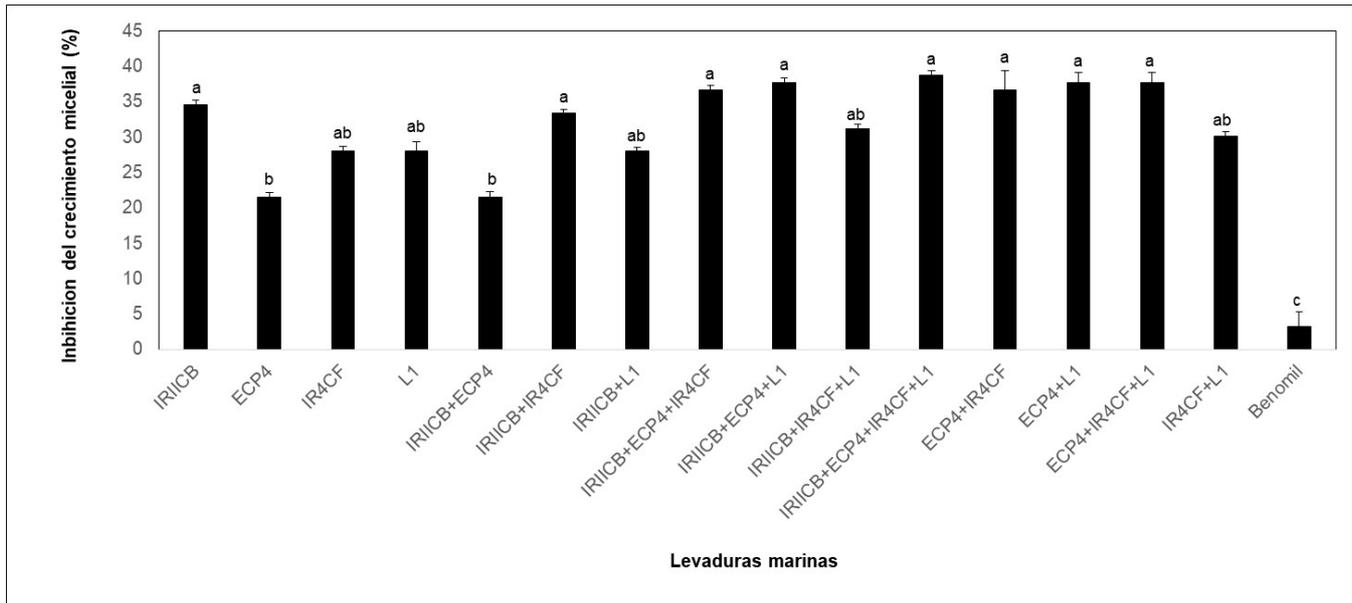


Figura 3. Efecto de la aplicación individual o en consorcio de levaduras de origen marino sobre el crecimiento micelial de *P. italicum*. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n = 3). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 3. Effect of the individual or consortium application of marine yeasts on the mycelial growth of *P. italicum*. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n = 3). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

rino y *P. italicum* (Figura 4). El consorcio con ECP4, L1, IRIICB y IR4CF más el fitopatógeno fue el que disminuyó significativamente el contenido de carbohidratos en el medio de cultivo a base de flavedo de limón persa (control). Por otra parte, las levaduras de origen marino inhibieron significativamente el número de esporas germinadas de *P. italicum* (Figura 5). El consorcio conformado por ECP4, L1, IRIICB y IR4CF, inhibió en un 77 % la germinación de esporas del fitopatógeno. *P. italicum* germinó en un 89 %.

Todos los microorganismos requieren de azúcares como fuentes de carbono para su crecimiento y reproducción, la competencia por espacio y nutrientes es una vía antagónica de levaduras hacia fitopatógenos (Mukherjee *et al.*, 2020), este mecanismo es eficaz debido a que las levaduras tienen un metabolismo más rápido que el fitopatógeno, agotando rápidamente las fuentes de carbono (fructosa, glucosa, sacarosa, entre otros) y limitando a la germinación de esporas (Spadaro y Droby, 2016; Adrees *et al.*, 2019). Los

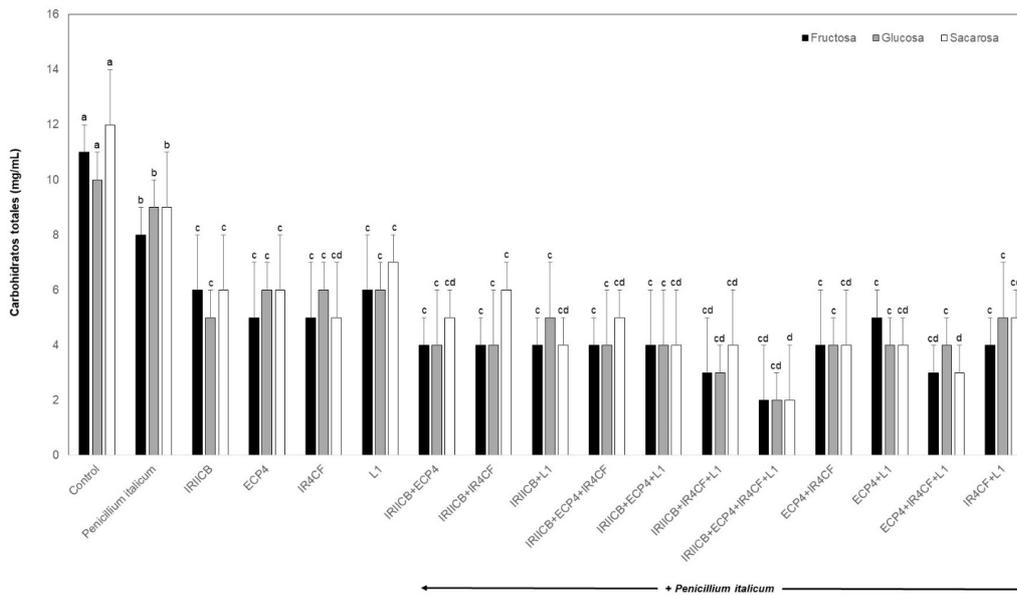


Figura 4. Contenido de carbohidratos en medio de cultivo a base de flavedo de limón persa inoculado con levaduras de origen marino y *P. italicum*. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n = 3). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 4. Carbohydrate content in culture medium based on Persian lemon flavedo inoculated with marine yeast and *P. italicum*. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n = 3). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

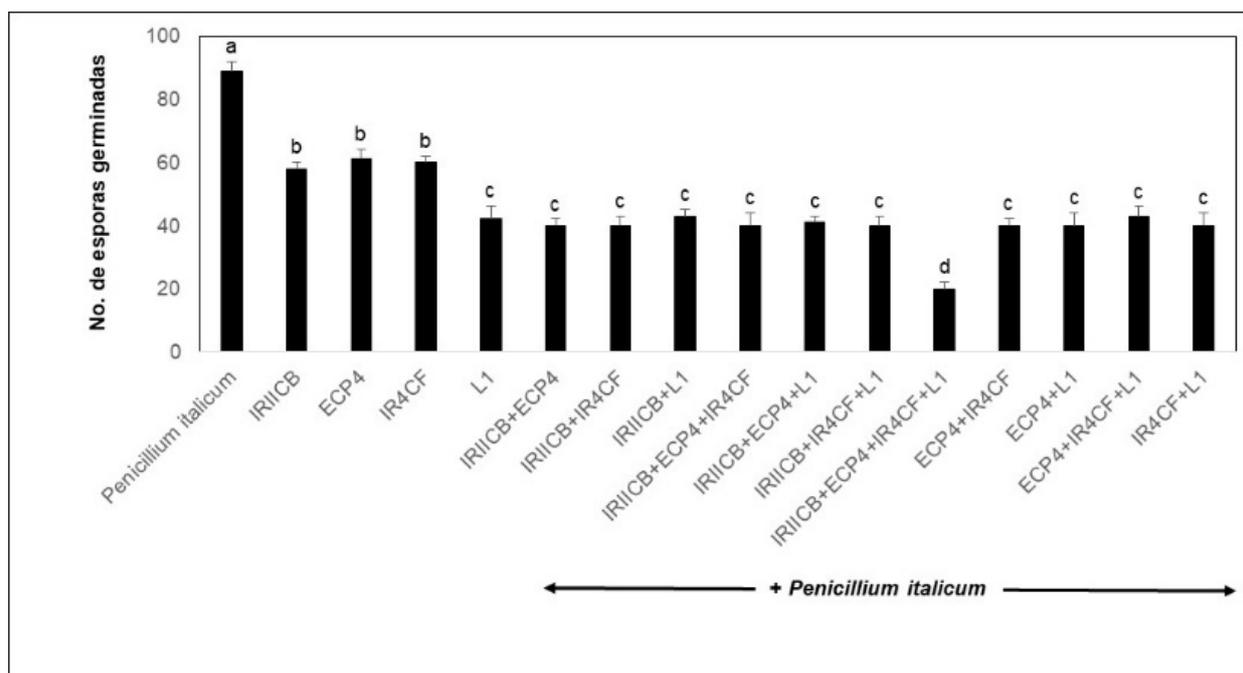


Figura 5. Germinación de esporas de *P. italicum* en medio de cultivo a base de flavedo de limón persa. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n = 3). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 5. Spore germination of *P. italicum* in a Persian lemon flavedo-based culture medium. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n = 3). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

microorganismos antagonistas deben tener la capacidad de competir efectivamente por los nutrientes disponibles en el nicho ecológico para colonizar y limitar el crecimiento de los fitopatógenos. Al respecto, Spadaro *et al.* (2010), mencionan que los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de asimilar una amplia variedad de mono y disacáridos. Hernández-Montiel *et al.* (2010), reportaron que las levaduras presentan una mayor tasa de consumo de glucosa y sacarosa que los fitopatógenos, lo cual restringe la germinación de la espora de los hongos.

Efecto levaduras de origen marino y ulvan en el control de *P. italicum* en frutos de limón persa

La incidencia de *P. italicum* en frutos de limón persa fue disminuida por la inoculación de levaduras de origen marino, ulvan y el fungicida sintético (Figura 6). La aplicación del consorcio microbiano con las cepas ECP4, L1, IRIICB y IR4CF disminuyó la incidencia de la enfermedad hasta en un 20 % y los frutos de limón persa con Benomyl 50° más *P. italicum* presentaron un 60 % de incidencia. En relación al diámetro de lesión, las levaduras de origen marino, ulvan y Benomyl 50° disminuyeron significativamente el daño ocasionado por el fitopatógeno en frutos de limón persa (Figura 7). Los frutos inoculados con el consorcio conformado por ECP4, L1, IRIICB y IR4CF presentaron el diámetro de lesión más bajo con valores de 2 mm. La aplicación de las levaduras de origen marino de manera individual o en consorcio disminuyó el diámetro de lesión en menos del 60 % en comparación con el tratamiento de los frutos con Benomyl 50° y el fitopatógeno.

P. italicum fue re-aislado de los frutos enfermos confirmando los postulados de Koch.

La actividad enzimática de POX, CAT y SOD fue incrementada en los frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino y ulvan (Tabla 1). Los valores más altos de las enzimas fueron cuantificados en el tratamiento de los frutos con el fitopatógeno más las levaduras y ulvan.

Diversos mecanismos antagónicos por levaduras están relacionados con el control biológico de enfermedades en los frutos (Wassermann *et al.*, 2019), incluyendo la competencia por nutrientes y espacio, toxinas *killer*, producción de enzimas hidrolíticas, parasitismo, bio-películas, compuestos orgánicos volátiles, inducción de resistencia del hospedero, entre otros (Konsue *et al.*, 2020; Solairaj *et al.*, 2020). La protección de los frutos puede ser incrementada cuando se aplican más de dos microorganismos antagónicos compatibles (Zhimo *et al.*, 2020), los cuales presentan varias ventajas sobre el uso de una sola especie, incluida una mayor eficacia de biocontrol de los fitopatógenos, resistencia al estrés ambiental y rápida adaptación al hospedero (Pandhal y Noirel, 2014; Mukherjee *et al.*, 2020).

Por otra parte, levaduras de origen marino y ulvan son capaces de activar la producción de enzimas SOD, CAT y POX en diversos hospederos disminuyendo las infecciones ocasionadas por diversos fitopatógenos (Khedia *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Las enzimas de defensa protegen a los frutos de diversas especies reactivas de oxígeno (ROS) causadas por fitopatógenos (Czarnecka *et al.*, 2019). Las ROS originan daños directamente sobre las células vegetales afectando

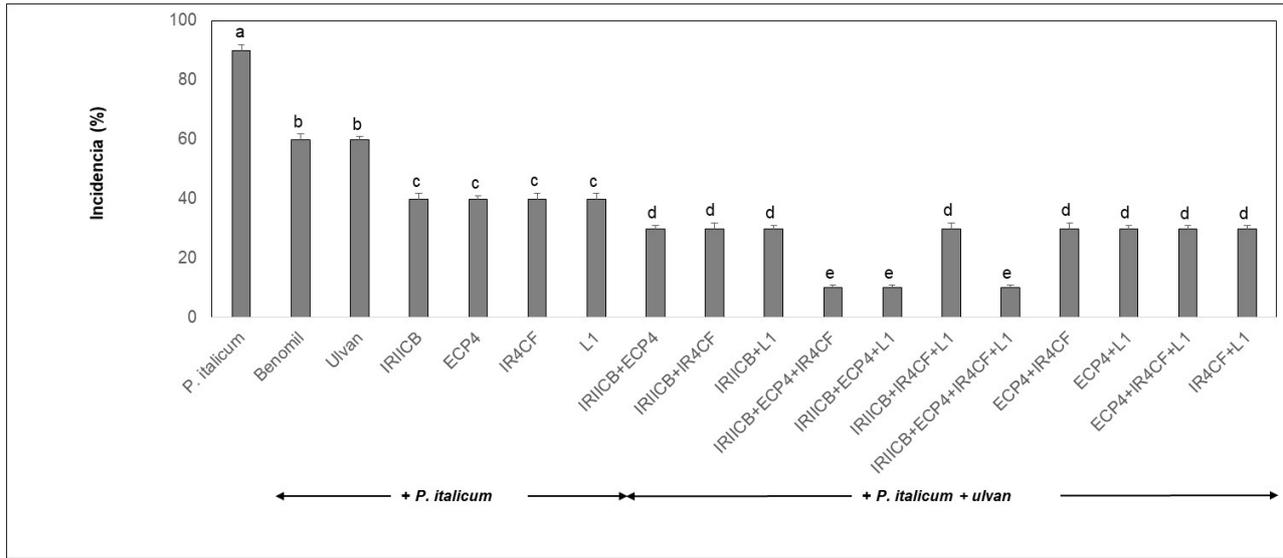


Figura 6. Incidencia de *P. italicum* en frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino y ulvan. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n= 5). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 6. Incidence of *P. italicum* in Persian lemon fruits inoculated with marine yeasts and ulvan. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n= 5). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

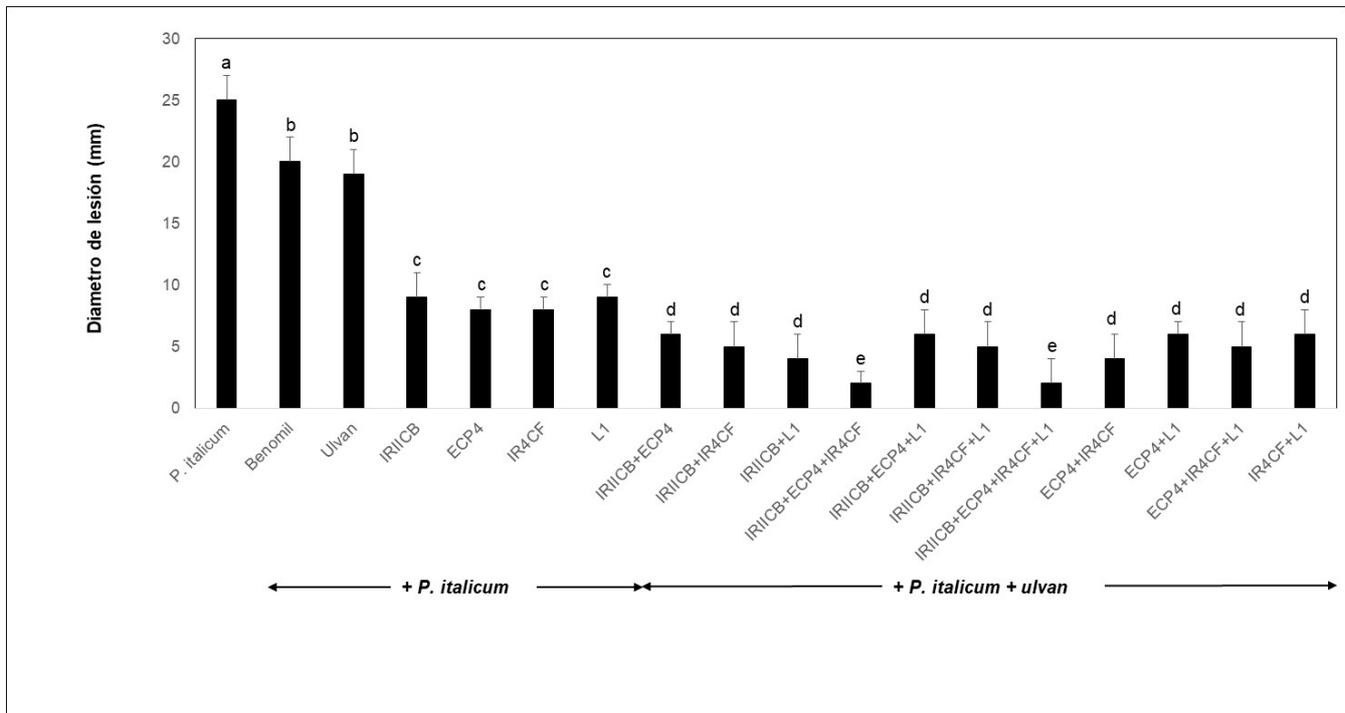


Figura 7. Diámetro de lesión ocasionado por *P. italicum* en frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino y ulvan. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n= 5). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 7. Diameter of lesion caused by *P. italicum* in Persian lemon fruits inoculated with marine yeast and ulvan. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n= 5). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

Tabla 1. Actividad enzimática de frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino, ulvan y *P. italicum*.**Table 1.** Enzymatic activity of Persian lemon fruits inoculated with marine yeasts, ulvan and *P. italicum*.

Tratamiento [§]	Actividad enzimática (U/g de proteína)			
	POX [¶]	CAT	SOD	
<i>P. italicum</i>	8.41±2 d [‡]	7.98±1 g	6.35±2 e	
Ulvan+ <i>P. italicum</i>	14.92±3 b	10.28±2 e	8.19±1 d	
IRIICB+ <i>P. italicum</i>	8.19±2 d	7.78±2 g	10.67±1 c	
ECP4+ <i>P. italicum</i>	7.91±1 d	8.98±1 f	10.31±2 c	
IR4CF+ <i>P. italicum</i>	7.33±1 d	8.54±1 f	11.41±2 c	
L1+ <i>P. italicum</i>	8.28±2 d	5.47±3 h	10.11±3 c	
+ <i>P. italicum</i> + ulvan	IRIICB+ECP4	11.21±2 bc	12.64±3 cd	13.21±3 b
	IRIICB+IR4CF	11.92±3 bc	13.15±2 c	13.48±3 b
	IRIICB+L1	12.17±2 bc	12.87±3 cd	14.11±2 b
	IRIICB+ECP4+IR4CF	14.29±3 b	15.68±1 b	14.56±2 b
	IRIICB+ECP4+L1	14.89±1 b	16.47±1 b	14.89±3 b
	IRIICB+IR4CF+L1	15.27±1 b	15.87±2 b	15.13±2 b
	IRIICB+ECP4+IR4CF+L1	19.97±3 a	20.45±3 a	19.55±1 a
	ECP4+IR4CF	12.19±2 bc	12.35±2 c	14.38±1 b
	ECP4+L1	12.34±2 bc	13.01±1 c	13.98±2 b
	ECP4+IR4CF+L1	11.97±1 bc	13.22±1 c	14.78±2 b

[§]Tratamiento: ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. [¶]Actividad enzimática: POX (peroxidasa), CAT (catalasa), SOD (superóxido dismutasa). [‡]Las letras en las columnas representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

diversas funciones metabólicas de las plantas (Qi *et al.*, 2019). La inducción de SOD en las plantas permite la reducción de las ROS en la célula, la POX y CAT disminuye y protege a las células vegetales de la actividad de H_2O_2 (Klein *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

Las levaduras de origen marino (*D. hansenii*, *R. minuta* y *C. laurentii*) inhibieron *in vitro* e *in vivo* a *P. italicum*. La aplicación de los consorcios de levaduras y ulvan sobre los frutos de limón persa disminuyó al moho azul ocasionado por *P. italicum* superando al fungicida sintético Benomyl 50*. La competencia por fuentes de carbono e inducción de resistencia del hospedero son dos mecanismos antagónicos de levaduras hacia fitopatógenos. La validación de consorcios a base de microorganismos antagónicos en empacadoras de limón persa permitirá la disminución del uso de fungicidas sintéticos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento del proyecto 352/2015. M.L. Vázquez-Vázquez agradece al CONACYT por la beca otorgada para realizar sus estudios de posgrado a nivel maestría. R.G. Chiquito-Contreras y L.G. Hernandez-Montiel fueron codirectores de tesis.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores de este trabajo no tienen ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Abouraicha, E., El-Alaoui-Talibi, Z., El-Boutachfai, R., Petit, E., Courtois, B., Coutois, J. and El Modafar, C. 2015. Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*. 181: 121-128.
- Adrees, H., Haider, M., Anjum, T. and Akram, W. 2019. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. *Crop Protection*. 115: 75-83.
- Berri, M., Slugocki, C., Oliver, M., Helloin, E., Jacques, I., Salmon, H., Demais, H., Le Goff, M. and Collen, P.N. 2016. Marine-sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cells. *Journal of Applied Phycology*. 28: 2999-3008.
- Chen, C., Wan, C., Peng, X., and Chen, J. 2020. A flavonone pinocembroside inhibits *Penicillium italicum* growth and blue mold development in 'Newhall' navel oranges by targeting membrane damage mechanism. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 165: 104505.
- Cerna-Chávez, E., De Lira-Ramos, K., Ochoa-Fuentes, Y., Delgado-Ortiz, J., Cepeda-Siller, M. y González-Gaona, E. 2021. Actividad de extractos de plantas y hongos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba (*Conotrachelus dimidiatus* Champion) Coleóptera: Curculionidae. *Biotecnia*. 23(1): 70-76.
- Chiquito-Contreras, R., Murillo-Amador, B., Carmona-Hernandez, S., Chiquito-Contreras, C. and Hernandez-Montiel, L. 2019. Effect of marine bacteria and ulvan on the activity of antioxidant defense enzymes and the bio-protection of papaya fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Antioxidants*. 8(12): 580.
- Collen, P. 2016. Marine sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cell. *Journal of Applied Phycology*. 28: 2999-3008.
- Czarnecka, M., Żarowska, B., Połomska, X., Restuccia, C. and Cirvilleri, G. 2019. Role of biocontrol yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Wickerhamomyces anomalus* in plants defense mechanisms against *Monilinia fructicola* in apple fruits. *Food Microbiology*. 83: 1-8.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D. and Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*. 52(2): 137-145.
- El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A. and Zacarias, L. 2011. *Citrus* spp.: Orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. *In: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 437-516e). Woodhead Publishing.
- Fathollahi, I., Farmani, J., Kasai, M. and Hamishehkar, H. 2021. Some physical properties of Persian lime (*Citrus latifolia*) seeds and physicochemical properties of the seed oil as affected by solvent extraction and cold pressing methods.

- Journal of Food Measurement and Characterization. 15: 1169-1178.
- FAO. 2019. Annual statistics. <http://www.fao.org>.
- Guo, K., Li, Z., Tian, H., Du, X., Liu, Z., Huang, H., Wang, P., Ye, Z., Zhang, X. and Tu, L. 2020. Cytosolic ascorbate peroxidases plays a critical role in photosynthesis by modulating reactive oxygen species level in stomatal guard Cell. *Frontiers in Plant Science*. 11: 446.
- Hernandez-Montiel, L., Ochoa, J., Troyo-Diéguez, E. and Larralde-Corona, C. 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology*. 56(2): 181-187.
- Jain, A., Chatterjee, A. and Das, S. 2020. Synergistic consortium of beneficial microorganisms in rice rhizosphere promotes host defense to blight-causing *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Planta*. 252(6): 1-25.
- Jing, J., Zhang, H., Xue, Y. and Zeng, K. 2020. Effects of INA on postharvest blue and green molds and anthracnose decay in citrus fruit. *Journal of Integrative Agriculture*. 19(5): 1396-1406.
- Kanashiro, A., Akiyama, D., Kupper, K. and Fill, T. 2020. *Penicillium italicum*: An underexplored postharvest pathogen. *Frontiers in Microbiology*. 11: 606852.
- Kellerman, M., Joubert, J., Erasmus, A. and Fourie, P. 2016. The effect of temperature, exposure time and pH on imazalil residue loading and green mould control on citrus through dip application. *Postharvest Biology and Technology*. 121: 159-164.
- Khedra, J., Dangariya, M., Nakum, A., Agarwal, P., Panda, A., Parida, A., Gangapur, D., Meena, R. and Agarwal, P. 2020. Sargassum seaweed extract enhances *Macrophomina phaseolina* resistance in tomato by regulating phytohormones and antioxidative activity. *Journal of Applied Phycology*. 32(6): 4373-4384.
- Klein, A., Hüselmann, L., Keyster, M. and Ludidi, N. 2018. Exogenous nitric oxide limits salt-induced oxidative damage in maize by altering superoxide dismutase activity. *South African Journal of Botany*. 115: 44-49.
- Konsue, W., Dethoup, T. and Limtong, S. 2020. Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. *Microorganisms*. 8(3): 317.
- Leyva-Acuña, M., Quintana-Obrigón, E., Soto-Landeros, F., Baez-Parra, K., Montes-Avila, J. y Angulo-Escalante, M. 2020. Actividad antifúngica de extractos metanólicos y alcaloides de *Jatropha platyphylla* contra *Aspergillus parasiticus*. *Biotecnica*. 22(3): 100-107.
- Li, B., Xu, H., Wang, X., Wan, Y., Jiang, N., Qi, H. and Liu, X. 2020. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of high sulfate content purified polysaccharide from *Ulva pertusa*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 146: 756-762.
- Moenne, A., Gómez, M., Laporte, D., Espinoza, D., Sáez, C. and González, A. 2020. Mechanisms of copper tolerance, accumulation, and detoxification in the marine macroalga *Ulva compressa* (Chlorophyta): 20 years of research. *Plants*. 9(6): 681.
- Moussa, H., El Omari, B., Chefchaou, H., Tanghort, M., Mzabi, A., Chami, N. and Remmal, A. 2021. Action of thymol, carvacrol and eugenol on *Penicillium* and *Geotrichum* isolates resistant to commercial fungicides and causing postharvest citrus decay. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 43(1): 26-34.
- Mukherjee, A., Verma, J., Gaurav, A., Chouhan, G., Patel, J. and Hesham, A. 2020. Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(4): 1497-1510.
- Ochoa, J., Hernandez-Montiel, L., Latisnere-Barragan, H., León de la Luz, J. y Larralde-Corona, C. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5: 352-359.
- Ons, L., Bylemans, D., Thevissen, K. and Cammue, B. 2020. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. *Microorganisms*. 8(12): 1930.
- Palmieri, D., Vitullo, D., De Curtis, F. and Lima, G. 2017. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against fusarium decline of chickpea. *Plant and Soil*. 412(1-2): 425-439.
- Pandhal, J. and Noirel, J. 2014. Synthetic microbial ecosystems for biotechnology. *Biotechnology Letters*. 36: 1141-1151.
- Panebianco, S., Vitale, A., Polizzi, G., Scala, F. and Cirivilleri, G. 2015. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. *Biological Control*. 84: 19-27.
- Pankiewicz, R., Leska, B., Messyasz, B., Fabrowska, J., Soloducha, M. and Pikosz, M. 2016. First isolation of polysaccharides ulvans from the cell walls of freshwater algae. *Algal Research*. 19: 348-35.
- Papoutsis, K., Mathioudakis, M., Hasperué, J. and Ziogas, V. 2019. Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Trends in Food Science and Technology*. 86: 479-491.
- Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M. y Del-Toro-Sánchez, C. 2013. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnica*. 15(3): 18-22.
- Qi, C., Lin, X., Li, S., Liu, L., Wang, Z., Li, Y., Bai, R., Xie, Q., Zhang, N., Ren, S., Zhao, B., Li, X., Fan, S. and Guo, Y. 2019. SoHSC70 positively regulates thermotolerance by alleviating cell membrane damage, reducing ROS accumulation, and improving activities of antioxidant enzymes. *Plant Science*. 283: 385-395.
- Rivas-García, T., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Chiquito-Contreras, R., Rincon-Enriquez, G. and Hernandez-Montiel, L. 2018. Effect of ulvan on the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* against fruit rot of *Cucumis melo* L. *Agronomy*. 8(12): 273.
- Sánchez-Espinosa, A., Villarruel-Ordaz, J. y Maldonado-Bonilla, L. 2021. Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico. *Biotecnica*. 23(1): 127-134.
- SADER, 2019. Estadísticas de cítricos, Superficie Cosechada, Sembrada y Producción. www.gob.mx
- Solairaj, D., Legrand, N., Yang, Q. and Zhang, H. 2020. Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and *in vivo* biocontrol activity of selected yeasts against them. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 110: 101478.

- Spadaro, D., Ciavarella, A., Dianpeng, Z., Garibaldi, A. and Gullino, M. 2010. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal of Microbiology*. 56(2): 128-137.
- Spadaro, D. and Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*. 47: 39-49.
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Piombo, E., Wu, X. and Yue, J. 2020. Genome sequence, assembly, and characterization of the antagonistic yeast *Candida oleophila* used as a biocontrol agent against post-harvest diseases. *Frontiers in Microbiology*. 11: 295.
- Taqarort, N., Echairi, A., Chaussod, R., Nouaim, R., Boubaker, H., Benaoumar, A. and Boudyach, E. 2008. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 3031-3038.
- Wassermann, B., Kusstatscher, P. and Berg, G. 2019. Microbiome response to hot water treatment and potential synergy with biological control on stored apples. *Frontiers in Microbiology*. 10: 2502.
- Zhang, H., Zheng, X. and Yu, T. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*. 18(4): 287-291.
- Zhang, X., Zong, Y., Li, Z., Yang, R., Li, Z., Bi, Y. and Prusky, D. 2020. Postharvest *Pichia guilliermondii* treatment promotes wound healing of apple fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 167: 111228.
- Zhimo, V. Y., Biasi, A., Kumar, A., Feygenberg, O., Salim, S., Vero, S., Wisniewski, M. and Droby, S. 2020. Yeasts and bacterial consortia from kefir grains are effective biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. *Microorganisms*. 8(3): 428.
- Zhu, J., Gao, J., Yang, C., Shang, X., Zhao, Z., Lawoe, R., Zhou, R., Sun, Y., Yin, X. and Liu, Y. 2020. Design, synthesis, and antifungal evaluation of neocryptolepine derivatives against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(8): 2306-2315.