



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS
ANTAGÓNICOS DE *Debaryomyces hansenii* CONTRA
Colletotrichum gloeosporioides Y SU EFECTO EN LA
PROTECCIÓN POSCOSECHA EN PAPAYA VAR.
MARADOL**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Eric Daniel Gutiérrez Pérez

La Paz, Baja California Sur, Noviembre de 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

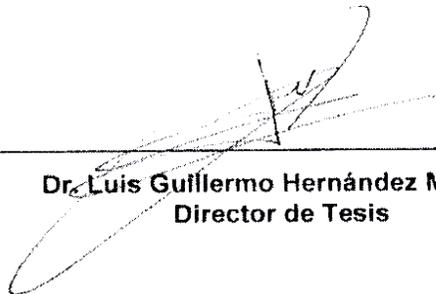
En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 11:00 horas del día 14 del Mes de Noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada: **"CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS ANTAGÓNICOS DE *Debaryomyces hansenii* CONTRA *Colletotrichum gloeosporioides* Y SU EFECTO EN LA PROTECCIÓN POSCOSECHA EN PAPAYA VAR. MARADOL"**

Presentada por el alumno: **Eric Daniel Gutiérrez Pérez**

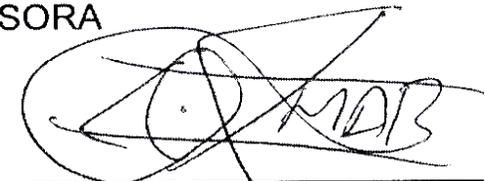
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **AGRICULTURA SUSTENTABLE**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

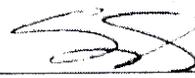
LA COMISIÓN REVISORA



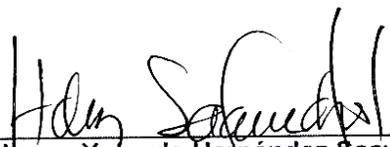
Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Director de Tesis



Dr. Bernardo Murillo Amador
Co-Tutor



Dra. Silvana Vero Méndez
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Comité Tutorial

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

México

Director

Dr. Bernardo Murillo Amador

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

México

Co-Tutor

Dra. Silvana Vero Méndez

Facultad de Química, Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Co-Tutor

Comité Revisor

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Dr. Bernardo Murillo Amador

Dra. Silvana Vero Méndez

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

Jurado en el Examen de Grado

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Dr. Bernardo Murillo Amador

Dra. Silvana Vero Méndez

Dra. Alejandra Nieto Garibay (Suplente)

«Dudar de todo o creérselo todo son dos soluciones
igualmente cómodas que nos eximen de reflexionar.»

HENRI POINCARÉ, *La ciencia y la hipótesis*.

Resumen

Se evaluó el efecto de control de *Debaryomyces hansenii* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* a través de los mecanismos antagónicos de competencia por carbohidratos, producción de enzimas hidrolíticas, producción de compuestos orgánicos volátiles, adhesión al patógeno, formación de biopelículas y concentración del antagonista. Además, se analizó el efecto de control sobre *C. gloeosporioides* al inocular al antagonista en frutos de papaya var. Maradol en diferentes tiempos, y se realizó un ensayo bajo condiciones de comercialización local. Los resultados muestran que la concentración de 10^8 cel·mL⁻¹ de antagonista maximiza el efecto de los mecanismos antagónicos contra *C. gloeosporioides*. Con esta concentración se observa que la levadura es capaz de producir biopelículas sobre las heridas de frutos de papaya, evitando al 100% la infección de *C. gloeosporioides*. El ensayo de tiempos de inoculación del antagonista indicó que la levadura es capaz de controlar al fitopatógeno al 100%, antes y después de su establecimiento en el fruto de papaya. Bajo condiciones de comercialización local la levadura tiene un efecto de protección contra hongos en el 50% de los frutos, mientras que el fungicida comercial solo presenta un 30%. Además, la aplicación de levadura no tiene efecto en el desarrollo del color de los frutos. La levadura *D. hansenii* presenta todos los mecanismos antagónicos ensayados; sin embargo, la protección de los frutos de papaya contra la antracnosis está relacionada directamente con la competencia por espacio y carbohidratos, así como con la formación de biopelículas.

PALABRAS CLAVE: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Debaryomyces hansenii*, Mecanismos antagónicos, Biopelículas.



Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Director de Tesis

Summary

The control effect of *Debaryomyces hansenii* on *Colletotrichum gloeosporioides* was evaluated through the antagonistic mechanisms of carbohydrate competition, production of hydrolytic enzymes, production of volatile organic compounds, adhesion on phytopathogen, biofilm formation and antagonist concentration. In addition, the control effect on *C. gloeosporioides* was tested when inoculating the antagonist on Maradol papaya fruits at different times, and an assay was performed under local marketing conditions. The results show that the antagonist concentration at 10^8 cel·mL⁻¹ maximizes the effect of antagonistic mechanisms against *C. gloeosporioides*. With that concentration, it is observed that the yeast is capable of producing biofilms on the wounds of papaya fruits, avoiding the infection of *C. gloeosporioides* at 100%. The test of inoculation times of the antagonist indicated that the yeast can control the phytopathogen at 100%, before and after its establishment in the papaya fruits. Under local commercialization conditions yeast has a protective effect against fungi in 50% of the fruits, while the commercial fungicide only presents 30%. In addition, the application of yeast has no effect on the development of fruit color. The yeast *D. hansenii* presents all the antagonistic mechanisms tested; however, the protection of papaya fruits against anthracnose is directly related to competition for space and carbohydrates, as well as the formation of biofilms.

KEY WORDS: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Debaryomyces hansenii*, Antagonic mechanisms, Biofilms.



Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Director de Tesis

Dedicatoria

A Dios, por todo.

A mis padres Raúl Gutiérrez Álvarez y María Elizabeth Pérez Albores, por estar siempre conmigo aún en la distancia, por su apoyo y amor. Por enseñarme el valor del trabajo y la perseverancia, con los cuales todo es posible.

A mamá Carmita, por sus oraciones, su ejemplo y su guía. Siempre admiraré su fortaleza y sus deseos por el bienestar del prójimo, así como su sentido desinteresado por compartir con los que menos tienen.

A toda mi familia por su apoyo y ánimos.

Al pueblo mexicano, cuyos impuestos apoyan la investigación y el desarrollo tecnológico. Espero que la información generada sea útil y contribuya al desarrollo social.

A mis profesores y amigos, Jesús Miranda Ochoa, Miguel Ángel Margáen Luna y Luis Guillermo Hernández Montiel, por sus enseñanzas, amistad, confianza, retos y motivarme a ser mejor.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), por permitir realizar mis estudios de Maestría, los conocimientos y espacios brindados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con #339123 y al financiamiento otorgado por el proyecto de Ciencia Básica 2012 con #181972.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, Dr. Bernardo Murillo Amador y Dra. Silvana Vero Méndez, por su apoyo académico y sus recomendaciones para mejorar el presente trabajo.

A la Universidad Veracruzana, campus Xalapa, por los espacios brindados durante mi estancia de movilidad.

Al Dr. Roberto Gregorio Chiquito Contreras y C. Hilario Morales Basurto, por el apoyo académico y facilitarme los frutos de papaya para realizar los experimentos.

A Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica de la SULSA del CIBNOR, por su valioso apoyo en la determinación de carbohidratos y actividad enzimática.

A Norma Angélica Ochoa Álvarez del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de la SULSA del CIBNOR, por su valioso apoyo en el cultivo y evaluación del crecimiento de los microorganismos empleados en este estudio.

A Ariel Arturo Cruz Villacorta del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la SULSA del CIBNOR, por el valioso apoyo en el manejo y preparación de muestras para análisis por microscopía electrónica.

A mis amigos: Yenia Murillo, Crystal Guluarte, Rubí Martínez, Karina Martínez, Rocío Salas, Elizabeth González, Liliana Saucedo, Rocio Solis, Mariana Guidiño, Sergio Valerio, Ricardo Galicia, Hamid Tejas e Ivan Sordia, por su apoyo y consejos.

Contenido

	Página
Resumen	i
Summary.....	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Los fungicidas químicos y su relación con la agricultura	4
2.2. El control biológico y sus agentes microbianos	5
2.3. ¿Porque seleccionar levaduras como ACB?	6
2.4. Mecanismos antagónicos de levaduras	8
2.4.1. Competencia por nutrientes y espacio	10
2.4.2. Producción de sideróforos.....	10
2.4.3. Formación de biopelícula y quorum sensing	11
2.4.4. Producción de compuestos antimicrobianos difusibles y volátiles	12
2.4.5. Liberación de hidrolasas	13
2.4.6. Inducción de resistencia	14
2.4.7. El papel del estrés oxidativo y la mitigación del daño oxidativo	16
2.5. Levadura <i>D. hansenii</i>	17
2.6. El hongo <i>C. gloeosporioides</i>	18
2.7. Papaya (<i>Carica papaya</i> L.) var. Maradol y antracnosis	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Dinámica poblacional de <i>D. hansenii</i> en medio de cultivo elaborado a base de papaya	24
6.2. Cuantificación <i>in vitro</i> de la competencia por carbohidratos entre <i>D. hansenii</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	25
6.3. Determinación de la producción de enzimas hidrolíticas por <i>D. hansenii</i>	26
6.3.2.1. Producción de β -1,3-glucanasa	27
6.3.2.2. Producción de quitinasa	28
6.3.2.3. Producción de proteasa.....	28
6.4. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos volátiles (CVOs) producidos por <i>D. hansenii</i> hacia la inhibición de <i>C. gloeosporioides</i>	29
6.5. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno	30
6.5.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de tres concentraciones celulares de <i>D. hansenii</i> sobre la formación de biopelículas.....	30
6.5.2. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de tres concentraciones celulares de <i>D. hansenii</i> sobre la adhesión al patógeno.....	32
6.5.3. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de tres concentraciones celulares de <i>D. hansenii</i> sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno	33
6.6. Determinación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la inhibición de <i>C. gloeosporioides</i>	35
6.7. Evaluación de diferentes tiempos de inoculación de <i>D. hansenii</i> sobre el control de <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya var. Maradol	37
6.8. Determinación del efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la protección de papaya var. Maradol bajo condiciones de comercialización local	38
7. RESULTADOS	41
7.1. Dinámica poblacional de <i>D. hansenii</i>	41
7.2. Competencia <i>in vitro</i> por carbohidratos entre <i>D. hansenii</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	41
7.3. Producción de enzimas hidrolíticas por <i>D. hansenii</i>	45
7.4. Efecto de compuestos orgánicos volátiles (CVOs) producidos por <i>D. hansenii</i> en la inhibición de <i>C. gloeosporioides</i>	47

7.5. Determinación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno	49
7.5.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la formación de biopelículas	49
7.5.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la adhesión al patógeno	49
7.5.3. Evaluación <i>in vivo</i> sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno	51
7.6. Cuantificación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> el efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la inhibición de <i>C. gloeosporioides</i>	51
7.6.1. Experimento <i>in vitro</i>	51
7.6.2. Experimento <i>in vivo</i>	54
7.7. Determinación de los tiempos de inoculación de <i>D. hansenii</i> sobre el control de <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya var. Maradol	55
7.8. Determinación del efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la protección de papaya var. Maradol en condiciones de comercialización local	56
8. DISCUSIÓN	58
8.1. Dinámica poblacional de <i>D. hansenii</i> en medio de cultivo elaborado a base de papaya	58
8.2. Cuantificación <i>in vitro</i> de la competencia por carbohidratos entre <i>D. hansenii</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	58
8.3. Determinación de la producción de enzimas hidrolíticas por <i>D. hansenii</i>	60
8.4. Evaluación del efecto de CVOs producidos por <i>D. hansenii</i> hacia la inhibición de <i>C. gloeosporioides</i>	61
8.5. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la concentración celular de <i>D. hansenii</i> sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno	62
8.5.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de tres concentraciones celulares de <i>D. hansenii</i> sobre la formación de biopelículas	62
8.5.2. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de tres concentraciones celulares de <i>D. hansenii</i> sobre la adhesión al patógeno	62
8.5.3. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto de tres concentraciones celulares de <i>D. hansenii</i> sobre la formación de biopelículas y adhesión al fitopatógeno	64
8.6. Determinación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la inhibición de <i>C. gloeosporioides</i>	66
8.6.1. Experimento en medio líquido	66

8.6.2. Experimento <i>in vivo</i>	67
8.7. Evaluación de diferentes tiempos de inoculación de <i>D. hansenii</i> sobre el control de <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya var. Maradol	68
8.8. Determinación del efecto de <i>D. hansenii</i> sobre la protección de papaya var. Maradol bajo condiciones de comercialización local	69
9. CONCLUSIONES	70
10. LITERATURA CITADA	71
11. ANEXO	86

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Crecimiento de <i>D. hansenii</i> en diferentes medios de cultivo.....	42
Figura 2. Germinación de conidios <i>C. gloeosporioides</i> en medio elaborado a base de papaya 1:10.....	43
Figura 3. Contenido de sacarosa en medio papaya 1:10 inoculado con <i>D. hansenii</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	43
Figura 4. Contenido de glucosa en medio papaya 1:10 inoculado con <i>D. hansenii</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	44
Figura 5. Contenido de fructosa en medio papaya 1:10 inoculado con <i>D. hansenii</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	44
Figura 6. Contenido de carbohidratos totales en medio papaya 1:10 inoculado con <i>D. hansenii</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	45
Figura 7. Producción de β -1,3-glucanasa por <i>D. hansenii</i>	46
Figura 8. Producción de quitinasas por <i>D. hansenii</i>	46
Figura 9. Producción de proteasa por <i>D. hansenii</i>	47
Figura 10. Efecto de la dosis celular <i>D. hansenii</i> sobre la Inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> a través de CVOs.....	48
Figura 11. Inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> a través de diferentes dosis celulares de <i>D. hansenii</i> cultivada en PDA y Papaya 1:10.....	48
Figura 12. Influencia de la concentración celular de <i>D. hansenii</i> en la formación de biopelículas.....	49
Figura 13. Influencia de la concentración celular de <i>D. hansenii</i> sobre la adhesión al micelio de <i>C. gloeosporioides</i>	50
Figura 14. Efecto de la concentración celular de <i>D. hansenii</i> en la protección de frutos de papaya por biopelículas contra <i>C. gloeosporioides</i>	52
Figura 15. Efecto de la concentración celular de <i>D. hansenii</i> sobre la germinación de conidios de <i>C. gloeosporioides</i>	53
Figura 16. Efecto de la concentración celular de <i>D. hansenii</i> en la protección de frutos de papaya contra la antracnosis causada por <i>C. gloeosporioides</i>	54

Figura 17. Incidencia de antracnosis en frutos de papaya var. Maradol inoculados con tres dosis de <i>D. hansenii</i>	55
Figura 18. Efecto del pre- (24, 12 y 0 h) y pos- (12 y 24 h) tratamiento de frutos de papaya var. Maradol con <i>D. hansenii</i> para el control de antracnosis ocasionada por <i>C. gloeosporioides</i>	56
Figura 19. Grado de madurez de frutos de papaya cv. Maradol inoculados con <i>D. hansenii</i>	57
Figura 20. Incidencia de hongos en frutos de papaya var. Maradol con madurez comercial inoculados con <i>D. hansenii</i>	57
Figura 21. Protección de <i>D. hansenii</i> contra hongos en frutos de papaya var. Maradol inoculados con 60-70% de madurez	86

Lista de tablas

	Página
Tabla I. Características ideales de un antagonista poscosecha para desarrollo comercial.....	8

1. INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos como agentes de control biológico (ACB) de hongos fitopatógenos, es una alternativa al uso de fungicidas químicos, la cual se ha estudiado por más de 30 años. Esta herramienta biotecnológica se emplea principalmente para el control poscosecha de hongos fitopatógenos en diferentes agro-productos de importancia alimentaria y comercial. Las levaduras son el grupo más estudiado como ACB debido a que presentan ventajas en comparación con las bacterias y los hongos filamentosos, además tienen requerimientos nutricionales simples, colonizan con facilidad las superficies de diversos agro-productos y pueden crecer en fermentadores con sustratos baratos (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007). El éxito de control de hongos fitopatógenos por levaduras en poscosecha, ha permitido desarrollar productos comerciales como Nexy® (*Candida olephila*), Yield plus® (*Cryptococcus albidus*) o Shemer® (*Metschnikowia frutícola*); sin embargo, algunos productos a base de estos microorganismos se han retirado del mercado por tener eficiencia variable/pobre, lo cual tiene relación con la capacidad de adaptación de una levadura a un ambiente específico, y con los mecanismos antagónicos que ejerce sobre el microorganismo blanco (Sharma *et al.*, 2009). Lo deseable es que un ACB presente diferentes mecanismos antagónicos contra uno o varios hongos fitopatógenos.

La levadura *Debaryomyces hansenii* es un microorganismo osmo-, halo- y xerotolerante lo cual, junto con otras características, le permite crecer y sobrevivir en condiciones adversas. Además, se considera un microorganismo benéfico y con potencial para aplicaciones biotecnológicas como la obtención de metabolitos de interés, aplicación en la industria de proceso de alimentos, farmacéutica y como ACB (Breuer y Harms, 2006). El efecto de control de hongos fitopatógenos por *D. hansenii* sobre los agro-productos en los que se ha estudiado, se atribuye

principalmente a la competencia por espacio y nutrientes (Hernández-Montiel *et al.*, 2010b).

El género *Colletotrichum* se considera el octavo grupo más importante de hongos fitopatógenos en el mundo (Dean *et al.*, 2012). La enfermedad de antracnosis afecta a frutos tropicales como aguacate, plátano, mango y papaya; es causada por especies del hongo *Colletotrichum*. Los frutos de papaya var. Maradol son altamente apreciados por su valor nutricional y tienen una demanda creciente en el mercado internacional, siendo México el principal exportador. Los frutos de papaya son altamente perecederos y susceptibles a enfermedades poscosecha como la antracnosis, esta enfermedad es de gran importancia económica debido a que puede causar pérdidas de cosecha que varían de 1 a 93% (Valenzuela *et al.*, 2015). Los productores de papaya aplican casi exclusivamente fungicidas como benomil o tiabendazol durante el empaque de los frutos para el control de ésta enfermedad, debido a que otros métodos de control presentan menor eficiencia o resultan costosos; sin embargo, el uso de fungicidas ha generado efectos negativos en la salud humana y el ambiente, y ha propiciado el desarrollo de biotipos de patógenos que presentan resistencia a los fungicidas aplicados en poscosecha, teniendo como consecuencia el retiro de algunos fungicidas del mercado (Bautista-Rosales *et al.*, 2013). Esto ha desembocado en la tendencia global de reducir el uso de fungicidas, motivando la búsqueda de enfoques alternativos como el control biológico con microorganismos.

Existen varios reportes del uso de levaduras como ACB de especies de *Colletotrichum* en diferentes hospederos (Rosa *et al.*, 2010), y la literatura científica reporta cerca de diez diferentes mecanismos antagónicos que pueden presentar las levaduras contra un hongo fitopatógeno, siendo atribuido su efecto de control poscosecha, principalmente por la competencia por espacio y nutrientes (Lutz *et al.*, 2013). En estudios previos se determinó que la levadura *D. hansenii* (cepa ECP4) puede emplearse como ACB de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre frutos de papaya var. Maradol en poscosecha, siendo poco

esclarecidos sus mecanismos antagónicos. Por lo tanto, este trabajo se centró en investigar los mecanismos antagónicos de *D. hansenni* hacia *C. gloeosporioides*, *in vitro* e *in vivo*, como parte de su caracterización, buscando además tener interacción con productores de papaya Maradol en el Estado de Veracruz para generar un trabajo integral y con valor social.

2. ANTECEDENTES

2.1. Los fungicidas químicos y su relación con la agricultura

Los fungicidas sintéticos son productos químicos empleados en la agricultura para el control de hongos fitopatógenos que causan afecciones a los cultivos y sus derivados. El mecanismo de acción de cada fungicida es diferente, pueden inhibir la respiración celular al unirse al sitio submicron del complejo III de la cadena respiratoria o inhibir el transporte de electrones mitocondrial, así como inhibir la división celular, la síntesis de la pared celular, la formación de microtubulos o la biosíntesis de ergosterol, los cuales son parte esencial de su estructura (Bi y Ma, 2016; Fairchild *et al.*, 2013; Holmström-Ruddick y Mortenseen, 1995).

Los frutos y vegetales son altamente perecederos, por lo que presentan pérdidas considerables por infección de fitopatógenos (Luo *et al.*, 2013). Las pérdidas poscosecha son consideradas económicamente más importantes debido a que incluyen los costos de cultivo, transporte, almacenamiento y comercialización (Lima *et al.*, 2013). La baja eficiencia de otros métodos de control es el factor principal que influye en la decisión que los agricultores apliquen exclusivamente fungicidas químicos durante el empaque de productos poscosecha. En México, en los últimos 10 años la demanda de fungicidas y bactericidas incrementó un 528%, aumentando 437% lo aplicable en tierra arable y cultivos permanentes, mientras que los apoyos de crédito para el sector agropecuario incrementaron un 268% (FAOSTAT, 2015), lo cual se traduce en mayor inversión para el control de enfermedades de los agro-productos y mayor carga de residuos al ambiente.

El uso indiscriminado de fungicidas químicos ha generado efectos negativos a la salud humana, animal y al ambiente, cambiando las propiedades fisicoquímicas del suelo y alterando la composición de las comunidades microbianas en las que se incluyen poblaciones benéficas (You *et al.*, 2016). Por otra parte, los fungicidas químicos que se han utilizado en las últimas décadas han perdido su efectividad

como es el caso de Carbendazim contra *Fusarium* spp. en China (Wang *et al.*, 2008), y debido a la presión selectiva que ejercen propician el desarrollo de biotipos de los patógenos, resistentes a estos productos, principalmente a través de mutaciones en las moléculas blanco de estos compuestos (Kano *et al.*, 2016; Lopez-Reyes *et al.*, 2010; Panebianco *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2011).

El empleo constante de fungicidas químicos ha ocasionado su prohibición que en la mayoría de los países desarrollados (Bautista-Rosales *et al.*, 2013). Este panorama y la demanda pública de agro-productos con menos residuos químicos generó la tendencia global del estudio de métodos alternativos al uso de estos productos como los desinfectantes con baja residualidad, métodos físicos o control biológico (Eshel *et al.*, 2009; Lutz *et al.*, 2012; Tripathi y Dubey, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

2.2. El control biológico y sus agentes microbianos

En fitopatología y poscosecha de agro-productos, el control biológico hace referencia al uso de microorganismos antagonistas con la capacidad de inhibir el crecimiento o dispersión de una enfermedad causada por un fitopatógeno, para un hospedero específico sin afectar a éste. Estos antagonistas se denominan agentes de control biológico (ACB) y se consideran una alternativa al uso de agroquímicos sobre los agro-productos (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007; Droby *et al.*, 2009).

En los últimos 30 años, los investigadores se han dedicado al estudio de microorganismos como ACB, principalmente contra fitopatógenos que causan afecciones poscosecha debido a la importancia comercial de los agro-productos y por ser parte de la dieta de las poblaciones. Los microorganismos antagonistas estudiados en control biológico incluyen bacterias, mohos y levaduras, y cada uno de estos se caracteriza por ciertos mecanismos antagónicos por los cuales ejercen su efecto de control sobre las enfermedades fúngicas (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008a; Droby *et al.*, 2011; Teixidó *et al.*, 2011).

La mayor parte de los ACB estudiados se han aislado de la superficie de frutos y plantas, así como del suelo, los cuales son denominados “antagonistas naturales” al aplicarse sobre el mismo huésped del que proceden, mientras que los que no tienen la misma procedencia son denominados “antagonistas introducidos artificialmente” (Kalia y Parshad, 2015; Wilson y Wisniewski, 1989). La fuente de procedencia de estos ACB “introducidos” puede ser incluso de ambientes en condiciones extremas como salinas, suelo del antártico, hielo subglacial y agua de mar (Butinar *et al.*, 2005; Gunde-Cimerman *et al.*, 2003; Lutz *et al.*, 2012; Vero *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos autores reportan que el uso de ACB “naturales” tienen mayor potencial ya que son un componente importante de la comunidad microbiana epífita y presentan una ventaja al estar fenotípicamente adaptados a estos nichos (Parafati *et al.*, 2015). La prueba del alcance de los ACB en poscosecha se ejemplifica con productos comerciales como Aspire, elaborado con la levadura *Candida oleophila* I-182 (Ecogen, Inc., Estados Unidos de América), BioSave 110, elaborado con la bacteria *Pseudomonas syringae* (EcoScience Corporation, Estados Unidos de América) y Contans WG, elaborado con el moho *Coniothyrium minitans* (Prohyta Biologischer, Alemania). Estos productos cuentan con un registro oficial de las autoridades de salud y ambientales para su aplicación en agro-productos poscosecha, además, se han desarrollado más productos comerciales a base de levaduras que de otros microorganismos considerados como ACB (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008b; Ippolito y Nigro, 2000; Sharma *et al.*, 2009).

2.3. ¿Porque seleccionar levaduras como ACB?

En la literatura científica, las levaduras son los microorganismos más estudiados (en diversidad de especies) como agentes de control biológico. Esto se debe a que presentan ventajas con respecto a otros antagonistas como el hecho de no producir esporas alérgicas o micotoxinas como muchos hongos filamentosos y, en general, no producen metabolitos secundarios (antibióticos) como algunas

bacterias antagonistas, los cuales podrían tener un impacto toxicológico negativo en la salud humana y/o animal o dar mayor resistencia a los fitopatógenos (Nunes, 2012; Qing y Shiping, 2000; Wilson *et al.*, 1993; Wisniewski y Wilson, 1992).

Dentro de las características relevantes que presentan estos microorganismos se encuentra su capacidad de colonizar y sobrevivir en la carposfera durante periodos largos de tiempo, crecen rápidamente, son poco sensibles e incluso algunos de ellos son compatibles con los fungicidas químicos empleados en poscosecha (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007). Diversas levaduras empleadas como ACB forman parte natural en el proceso de alimentos por lo que son reconocidos generalmente como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) por la FDA (Wang *et al.*, 2010), además contienen cantidades altas de vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales (Spadaro *et al.*, 2002).

Las levaduras son tolerantes a condiciones adversas como cambios de temperatura, desecación y cambios de humedad relativa, niveles bajos de oxígeno, fluctuaciones de pH, déficit de nutrientes disponibles o radiación UV (Breuer y Harms, 2006). Estas condiciones se presentan en el ambiente, así como en algunos procesos desarrollados para el control de enfermedades en productos poscosecha. Otra cualidad es su adaptación a los microambientes de las frutas con alta concentración de azúcares, alta presión osmótica y pH bajo (Spadaro y Droby, 2016). Estos microorganismos presentan ventajas industriales debido a que tienen una velocidad de crecimiento alto con requerimientos nutricionales simples, lo cual permite cultivarlas en sustratos baratos en fermentadores y producirlos en grandes cantidades (Nantawanit *et al.*, 2010; Sundh y Melin, 2011).

Algunos autores han descrito una serie de características que son deseables en los ACB (Tabla I) y las levaduras cumplen en gran medida con las mismas, lo cual incrementa su valor como herramienta biotecnológica para poscosecha de frutas.

Tabla I. Características ideales de un antagonista poscosecha para desarrollo comercial. (Adaptado y modificado de Wilson y Wisniewski, 1989 y Liu *et al.*, 2013).

-
- Genéticamente estable.
 - Efectivo a baja concentración.
 - Sin requerimiento de nutrientes exigente.
 - Habilidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas (incluyendo baja/alta temperatura, estrés oxidativo y almacenamiento con atmosferas controladas).
 - Habilidad de adherirse y colonizar a la superficie de los huéspedes.
 - Presentar más de un mecanismo antagónico hacia el/los patógenos que se desean controlar.
 - Eficaz contra una amplia gama de patógenos de diferentes agro-productos.
 - Producción en un medio de crecimiento de bajo costo.
 - Que se prepare en una formulación que se pueda almacenar y dispensar eficazmente.
 - Resistente a químicos empleados en poscosecha, amigable con el medio ambiente y no patogénica a los productos huésped.
 - No producir metabolitos que son perjudiciales a la salud humana.
 - Incapaz de crecer a 37°C y no estar asociado con infecciones en humanos.
-

2.4. Mecanismos antagónicos de levaduras

El sistema de control biológico poscosecha engloba una compleja interacción entre patógeno-huesped-antagonista, lo cual constituye un reto en el entendimiento de las vías por las cuales los ACB protegen a los agro-productos. La información de los mecanismos antagónicos de las levaduras que se han estudiado aún es incompleta (Spadaro *et al.*, 2002) y entender el modo de acción de los antagonistas es de suma importancia, porque permite el desarrollo de

procedimientos efectivos para su aplicación e identifica rasgos de su actividad que pueden mejorarse, proporcionan información que justifica su selección y finalmente, esto contribuye en la aprobación oficial para aplicarse en productos alimenticios (Castoria *et al.*, 2001; Rivera Avalos *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2009). Las investigaciones muestran que los efectos positivos de esta tecnología cambian según la especie de levadura que se emplea, lo cual se relaciona con los mecanismos antagónicos que presentan.

Dentro de los estudios de control biológico poscosecha se han descrito antagonistas que deben su actividad de bio-control principalmente a la competencia por espacio y nutrientes, exudación de enzimas específicas, parasitismo, la adhesión al patógeno y secreción de sustancias antimicrobianas (solubles en agua o volátiles) (Nantawanit *et al.*, 2010; Wilson y Wisniewski, 1989). Adicionalmente, se considera que la formación de biopelículas, producción de especies reactivas de oxígeno, inducción de resistencia en el tejido del huésped, producción de sideróforos y producción de toxinas *killer*, participan en la supresión de la actividad de los fitopatógenos; sin embargo, se considera que la competencia por espacio y nutrientes es el principal mecanismo contra los fitopatógenos en poscosecha (Janisiewicz y Korsten, 2002; Lutz *et al.*, 2013).

Los ACB pueden presentar más de un mecanismo antagónico, lo cual es deseable e ideal. Los productos Aspire, Shemer y Yield plus basan su efecto de control principalmente en la competencia por espacio y nutrientes, producción de β -1-3 glucanasa y quitinasa. Sin embargo, a pesar de presentar más de un mecanismo antagónico algunos productos se han retirado del mercado por presentar resultados inconsistentes, como es el caso de Avogreen y Aspire (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008b; El Ghaouth *et al.*, 2004; Spadaro y Gullino, 2004).

Los ACB presentan varios mecanismos antagónicos por lo que es necesario caracterizarlos para aumentar la eficiencia de estos microorganismos en el control biológico de enfermedades en las plantas.

2.4.1. Competencia por nutrientes y espacio

El principal mecanismo antagonico de levaduras como ACB es la competencia por fuentes de carbono y espacio, los cuales, pueden ser limitados según la densidad celular a la que se aplique el microorganismo. Existe una eficiencia alta en el control biológico de fitopatógenos cuando se aplican concentraciones altas de levadura; sin embargo, en algunos casos su efecto antagonico no supera al obtenido con los fungicidas químicos (Cao *et al.*, 2011; Hernández-Montiel *et al.*, 2010).

La competencia es un mecanismo intrínseco de las levaduras y de los microorganismos, los cuales aprovechan los sustratos disponibles de carbono y nitrógeno para sobrevivir. Al estar en presencia con otro microorganismo como un fitopatógeno, sobre la herida de un agro-producto, ambos hacen uso de sus capacidades metabólicas para obtener una cantidad de nutrientes mayor, al existir diferencia en las velocidades metabólicas solo el microorganismo mejor adaptado prevalece, por lo que la compatibilidad de la levadura con el sustrato es crucial en la expresión de este mecanismo. Sin embargo, este mecanismo solo priva la obtención de nutrimentos de los fitopatógenos, pero no lo elimina. En la competencia por espacio las levaduras tienen ventaja por su rápido crecimiento y por la producción de polisacáridos extracelulares, forman encapsulamientos que promueven su adhesión a la superficie de los agro-productos formando biopelículas que cubren por completo el área de la lesión (Droby *et al.*, 2009; Janisiewicz y Korsten, 2002; Zhang *et al.*, 2010).

2.4.2. Producción de sideróforos

Es un mecanismo activado por el agotamiento del ion hierro, las levaduras expresan dos sistemas genéticos diferentes para la captación de este elemento, el sistema reductivo y el no-reductivo. Las sales férricas y los quelatos férricos son sustratos para el sistema reductivo mientras que el no reductivo reconoce

exclusivamente sideróforos de hierro quelado. El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los hongos y su patogénesis, este elemento está presente como cofactor de hemo-proteínas como catalasa y citocromos y se requiere para la actividad de diversas enzimas involucradas en un amplio rango de procesos celulares, como la protección contra especies reactivas de oxígeno (EROs), aunado a esto la adaptación a la hipoxia y la homeostasis de hierro están involucrados en la regulación de genes responsables de la virulencia de los hongos. En el control biológico, la levadura aprovecha la lesión del agro-producto, el cual es un microambiente con poco oxígeno y hierro, y mediante la producción de sideroforos compete por el hierro e interfiere con la germinación de las esporas del patógeno, su crecimiento y su virulencia. En estas condiciones, los hongos tienen una actividad baja de catalasa y una protección menor contra daños por EROs (Philpott y Protchenko, 2008; Saravanakumar *et al.*, 2008; Talibi *et al.*, 2014).

2.4.3. Formación de biopelícula y quorum sensing

La adhesión de las células de levadura, se produce regularmente por la proteína adhesiva glucofosfatidil inositol que está anclada a la pared celular al igual que las lectinas. La expresión de esta habilidad por parte de las levaduras antagonistas, permite su adhesión a la superficie del micelio y conidios de los patógenos sobre los agro-productos, de esta forma al interactuar con el patógeno, reduce la superficie de absorción de nutrientes de éste, retrasando o limitando su desarrollo. Los efectos de este mecanismo aumentan cuando dan paso a la formación de una biopelícula. La biopelícula está conformada por agrupaciones multicelulares de levadura, la cual se produce por alteraciones de expresión génica como respuesta de una condición de estrés. En la biopelícula, la microcolonia se encuentra dentro de una matriz hidratada de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, producidos por éstos. La formación de esta estructura es mediada por “quorum sensing” con reguladores como tirosol, farnesol y alcohol fenílico que coordinan la

conmutación fenotípica de levadura-unicelular a hifa. Las familias de genes de adhesión HWP1 y ALS, participan en el reconocimiento celular del huésped, la adhesión, invasión y formación de biopelículas. Las levaduras tienen diferentes familias adhesivas dependiendo de la especie, como resultado de adaptación a un nicho ecológico. En el control biológico poscosecha, la formación de la biopelícula, por levaduras antagonistas, actúa como una barrera mecánica que se interpone entre la superficie de la herida del agro-producto y el patógeno. Sin embargo, poco se sabe del papel de las biopelículas de levaduras antagónicas en el control biológico de enfermedades poscosecha y los mecanismos involucrados en su formación (Chi *et al.*, 2015; Gori *et al.*, 2011; Kalia y Parshad, 2015; Lutz *et al.*, 2013).

2.4.4. Producción de compuestos antimicrobianos difusibles y volátiles

Las levaduras pueden producir compuestos antifúngicos como toxinas *killer*, antibióticos y compuestos orgánicos volátiles. Algunas levaduras con fenotipo *killer*, exudan proteínas tóxicas (*killer*) al medio extracelular, las cuales son letales para las células microbianas sensibles pertenecientes a la misma especie u otra diferente. Los productores de estas toxinas son capaces de eliminarse entre ellos, pero son inmunes a toxinas *killer* de su propia clase. Dentro de las toxinas *killer* estudiadas están K1, K2 y K28. La mayoría de las toxinas *killer* son estables y activas en rangos de pH 3 a 5.5, condición presente en heridas o lesiones de frutos, además estas toxinas son vulnerables a proteasas y lábiles al calor, por lo cual este mecanismo puede ser ineficaz en poscosecha. El mecanismo de acción de estas toxinas es diverso; K1 por ejemplo, muestra ser una toxina relacionada con la formación de poros en membranas, incrementando su permeabilidad y produciendo la pérdida de contenido intracelular (Marquina *et al.*, 2002).

La producción de antibióticos por levaduras, como farnesol pueden inhibir *in vitro* a diferentes bacterias y hongos, además, este metabolito se encuentra en

numerosos aceites esenciales de plantas. Otra sustancia antifúngica volátil, es el 2-feniletanol que ha demostrado tener actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos de cítricos. La expresión de este mecanismo sobre los productos alimenticios, genera la preocupación del desarrollo de patógenos de humanos resistentes a estos compuestos y el desarrollo de fitopatógenos resistentes, por lo que se debe tener cuidado con el uso de ACB que presenten este mecanismo sobre los agro-productos (Jamalizadeh *et al.*, 2011).

Los hongos filamentosos son capaces de producir compuestos orgánicos volátiles (COV) antifúngicos y las levaduras no son la excepción. Algunos de estos COV son, 2-fenil alcohol, etanol o acetato de etilo. Algunos de los COV producidos son resultado del proceso de fermentación alcohólica de las levaduras, los cuales presentan actividad antimicrobiana contra patógenos de frutos en poscosecha. La problemática principal de este mecanismo, es la evaluación del impacto real en el control biológico, pues no se puede establecer un punto de comparación de los resultados *in vitro* e *in vivo*. La concentración de COVs necesario para el control de fitopatógenos y su difusión, son algunas limitaciones que presenta este mecanismo, además, algunos COV producidos por hongos presentan un riesgo carcinogénico. La producción de COVs es una alternativa potencial de control biológico debido a que no requiere contacto físico con los agro-productos; sin embargo, la seguridad de su uso debe ser evaluado (Liu *et al.*, 2014; Spadaro y Guillino, 2004).

2.4.5. Liberación de hidrolasas

En el control biológico poscosecha, el parasitismo tiene lugar cuando la levadura se alimenta del hongo fitopatógeno, produciendo lisis parcial o total de sus estructuras y propágulos. Las paredes celulares de los hongos están compuestas principalmente por quitina (20%), β -glucano (50-60%) y proteínas (20-30%). La quitina es un homopolímero lineal e insoluble, formado por subunidades de N-

acetil glucosamina unidas por enlaces β -1,4, y actúa como el soporte medular de la pared celular. El glucano es un polisacárido que se encuentra unido por enlaces β -glucosídicos. El β -1,3-glucano se considera el principal constituyente estructural al cual están unidos covalentemente otros componentes de la pared celular, proporcionándole fuerza e integridad mecánica. La mayoría de las proteínas de la pared celular son glicoproteínas con diversas modificaciones, con oligosacáridos. Las proteínas de la pared celular juegan un papel importante en el mantenimiento de la forma celular, la síntesis y la remodelación de componentes de la pared celular, la absorción de moléculas y la protección de la célula contra moléculas externas. Las levaduras antagónicas rompen la pared celular de los hongos mediante la participación de diferentes enzimas, que actúan sobre los tres componentes principales mencionados. Las endo y exo-quitinasas hidrolizan la quitina, rompiendo los enlaces β -1,4 que unen las subunidades de N-acetil glucosamina, en sitios al azar a lo largo de la cadena polimérica y por los extremos, respectivamente, lo cual permite la obtención de una fuente de carbono y nitrógeno para la levadura. Las endo y exo-glucanasas hidrolizan el glucano, en sitios al azar a lo largo de la cadena del polisacárido y por el extremo no reducido, respectivamente, produciendo oligosacáridos de menor tamaño y glucosa, la cual es aprovechada como fuente de carbono por la levadura. Las proteasas se clasifican en serin proteinasas, cistein proteinasa, aspártico proteinasa y metaloproteinasas de acuerdo a su sitio catalítico y condición de acción. A través de la degradación de las proteínas de membrana del hongo, las levaduras pueden suministrarse de una fuente de aminoácido, nitrógeno, así como de cofactores (Magallon-Andalon *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2009).

2.4.6. Inducción de resistencia

Durante el control biológico poscosecha las levaduras interactúan con la carposfera del huésped, en particular con la zona de la lesión. En el estudio de estas interacciones, los antagonistas muestran mayor eficiencia de control sobre

los hongos cuando se aplican antes de la inoculación del patógeno, esto dio lugar a la hipótesis de que las células de levadura pueden inducir procesos de resistencia en el tejido de frutos a través de inductores que son secretados por éstas o por componentes de su pared celular, tal como sucede en plantas. En los estudios de interacción planta-microorganismo, se tiene un amplio conocimiento del proceso de señalización que da lugar a las respuestas bioquímicas y moleculares de defensa, sin embargo, se desconoce esta relación entre los productos poscosecha y los agentes de control biológico (Liu *et al.*, 2013).

La inducción de respuestas de defensa por levaduras, se demuestra con los procesos que tienen lugar en frutos poscosecha, seguidas de la aplicación de levaduras antagonistas. Dentro de estos procesos se describe la producción de diferentes enzimas y metabolitos, reportándose i) proteínas ligadas a la patogenicidad que incluye glucanasas y quitinasas, peroxidasas, superóxido dismutasa, catalasa (que protegen el tejido contra daño oxidativo), inhibidores de proteínas o proteínas transportadoras de lípidos; ii) compuestos con actividad antimicrobiana como fitoalexinas; y iii) papilas formadas por calosa y lignina, depositadas en la pared celular asegurando su fortalecimiento. Otros patrones clave que desencadenan inmunidad son, iv) la producción de EROs con una función de señalización y efecto antimicrobiano directo, o v) el cierre de estomas. En plantas, la respuesta inmune es mediada y dependiente de fitohormonas, como el ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y ácido abscísico, así como su interacción, permitiendo la activación de respuestas inmunes contra organismos específicos (Liu *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013b; Luo *et al.*, 2013).

Aunque la inducción de resistencia en el tejido del huésped, por el tratamiento con antagonistas se correlaciona, no se ha establecido evidencia directa de la capacidad de las sustancias inducidas para inhibir la infección por patógenos poscosecha (Spadaro y Droby, 2016).

2.4.7. El papel del estrés oxidativo y la mitigación del daño oxidativo

La producción de EROs en plantas, son la respuesta inicial contra microorganismos patógenos y no patógenos. En el caso de interacciones parasitarias no compatibles se produce inicialmente un aumento moderado de EROs, que precede a un estallido oxidativo más fuerte, mientras que en una interacción compatible no se produce este segundo incremento de radicales reactivos en el tejido del huésped. El estrés oxidativo tiene efectos adversos si no es regulado por una respuesta antioxidante, ocasionando daños como degradación de ADN, alteraciones en la capa lipídica de la membrana celular, inactivación de receptores de membrana y afecciones a proteínas, incrementando su susceptibilidad a proteólisis e inhibiendo su actividad (Barna *et al.*, 2012).

La producción de EROs por levaduras antagónicas es un mecanismo descubierto recientemente y se comprueba por la acumulación de EROs en el tejido de frutos poco tiempo después de la aplicación de las células de levadura. Además, se ha demostrado que algunas levaduras tienen la capacidad de tolerar, producir y acumular H₂O₂ intracelular. El incremento de EROs en el sitio de la lesión de frutos, conduce a la activación de mecanismos de defensa del huésped, lo cual se estudia genéticamente por la inducción de la expresión de genes que codifican a quitinasa, fenilalanina amonio liasa, chalcona sintasa entre otros, así como la regulación a la baja de genes de peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, lo que se relaciona con los niveles altos de peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radical hidroxilo en el tejido tratado con levaduras (Castoria *et al.*, 2003; Macarisin *et al.*, 2010; Teixidó *et al.*, 2011).

La regulación negativa y positiva de genes de defensa, en conjunto con la capacidad de algunas levaduras de producir EROs, sugiere que la levadura contribuye en los niveles de EROS en el tejido del huésped, los cuales tienen un efecto directo o indirecto sobre el control de hongos que afectan los productos poscosecha (Spadaro y Droby, 2016).

2.5. Levadura *D. hansenii*

D. hansenii es una levadura no patógena, la cual está presente en frutos y participa en los procesos de elaboración de alimentos como quesos, embutidos secos fermentados, vino y cerveza, donde su actividad proteolítica y lipolítica contribuye a la maduración de los alimentos y desarrollo del aroma por la producción de compuestos aromáticos como aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres y compuestos de azufre. Tiene aplicaciones que incluyen la preparación de emulsiones alimenticias, produce péptidos antihipertensivos derivados de caseína y xilitol, el cual se usa en la industria alimentaria por su efecto edulcorante, propiedades anti caries y su tolerancia por los diabéticos. Por estas razones se reconoce como un organismo con usos benéficos y sus metabolitos se consideran GRAS (Bourdichon *et al.*, 2012; Cano-García *et al.*, 2014; García-Tejedor *et al.*, 2015).

Esta levadura pertenece a los ascomicetos, es cosmopolita, osmo-, halo- y xerotolerante. Es capaz de crecer en concentraciones de cloruro de sodio hasta 20.5 M. Sus rangos de temperatura de crecimiento van de 4 a 35°C con óptimo de 20-25°C, y es capaz de crecer en un rango de pH de 3 a 10 y en ambientes con actividad acuosa hasta de 0.99; además es capaz de asimilar diferentes fuentes de carbono (Breuer y Harms, 2006; Papagora *et al.*, 2013; Prista *et al.*, 2005)

La aplicación de *D. hansenii* como ACB en poscosecha se ha demostrado en cítricos contra *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *Geotrichum candidum*, en durazno contra *Rhizopus stolonifer*, en manzana contra *P. expansum*, en uva contra moho gris y en tomate contra *Rhizopus spp.*, moho gris y *Alternaria spp.* (Sharma *et al.*, 2009). Los mecanismos antagónicos reportados para este microorganismo incluyen la competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas, toxinas *killer* e inducción de resistencia por fitoalexinas (Banjara, 2014; Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Strano *et al.*, 2003). Una característica importante para su aplicación como ACB es su tolerancia y compatibilidad con biocidas como el dióxido de cloro, penconol, benomil y

cicloheximida, los cuales son aplicados en productos poscosecha para el control de fitopatógenos (Breuer y Harms, 2006).

2.6. El hongo *C. gloeosporioides*

El género *Colletotrichum* se considera como el octavo grupo más importante de hongos patógenos de plantas en el mundo (Dean *et al.*, 2012). *C. gloeosporioides* es uno de los agentes fitopatógenos más comunes en frutos poscosecha y se distribuye ampliamente. Este hongo es el agente causal de la enfermedad denominada antracnosis, la cual afecta a frutos tropicales de importancia económica como aguacate, plátano, mango y papaya (Admasu *et al.*, 2014; Bautista-Baños, 2014; Coates *et al.*, 1993; Torres-Calzada *et al.*, 2013).

Estudios histológicos de la patogénesis de *Colletotrichum* en aguacate y naranja revelaron que existen dos patrones de infección del hongo. El primero consiste en el desarrollo del tubo germinativo del conidio, el cual penetra de manera directa la epidermis del hospedero; el segundo, presente con mayor frecuencia, se basa en el desarrollo del tubo germinativo del conidio, el cual subsecuentemente genera un apresorio con el que penetra por acción mecánica y la enzima cutinasa, y después desarrolla una punta infectiva que penetra la pared periclinal de las células epidérmicas (Binyamini y Schiffmann-Nadel, 1972; Carrillo *et al.*, 2002; O'Connell *et al.*, 2012). Para el desarrollo del apresorio se requiere de vías de señalización cAMP y MAPK, las cuales se producen al entrar en contacto el conidio con la cutícula del huésped, activando el gen *CAP20* que está involucrado en la formación del apresorio. La hifa penetrante del apresorio se desarrolla dentro de la cutícula y en las capas superiores de células epidérmicas en los frutos verdes, sin inducir reacciones visibles en el huésped, lo cual se debe a que en esta fase el hongo expresa el gen *CgDN3*, que es indispensable para evadir el reconocimiento por parte del huésped, suprimiendo su respuesta de hipersensibilidad (Eloy *et al.*, 2015; Podila *et al.*, 1993; Rodríguez-López *et al.*, 2009; Stephenson *et al.*, 2000).

En condiciones de madurez fisiológica de los frutos, el apresorio permite que el hongo permanezca adherido a la superficie de huésped, en estado latente y sin causar afecciones, hasta presentarse las condiciones adecuadas para la infección. Por tal razón, este patógeno es hemibiotrófico (biotrófico y necrotrófico) (Eckert y Ogawa, 1985; Rodríguez-López *et al.*, 2013).

El cambio de estado biotrófico al necrotrófico de infección, ocurre durante la maduración del fruto, las señales para la liberación del estado de latencia incluyen la aparición de sustratos desmontados de las paredes celulares, incremento de etileno, disminución de la cantidad de compuestos antifúngicos preformados en el fruto, como derivados de lípidos, polifenoles y fitoalexinas y la disminución de la respuesta de defensa inducible del huésped. Al activarse el estado necrotrófico, el hongo produce poligalacturonasas y pectato liasas, que degradan la pared celular del hospedero y dan lugar a la enfermedad de antracnosis (Alkan *et al.*, 2015; Siddiqui y Ali, 2014).

2.7. Papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol y antracnosis

La papaya es un fruto tropical y subtropical que pertenece a la familia de las *Caricáceas* y se ha convertido en una fruta importante a nivel internacional, como producto fresco y procesado, por su valor nutricional y terapéutico (Ong *et al.*, 2013, 2014). La producción de papaya en el mundo y los valores de importación, han aumentado continuamente en los últimos años, llegando a 11.8 millones de toneladas con un valor de 243 millones de dólares, respectivamente (Udomkum *et al.*, 2015). La producción de papaya en México es una actividad que genera altas divisas por su constante demanda del mercado internacional. Los cinco principales productores a nivel mundial de este fruto son India, Brasil, Indonesia, Nigeria y México. Este último, ocupa el primer lugar en exportación siendo su principal comprador Estados Unidos de América, el cual importa 103,926.00 ton con valor aproximado de 45 millones de dólares (FAOSTAT, 2015). En La República

Mexicana, se producen las variedades Amarilla, Criolla, Hawaiana, Maradol y Roja. La papaya var. Maradol es la más cultivada a nivel nacional, con una producción promedio anual de 611,653.84 ton (SIAP, 2015). En México, de 2007 a 2013 la producción de papaya disminuyó un 16.8% (FAOSTAT, 2015) y, considerando el aumento del consumo de fungicidas en el país, se infiere que se requiere de una mayor inversión para la producción de éste y otros agro-productos, lo cual puede afectar las ganancias económicas del agricultor.

El fruto de papaya es climatérico y susceptible a pérdidas poscosecha a lo largo de toda la cadena de valor, lo cual se debe a su deterioro rápido, enfermedades parasitarias, trastornos fisiológicos, daños mecánicos y fruta sobremadura. Esto se traduce en un tiempo corto de conservación del producto fresco por lo cual requiere un manejo cuidadoso (Paull *et al.*, 1997; Udomkum *et al.*, 2015). El principal factor que afecta la calidad poscosecha de los frutos de papaya es la aparición de enfermedades por hongos patógenos, como *Phoma caricae-papayae*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium* spp. La principal enfermedad que afecta éstos frutos es la antracnosis, causada por el “complejo de especies” *C. gloeosporioides*. Esta enfermedad causa pérdidas en las cosechas que varían de 1 a 93%, por lo cual su control es muy importante para evitar pérdidas económicas (Spadaro y Gullino, 2004; Valenzuela *et al.*, 2015; Vij y Prashar, 2015).

En general, *C. gloeosporioides* inicia la infección tan pronto empieza la floración en campo y permanece latente hasta que las condiciones ambientales poscosecha favorezcan la colonización del tejido del fruto de papaya. En los primeros síntomas de antracnosis, usualmente aparecen áreas oscuras, pequeñas y redondas en las porciones maduras de los frutos. Conforme avanza la maduración, éstas manchas se agrandan rápidamente formando lesiones circulares ligeramente hundidas que alcanzan un tamaño mayor de 2 pulgadas de diámetro, los márgenes de la herida toman un color oscuro en tanto la porción central de la lesión se torna color café o negro. En la etapa más avanzada de la enfermedad se

producen signos del hongo como la aparición de masas de esporas de color naranja en la porción central de la lesión, dispuestas frecuentemente en forma de anillos concéntricos. Además de producir lesión en la superficie, el hongo también avanza al interior del fruto, produciendo pudrición que afecta los tejidos del fruto, volviéndolos blandos y oscuros (Carrillo *et al.*, 2002; Ong y Ali, 2015)

El control de la antracnosis se realiza casi exclusivamente por el uso de fungicidas como benomil y tiabendazol, por la inmersión de frutos en estas soluciones, durante el proceso de empaque. Sin embargo, se reportan estrategias alternativas al uso de fungicidas, como el control físico por radiación gamma y ultravioleta, el uso de recubrimientos comestibles a base de quitosano, el uso de aceites esenciales solos o en combinación con compuestos no tóxicos, como goma arábica y el control biológico (Lima *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2015). Algunos ejemplos de levaduras empleadas como ACB contra especies de *Colletotrichum* son, *Torulaspota globosa* contra *C. sublineolum* en sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Rosa *et al.*, 2010), *Pichia guilliermondii* contra *C. capsici* en chile (*Capsicum annum* L. var. *acuminatum* Fingerh) (Nantawanit *et al.*, 2010), *Candida membranifaciens* contra *C. gloeosporioides* en mango (*Mangifera indica* L.) (Kefialew y Ayalew, 2008) y *Cryptococcus magnus* contra *C. gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya* L.) (de Capdeville *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

El peligro que representa el empleo de fungicidas sobre agro-productos para la salud humana, el ambiente y el desarrollo de fitopatógenos resistentes, hace necesario implementar alternativas como el control biológico, con el cual se pueden reducir estos riesgos, así como las pérdidas poscosecha de cultivos de importancia económica y reducir los costos de manejo de estos al eliminar el empleo de fungicidas químicos. La levadura *D. hansenii* ha mostrado controlar la enfermedad de la antracnosis en frutos de papaya var. Maradol; sin embargo, no se conocen sus mecanismos antagónicos, lo cual es necesario investigar como parte de su caracterización, así como los factores que pueden influir en su eficiencia como ACB. Al obtenerse estos conocimientos se pueden desarrollar estrategias para incrementar la eficiencia de este microorganismo y desarrollar un producto comercial con el cual se beneficie el sector poscosecha, la salud humana y el ambiente.

4. HIPÓTESIS

Sí *D. hansenii* presenta los mecanismos antagónicos de competencia por carbohidratos, producción de enzimas hidrolíticas, producción de compuestos orgánicos volátiles, adhesión al patógeno, formación de biopelículas, y concentración y tiempo de inoculación, entonces por medio de estos podría inhibir *in vitro* y ofrecer una protección poscosecha de frutos de papaya var. Maradol contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar los principales mecanismos antagónicos de *D. hansenii* hacia *C. gloeosporioides* para la protección poscosecha de papaya var. Maradol.

5.1.1. Objetivos particulares

- a. Evaluar la dinámica poblacional de *D. hansenii* en un medio de cultivo elaborado a base de papaya.
- b. Cuantificar *in vitro* la competencia por carbohidratos entre *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*.
- c. Determinar la producción de enzimas hidrolíticas (β -1,3-glucanasa, quitinasas y proteasas) de *D. hansenii*.
- d. Evaluar el efecto de compuestos orgánicos volátiles (CVOs) producidos por *D. hansenii* hacia la inhibición de *C. gloeosporioides*.
- e. Evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno.
- f. Determinar *in vitro* e *in vivo* el efecto de *D. hansenii* sobre la inhibición de *C. gloeosporioides*.
- g. Evaluar diferentes tiempos de inoculación de *D. hansenii* sobre el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya var. Maradol.
- h. Determinar el efecto de *D. hansenii* sobre la protección de papaya var. Maradol en condiciones de comercialización.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Dinámica poblacional de *D. hansenii* en medio de cultivo elaborado a base de papaya

6.1.1. *D. hansenii*

Se utilizó la cepa ECP4 de *D. hansenii* la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La cepa se cultivó en medio sólido de Agar de Dextrosa y Papa (PDA por sus siglas en inglés, Difco™) a 25°C por 48 h. Posteriormente de la placa de cultivo se colectó la biomasa y con solución salina (0.85%) se ajustó su concentración a 10⁸ cel·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.1.2. Elaboración de medio de cultivo

Se colectaron 300 g de frutos de papaya var. Maradol con madurez comercial los cuales se trituraron, homogenizaron y filtraron con gasas estériles para la obtención de 100 mL de concentrado. A partir de esta solución se elaboraron dos diluciones seriales: 1:10 y 1:100 con agua destilada estéril y posteriormente se esterilizaron en autoclave a 120°C con 15 lb de presión por 15 min (Maragatham y Panneerselvam, 2011).

6.1.3. Experimento

Matraces Erlenmeyer con 30 mL del medio de cultivo a base de papaya (dilución 1:10 y 1:100) se inocularon con 1 mL de la suspensión de levadura. Como control se inoculó la levadura en medio líquido de Caldo de Papa y Dextrosa (PDB por sus siglas en inglés, Difco™). Los matraces se incubaron a 25°C por 48 h. De

cada medio de cultivo se colectaron alícuotas de 1 mL a intervalos de 5 h determinando su absorbancia a una longitud de onda de 580 nm mediante un espectrofotómetro-UV (HACH® DR-2700) y se cuantificó la concentración total de células de levadura (cel/mL) utilizando una cámara de Neubauer. Se utilizó como blanco el medio de cultivo de cada tratamiento para calibrar el espectrofotómetro-UV. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Los datos de las variables se promediaron y se obtuvo la desviación estándar correspondiente.

6.2. Cuantificación *in vitro* de la competencia por carbohidratos entre *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*

6.2.1. *D. hansenii*

La cepa ECP4 de *D. hansenii* se cultivó en PDA a 25°C por 48 h. Posteriormente de la placa de cultivo se colectó la biomasa y con solución salina (0.85%) se ajustó su concentración a 10^8 cel·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.2.2. *C. gloeosporioides*

Se utilizó la cepa AEPC2.7 de *C. gloeosporioides* la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. El hongo se cultivó en PDA a 25°C por 9 días. Posteriormente de la placa de cultivo se colectaron los conidios y con agua se ajustó su concentración a 10^6 conidios·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.2.3. Desarrollo experimental

Se depositaron 100 μ L de la suspensión de levadura y/o 100 μ L de la suspensión de *C. gloeosporioides* en 0.04 L de medio de cultivo a base de papaya 1:10. Los matraces Erlenmeyer con las soluciones se incubaron a 25°C y 150 rpm por 24 h. Se tomaron alícuotas de 5 mL a las 12 h para determinar: la cantidad de carbohidratos totales empleando el método de antrona (Roe *et al.*, 1961), sacarosa mediante el método de DNS (Bruner, 1964), glucosa mediante el método GOD/PAP (Barham y Trinder, 1972) y fructosa mediante el método con triptamina-HCl (Taylor, 1995). También se cuantificó el porcentaje de conidios germinados de *C. gloeosporioides* a las 5, 12 y 24 h. Se tomaron alícuotas de 10 μ L para cuantificar 100 conidios por tratamiento, considerando a un conidio germinado cuando el tubo de germinación era igual o mayor al tamaño del conidio. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.2.4. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y comparaciones múltiples de medias por LSD ($P \leq 0.05$), empleando el paquete estadístico Minitab® 17.1.0. Los porcentajes de germinación de conidios se transformaron previamente en valores angulares mediante la ecuación (1) (Castoria *et al.*, 2001):

$$\text{ArcSen}\sqrt{x} \quad (1)$$

6.3. Determinación de la producción de enzimas hidrolíticas por *D. hansenii*

6.3.1. Extracción de pared celular de *C. gloeosporioides*

El hongo se cultivó en medio YES (conteniendo: 2% de extracto de levadura y 15% de sacarosa) a 25°C y 150 rpm por 12 días. Posteriormente, la masa micelial se retiró y maceró en nitrógeno líquido. La pared celular del hongo se resuspendió en una solución de NaCl 5M y se sonicó (Branson® 2510DTH) por 15 min. A continuación, se centrifugó por 20 min a 12006 xg para descartar el sobrenadante. Las paredes se lavaron con agua destilada estéril y se secaron en horno (Cole-Parmer® 05015-50) a 60°C por 48 h (Hernández-Montiel *et al.*, 2010).

6.3.2. Cultivo con paredes de *C. gloeosporioides*

La cepa ECP4 de *D. hansenii* se cultivó en matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio mínimo YNB (conteniendo: 0.67% de Base-Levadura-Nitrógeno, Difco™), suplementado con 1 mg/mL⁻¹ de pared del hongo. Se incubaron a 25°C y 100 rpm por 15 días. Se realizaron los cultivos por triplicado y como control se utilizó la cepa de referencia L1 de *D. hansenii*. Del sobrenadante se cuantificó el contenido de β -1,3-glucanasa, quitinasas y proteasas (Hernández-Montiel *et al.*, 2010).

6.3.2.1. Producción de β -1,3-glucanasa

La producción de esta enzima se determinó empleando laminarina como sustrato. Se mezclaron 62.5 μ L del sobrenadante con la misma cantidad del sustrato al 1%, incubando la mezcla a 25°C por 4 h. La liberación de glucosa se cuantificó usando el Kit de RANDOX (método GOD-PAP). Definiendo a una unidad (U) de β -1,3-glucanasa como los μ mol de azúcares reductores liberados por mg de proteína por min a pH 5 y 37°C. El contenido total de proteína se cuantificó mediante el método descrito por Lowry *et al.* (1951). Se realizaron tres repeticiones y se calculó la desviación estándar.

6.3.2.2. Producción de quitinasa

La producción de esta enzima se determinó mediante un Kit de ensayo para quitinasas (N° CS0980, SIGMA) con el cual se evalúa quitobiosidasa (exoquitinasa), β -N-acetilglucosaminidasa (exoquitinasa) y endoquitinasas, empleando un sustrato específico para cada uno. En microplacas, se colocó en pozos individuales el sustrato correspondiente para cada enzima: 1) 100 μ L para muestra blanco, 2) 90 μ L para el control positivo y 3) 90 μ L para la muestra a evaluar, posteriormente se agregaron 10 μ L de quitinasa de *T. viride* (para el control positivo) y 10 μ L del sobrenadante del medio de cultivo para la muestra a evaluar; como estándar se utilizaron 300 μ L de solución de p-nitrofenol. La placa se colocó en incubación a 37°C (Thermo Scientific® 2835) por 30 min. Finalmente se adicionaron 200 μ L de la solución de paro (excepto para la solución estándar) en cada pozo. Se cuantificó la absorbancia de las muestras a 405 nm. Se definió una unidad (U) de quitinasa como la capacidad de la enzima para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por min del sustrato apropiado a pH 4.8 y 37°C. Se realizaron tres repeticiones y se calculó la desviación estándar.

6.3.2.3. Producción de proteasa

La producción de proteasa se determinó empleando el Kit de detección de proteasa por fluorescencia (N° PF0100, SIGMA). En tubos de 1.5 mL se colocaron 20 μ L de buffer de incubación, se adicionaron 20 μ L de FITC-caseína como sustrato y finalmente se incorporaron 10 μ L de una de las siguientes muestras: 1) muestra a evaluar, 2) tripsina (control positivo) y 3) agua ultra pura (como blanco). Los tubos se incubaron a 37°C por 60 min, posteriormente se adicionaron 150 μ L de ácido tricloracético 0.6 N a cada tubo y se colocaron en incubación a 37°C por 30 min. Las mezclas se centrifugaron a 10,000 xg por 10 min. En microplacas negras se colocaron 2 μ L del sobrenadante de cada muestra y se adicionaron 200 μ L de buffer de ensayo. Se cuantificó la intensidad de

fluorescencia en un fluorómetro a una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm. Para calcular la cantidad de proteasas se realizó una curva estándar con la solución control de tripsina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), realizando diluciones 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40; posteriormente se calculó una regresión lineal de los valores de la concentración de los estándares contra las lecturas de absorbancia, obteniendo el modelo matemático de la recta sobre la cual se evaluaron las absorbancias de los tratamientos. Se realizaron tres repeticiones y se calculó la desviación estándar.

6.4. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos volátiles (CVOs) producidos por *D. hansenii* hacia la inhibición de *C. gloeosporioides*

6.4.1. *D. hansenii*

La cepa ECP4 de *D. hansenii* se cultivó en PDA a 25°C por 48 h. Posteriormente de la placa de cultivo se colectó la biomasa y con solución salina (0.85%) se ajustó su concentración a 10^4 , 10^6 y $10^8 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizando una cámara de Neubauer.

6.4.2. *C. gloeosporioides*

La cepa AEPC2.7 de *C. gloeosporioides* se cultivó en PDA a 25°C por 9 días. Posteriormente de la placa de cultivo se colectaron los conidios y con agua se ajustó su concentración a $10^4 \text{ conidios}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizando una cámara de Neubauer.

6.4.3. Desarrollo experimental

Alícuotas de $20 \mu\text{L}$ de cada concentración de la levadura fueron depositadas y estriadas en placas con medio PDA y papaya 1:10 (suplementado con agar al 2%). De la misma manera en otro lote de placas con los medios mencionados anteriormente se depositaron alícuotas de $20 \mu\text{L}$ de la suspensión de conidios del

hongo. Se utilizó el método de cultivo doble donde se empata cara a cara el cultivo de levadura vs hongo (Parafati *et al.*, 2015). Ambas placas se sellaron con plástico Kleen Pack e incubaron a 25°C por 10 días. Al final del experimento se cuantificó el diámetro de crecimiento (mm) de *C. gloeosporioides* y se calculó la reducción del crecimiento radial con la ecuación descrita por Parafati *et al.* (2015):

$$\%I = \frac{(DC-DT)}{DC} \times 100 \quad (2)$$

donde “%I” representa la inhibición del crecimiento del micelio en porcentaje, DC representa el diámetro del micelio medido en el tratamiento control y DT representa el diámetro del micelio en presencia del tratamiento con levadura. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.4.4. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de medias por LSD ($P \leq 0.05$) empleando el paquete estadístico Minitab® 17.1.0.

6.5. Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno

6.5.1. Evaluación *in vitro* del efecto de tres concentraciones celulares de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas

6.5.1.1. Levaduras

La levadura ECP4 se cultivó en medio YNB suplementado con 100 mM de glucosa a 37°C y 150 rpm por 24 h. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4695 xg por 10 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 5 mL de buffer fosfato salino

(PBS; NaCl, KCl, Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ a pH 7.4). Finalmente se ajustaron tres concentraciones a 10⁴, 10⁶ y 10⁸ cel·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer. Como referencia se utilizó la cepa ES1 de *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones y concentraciones anteriormente descritas.

6.5.1.2. Desarrollo experimental

En microplacas se colocaron 100 µL de cada suspensión de levadura e incubaron en un agitador orbital (Thermo Scientific® MAXQ-4450) a 37°C y 75 rpm por 1.5 h. Como blanco se empleó PBS sin suspensión celular. Posteriormente, de cada pozo se removieron las suspensiones celulares y se lavaron dos veces con 150 µL de PBS. Inmediatamente se agregaron 100 µL de medio YNB a cada pozo y la placa se incubó a 37°C y 75 rpm por 66 h. El medio se reemplazó cada día con medio fresco. La formación de la biopelícula se cuantificó por la prueba de cristal violeta. Los pozos se lavaron dos veces con 200 µL de PBS y se dejaron secar a temperatura ambiente por 45 min. Cada pozo con las células lavadas se tiñió con 110 µL de cristal violeta al 0.3% por 45 min. Posteriormente a la tinción los pozos se lavaron cuatro veces con 250 µL de agua destilada estéril, se destiñeron agregando 200 µL de etanol al 95% y se incubaron a temperatura ambiente por 45 min. Finalmente se transfirieron 100 µL de solución de desteñido a un pozo nuevo, la cantidad de cristal violeta se midió en un lector de microplaca a 595 nm (Jin *et al.*, 2003). Los valores de absorbancia de los blancos se sustrajeron de las muestras evaluadas para minimizar la interferencia del fondo. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento y el experimento fue repetido dos veces.

6.5.1.3. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de medias por LSD ($P \leq 0.05$) empleando el paquete estadístico Minitab® 17.1.0.

6.5.2. Evaluación *in vitro* del efecto de tres concentraciones celulares de *D. hansenii* sobre la adhesión al patógeno

6.5.2.1. Levaduras

La levadura ECP4 se cultivó en medio PDA a 26°C por 48 h. Posteriormente de la placa de cultivo se colectó la biomasa y con solución salina (0.85%) se ajustó la suspensión celular a tres concentraciones (10^4 , 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹) utilizando una cámara de Neubauer. Como control de referencia fue utilizada la cepa ES1 de *S. cerevisiae* bajo las condiciones y concentraciones anteriormente descritas.

6.5.2.2. *C. gloeosporioides*

La cepa AEPC2.7 de *C. gloeosporioides* se cultivó en PDA a 25°C por 9 días. Posteriormente de la placa de cultivo se colectaron los conidios y con agua se ajustó su concentración a 10^4 conidios·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.5.2.3. Desarrollo experimental

Se prepararon microcultivos (cuadro de PDA de 1 cm²) con la concentración del fitopatógeno y se incubaron a 27°C por 48 h. Posteriormente 30 µL de la concentración de cada levadura se agregaron al micelio obtenido. Los microcultivos se lavaron con agua destilada estéril después de 12, 24 y 48 h. A través de micrográficas se observó la formación de biopelículas y la adhesión de la levadura al micelio del fitopatógeno (Bautista-Rosales *et al.*, 2014). Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y el experimento fue repetido dos veces.

6.5.2.4. Micrografías

Al término del experimento los microcultivos se colocaron en cajas de Petri con gel sílica durante 4 días y posteriormente se sometieron a un recubrimiento por baño de oro (Bozzola y Russell, 1999). Las muestras se examinaron por microscopio electrónico de barrido.

6.5.3. Evaluación *in vivo* del efecto de tres concentraciones celulares de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno

6.5.3.1. *D. hansenii*

La cepa ECP4 de *D. hansenii* se cultivó en PDB a 25°C por 48 h. Posteriormente con solución salina (0.85%) se ajustó la suspensión celular a tres concentraciones (10^4 , 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹) utilizando una cámara de Neubauer.

6.5.3.2. *C. gloeosporioides*

La cepa AEPC2.7 de *C. gloeosporioides* se cultivó en PDA a 25°C por 9 días. Posteriormente de la placa de cultivo se colectaron los conidios y con agua se ajustó su concentración a 10^4 conidios·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.5.3.3. Fungicida comercial

Se utilizó el producto químico denominado Tecto 60 (i.a. tiabendazol: 2-(4-Tiazolil)-1H-benzimidazol) a una concentración de 1000 ppm.

6.5.3.4. Desarrollo experimental

Frutos de papaya var. Maradol con madurez comercial se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 3 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron por 2 h en una campana de flujo laminar. A cada fruto se les realizaron 3 heridas de 1 mm de profundidad con una aguja estéril, se sumergieron en cada concentración de levadura por 1 min y se secaron por 2 h. Posteriormente se inoculó en cada herida 10 μ L de la suspensión de conidios de *C. gloeosporioies* (Lu *et al.*, 2013). Un lote de frutos fue inoculado con el fitopatógeno y tratado con la solución del fungicida comercial. Otro lote solo fue inoculado con el fitopatógeno y uno más solo inoculado con agua destilada estéril. Los frutos se colocaron dentro de contenedores de plástico estériles a una humedad relativa del 90% a 25°C por 7 días. Para observar la formación de biopelículas y la adhesión de la levadura al micelio del fitopatógeno se tomaron muestras de tejido y se observaron al microscopio electrónico de barrido. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y el experimento fue repetido dos veces.

6.5.3.5. Micrografías

De la zona donde se realizó la lesión en los frutos, se colectaron las muestras de tejido (1 \times 1 \times 0.3 cm) de cada tratamiento y fijadas en glutaraldehído al 2% (v/v) por 5 min. Posteriormente los tejidos fueron lavados 3 veces con agua destilada estéril y deshidratados parcialmente en un gradiente de etanol (30, 50, 70, 80, 95 y 100%) por 20 min, se secaron a punto crítico con CO₂ y se sometieron a un recubierto por baño de oro (Bozzola y Russell, 1999). Las muestras se examinaron por microscopio electrónico de barrido.

6.6. Determinación *in vitro* e *in vivo* del efecto de *D. hansenii* sobre la inhibición de *C. gloeosporioides*

6.6.1. *D. hansenii*

La cepa ECP4 de *D. hansenii* se cultivó en PDB a 25°C por 48 h. Posteriormente con solución salina (0.85%) se ajustó la suspensión celular a tres concentraciones (10^4 , 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹) utilizando una cámara de Neubauer.

6.6.2. *C. gloeosporioides*

La cepa AEPC2.7 de *C. gloeosporioides* se cultivó en PDA a 25°C por 9 días. Posteriormente de la placa de cultivo se colectaron los conidios y con agua se ajustó su concentración a 10^4 conidios·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.6.3. Fungicida comercial

Se utilizó el producto químico denominado Tecto 60 (i.a. tiabendazol: 2-(4-Tiazolil)-1H-benzimidazol) a una concentración de 1000 ppm.

6.6.4. Experimento *in vitro*

En medio PDB y medio de papaya (diluido 1:10) se inocularon 100 µL de cada concentración de levadura más 100 µL de la concentración del fitopatógeno. Como control se inoculó cada medio de cultivo con conidios del fitopatógeno. Se incubaron a 25°C por 48 h (Hernández-Montiel *et al.*, 2010b). Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de conidios germinados cada 24 h. Se tomaron alícuotas de 10 µL para cuantificar 100 conidios por tratamiento, considerando a un conidio germinado cuando el tubo de germinación era igual o mayor al tamaño del conidio.

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.6.4.1. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de medias por LSD ($P \leq 0.05$), empleando el paquete estadístico Minitab® 17.1.0. Los porcentajes de germinación de conidios se transformaron previamente en valores angulares mediante la ecuación (1) anteriormente descrita.

6.6.5. Experimento *in vivo*

Frutos de papaya var. Maradol con madurez comercial se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 3 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron por 2 h en una campana de flujo laminar. A cada fruto se le realizaron 3 heridas de 1 mm de profundidad con una aguja estéril y se sumergieron en cada concentración de levadura por 1 min y se secaron por 2 h. Posteriormente se inoculó en cada herida 10 μ L de la suspensión de conidios de *C. gloeosporioides* (Lu *et al.*, 2013). Un lote de frutos se inoculó con el fitopatógeno y se trató con la solución del fungicida comercial. Otro lote solo se inoculó con el fitopatógeno y uno más solo se inoculó con agua destilada estéril. Los frutos se colocaron dentro de contenedores de plástico estériles a una humedad relativa del 90% a 25°C por 7 días. Al final del experimento se evaluó la incidencia de la enfermedad y el diámetro de lesión (mm). Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.6.5.1. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de medias por LSD ($P \leq 0.05$), empleando el paquete estadístico Minitab® 17.1.0.

6.7. Evaluación de diferentes tiempos de inoculación de *D. hansenii* sobre el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya var. Maradol

6.7.1. *D. hansenii*

La cepa ECP4 de *D. hansenii* se cultivó en PDB a 25°C por 48 h. Posteriormente con solución salina (0.85%) se ajustó su concentración a 10^8 cel·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.7.2. *C. gloeosporioides*

La cepa AEPC2.7 de *C. gloeosporioides* se cultivó en PDA a 25°C por 9 días. Posteriormente de la placa de cultivo se colectaron los conidios y con agua se ajustó su concentración a 10^4 conidios·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.7.3. Fungicida comercial

Se utilizó el producto químico denominado Tecto 60 (i.a. tiabendazol: 2-(4-Tiazolil)-1H-benzimidazol) a una concentración de 1000 ppm.

6.7.4. Desarrollo experimental

Frutos de papaya var. Maradol con madurez comercial se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 3 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron por 2 h en una campana de flujo laminar. A cada fruto se realizaron 3 heridas de 1 mm de profundidad con una aguja estéril. Lotes de frutos se trataron con la solución de levadura por inmersión a las 24 h, 12 h y 0 h previo a la inoculación de cada herida con 10 μ L de la suspensión de conidios de *C. gloeosporioides*. Otro lote de frutos se inocularon con *C. gloeosporioides* a las 12 h y 24 h previo al tratamiento con levadura. Se utilizó como control un lote de frutos inoculado solo con el fitopatógeno y uno más con *C. gloeosporioides* más el fungicida comercial. Los frutos se colocaron dentro de contenedores de plástico estériles a una humedad relativa del 90% a 25°C por 7 días (Zhao *et al.*, 2008). Al final del experimento se evaluó la incidencia de la enfermedad y el diámetro de lesión (mm). Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.7.5. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de medias por LSD ($p \leq 0.05$), empleando el paquete estadístico Minitab® 17.1.0.

6.8. Determinación del efecto de *D. hansenii* sobre la protección de papaya var. Maradol bajo condiciones de comercialización local

6.8.1. *D. hansenii*

La cepa ECP4 de *D. hansenii* se cultivó en PDB a 25°C por 48 h. Posteriormente con solución salina (0.85%) se ajustó su concentración a 10^8 cel·mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer.

6.8.2. Fungicida comercial

Se utilizó el producto químico denominado Tecto 60 (i.a. tiabendazol: 2-(4-Tiazolil)-1H-benzimidazol) a una concentración de 1000 ppm.

6.8.3. Desarrollo experimental

Siguiendo el procedimiento realizado por los productores de papaya var. Maradol del Estado de Veracruz, se planteó la siguiente metodología: frutos de papaya con 60-70% de madurez se lavaron con agua corriente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 3 min y se lavaron con agua destilada estéril. Lotes de frutos se trataron con la suspensión de levadura por inmersión por 1 min. Se utilizó otro lote de frutos tratado sólo con agua destilada estéril y otro con el fungicida comercial. Los frutos se cubrieron con papel periódico y se almacenaron en condiciones ambientales (22-25°C y ~80% HR) por 6 días (Wang *et al.*, 2008). Al final del experimento se determinó la madurez de los frutos basado en la coloración donde, 1 = 100% de frutos con coloración amarilla y 2 = sobremaduro (con pequeñas manchas color café). Los resultados se expresaron en porcentaje. La vida de anaquel de los frutos se evaluó de acuerdo al número de frutos que no presentaron incidencia de hongos, y se expresó en porcentaje. Se utilizaron un total de doce frutos por tratamiento y el experimento se repitió dos veces en el tiempo.

6.8.4. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de medias por LSD ($P \leq 0.05$), empleando el paquete estadístico Minitab® 17.1.0. Los porcentajes obtenidos se transformaron previamente en valores angulares mediante la ecuación (1) anteriormente descrita.

7. RESULTADOS

7.1. Dinámica poblacional de *D. hansenii*

Después de las 5 h de inoculados los medios de cultivo se observó la fase de adaptación de la levadura. La fase logarítmica se extendió hasta las 20, 15 y 10 h en el medio PDB (Fig. 1a), papaya 1:10 (Fig. 1b) y papaya 1:100 (Fig. 1c) respectivamente.

7.2. Competencia *in vitro* por carbohidratos entre *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*

El porcentaje de germinación de conidios de *C. gloeosporioides* disminuyó estadísticamente ($P \leq 0.05$) a las 5, 12 y 24 h después de la inoculación del medio papaya 1:10 con el fitopatógeno más la levadura (Fig. 2). Aunque *D. hansenii* disminuyó la germinación de conidios en todos los tiempos de evaluación, a las 12 h se observó la mayor inhibición con un 25%. Los valores más altos de germinación de conidios se cuantificaron en el medio de cultivo donde solo estaba presente el fitopatógeno. La concentración de sacarosa disminuyó estadísticamente ($P \leq 0.05$) en los tratamientos con ambos microorganismos (Fig. 3). Aunque el tratamiento solo con la levadura y el fitopatógeno redujeron la concentración de sacarosa en el medio de cultivo en comparación con el control, en la co-inoculación con *D. hansenii* y *C. gloeosporioides* se observó la cantidad menor del disacárido presente en el medio. En relación a la glucosa, no existieron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre los tratamientos con los microorganismos (Fig. 4). Sin embargo, se observó una concentración menor del monosacárido en el tratamiento donde solo se inoculó la levadura. La concentración de fructosa disminuyó estadísticamente ($P \leq 0.05$) en los tratamientos con los microorganismos (Fig. 5). El tratamiento donde se observó una cantidad menor del monosacárido fue en el medio con la levadura.

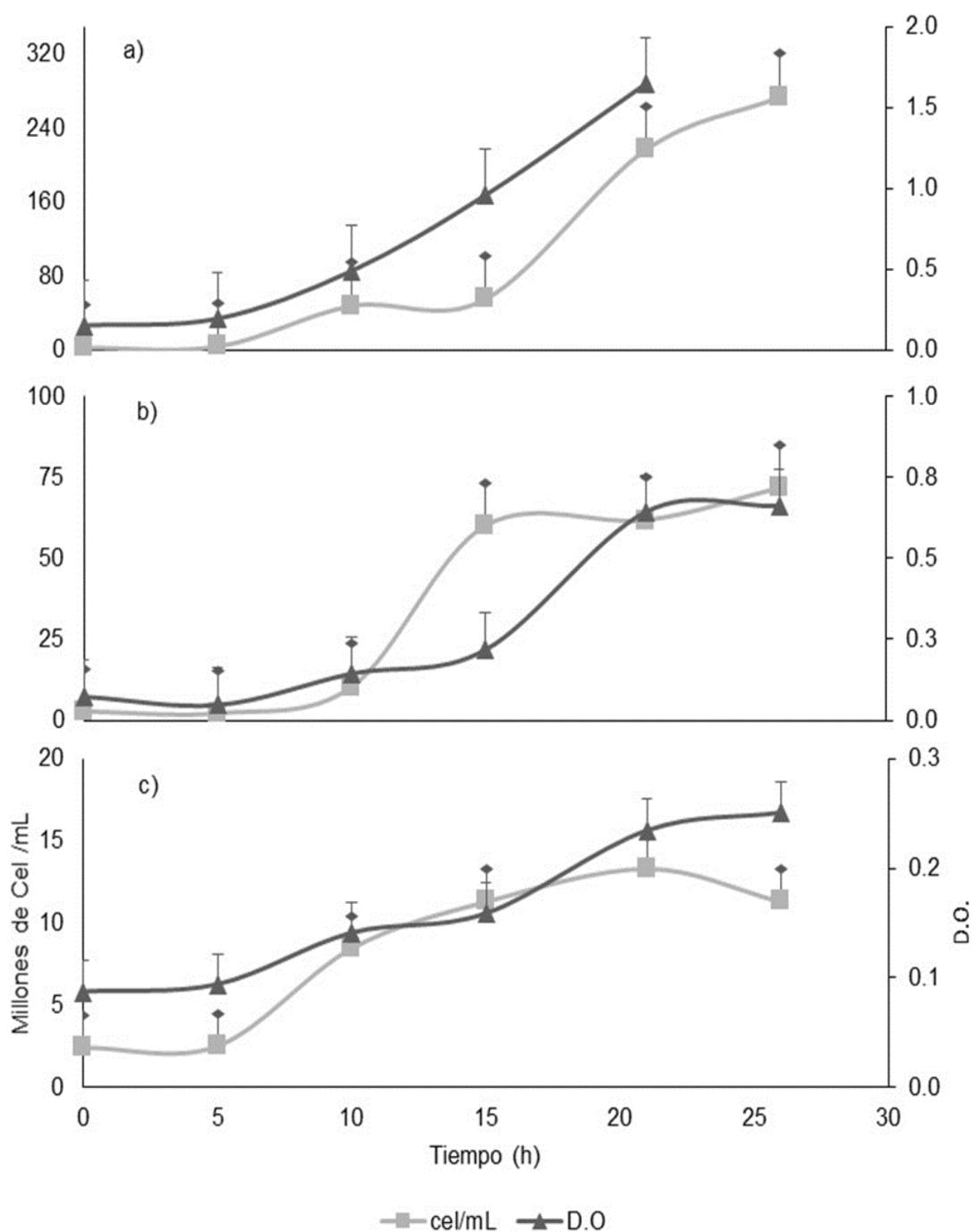


Figura 1. Crecimiento de *D. hansenii* en diferentes medios de cultivo. Donde; a = PDB, b = Papaya 1:10 y c = Papaya 1:100. La curva de crecimiento se determinó por densidad óptica (D.O. a 580 nm) y conteo celular (cel/mL). Las barras verticales representan la desviación estándar.

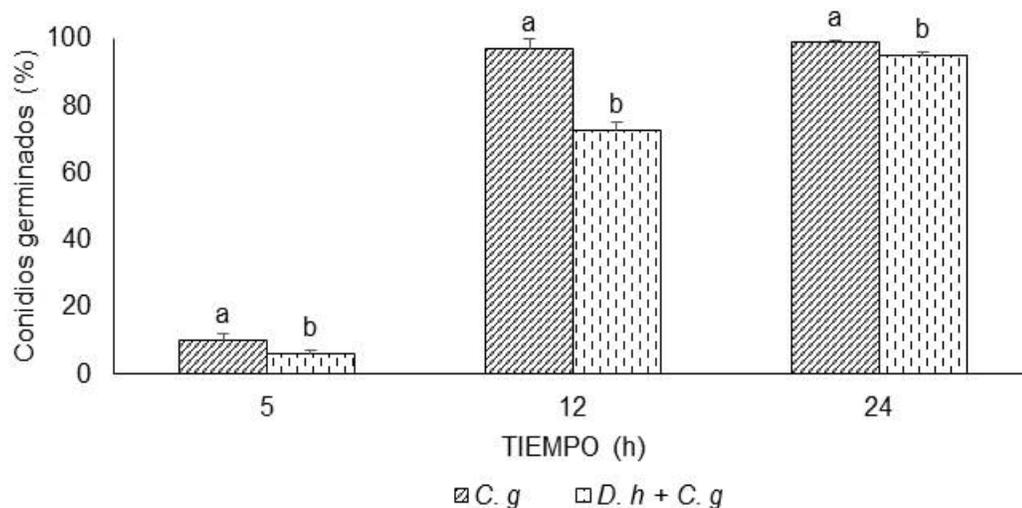


Figura 2. Germinación de conidios *C. gloeosporioides* en medio elaborado a base de papaya 1:10. Donde; *C.g* = *C. gloeosporioides* y *D.h+C.g* = *D. hansenii*+*C. gloeosporioides*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre los tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

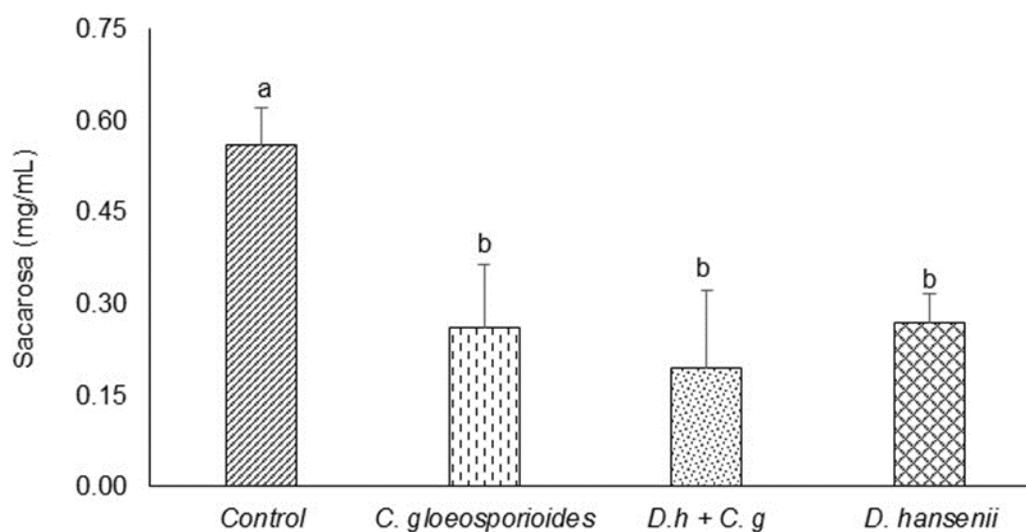


Figura 3. Contenido de sacarosa en medio papaya 1:10 inoculado con *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las barras representan la diferencia estadística entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

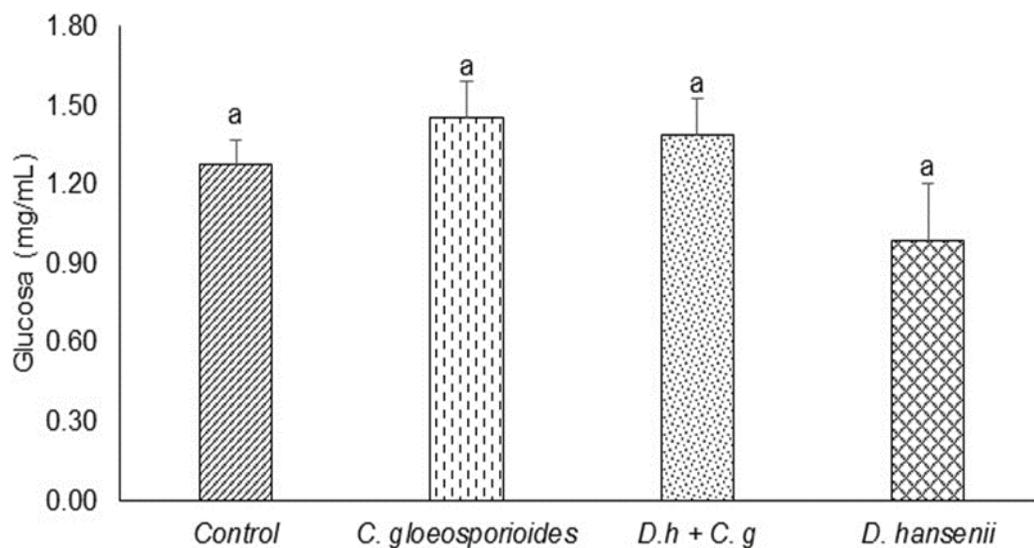


Figura 4. Contenido de glucosa en medio papaya 1:10 inoculado con *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las barras representan la diferencia estadística entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

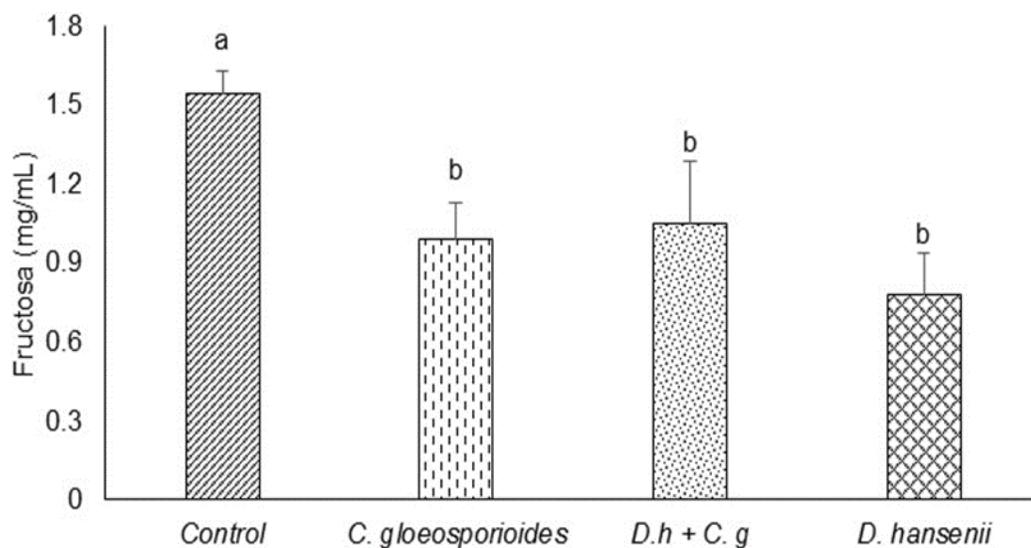


Figura 5. Contenido de fructosa en medio papaya 1:10 inoculado con *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las barras representan la diferencia estadística entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

La concentración de carbohidratos totales disminuyó estadísticamente ($P \leq 0.05$) en los tratamientos con los microorganismos (Fig. 6). El tratamiento donde se observó una cantidad menor de carbohidratos totales fue en el medio con la levadura.

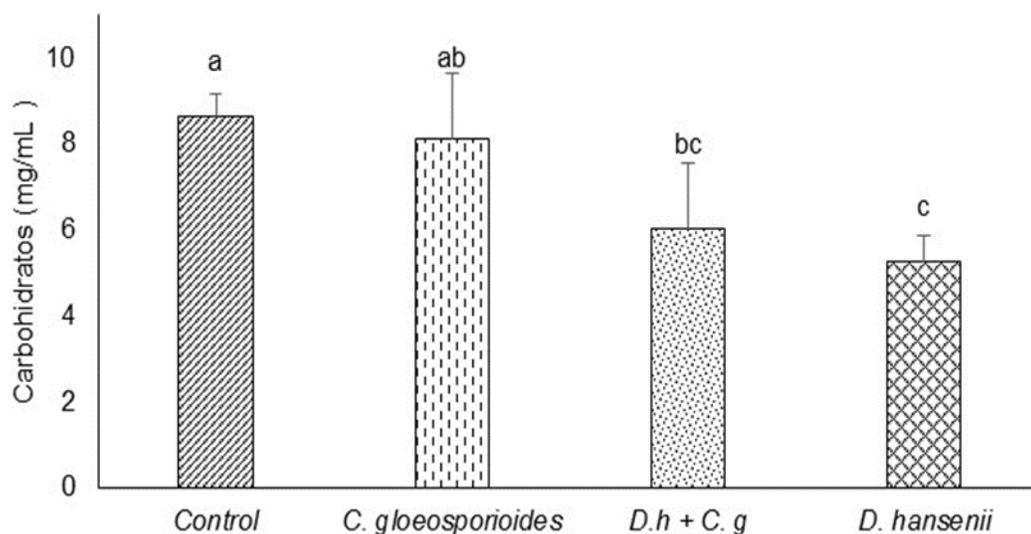


Figura 6. Contenido de carbohidratos totales en medio papaya 1:10 inoculado con *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las barras representan la diferencia estadística entre tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

7.3. Producción de enzimas hidrolíticas por *D. hansenii*

La levadura presentó actividad enzimática para β -1,3-glucanasa (Fig. 7), quitobiosidasa (exoquitinasa) (Fig. 8) y proteasa (Fig. 9). La concentración de quitobiosidasa y proteasas se localizó en el límite detectable por el kit.

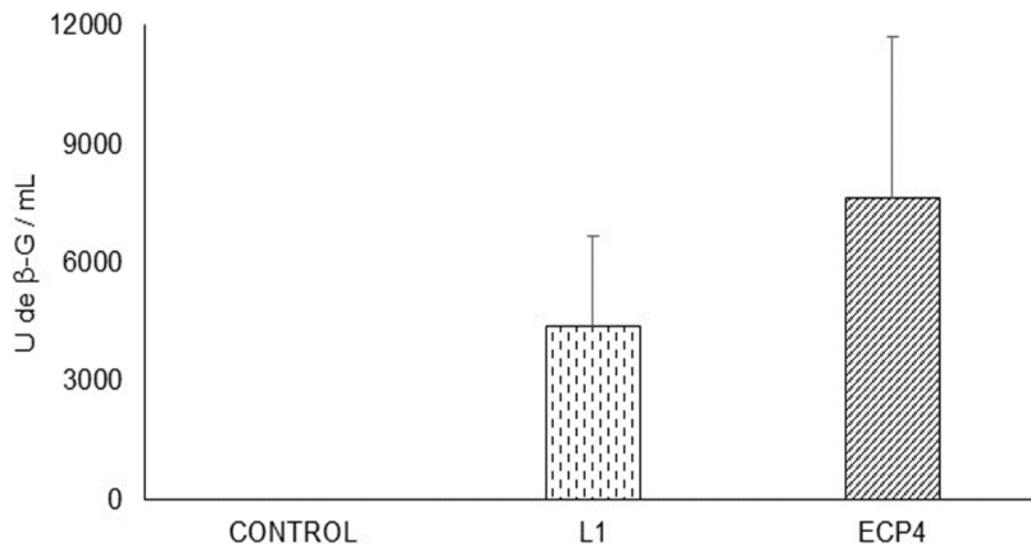


Figura 7. Producción de β -1,3-glucanasa por *D. hansenii*. Levaduras *D. hansenii* L1 (de referencia) y ECP4 cultivadas con pared celular de *C. gloeosporioides*. La producción de enzima se expresó en unidades (U) por mililitro de β -1,3-glucanasa (β -G). Las barras verticales representan la desviación estándar.

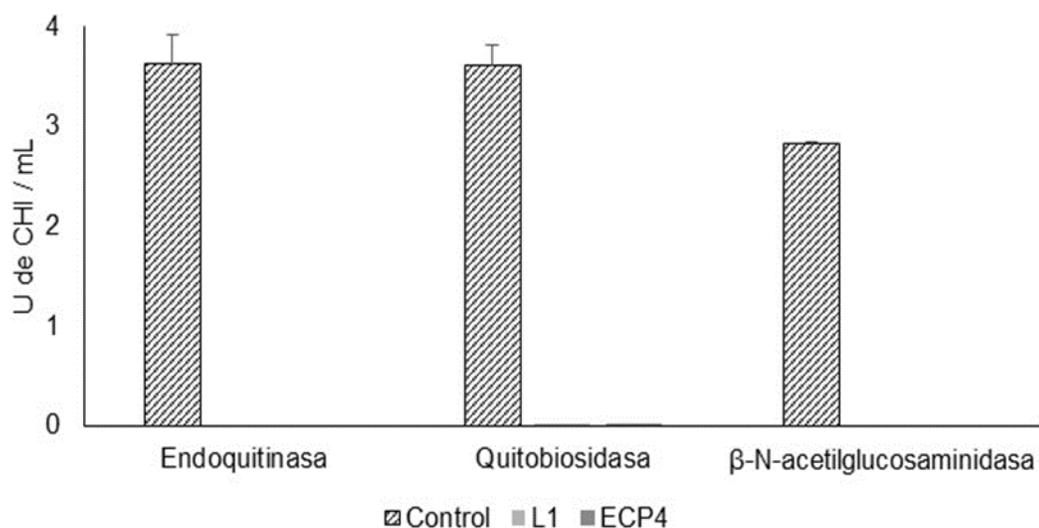


Figura 8. Producción de quitinasas por *D. hansenii*. Levaduras *D. hansenii* L1 (de referencia) y ECP4 cultivadas con pared celular de *C. gloeosporioides*. La producción de enzima se expresó en unidades (U) por mililitro para las quitinasas (CHI) evaluadas. Las barras verticales representan la desviación estándar.

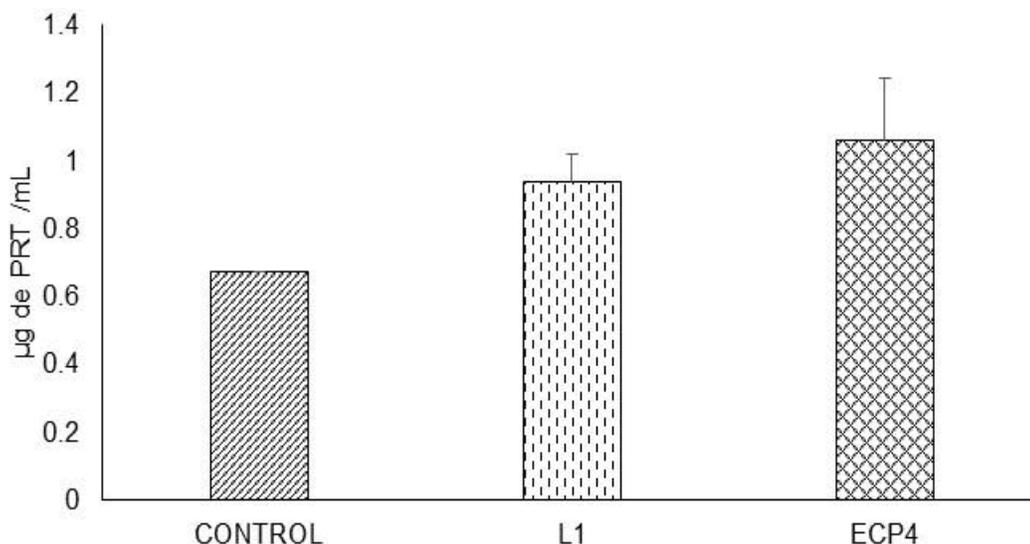


Figura 9. Producción de proteasa por *D. hansenii*. Levaduras *D. hansenii* L1 (de referencia) y ECP4, cultivadas con pared celular de *C. gloeosporioides*. La producción de enzima se expresó en microgramos (μg) por mililitro de proteasa (PRT). Las barras verticales representan la desviación estándar.

7.4. Efecto de compuestos orgánicos volátiles (CVOs) producidos por *D. hansenii* en la inhibición de *C. gloeosporioides*

Los compuestos volátiles producidos por las tres dosis celulares de *D. hansenii* inhibieron estadísticamente ($P \leq 0.05$) el crecimiento de *C. gloeosporioides* en los dos medios de cultivo (Fig. 10). Con las concentraciones de 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii* se obtuvieron los valores más altos de inhibición del fitopatógeno en ambos medios. En la comparación de la producción de CVOs por *D. hansenii* cultivada en ambos medios, se observó una mayor inhibición en PDA (Fig. 11).

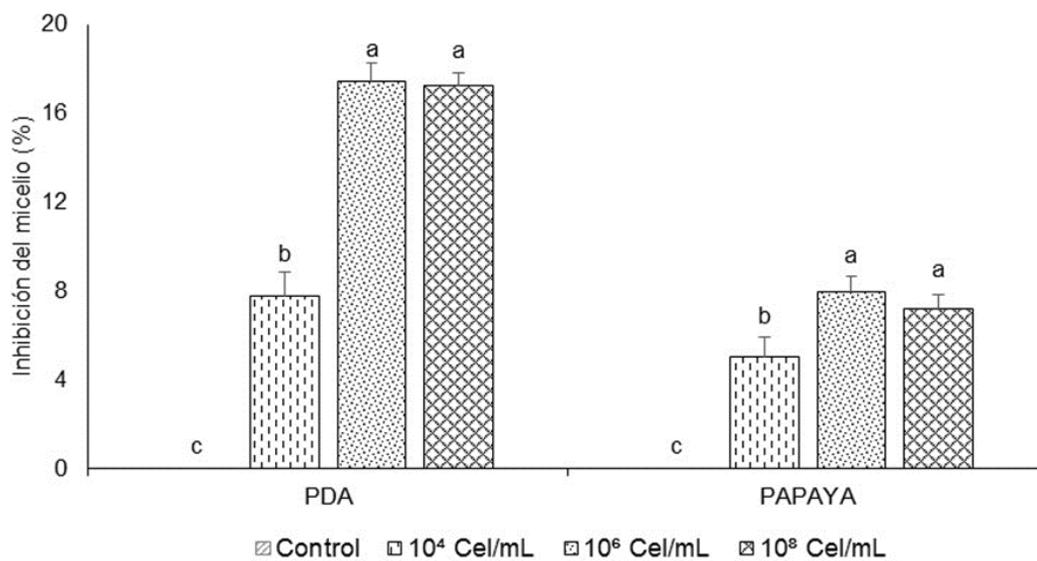


Figura 10. Efecto de la dosis celular *D. hansenii* sobre la Inhibición de *C. gloeosporioides* a través de CVOs. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre los tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$) para un solo medio de cultivo.

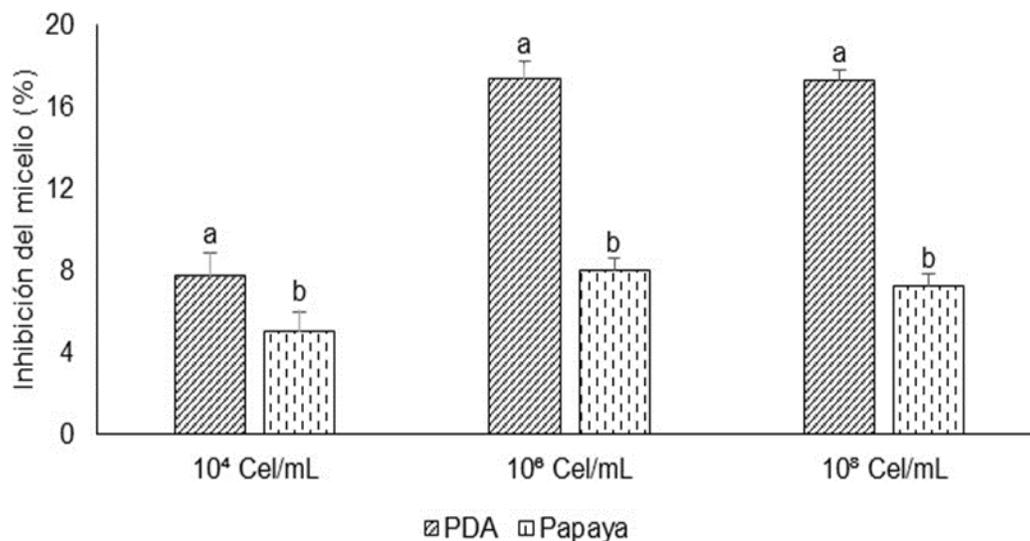


Figura 11. Inhibición de *C. gloeosporioides* a través de diferentes dosis celulares de *D. hansenii* cultivada en PDA y Papaya 1:10. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre diferentes medios de cultivo para un solo tratamiento (LSD, $P \leq 0.05$).

7.5. Determinación *in vitro* e *in vivo* del efecto de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno

7.5.1. Evaluación *in vitro* de la formación de biopelículas

La formación de biopelículas fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) entre las concentraciones del tratamiento con *D. hansenii* (Fig. 12). Los valores más altos se observaron con la dosis de 10^8 cel·mL⁻¹ de la levadura. En relación a *S. cerevisiae* no existió una diferencia estadística ($P > 0.05$) entre las dosis celulares y la formación de biopelículas.

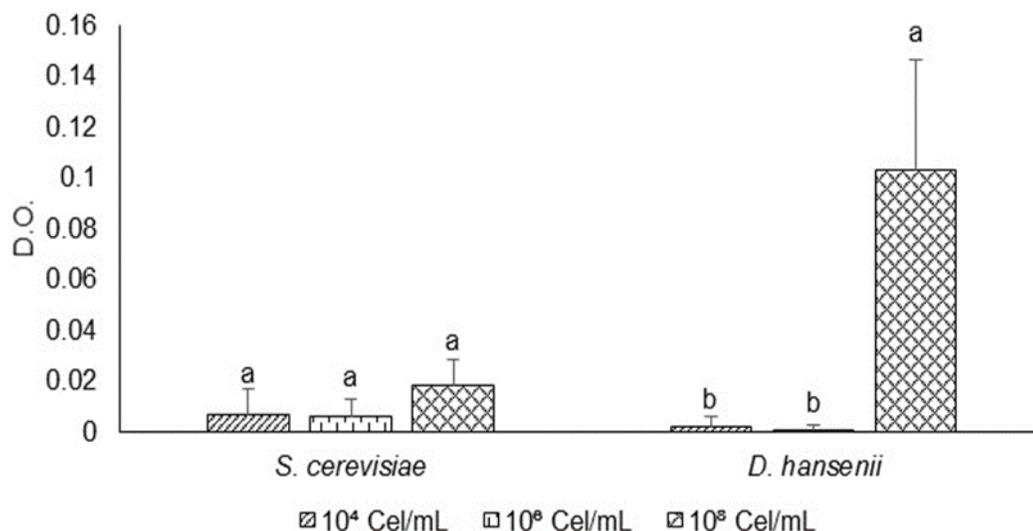


Figura 12. Influencia de la concentración celular de *D. hansenii* en la formación de biopelículas. Donde; D.O. = Densidad óptica a 595 nm. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las barras indican diferencia estadística entre los tratamientos, para cada microorganismo (LSD, $P \leq 0.01$).

7.5.2. Evaluación *in vitro* de la adhesión al patógeno

En las micrografías del tratamiento con *C. gloeosporioides* se observó una gran cantidad de micelio y esporas aglomeradas característico de este fitopatógeno (Fig. 13a). En el tratamiento con la dosis más baja de *D. hansenii* y el fitopatógeno

no se observó la adhesión de la levadura al micelio del hongo (Fig. 13b); sin embargo, en la dosis 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹, se observó la adhesión de las células al micelio de *C. gloeosporioides* presentando cambios en su morfología y unión por filamentos (Fig. 13c y d). En la dosis más alta de la levadura se formaron biopelículas sin presentar la matriz extracelular.

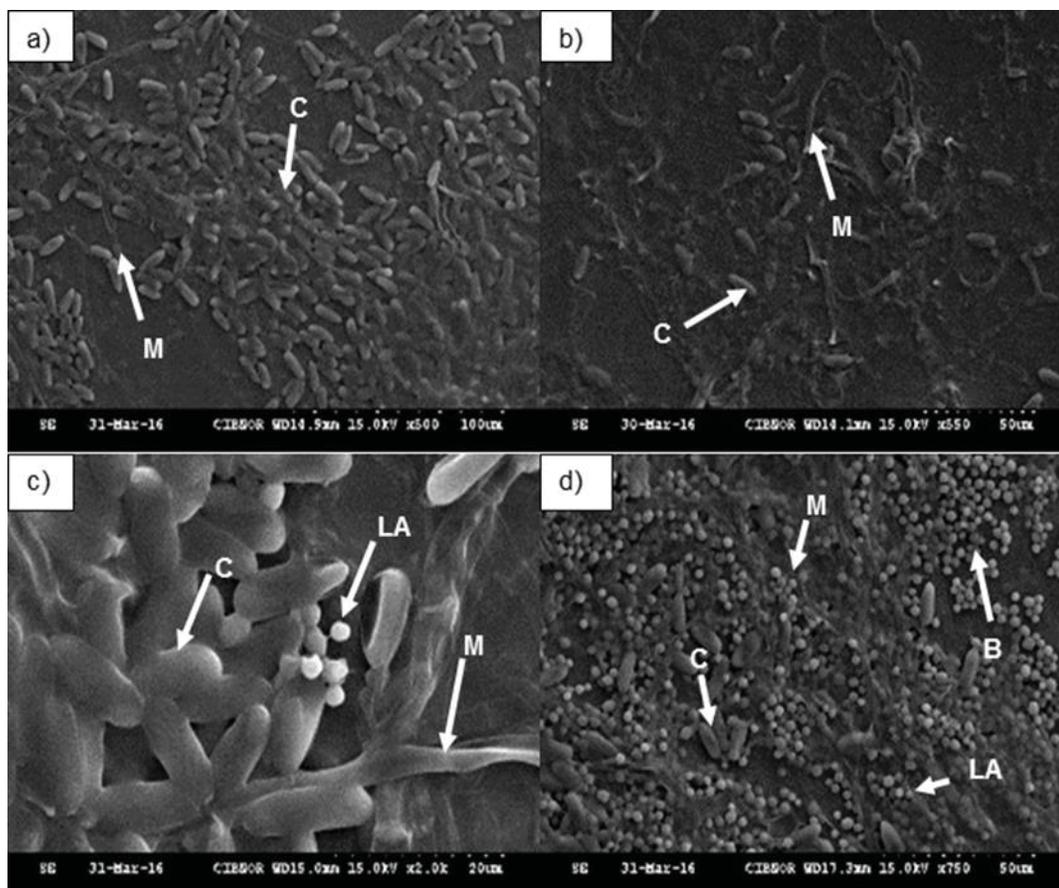


Figura 13. Influencia de la concentración celular de *D. hansenii* sobre la adhesión al micelio de *C. gloeosporioides*. Donde; a) Fitopatógeno (F), b) F+ 10^4 cel·mL⁻¹ de levadura (L), c) F+ 10^6 cel·mL⁻¹ L y d) F+ 10^8 cel·mL⁻¹ L. C = conidios, M = Micelio, L = Levadura, LA = Levadura adherida y B = biopelícula.

En las micrografías del tratamiento con *S. cerevisiae* no se observó la adhesión de la levadura al micelio del hongo en ninguna de las tres dosis celulares evaluadas (micrografías no mostradas).

7.5.3. Evaluación *in vivo* sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno

En las micrografías del tratamiento con *C. gloeosporioides* se observó una gran cantidad de micelio y esporas aglomeradas característico de este fitopatógeno (Fig. 14a). En el tratamiento de *D. hansenii* y *C. gloeosporioides* se observó una reducción del crecimiento del micelio del fitopatógeno relacionada con la concentración celular de la levadura (Fig. 14d, e y f). No se observaron afecciones al micelio o conidios del fitopatógeno. En el tratamiento con la dosis más baja de la levadura únicamente se observaron colonias aisladas sobre el tejido del fruto sin mostrar cambios en su morfología (Fig. 14d). En el tratamiento con 10^6 cel·mL⁻¹ de la levadura se observaron filamentos entre levaduras, dando inicio a la formación de una matriz (Fig. 14e), la cual limitaba la zona de infección del hongo. En el tratamiento con 10^8 cel·mL⁻¹ de la levadura, se observó la formación de biopelículas homogéneas (Fig 14f), en la cual las levaduras se encontraron embebidas en una matriz hidratada localizada sobre la zona de lesión del fruto.

7.6. Cuantificación *in vitro* e *in vivo* el efecto de *D. hansenii* sobre la inhibición de *C. gloeosporioides*

7.6.1. Experimento *in vitro*

A las 24 h, las tres dosis celulares de *D. hansenii* inhibieron estadísticamente ($P \leq 0.05$) la germinación de conidios del fitopatógeno en los medios de cultivo PDB y papaya 1:10 (Fig. 15a). En el medio PDB, la dosis de 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii*, inhibió la germinación de conidios de *C. gloeosporioides* en un 33 y 98%, respectivamente. En el medio papaya 1:10 la dosis de 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii*, inhibió en un 15 y 98%, respectivamente, la germinación de conidios de *C. gloeosporioides*. Con la dosis más baja de la levadura no se observó inhibición hacia el fitopatógeno en ambos medios de cultivo.

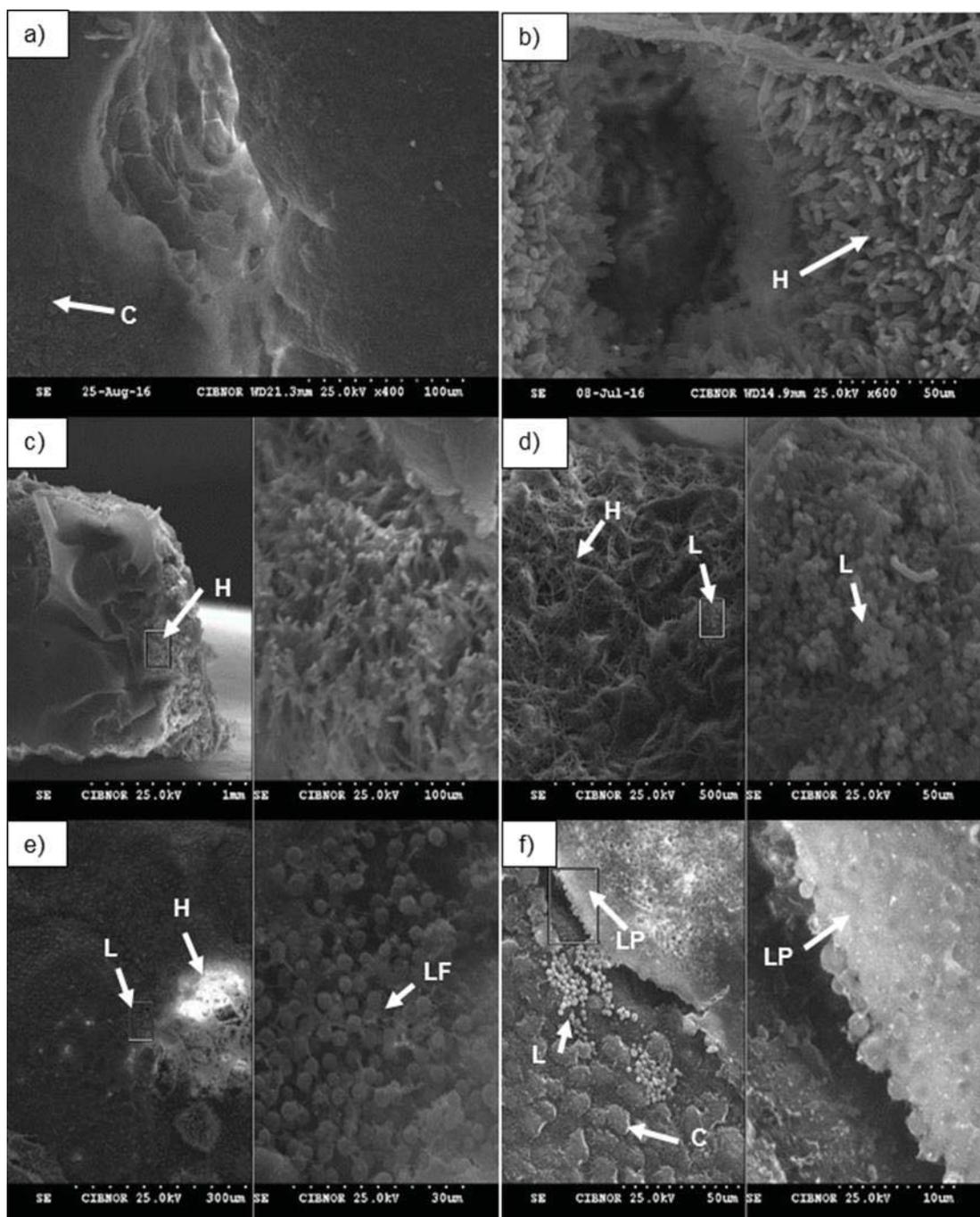


Figura 14. Efecto de la concentración celular de *D. hansenii* en la protección de frutos de papaya por biopelículas contra *C. gloeosporioides*. Donde; a) Agua, b) Fitopatógeno, c) Fungicida+fitopatógeno, d) levadura 10^4 cel·mL⁻¹+fitopatógeno, e) Levadura 10^6 cel·mL⁻¹+fitopatógeno y f) levadura 10^8 cel·mL⁻¹+fitopatógeno C = Cera del fruto, H = Hongo, L = Levadura, LF = Levaduras con filamentos y LP = Levaduras formando biopelícula.

A las 48 h, la dosis celular más alta de *D. hansenii* inhibió estadísticamente ($P \leq 0.05$) la germinación de conidios del fitopatógeno en los medios de cultivo PDB y papaya 1:10 (Fig. 15b). En los medio PDB y papaya 1:10, la dosis 10^8 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii*, inhibió la germinación de conidios de *C. gloeosporioides* en un 97 y 99%, respectivamente. El resto de las dosis no inhibieron la germinación en ambos medios.

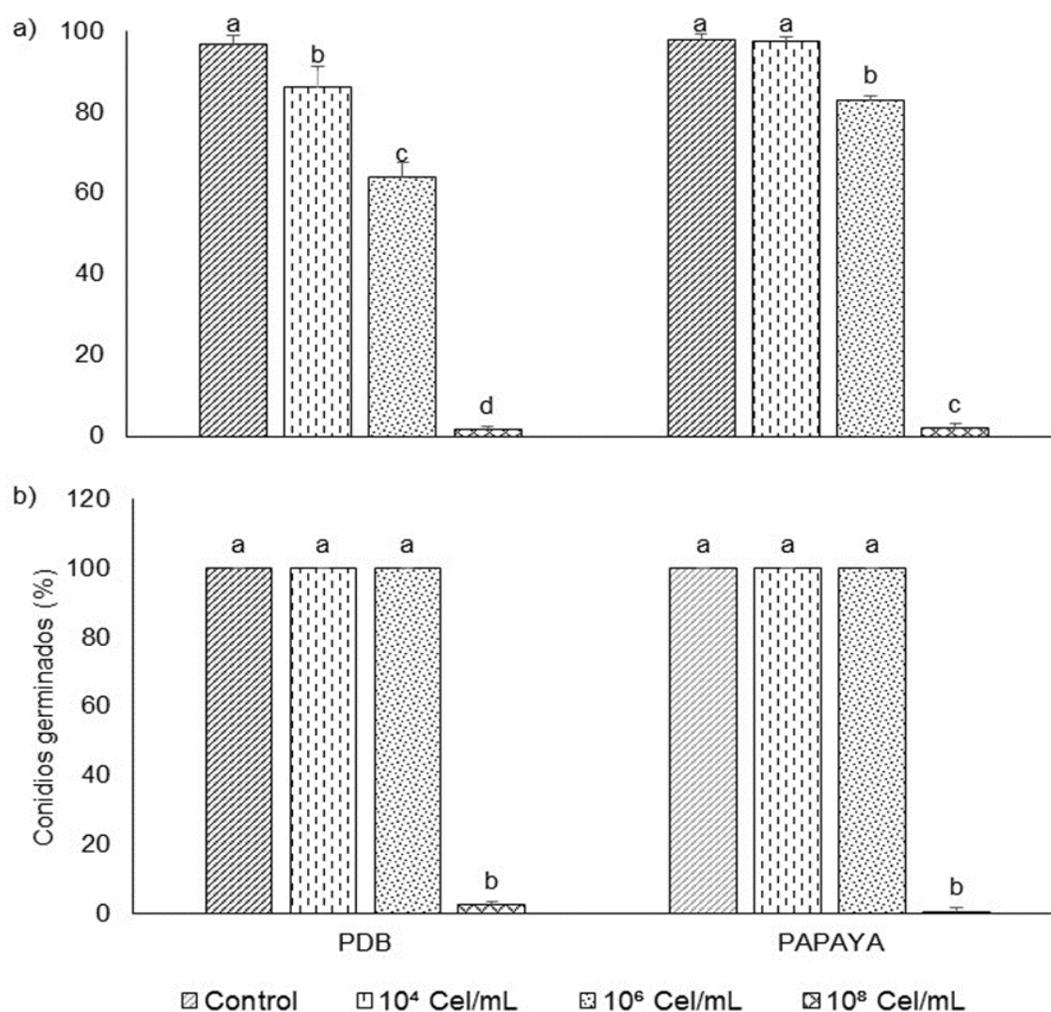


Figura 15. Efecto de la concentración celular de *D. hansenii* sobre la germinación de conidios de *C. gloeosporioides*. a) 24 h y b) 48 h, después de inoculados los medios de cultivo. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre los tratamientos para un solo medio de cultivo (LSD, $P \leq 0.05$).

7.6.2. Experimento *in vivo*

Los frutos inoculados con las tres dosis celulares de *D. hansenii* más el fitopatógeno presentaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) en el diámetro de lesión de los frutos e incidencia de la enfermedad (Fig. 16). Con la dosis más alta de la levadura no se observó presencia de la enfermedad en ninguno de los frutos tratados con esta dosis (Fig. 17), manteniéndose libres de antracnosis durante el tiempo de experimentación. Con la dosis 10^6 cel·mL⁻¹ de la levadura, disminuyó en un 25% la incidencia de la enfermedad en los frutos y el diámetro de lesión en un 84%. El efecto protector que se observó con las dosis 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ en los frutos de papaya superó al tratamiento con el fungicida comercial.

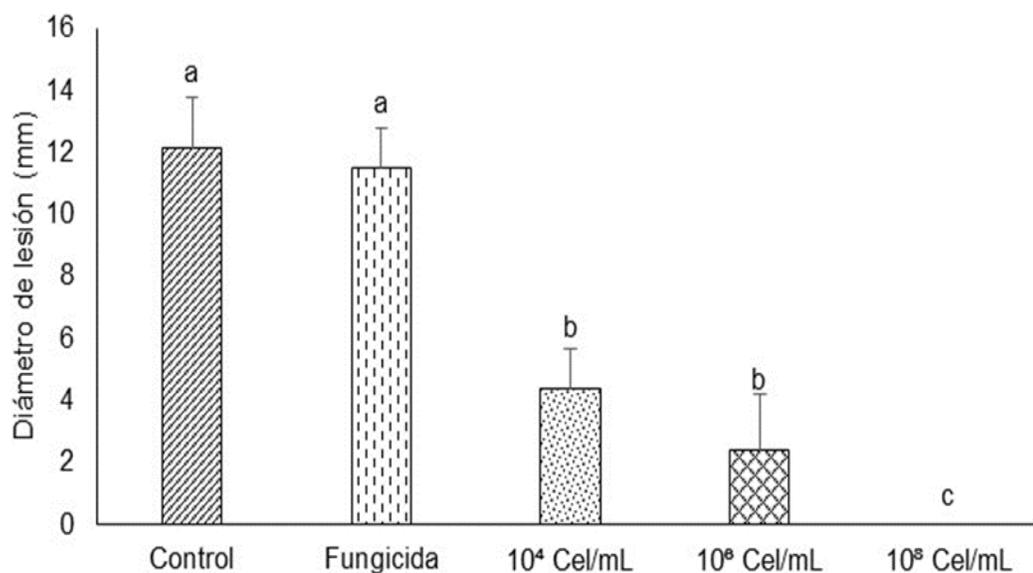


Figura 16. Efecto de la concentración celular de *D. hansenii* en la protección de frutos de papaya contra la antracnosis causada por *C. gloeosporioides*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre los tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

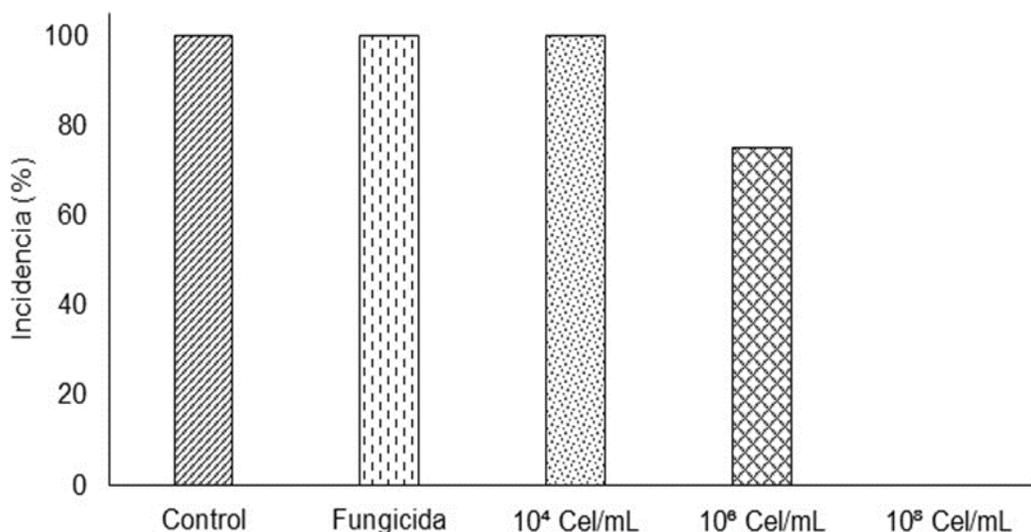


Figura 17. Incidencia de antracnosis en frutos de papaya var. Maradol inoculados con tres dosis de *D. hansenii*.

7.7. Determinación de los tiempos de inoculación de *D. hansenii* sobre el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya var. Maradol

Los frutos inoculados a diferentes tiempos con *D. hansenii* presentaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) en el diámetro de lesión e incidencia de la enfermedad ocasionada por *C. gloeosporioides* (Fig. 18a y b). La aplicación de la levadura antes, después y al mismo tiempo que el fitopatógeno protegió al 100% a los frutos, no observando antracnosis ni lesiones. El tratamiento de los frutos con el fungicida comercial más el fitopatógeno no fue efectivo en la presencia de la enfermedad y el tamaño de lesión comparado con el tratamiento sólo con *C. gloeosporioides*.

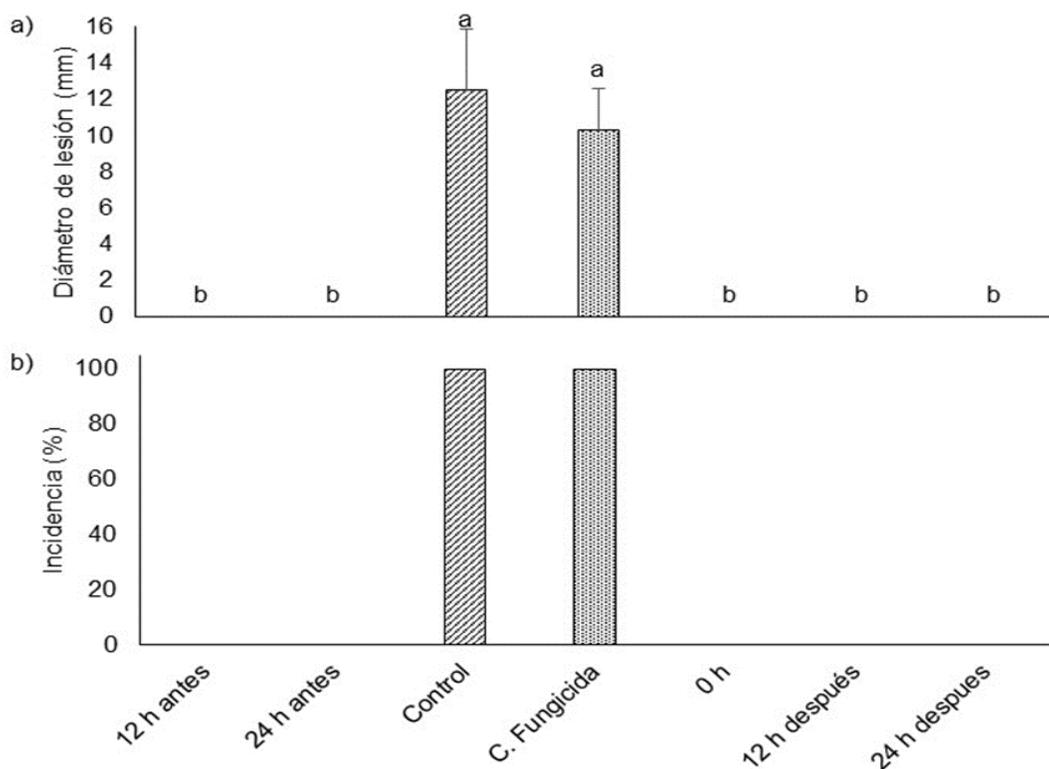


Figura 18. Efecto del pre (24, 12 y 0 h) y pos (12 y 24 h) tratamiento de frutos de papaya var. Maradol con *D. hansenii* para el control de antracnosis ocasionada por *C. gloeosporioides*. a) Diámetro de lesión y b) incidencia de la antracnosis. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre los tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

7.8. Determinación del efecto de *D. hansenii* sobre la protección de papaya var. Maradol en condiciones de comercialización local

Los frutos inoculados con *D. hansenii* no presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el grado de madurez (Fig. 19) pero sí en la incidencia de hongos presentes sobre la papaya var. Maradol (Fig. 20). El tratamiento con la levadura y el fungicida comercial presentaron valores similares en la madurez de los frutos. Sin embargo, el tratamiento con *D. hansenii* fue más efectivo en la reducción de la incidencia de hongos sobre los frutos en comparación con el tratamiento con el fungicida comercial, como se puede apreciar en la Fig. 21 (ANEXO).

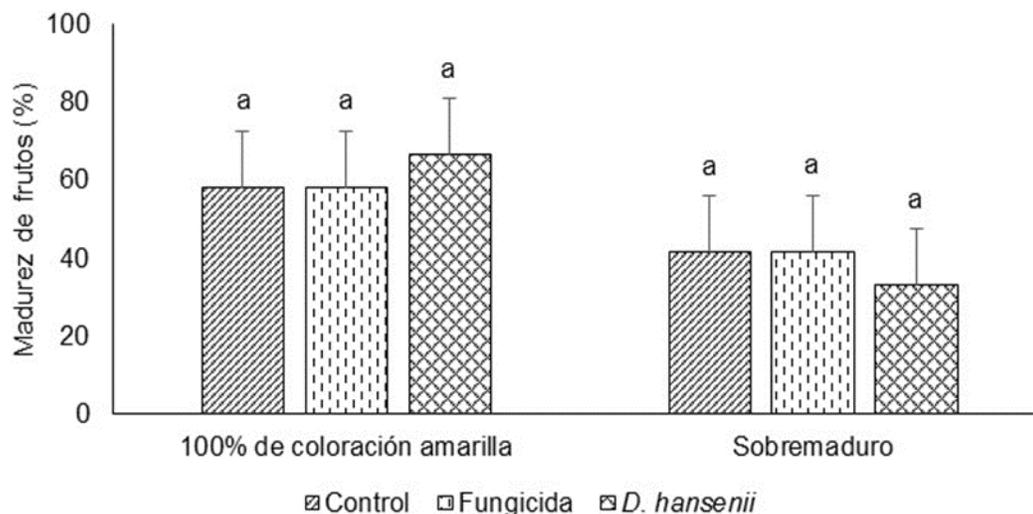


Figura 19. Grado de madurez de frutos de papaya cv. Maradol inoculados con *D. hansenii*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre los tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

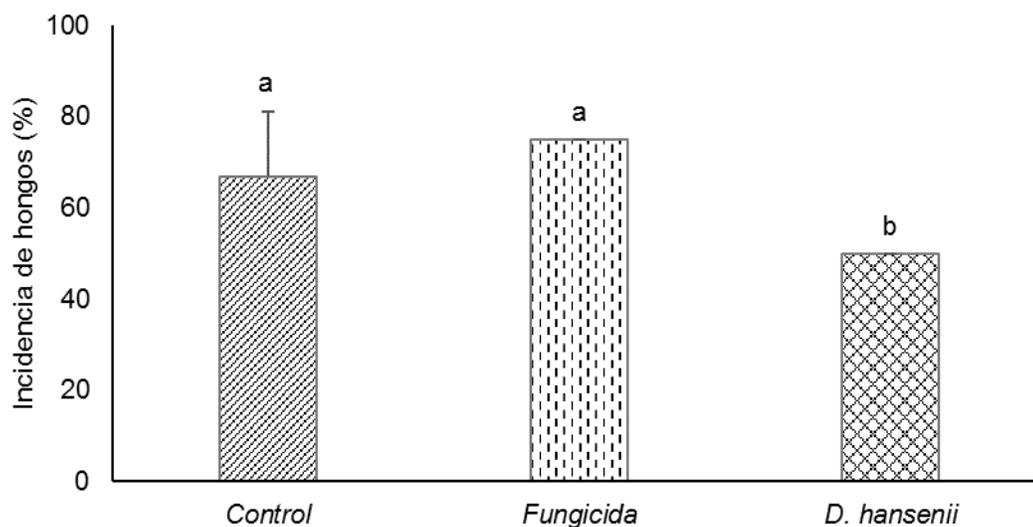


Figura 20. Incidencia de hongos en frutos de papaya var. Maradol con madurez comercial inoculados con *D. hansenii*. Las barras verticales representan la desviación estándar. Las letras sobre las columnas representan la diferencia estadística entre los tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1. Dinámica poblacional de *D. hansenii* en medio de cultivo elaborado a base de papaya

La dinámica de crecimiento de *D. hansenii* en medio de cultivo de papaya concuerda con lo descrito por Maragatham *et al.* (2011) quien reporta que al diluir el medio de papaya, el crecimiento celular de levaduras disminuye, lo cual se relaciona con la cantidad de nutrimentos disponible en el medio de cultivo. El nitrógeno representa otro factor limitante en un medio rico en fuentes de carbono (Lutz *et al.*, 2013), esta limitante pudo influir en el medio de cultivo a base de papaya dando como resultado una concentración celular menor de *D. hansenii* comparado con el obtenido en el medio PDB. Algunas levaduras tienen la capacidad de crecer en medios de cultivo a base de frutos como lo reporta Spadaro *et al.* (2002) para medio de manzana, Maragatham *et al.* (2011) en medio de papaya y Hernández-Montiel *et al.* (2010) en medio de limón; estos últimos autores reportan que la fase logarítmica de crecimiento de *D. hansenii* inicia 8 h después de la inoculación, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en los tres medios de cultivo de este experimento. Esto demuestra la rápida adaptación y crecimiento de *D. hansenii* con diferentes sustratos.

8.2. Cuantificación *in vitro* de la competencia por carbohidratos entre *D. hansenii* y *C. gloeosporioides*

El porcentaje de germinación de conidios de *C. gloeosporioides* disminuye con la presencia de *D. hansenii*. La sacarosa es un disacárido presente en frutos de papaya. Durante la fase exponencial de crecimiento de un microorganismo este disacárido puede disminuir debido a la producción de invertasa, obteniendo glucosa y fructosa (Gascón *et al.*, 1968). La concentración de sacarosa es estadísticamente diferente para todos los tratamientos comparados con el control,

lo cual se debe a que *D. hansenii* y *C. gloeosporioides* tienen la capacidad de metabolizar exitosamente este disacárido, disminuyendo la disposición de este nutrimento (Bautista-Rosales *et al.*, 2014; Chanchaichaovivat *et al.*, 2007; Fleet, 2003). La concentración de glucosa es estadísticamente igual en todos los tratamientos; sin embargo, numéricamente hay una concentración menor de este monosacárido en el tratamiento sólo con *D. hansenii*. Esto puede deberse a la fragmentación de sacarosa en el medio de cultivo lo cual da como resultado un incremento en la concentración de glucosa (Mishra *et al.*, 2015). La concentración de fructosa en los tratamientos con microorganismos es estadísticamente diferente, lo cual sugiere que los microorganismos metabolizan con mayor eficiencia la fructosa que la glucosa. Hernández-Montiel *et al.* (2010) reportan que algunas cepas de *D. hansenii* presentan una velocidad de consumo mayor para la fructosa que para la glucosa en medio flavado (limón). Por otra parte, reportan que *P. italicum*, patógeno de frutos de limón mexicano, tiene una velocidad de consumo mayor de fructosa que de glucosa. La afinidad metabólica por la fructosa se debe a que la levadura y el fitopatógeno requieren menos gasto energético para metabolizar este monosacárido en comparación con la glucosa. Esto se relaciona con la facilidad de integración de cada uno de los azúcares al ciclo de glucólisis para la obtención de energía; para la formación de fructosa-6-fosfato a partir de glucosa, se requieren de dos enzimas intermediarias. Para obtener la misma molécula a partir de fructosa solo se requiere fosforilar este monosacárido a través de una fosfo-fructocinasa (Mathews, 2002). La concentración de carbohidratos totales es estadísticamente diferente en los tratamientos donde está presente *D. hansenii*, lo cual indica un aprovechamiento mayor de éstos por parte de la levadura durante la fase exponencial de su crecimiento. El método de análisis de carbohidratos solo evalúa los solubles en el medio y cada carbohidrato influye de diferente manera en las lecturas de absorbancia, por tanto, diferencias numéricas de estos azúcares impactan en los resultados y en el análisis estadístico (Roe *et al.*, 1961). De forma integral, los resultados indican que existe una competencia por carbohidratos entre microorganismos en el medio de papaya

y *D. hansenii* consume una cantidad mayor de éstos durante la fase exponencial de su crecimiento, lo cual disminuye el porcentaje de germinación de conidios en esta etapa. Debido que la levadura *D. hansenii* es epífita de papaya y *C. gloeosporioides* un patógeno de este fruto, sus características fenotípicas están adaptadas para obtener el beneficio nutrimental mayor de este fruto (Parafati *et al.*, 2015). Chanchaichaovivat *et al.* (2008b) reporta que la competencia por nutrientes y la secreción de enzimas hidrolíticas de pared celular por *P. guilliermondi* contra *C. capsici*, explican parcialmente la forma de control de éste patógeno en Chile. En los resultados obtenidos por este autor, se observa que la fructosa parece ser indispensable para que la levadura afecte al desarrollo de la germinación de esporas, lo cual puede estar relacionado con lo obtenido en este ensayo.

8.3. Determinación de la producción de enzimas hidrolíticas por *D. hansenii*

Las levaduras *D. hansenii* presentaron producción de enzimas: β -1,3 glucanasa, quitobiosidasa (exoquitinasa) y proteasa, lo cual concuerda con lo reportado por Hernández-Montiel *et al.* (2010) para la cepa L1; además, estos autores reportan que existe diferencia en la producción de estas enzimas para diferentes cepas de *D. hansenii*. A diferencia de levaduras como *P. membranefaciens* y *C. albidus*, *D. hansenii* no produce endoquitinasas (Bautista-Rosales *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2005). La producción de enzimas β -1,3 glucanasa y quitinasas, dependen de la fuente de carbono que se suministre al cultivo de levadura, cuando se suministra pared celular del hongo patógeno, se induce una producción mayor de ambas enzimas (Castoria *et al.*, 2001). La pared celular de las levaduras también está constituida por quitina, glucano y manoproteína y la fuente de carbono que se suministra en un cultivo afecta la composición de su pared celular. La incorporación de β (1,3) y β (1,6)-glucanos tiene una función importante en el ensamblaje de la pared celular y le confieren resistencia a las levaduras contra lisis (Uscanga *et al.*, 2005) lo cual puede relacionarse con el hecho que existe una

producción mayor de β -1,3 glucanasa que el resto de las enzimas hidrolíticas en el cultivo con pared celular de *C. gloeosporioides*. La degradación de quitina y glucano del hongo inducen resistencia en el fruto contra hongos (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008b) por lo que es necesario investigar la producción y actividad de estas enzimas hidrolíticas *in vivo*.

8.4. Evaluación del efecto de CVOs producidos por *D. hansenii* hacia la inhibición de *C. gloeosporioides*

Las concentraciones 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii* presentan estadísticamente un efecto de inhibición mayor de crecimiento del hongo por medio de la producción de compuestos volátiles. En comparación a lo reportado por Parafati *et al.* (2015) las levaduras *S. cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Aureobasidium pullulans* ejercen un efecto de inhibición mayor sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* por medio de la producción de CVOs. Lutz *et al.* (2013) reportan que no todas las levaduras tienen el mismo efecto sobre la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos ni la misma capacidad de producir COVs como mecanismo antagónico. Spadaro *et al.* (2016) reportan que algunos de los compuestos volátiles producidos por levaduras con actividad antifúngica son 2-feniletanol, etanol y acetato de etilo. Gori *et al.* (2011) mencionan que *D. hansenii* es capaz de producir 2-feniletanol y la concentración de este metabolito se relaciona con la concentración celular en el medio. Estadísticamente se observó un efecto de inhibición mayor del crecimiento de *C. gloeosporioides* en los tratamientos en medio de cultivo PDA, lo cual sugiere que la composición y disposición de nutrimentos es un factor importante para que *D. hansenii* produzca compuestos volátiles. Cano-García *et al.* (2014) concluyen que parámetros como la temperatura y la composición del sustrato, tienen una función importante en el desarrollo del aroma producido por *D. hansenii* en embutidos crudos curados.

8.5. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la concentración celular de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas y adhesión al patógeno

8.5.1. Evaluación *in vitro* del efecto de tres concentraciones celulares de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas

La levadura *S. cerevisiae* no tiene la capacidad de adherirse a la superficie de las placas de polietileno (Parafati *et al.*, 2015) es por eso que las diferentes concentraciones de esta levadura no mostraron diferencia estadística en la densidad óptica (D.O.) y poseen valores bajos. Únicamente la concentración de 10^8 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii* mostró diferencia estadística en la D.O. en comparación con las concentraciones celulares menores, y es mayor a la generada por *S. cerevisiae*. Esto coincide con lo reportado por Jin *et al.* (2003) quienes concluyen que la concentración óptima para la formación de biopelículas por levaduras es de 10^7 cel·mL⁻¹. Por otra parte, Lutz *et al.* (2013) reportan que algunas levaduras tienen la capacidad de formar biopelículas a concentraciones de 10^6 cel·mL⁻¹. Chi *et al.* (2015) señalan que la capacidad de *D. hansenii* para formar biopelículas se debe a cambios en la morfología de las células; este cambio morfológico se asocia a la expresión de la glucoproteína *Flo11p*, la proteína de señalización *Wsc1p*, la fosfolipasa C y la proteína glicosilfosfatidil inositol RBR1 y “quórum sensing” mediado por acoholes. La formación de biopelículas por levaduras está ligada además a factores de estrés como la temperatura (Gori *et al.*, 2011), por lo tanto, el desarrollo de biopelículas en el experimento se relaciona con las condiciones de incubación de la levadura.

8.5.2. Evaluación *in vitro* del efecto de tres concentraciones celulares de *D. hansenii* sobre la adhesión al patógeno

En los tratamientos de *D. hansenii* con 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ se observó que las levaduras se adhieren a micelio y conidios del hongo. En ambos tratamientos se

observan cambios morfológicos en las levaduras y uniones por filamentos entre estas, los cuales pueden estar constituidos por proteínas como la glicosilfosfatidil inositol que participan en la adhesión entre células de levaduras (Gori *et al.*, 2011). La adhesión del antagonista al hongo a una concentración 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ indica que la adhesión es un mecanismo que se presenta a estas concentraciones celulares. La unión de los antagonistas a las hifas del patógeno aumenta la competencia de nutrientes, así como interferir con la capacidad de los patógenos para iniciar e incrementar la lesión en el fruto (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008b). No se observaron afecciones al micelio y conidios del patógeno en ninguno de los tratamientos con levaduras, por lo cual se descarta la participación de producción de enzimas hidrolíticas. Spadaro *et al.* (2002) observaron que la adhesión de levaduras a esporas e hifas de *B. cinérea* sin presenciarse ataques a estas estructuras, lo que sugiere una interacción directa entre el antagonista y el patógeno. La falta de capacidad de *S. cerevisiae* para adherirse al fitopatógeno coincide con lo descrito por Parafati *et al.* (2015). Al emplear una concentración de levadura de 10^8 cel·mL⁻¹ se observó la formación de un tipo de biopelícula, la cual a diferencia de las características típicas de las biopelículas no presenta el embebimiento de las levaduras en una matriz extracelular (Pu *et al.*, 2014). La formación de la biopelícula por *D. hansenii* a una concentración de 10^8 cel·mL⁻¹ concierne con lo descrito por Jin *et al.* (2003). A pesar que el tratamiento con 10^6 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii* muestra adhesión entre levaduras, no hay una unión extensa que dé lugar a la formación de una biopelícula como reporta Lutz *et al.* (2013) para esta concentración. Existe evidencia que la capacidad de formación de biopelículas por *D. hansenii in vitro*, se debe a cambios morfológicos que permiten un ensamblaje entre células como se menciona en el objetivo anterior.

8.5.3. Evaluación *in vivo* del efecto de tres concentraciones celulares de *D. hansenii* sobre la formación de biopelículas y adhesión al fitopatógeno

Las micrografías electrónicas muestran la evolución de la formación de una biopelícula por levaduras, basado en la concentración celular empleada sobre frutos de papaya. Primeramente, al emplear una concentración de levadura a 10^4 cel·mL⁻¹ se forman microcolonias; seguidamente al aumentar la concentración a 10^6 cel·mL⁻¹ de levadura se observan filamentos entre las levaduras de la microcolonia, las cuales las mantiene unidas y finalmente al emplear una concentración de 10^8 cel·mL⁻¹ se produce la formación de una biopelícula homogénea, en la cual las levaduras se encuentran embebidas en una matriz hidratada. El emplear una concentración de levadura de 10^6 cel·mL⁻¹ solo se delimita la zona de infección del hongo, pero internamente éste sigue creciendo. Por otra parte, el emplear una concentración de levadura de 10^8 cel·mL⁻¹ evita la infección del fitopatógeno debido a la formación de la biopelícula. Para la formación de biopelículas por parte de *D. hansenii* es necesario emplear una alta concentración celular en los frutos. Pu *et al.* (2014) demostraron que *Kloeckera apiculata* es capaz de producir biopelículas sobre frutos cítricos cuando se emplea a una concentración 10^8 cel·mL⁻¹, dando lugar a una matriz extracelular, lo cual corresponde con los resultados obtenidos; sin embargo, la matriz de la biopelícula únicamente se forma en la interacción fruto-levadura y cuando se agrega un patógeno ésta deja de formarse y las levaduras se unen al micelio del patógeno. Estos autores también reportan que al aplicar 2-feniletanol sobre *K. apiculata* en medio PDA ésta forma filamentos y conglomerados de levadura; sin embargo, esto no sucede *in vivo*. Para la formación de la biopelícula es necesario un cambio en morfología de las células de levadura, lo cual involucra cambios como modificaciones en actina y citoesqueloto microtubular (Sipiczki *et al.*, 1998). Este cambio puede ser inducido por factores ambientales como temperaturas poco óptimas, poca disponibilidad de oxígeno, alta osmolaridad, pH o limitación de sustrato incluyendo la falta de nitrógeno. La falta de este último factor podría

presentarse en la herida del fruto debido a la alta concentración del antagonista (Lutz *et al.*, 2013) dando lugar a la formación de la biopelícula. Chanchaichaovivat *et al.* (2007) concluyen que la actividad antagónica de las levaduras contra hongos fitopatógenos depende de la edad del cultivo y la concentración inicial de antagonista, lo cual tiene relación con la formación de la biopelícula como se ha descrito anteriormente. Por otra parte, el tejido herido de los frutos responde a diversos elicitores de levaduras, principalmente a componentes de pared celular, activando mecanismos de defensa que regulan la densidad poblacional de la levadura a través de cambios de pH, producción de compuestos oxidativos e inducción de cambios morfológicos en la levadura (Liu *et al.*, 2013), lo cual da lugar a la formación de biopelículas, conformadas con la matriz extracelular, haciendo indispensable la interacción levadura-fruto para esto. Gori *et al.* (2011) reportan que *D. hansenii* es capaz de producir los alcoholes aromáticos 2-feniletanol y tirosol, y en cultivos con alta densidad celular incrementa la concentración de estos alcoholes, los cuales son moléculas mediadoras de quorum sensing coordinando la adhesión de *D. hansenii* a superficies y la formación de biopelículas. Si *D. hansenii* es capaz de producir 2-feniletanol durante la formación de la biopelícula, esta molécula tiene participación en el efecto de control sobre *C. gloeosporioides* ya que se ha demostrado que este alcohol afecta la germinación, crecimiento y expresión génica de hongos (Parafati *et al.*, 2015). En este ensayo tampoco se observan afecciones al micelio del hongo, lo cual sugiere que la producción de enzimas hidrolíticas no tiene una participación en el control de *C. gloeosporioides in vivo*. La actividad y producción de estas enzimas depende de factores como la temperatura y pH (Vaidya *et al.*, 2001) por lo tanto, es posible que en condiciones de almacenamiento comercial (bajas temperaturas) la actividad de estas enzimas se incremente y participe en el control de la enfermedad como lo reporta Lutz *et al.* (2013). Sin embargo, la producción de β -1,3 glucanasa por levaduras se reprime cuando en el medio la glucosa se encuentra como la principal fuente de carbono (Chanchaichaovivat *et al.* 2007), lo cual sucede en el antagonismo *in vivo*. Las biopelículas cumplen la

función de crear una barrera mecánica entre la herida y el patógeno; sin embargo, la inducción de resistencia del huésped es un mecanismo que influye en el control de la antracnosis.

8.6. Determinación *in vitro* e *in vivo* del efecto de *D. hansenii* sobre la inhibición de *C. gloeosporioides*

8.6.1. Experimento en medio líquido

El tratamiento con la concentración celular mayor es el único que mantuvo un efecto de inhibición sobre la germinación de conidios con un 97%. Esto coincide con lo reportado por Lutz *et al.* (2013) y Spadaro *et al.* (2002) quienes reportan que una concentración de levadura de 10^8 cel·mL⁻¹ presenta una inhibición completa de la germinación de conidios y una concentración menor a ésta no ejerce una inhibición significativa. Por otra parte, la concentración 10^8 cel·mL⁻¹ de *D. hansenii* empleada en el ensayo, supera el porcentaje de inhibición de conidios reportado por Hernández-Montiel *et al.* (2010a) para *P. italicum* en medio de limón a una concentración de 10^9 cel·mL⁻¹, con diferentes cepas de *D. hansenii* después de 48 h. Estos autores mencionan que la germinación de *Penicillium* spp. requiere de una fuente de carbono que actúe como inductor y como señal para iniciar el proceso de infección en un fruto y la ausencia de una fuente de carbono puede actuar como un factor que induce dormancia en algunas esporas; basado en esto, al incrementar la concentración celular de *D. hansenii* se produce un incremento en la competencia de nutrientes del medio, dando como resultado el agotamiento de estos y favoreciendo el estado de dormancia de los conidios de *C. gloeosporioides*. Otro mecanismo que puede estar involucrado en el fenómeno observado es la producción de COVs por parte de la levadura, como el 2-nonanona, el cual es producido por *Candida intermedia* y suprime la germinación de conidios y el crecimiento de micelio de *Botrytis cinérea* (Spadaro y Droby,

2016). Ong y Ali (2015) reportan que el uso de ozono a una concentración de 1.5-5 $\mu\text{L L}^{-1}$ inhibe la germinación de conidios de *C. gloeosporioides* al 100%, lo cual es similar a lo obtenido en el ensayo realizado y demuestra la eficiencia de la levadura.

8.6.2. Experimento *in vivo*

Al incrementar la concentración de *D. hansenii* en los frutos, se redujo la incidencia y el diámetro de lesión causado por antracnosis, siendo nulas estas variables al emplear una concentración de 10^8 cel·mL⁻¹ de antagonista. Estos resultados coinciden con lo descrito por Chanchaichaovivat *et al.* (2007) y de Capdeville *et al.* (2007) quienes demostraron que emplear concentraciones de levadura superiores a 10^6 cel·mL⁻¹ incrementa el efecto de control sobre el diámetro de lesión de antracnosis, ocasionada por *C. capsici* y *C. gloeosporioides*, en chile y papaya respectivamente. En relación a la variable de la incidencia de la enfermedad, sólo los tratamientos con 10^6 y 10^8 cel·mL⁻¹ mostraron un efecto de reducción sobre esta variable, lo cual concierne con lo reportado por Wang *et al.* (2010b) quienes emplearon la levadura *Rhodosporidium paludigenum* en un rango de 10^6 cel·mL⁻¹ a 10^9 cel·mL⁻¹ reduciendo significativamente la incidencia de moho gris en tomate cherry. Estos autores atribuyen que el efecto de protección sobre tomate se debe a la competencia por espacio y nutrientes por parte de la levadura, así como por su capacidad de crecer rápidamente sobre las heridas del fruto, mostrando una adaptación al microambiente de la herida. El efecto de inhibición al emplear una concentración de 10^8 cel·mL⁻¹ de antagonista se relaciona directamente con los resultados obtenidos de competencia por espacio y nutrientes, así como con la formación de biopelículas.

8.7. Evaluación de diferentes tiempos de inoculación de *D. hansenii* sobre el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya var. Maradol

Una de las características más importantes de un microorganismo antagonista en poscosecha, es que controle una enfermedad antes de darse la infección en el agro-producto así como el de controlar una enfermedad una vez establecida. En este estudio, los frutos tratados con *D. hansenii*, independiente del tiempo de aplicación del antagonista, no presentaron incidencia ni diámetro de lesión en comparación con los frutos tratados solo con el fitopatógeno y fungicida. Autores como Zhao *et al.* (2008) y Lu *et al.* (2013) realizaron estudios evaluando el efecto del momento de inoculación de las levaduras *P. guilliermondii* y *R. paludigenum*, sobre el control de enfermedades en tomate y cítricos, respectivamente. Estos autores concluyen que aplicar al antagonista antes que el fitopatógeno tiene como consecuencia una tasa de infección menor, contrario a tratamientos en los que se invierten los papeles y de la misma manera el tiempo de inoculación tiene influencia sobre el desarrollo de la lesión, obteniéndose un control mayor de las enfermedades cuando se aplica 24 h antes al antagonista. Los estudios realizados por de Capdeville *et al.* (2007) con levaduras epifitas de papaya, Lima *et al.* (2013) con *W. anomalous* y *Meyerozyma guilliermondi* y Valenzuela *et al.* (2015) con cepas de *Trichoderma*, reportan que la aplicación de estos microorganismos previamente a la infección con *C. gloeosporioides* ejerce un control mayor sobre la antracnosis en frutos de papaya; además, la aplicación de los mismos posterior a la infección con *C. gloeosporioides* muestra un efecto de inhibición de la enfermedad en comparación con el control, lo cual corresponde con los resultados obtenidos. En éste trabajo, el control de antracnosis en frutos de papaya fue superior a lo reportado con microorganismos antagonistas y métodos físicos como ozono (Ong y Ali, 2015), radicación gamma y UV-C (Cia *et al.*, 2007) demostrando que la levadura *D. hansenii* es capaz de evitar la infección de *C. gloeosporioides* al 100%, cuando se aplica a una concentración de 10^8 cel mL⁻¹ por inmersión, e

incluso una vez establecido el hongo en el fruto, además de presentar una eficiencia mayor al del fungicida comercial.

8.8. Determinación del efecto de *D. hansenii* sobre la protección de papaya var. Maradol bajo condiciones de comercialización local

El tratamiento con la levadura *D. hansenii* no mostró un efecto adverso sobre la maduración de frutos de papaya cv. Maradol. Numéricamente el tratamiento con levadura presentó menos frutos sobremaduros, esto es deseable debido a que permite su preservación por más tiempo lo cual es un factor que influye en su comercialización. El efecto de protección de *D. hansenii* sobre frutos de papaya es mayor que el tratamiento de agua y de fungicida. En el control con agua se presenta un 33.33% de protección, lo cual coincide con lo descrito por Rashid *et al.* (2015) quienes reportan que para frutos sin tratar (solo lavados), únicamente el 30% no presenta incidencia de enfermedades. Estos resultados indican que la levadura *D. hansenii* puede emplearse en poscosecha para el control de enfermedades de papaya reduciendo las pérdidas y evitando la aplicación de fungicidas. Es posible que aplicando al antagonista sobre frutos con menor madurez, se obtenga un resultado mejor en el control de hongos y permita de esta manera extender su vida de anaquel.

9. CONCLUSIONES

La cepa ECP4 de la levadura *D. hansenii* se puede cultivar en medio elaborado a base de frutos de papaya var. Maradol. La cepa ECP4 expresa mecanismos antagónicos de competencia por carbohidratos, producción de enzimas hidrolíticas, producción de compuestos orgánicos volátiles, adhesión al patógeno y formación de biopelículas, y concentración y tiempo de inoculación contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Por lo tanto, a excepción del mecanismo de producción de enzimas hidrolíticas, se acepta la hipótesis planteada. Basado en los resultados, los principales mecanismos antagónicos de *D. hansenii* involucrados en la protección de frutos de papaya son la competencia por espacio y carbohidratos, así como la formación de biopelículas.

La concentración celular del antagonista tiene una función importante en el control de antracnosis. Al emplear una concentración alta de la levadura, se incrementaron los efectos de cada mecanismo sobre el fitopatógeno. Se observó que la formación de biopelículas solo tiene lugar al utilizar una concentración de 10^8 cel·mL⁻¹, lo cual determinó el control efectivo de la antracnosis ocasionada por *C. gloeosporioides*. El ensayo de los tiempos de inoculación de la levadura sobre los frutos mostró un control del 100% sobre la incidencia y diámetro de lesión de la antracnosis.

Los resultados del experimento bajo las condiciones de comercialización poscosecha llevadas a cabo por los productores del Estado de Veracruz, concluyeron que *D. hansenii* fue más eficiente en la protección de los frutos de papaya var. Maradol en comparación con el fungicida comercial. Lo anterior permite ofrecer a esta levadura como una alternativa para el manejo de la antracnosis en papaya disminuyendo los costos de producción al limitar la aplicación de fungicidas químicos.

10. LITERATURA CITADA

Admasu, W., S. Sahile, M. Kibret. 2014. Assessment of potential antagonists for anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease of mango (*Mangifera indica* L.) in North Western Ethiopia (Pawe). Archives of Phytopathology and Plant Protection. 47(18): 2176-2186.

Alkan, N., G. Friedlander, D. Ment, D. Prusky, R. Fluhr. 2015. Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. New Phytol. 205(2): 801-815.

Banjara, N. 2014. *Debaryomyces hansenii*: a foodborne yeast that produces anti-Candida killer toxin. MS Thesis. University of Nebraska-Lincoln.

Barham, D., P. Trinder. 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. Analyst. 97(1151): 142-145.

Barna, B., J. Fodor, B.D. Harrach, M. Pogány, Z. Király. 2012. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. Plant Physiol. Biochem. 59: 37-43.

Bautista-Baños, S. (Ed.). (2014). Postharvest Decay: Control Strategies. Editorial Elsevier. Primera edición. Estados Unidos de América, 394p.

Bautista-Rosales, P.U., M. Calderon-Santoyo, R. Servín-Villegas, N.A. Ochoa-Álvarez, J.A. Ragazzo-Sánchez. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. Biol. Control. 65(3): 293-301.

Bautista-Rosales, P.U., M. Calderon-Santoyo, R. Servín-Villegas, N.A. Ochoa-Álvarez, R. Vázquez-Juárez, J.A. Ragazzo-Sánchez. 2014. Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango. Crop Prot. 65: 194-201.

- Bi, Q., Z. Ma. 2016. Sensitivity, resistance stability, and cross-resistance of *Plasmopara viticola* to four different fungicides. *Crop Prot.* 89: 265-272.
- Binyamini, N., M. Schiffmann-Nadel. 1972. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology.* 62(6): 592-594.
- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J.C. Frisvad, M.L. Gerds, W.P. Hammes, ... I.B. Powell. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154(3): 87-97.
- Bozzola, J.J., L.D. Russell. 1999. *Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists*, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
- Breuer, U., H. Harms. 2006. *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast.* 23(6): 415-437.
- Bruner, R.L. 1964. Determination of reducing value: 3, 5-Dinitrosalicylic acid method. *Methods Carbohydr. Chem.* 4: 67-71.
- Butinar, L., S. Santos, I. Spencer-Martins, A. Oren, N. Gunde-Cimerman. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol. Lett.* 244(2): 229-234.
- Cano-García, L., S. Rivera-Jiménez, C. Belloch, M. Flores. 2014. Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains. *Food Chem.* 151: 364-373.
- Cao, S., Z. Yang, Z. Hu, Y. Zheng. 2011. The effects of the combination of *Pichia membranefaciens* and BTH on controlling of blue mould decay caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. *Food Chem.* 124(3): 991-996.
- Carrillo, U.C., E.C. Soriano, D.N. Ángel, J.G.G. Alonso. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20(1): 88-93.

Castoria, R., F. De Curtis, G. Lima, L. Caputo, S. Pacifico, V. De Cicco. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biol. Technol.* 22(1): 7-17.

Castoria, R., L. Caputo, F. De Curtis, V. De Cicco. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. *Phytopathology.* 93(5): 564-572.

Chan, Z., S. Tian. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biol. Technol.* 36(2): 215-223.

Chanchaichaovivat, A., P. Ruenwongsa, B. Panijpan. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biol. Control.* 42(3): 326-335.

Chanchaichaovivat, A., B. Panijpan, P. Ruenwongsa. 2008. Yeast biocontrol of a fungal plant disease: a model for studying organism interrelationships. *J. Biol. Educ.* 43(1): 36-40.

Chanchaichaovivat, A., B. Panijpan, P. Ruenwongsa. 2008b. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biol. Control.* 47(2): 207-215.

Chi, M., G. Li, Y. Liu, G. Liu, M. Li, X. Zhang, J. Liu. 2015. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biol. Control.* 90: 113-119.

Cia, P., S.F. Pascholati, E.A. Benato, E.C. Camili, C.A. Santos. 2007. Effects of gamma and UV-C irradiation on the postharvest control of papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.* 43(3): 366-373.

Coates, L.M., I.F. Muirhead, J.A.G. Irwin, D.H. Gowanlock. 1993. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. *Mycol. Res.* 97(11): 1363-1370.

Dean, R., J.A. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, ... G.D. Foster. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13(4): 414-430.

de Capdeville, G., M.T. Souza, J.R.P. Santos, S. de Paula Miranda, A.R. Caetano, F.A.G. Torres. 2007. Selection and testing of epiphytic yeasts to control anthracnose in post-harvest of papaya fruit. *Sci. Hort.* 111(2): 179-185.

Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarasin, C. Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biol. Technol.* 52(2): 137-145.

Droby, S., M. Wisniewski, N. Benkeblia, E.M. Yahia. 2011. Postharvest pathology of tropical and subtropical fruit and strategies for decay control. *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: Volume 1: Fundamental issues.* 194-223.

Eckert, J.W., J.M. Ogawa. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23(1): 421-454.

El Ghaouth, A., C. Wilson, M. Wisniewski. 2004. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruit and vegetables. En: Naqvi, S.A.M.H. (ed.). *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II.* Editorial Kluwer Academic Publishers. Paises Bajos. pp 511-535.

Eloy, Y.R., I.M. Vasconcelos, A.L. Barreto, F.R. Freire-Filho, J.T. Oliveira. 2015. H₂O₂ plays an important role in the lifestyle of *Colletotrichum gloeosporioides* during interaction with cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Fungal Biol.* 119(8): 747-757.

Eshel, D., R. Regev, J. Orenstein, S. Droby, S. Gan-Mor. 2009. Combining physical, chemical and biological methods for synergistic control of postharvest diseases: A case study of Black Root Rot of carrot. *Postharvest Biol. Technol.* 54(1): 48-52.

Fairchild, K.L., T.D. Miles, P.S. Wharton. 2013. Assessing fungicide resistance in populations of *Alternaria* in Idaho potato fields. *Crop Prot.* 49: 31-39.

FAO, 2015 (<http://faostat3.fao.org>). Acceso: Junio 25 de 2016.

Fleet, G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86(1): 11-22.

García-Tejedor, A., L. Sánchez-Rivera, I. Recio, J.B. Salom, P. Manzanares. 2015. Dairy *Debaryomyces hansenii* strains produce the antihypertensive casein-derived peptides LHLPLP and HLPLP. *LWT-Food Sci. Technol.* 61(2): 550-556.

Gascón, S., N.P. Neumann, J.O. Lampen. 1968. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J. Biol. Chem.* 243(7): 1573-1577.

Gori, K., P.B. Knudsen, K.F. Nielsen, N. Arneborg, L. Jespersen. 2011. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 11(8): 643-652.

Gunde-Cimerman, N., S. Sonjak, P. Zalar, J.C. Frisvad, B. Diderichsen, A. Plemenitaš. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C.* 28(28): 1273-1278.

Hernández-Montiel, L.G., C.P. Larralde-Corona, S. Vero, M.G. López-Aburto, J.L. Ochoa, F. Ascencio-Valle. 2010. Characterization of yeast *Debaryomyces hansenii* for the biological control of blue mold decay of Mexican lemon. *CyTA-Journal of Food.* 8(1): 49-56.

Hernández-Montiel, L.G., J.L. Ochoa, E. Troyo-Diéguez, C.P. Larralde-Corona 2010b. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. Postharvest Biol. Technol. 56(2): 181-187.

Holmström-Ruddick, B., K. Mortensen. 1995. Factors affecting pathogenicity of a benomyl-resistant strain of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. malvae. Mycol. Res. 99(9): 1108-1112.

Jamalizadeh, M., H.R. Etebarian, H. Aminian, A. Alizadeh. 2011. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. EPPO Bulletin. 41(1): 65-71.

Janisiewicz, W.J., L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Ann. Rev. Phytopathol. 40(1): 411-441.

Jin, Y.Y.H.K., H.K. Yip, Y.H. Samaranayake, J.Y. Yau, L.P. Samaranayake. 2003. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. J. Clin. Microbiol. 41(7): 2961-2967.

Kefialew, Y., A. Ayalew. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). Postharvest Biol. Technol. 50(1): 8-11.

Kalia, A., V.R. Parshad. 2015. Novel trends to revolutionize preservation and packaging of fruits/fruit products: Microbiological and nanotechnological perspectives. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 55(2): 159-182.

Kano, R., H. Sobukawa, S.Y. Murayama, D. Hirose, Y. Tanaka, Y. Kosuge, ... H. Kamata. 2016. *In vitro* resistance of *Aspergillus fumigatus* to azole farm fungicide. J. Infect. Chem. 22(3): 133-136.

Lima, J.R., D.M.F. Gondim, J.T.A. Oliveira, F.S.A. Oliveira, L.R.B. Gonçalves, F.M.P. Viana. 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.* 83: 58-64.

Liu, J., Y. Sui, M. Wisniewski, S. Droby, Y. Liu. 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 167(2): 153-160.

Liu, P., Y. Cheng, M. Yang, Y. Liu, K. Chen, C.A. Long, X. Deng. 2014. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiol.* 14(1): 1.

Lopez-Reyes, J.G., D. Spadaro, M.L. Gullino, A. Garibaldi. 2010. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. *Flavour Frag. J.* 25(3): 171-177.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.

Lu, L., H. Lu, C. Wu, W. Fang, C. Yu, C. Ye, X. Zheng. 2013. *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 85: 196-202.

Lu, L., C. Ye, S. Guo, K. Shenq, L. Shao, T. Zhou, X. Zhenq. 2013b. Preharvest application of antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum* induced resistance against postharvest diseases in mandarin orange. *Biol. Control.* 67(2): 130-136.

Luo, Y., Y. Zhou, K. Zeng. 2013. Effect of *Pichia membranaefaciens* on ROS metabolism and postharvest disease control in citrus fruit. *Crop Prot.* 53: 96-102.

Lutz, M.C., C.A. Lopes, M.C. Sosa, M.P. Sangorrín. 2012. A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Sci. Technol.* 22(12): 1465-1483.

Lutz, M.C., C.A. Lopes, M.E. Rodriguez, M.C. Sosa, M.P. Sangorrín. 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *Int. J. Food Microbiol.* 164(2): 166-172.

Macarisin, D., S. Droby, G. Bauchan, M. Wisniewski. 2010. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist–fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol?. *Postharvest Biol. Technol.* 58(3): 194-202.

Magallon-Andalon, C.G., G. Luna-Solano, J.A. Ragazzo-Sanchez, M. Calderon-Santovo. 2012. Parasitism and substrate competitions effect of antagonistic yeasts for biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya (*Carica papaya* L.) var Maradol. *Mexican Journal of Scientific Research.* 1(1): 2-9.

Maragatham, C., A. Panneerselvam. 2011. Production of single cell protein from yeast using papaya extract medium. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2: 14-18.

Marquina, D., A. Santos, J. Peinado. 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5(2): 65-71.

Mathews, C.K., K.E. Van Holde, K.G. Ahern. 2002. *Bioquímica*. Editorial Pearson Education. Tercera edición. Estados Unidos de América. 1335p.

Nantawanit, N., A. Chanchaichavivat, B. Panijpan, P. Ruenwongsa. 2010. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biol. Control.* 52(2): 145-152.

Nunes, C.A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.* 133(1): 181-196.

O'Connell, R.J., M.R. Thon, S. Hacquard, S.G. Amyotte, J. Kleemann, M.F. Torres, J. Altmüller. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44(9): 1060-1065.

Ong, M.K., C.F. Forney, P.G. Alderson, A. Ali. 2013. Postharvest profile of a Solo variety 'Frangi' during ripening at ambient temperature. *Sci. Hort.* 160: 12-19.

Ong, M.K., A. Ali, P.G. Alderson, C.F. Forney. 2014. Effect of different concentrations of ozone on physiological changes associated to gas exchange, fruit ripening, fruit surface quality and defence-related enzymes levels in papaya fruit during ambient storage. *Sci. Hort.* 179: 163-169.

Ong, M.K., A. Ali. 2015. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.* 100: 113-119.

Panebianco, A., I. Castello, G. Cirvilleri, G. Perrone, F. Epifani, M. Ferrara, A. Vitale. 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Prot.* 77: 65-73.

Papagora, C., T. Roukas, P. Kotzekidou. 2013. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food Bioprod. Process.* 91(4): 413-420.

Parafati, L., A. Vitale, C. Restuccia, G. Cirvilleri. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47: 85-92.

Paull, R.E., W. Nishijima, M. Reyes, C. Cavaletto. 1997. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biol. Technol.* 11(3): 165-179.

Philpott, C.C., O. Protchenko. 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* 7(1): 20-27.

Podila, G.K., L.M. Rogers, P.E. Kolattukudy. 1993. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.* 103(1): 267-272.

Prista, C., M.C. Loureiro-Dias, V. Montiel, R. García, J. Ramos. 2005. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Res. 5(8): 693-701.

Pu, L., F. Jingfan, C. Kai, L. Chao-an, C. Yunjiang. 2014. Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. FEMS Yeast Res. 14(4): 536-546.

Qing, F., T. Shiping. 2000. Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. Plant Dis. 84(11): 1212-1216.

Rashid, M.H.A., B.W.W. Grout, A. Continella, T.M.M. Mahmud 2015. Low-dose gamma irradiation following hot water immersion of papaya (*Carica papaya* linn.) fruits provides additional control of postharvest fungal infection to extend shelf life. Radiat. Phys. Chem. 110: 77-81.

Rivera Avalos, S., R.Á. Martínez-Peniche, L. Soto-Muñoz, M.D.S. Chávaro-Ortiz. 2012. Modos de acción de cuatro cepas de levaduras antagónicas contra *Penicillium expansum* Link en manzana. Revista Chapingo. Serie Hort. 18(2): 227-238.

Rodríguez-López, E.S., J.M. González-Prieto, N. Mayek-Pérez. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. Rev. Mex. Fitopatol. 27(1): 53-63.

Rodríguez-López, É.S., E. Cárdenas-Soriano, S. Hernández-Delgado, A. Gutiérrez-Diez, N. Mayek-Pérez. 2013. Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. infection of avocado fruits. Rev. Bras. Frutic. 35(3): 898-905.

Roe, J.H., J.M. Bailey, R.R. Gray, J.N. Robinson. 1961. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. J. Biol. Chem. 236(5): 1244-1246.

Rosa, M.M., S.M. Tauk-Tornisielo, P.E. Rampazzo, S.R. Ceccato-Antonini. 2010. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. World J. Microbiol. Biotechnol. 26(8): 1491-1502.

Saravanakumar, D., A. Ciavarella, D. Spadaro, A. Garibaldi, M.L. Gullino. 2008. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. Postharvest Biol. Technol. 49(1): 121-128.

Sharma, R.R., D. Singh, R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biol. Control. 50(3): 205-221.

SIAP, 2015.
(http://www.siap.gob.mx/?option=com_content&view=article&id=181&Itemid=426).
Acceso: Abril 15 de 2016.

Siddiqui, Y., A. Ali. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). En: Bautista-Baños, S. (ed.). Postharvest Decay: Control Strategies. Editorial Academic Publishers. Estados Unidos de America. pp 337-364.

Sipiczki, M., K. Takeo, A. Grallert. 1998. Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. Microbiology. 144(12): 3475-3485.

Spadaro, D., R. Vola, S. Piano, M.L. Gullino. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. Postharvest Biol. Technol. 24(2): 123-134.

Spadaro, D., M.L. Gullino. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. Int. J. Food Microbiol. 91(2): 185-194.

Spadaro, D., S. Droby. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Tech.* 47: 39-49.

Stephenson, S.A., J. Hatfield, A.G. Rusu, D.J. Maclean, J.M. Manners. 2000. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Mol. Plant Microbe Interac.* 13(9): 929-941.

Strano, L., A. Campisano, A. Renda, S. Di Silvestro, G. Ruberto. 2003. Elicitation of coumarins in lemon fruits after yeast inoculation. *J. Plant Pathol.* 85(4): 298.

Sundh, I., P. Melin. 2011. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 99(1): 113-119.

Talibi, I., H. Boubaker, E.H. Boudyach, A. Ait Ben Aoumar. 2014. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *J. Appl. Microbiol.* 117(1): 1-17.

Taylor, K.A. 1995. A colorimetric fructose assay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53(3): 215-227.

Teixidó, N., R. Torres, I. Viñas, M. Abadias, J. Usall. 2011. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. En: Lacroix, C. (ed). *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation.* Editorial Woodhead Publishing. Londres. pp 364-402.

Torres-Calzada, C., R. Tapia-Tussell, I. Higuera-Ciapara, D. Perez-Brito. 2013. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *Eur. J. Plant Pathol.* 135(1): 67-79.

Tripathi, P., N.K. Dubey. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 32(3): 235-245.

Udomkun, P., M. Nagle, B. Mahayothee, D. Nohr, A. Koza, J. Müller. 2015. Influence of air drying properties on non-enzymatic browning, major bio-active compounds and antioxidant capacity of osmotically pretreated papaya. *LWT-Food Sci. Technol.* 60(2): 914-922.

Uscanga, B.R.A., J.R.S. Pacheco, J. Francios. 2005. Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura "*Saccharomyces cerevisiae*". *e-Gnosis*. 3.

Vaidya, R.J., I.M. Shah, P.R. Vyas, H.S. Chhatpar. 2001. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17(7): 691-696.

Valenzuela, N.L., D.N. Angel, D.T. Ortiz, R.A. Rosas, C.F.O. García, M.O. Santos. 2015. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biol. Control.* 91: 88-93.

Vero, S., G. Garmendia, M.B. González, O. Bentancur, M. Wisniewski. 2013. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malusx domestica*). *FEMS Yeast Res.* 13(2): 189-199.

Vij, T., Y. Prashar. 2015. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 5(1): 1-6.

Wang, Y., Y. Bao, D. Shen, W. Feng, T. Yu, J. Zhang, X.D. Zheng. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *Int. J. Food Microbiol.* 123(3): 234-239.

Wang, Y., X. Ren, X. Song, T. Yu, H. Lu, P. Wang, X.D. Zheng. 2010. Control of postharvest decay on cherry tomatoes by marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* and calcium chloride. *J. Appl. Microbiol.* 109(2): 651-656.

Wang, Y., T. Yu, J. Xia, D. Yu, J. Wang, X. Zheng. 2010b. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Biol. Control.* 53(2): 178-182.

Wilson, C.L., M.E. Wisniewski. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27(1): 425-441.

Wilson, C.L., M.E. Wisniewski, S. Droby, E. Chalutz. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Sci. Hort.* 53(3): 183-189.

Wisniewski, M.E., C.L. Wilson. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience.* 27(2): 94-98.

You, C., C. Zhang, F. Kong, C. Feng, J. Wang. 2016. Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl–mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. *Ecol. Eng.* 91: 119-125.

Yu, C.H.E.N., W.X. Wang, A.F. Zhang, C.Y. Gu, M.G. Zhou, T.C. Gao. 2011. Activity of the fungicide JS399-19 against *Fusarium* head blight of wheat and the risk of resistance. *Agr. Sci. China.* 10(12): 1906-1913.

Zhang, H., X. Zheng, T. Yu. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control.* 18(4): 287-291.

Zhang, D., D. Spadaro, A. Garibaldi, M.L. Gullino. 2010. Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharvest Biol. Technol.* 55(3): 174-181.

Zhao, Y., K. Tu, X. Shao, W. Jing, Z. Su. 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 49(1): 113-120.

11. ANEXO



Figura 21. Protección de *D. hansenii* contra hongos en frutos de papaya var. Maradol inoculados con 60-70% de madurez. Donde; a) agua, b) fungicida y c) *D. hansenii*.