CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

MOHOS FITOPATÓGENOS DEL LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia* T.) PRODUCTORES DE MICOTOXINAS Y SU INHIBICIÓN CON LEVADURAS MARINAS

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

P r e s e n t a

TERESA DE JESÚS SANDOVAL CONTRERAS

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2017.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:30 horas del día 8 del Mes de Febrero del 2017, 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:

"Mohos fitopatógenos del limón persa (*Citrus latifolia* T.) productores de micotoxinas y su inhibición con levaduras marinas"

Presentada por el alumno:

Teresa de Jesús Sandoval Contreras

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

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. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis

Dra. Angélica Villarruel López
Co-Director de Tesis

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Tutor

Dra. Montserrat Calderón Santoyo
Co-Tutor

Dr. José Santos García Alvarado
Co-Tutor

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

Bajé al mercado

y traje
tomates diarios aguaceros
endivias y envidias
gambas grupas y amenes
harina monosílabos jerez
instantáneas estornudos arroz
alcachofas y gritos
rarísimos silencios

página en blanco
aquí te dejo todo
haz lo que quieras
espabílate
o por lo menos organízate

yo me echaré una siesta
ojalá me despiertes
con algo original
y sugestivo
para que yo lo firme

Mario Benedetti

Comité Tutorial

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.
Co-Director

Dra. Angélica Villarruel López
Universidad de Guadalajara
Co-Directora

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Tutor

Dra. Montserrat Calderón Santoyo
Instituto Tecnológico de Tepic
Tutor

Dr. José Santos García Alvarado
Universidad Autónoma de Nuevo León
Tutor

Comité Revisor de Tesis
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dra. Angélica Villarruel López
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Montserrat Calderón Santoyo
Dr. José Santos García Alvarado

Jurado de examen
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dra. Angélica Villarruel López
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Montserrat Calderón Santoyo
Dr. José Santos García Alvarado

Suplentes
Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Resumen

Los mohos además de causar deterioro y grandes pérdidas económicas en frutas y otros alimentos, pueden sintetizar micotoxinas que representan un riesgo para la salud humana y animal. El objetivo general fue caracterizar los mohos fitopatógenos de limón Persa (*Citrus latifolia* T.) con capacidad micotoxigénica en un medio complejo a base de pericarpio de limón y su inhibición con levaduras marinas. Para cumplir con los objetivos primero se determinó la capacidad micotoxigénica de mohos fitopatógenos para el limón Persa por medio de la búsqueda de secuencias que pertenecen a genes que participan en la biosíntesis de micotoxinas, por PCR convencional. De los mohos positivos a secuencias de genes micotoxigénicos se realizaron cultivos en un medio complejo a base de pericarpio de limón Persa -que se le se denominó Agar Limón (AL)- en diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación. Se determinó el grado de toxicidad de las micotoxinas producidas por los mohos utilizando bioensayo de toxicidad con *A. salina*. Por último se identificaron y cuantificaron las micotoxinas por HPLC-MS. Como segundo paso, se analizó la capacidad de síntesis de micotoxinas sobre limón Persa infectado artificialmente con las cepas *A. niger y A. carbonarius;* se analizaron las diferentes partes del limón y se determinó la difusión de las micotoxinas en el fruto. Finalmente, se determinaron las condiciones para el biocontrol de los mohos con la levadura marina *Debaryomyces hansenii*. En una primera etapa se modelizó el crecimiento de los diferentes mohos sobre agar limón y se determinó la velocidad de crecimiento teórico, así como el tiempo en que se hace visible la colonia. En la segunda etapa, se evaluó la capacidad inhibitoria tanto de la levadura, como de los sobrenadantes de su cultivo, esto último relacionado con la habilidad de las levaduras de producir proteínas killer contra los microorganismos sensibles, para lo cual se realizaron retos de inhibición de los mohos micotoxigénicos, *in vitro*, e *in vivo*. Se encontraron tres cepas positivas a genes participantes en la biosíntesis de micotoxinas: *A. alternata* positiva al gen PKS (síntesis de melanina, precursor de altertoxina), *A. carbonarius* positivo al gen PKS (enzima en la policondensacion de cetonas, ruta de la OTA) y *A. niger* positivo al gen *aflL* (antes *Ver*B) y *FUM*1 (síntesis de aflatoxinas y fumonisinas respectivamente). Se determinó que los mohos son capaces de sintetizar más de una micotoxina de interés alimentario en una amplia variedad de condiciones. La infección artificial de limón Persa con las cepas *A. niger y A. carbonarius*, confirmaron la utilización del limón Persa como sustrato para la síntesis de micotoxina y se determinó que éstas son capaces de atravesar los tejidos del fruto. Se determinó la velocidad de crecimiento y el tiempo en que aparece la colonia en cinco cepas de *A. niger*. Durante su validación en el fruto los valores predichos mostraron discrepancias. Finalmente se determinó que la levadura tiene capacidad para inhibir el crecimiento de los mohos micotoxigénicos *A. niger, A. carbonarius* y *A. alternata* por antagonismo además de presentar actividad killer.

Palabras clave: mohos fitopatógenos micotoxigénicos, riesgo alimentario, levaduras marinas, antagonismo.

Dr. Felipe De Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis

Dra. Angélica Villarruel López
Co-Director de Tesis

Summary

Filamentous fungi, apart from causing damage and great economic losses in fruit and other foods, can synthesize mycotoxins that represent a risk for the health of humans and animals who eat them. The general objective was to characterize the phytopathogenic molds of Persian lime (*Citrus latifolia* T.) with mycotoxigenic capabilities in a complex medium based of lime pericarp, and their inhibition with marine yeasts. To meet these objectives we first determined the mycotoxigenic capability of Persian lime phytopathogenic molds by using conventional PCR to find sequences that belong to genes participating in the biosynthesis of mycotoxins. The molds that tested positive for mycotoxigenic gene sequences were cultured in a Persian lime pericarp-based complex medium, under different conditions of pH, temperature and incubation time. The degree of toxicity of the produced mycotoxins was tested using a letaly assay with *A. salina.* Lastly, we identified and quantified the mycotoxins using HPLC-MS. As a second step, we analyzed the mycotoxin synthesis capability on Persian limes infected artificially with the *A. niger* and *A. carbonarius* strains; we analyzed the different parts of the lime and determined the diffusion of mycotoxins in the fruit. Finally, we determined the conditions for biological mold control with the *Debaryomyces hansenii* marine yeast. On the first stage, we determined the growth of the different molds on LA and their theoretical growth velocity, as well as the time before the colony becomes visible. On the second stage, we evaluated the inhibitory capability of the yeast as well as its culture's supernatants, the latter evaluation related with the ability of the yeasts to produce killer proteins against sensitive microorganisms, for which we performed *in vitro* and *in vivo* mycotoxigenic mold inhibition challenges. We found three strains that tested positive for genes participating in mycotoxin biosynthesis: the *PKS* gene in *A. alternata* (synthesis of melanin, a precursor of altertoxins), the PKS gene in *A. carbonarius* (an enzyme for polycondensation of ketones, part of the OTA path), and the *aflL* and *FUM1* genes in *A. niger* (synthesis of aflatoxins and fumonisins respectively). We determined that these molds are capable of synthesizing more than one mycotoxin of alimentary interest in a wide variety of conditions. Artificial infection of Persian limes with the *A. niger* and *A. carbonarius* strains confirmed the usage of Persian lime as a substrate for mycotoxin synthesis and their capability to traverse the tissues of the fruit. We determined the growth velocity and the time before colonies become visible in 5 strains of *A. niger*. During their validation in the fruit, the predicted values showed discrepancies. Finally, we determined that the yeast has the capability of inhibiting growth of the mycotoxigenic molds *A. niger, A. carbonarius and A. alternata* through antagonism, apart from presenting killer activity.

Keywords: Mycotoxigenic phytopathogenic molds, alimentary risk, marine yeasts, antagonism.

Dr. Felipe De Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis

Dra. Angélica Villarruel López
Co-Director de Tesis

Dedicatorias

A los motores de mi vida: Luis, Acoyani, Yolivani y Ameyali

A Juan Sandoval Urbieta† y Leonila Contreras Macías†

A mis amigos de la palapa

A mis amigos de Guadalajara

A Angie

A mi familia…

Agradecimientos.
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca número 282771 de estudios de posgrado (nivel doctorado) y por la beca mixta de movilidad internacional número 290936.
Al Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C. (CIBNOR), por las facilidades recibidas durante el proceso de investigación.
A la Universidad de Guadalajara (UDG), por las facilidades otorgadas durante el desarrollo de esta investigación.
A la Universitat de Lleida (UDL, Catalunya, España), por las facilidades recibidas durante la estancia de investigación.
Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ) por las facilidades otorgadas durante la estancia de investigación.
A mi comité tutorial: Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, Dra. Angélica Villarruel López, Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, Dra. Montserrat Calderón Santoyo, Dr. José Santos García Alvarado.
A la Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril, por el soporte técnico en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana.
Al M.C. Pablo Monsalvo Spencer, por el soporte técnico en el Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos.
Al M.C. Julio Antonio Hernández González, por el soporte técnico en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas.
A Arturo Pedro Sierra Beltrán, por el soporte técnico en el Laboratorio de Proteómica y Genotoxicidad.
A Horacio Sandoval Gómez, por el soporte técnico en el Laboratorio de Cómputo.
Al personal de biblioteca: Susana Luna Garcia, Maria Esther Ojeda Castro, Elizabeth Guadalupe Sánchez Vazquez y Ana María Talamantes Cota por el apoyo incondicional con el material bibliográfico.
A la Dra. Ma. Del Refugio Torres Vitela, por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria Investigación (LMSI) de la Universidad de Guadalajara.
A la M. C. María de los Ángeles Olea y M. C. Laura Orozco por el apoyo técnico en el LMSI de la UDG.
A la Dra. Ma. Esther Macías Rodríguez (UdG) por su apoyo y asesoría en el área de Biología molecular.
Al Dr. Luis E. Garrido Sánchez, del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Occidente (ITESO), por su asesoría en el tema de Modelización.
A la Dra. Anne Gschaedler, por la asesoría durante la estancia de investigación en el CIATEJ.
A la Dra. Sonia Marín Sillué, por la asesoría durante la estancia de investigación en la UDL.
A la QFB. Dora Valle Reyes, QFB Vanessa Valle Reyes e Ing. Ixchel Tovarez Por el apoyo técnico durante el desarrollo del trabajo de laboratorio.

Índice

Resumen..... iii
Summary iv
Dedicatorias..... v
Agradecimientos..... vi
Contenido ix
Lista de figuras x
Lista de tablas xi
Abreviaturas..... x
1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES..... 3
2.1 Mohos fitopatógenos en cítricos 4
2.2 Presencia de mohos micotoxigénicos en cítricos 9
2.3 Control de mohos fitopatógenos y micotoxinas 10
2.4 Levaduras en el biocontrol postcosecha de cítricos 13
3. JUSTIFICACIÓN..... 15
4. HIPÓTESIS..... 16
5. OBJETIVO GENERAL 17
5.1 Objetivos específicos 17
6. MATERIAL Y MÉTODOS 18
6.1 Identificación de mohos potencialmente micotoxigénicos aislados de la filosfera de cítricos. 19
6.2 Capacidad de síntesis de micotoxinas de los mohos fitopatógenos con potencial micotoxigénico 20
6.3 Evaluación de las condiciones de pH y temperatura para la síntesis de micotoxinas. ... 25
6.4 Determinación de la bioacumulación de micotoxinas sobre el limón Persa 28
6.5 Control de mohos micotoxigénicos..... 29
7. RESULTADOS 36
7.1 Identificación de mohos potencialmente micotoxigénicos aislados de cítricos. 36
7.2 Capacidad de síntesis de micotoxinas de los mohos fitopatógenos con potencial micotoxigénico. 37
7.3 Evaluación de las condiciones de pH y temperatura para la síntesis de micotoxinas. ... 44
7.4 Determinación de la bioacumulación de micotoxinas sobre limón Persa 50
7.5 Control de mohos micotoxigénicos..... 51
7.5.1 Modelización del crecimiento fúngico 51
7.5.2 Inhibición de mohos micotoxigénicos con levaduras marinas. 57
7.5.3 Protección in vivo del limón Persa (Citrus latifolia T.) con levaduras marinas 61
8. DISCUSIÓN 62
9. CONCLUSIONES 83
10. PERSPECTIVAS..... 84
11. LITERATURA CITADA..... 85
12. ANEXOS..... 98

12.1 Artículo aceptado.
Sandoval – Contreras, T., S. Marín, A. Villarruel – López, A. Gschaedler, L. Garrido – Sánchez, F. Ascencio. 2017. Growth modeling of *Aspergillus niger* strains isolated from citrus fruit as temperature function on a synthetic medium from lime (*Citrus latifolia* T.) pericarp. J. Food Protec. F.I. 1.72.

12.2 Artículo sometido.
Sandoval - Contreras, T., A. Villarruel - López, R. Torres - Vitela, C. Garciglia - Mercado, G. Gómez - Anduro, E. Velázquez – Lizárraga, F. Ascencio. 2017. Mycotoxigenic potential of phytopathogenic moulds isolated from citrus fruits from different states of Mexico. Acta Universitaria. Padrón CONACyT.

12.3 Artículo sometido.
Sandoval - Contreras, T., A. Villarruel - López, A. Sierra - Beltrán, R. Torres – Vitela, F. Ascencio. 2017. Mycotoxigenicity of lime fruit (*Citrus latifolia* T) associated *Alternaria alternata*, *Aspergillus carbonarius*, and *Aspergillus niger* strains on brine shrimp (*Artemia salina*). Acta Universitaria. Padrón CONACyT.

12.4 Artículo sometido.
Sandoval - Contreras, T., A. Villarruel - López, A. Pedro Sierra - Beltrán, R. Torres – Vitela, F. Ascencio. Mycotoxin and antibiotic production by phytopathogenic moulds associated to citrus fruit in a complex media. 2017. Emirates J. Food Agric. F.I. 0.623.

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama general de metodología.....19
Figura 2. Albedo y flavedo de limón utilizados en la preparación del medio de cultivo. ...22
Figura 3. Identificación de secuencias de los genes *PKS-A*, *FUM1*, *aflL* y *PKS*. 36
Figura 4. Crecimiento de algunos mohos en diferentes medios de cultivo AL ensayados. 38
Figura 5. Mortalidad de nauplios de *A. salina* frente a extractos de cultivos estáticos de los 39
Figura 6 . Síntesis de micotoxinas medidos por HPLC-MS-MS, en caldo CL, a diferentes temperaturas y tiempos de incubación. 40
Figura 7. Representación gráfica de los componentes principales en las cinéticas de síntesis 41
Figura 8. Inhibición de nauplios de *A. salina* por la presencia de micotoxinas medido por microcalorimetría isotérmica. 44
Figura 9. Mortalidad de nauplios de *A. salina* frente a extractos de cultivos de mohos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura en agar limón. *p > 0.05.....45
Figura 10. Gráfico de Superficie de respuesta (SR) de la mortalidad de nauplios de *A. salina* frente a extractos clorofórmicos de cultivos 46
Figura 11. Síntesis de micotoxinas en medio AL a diferentes condiciones de pH y temperaturas, medidos por HPLC-MS.....48
Figura 12. Representación gráfica de la expresión relativa de *AflL* y *FUM1* en *A. niger*-24. 49
Figura 13. Esquema de las partes de un limón Persa, e infección con la cepa de *A. niger*. 50
Figura 14. Micotoxinas cuantificadas en las diferentes partes del limón Persa infectado 51
Figura 15. Gráficos del ajuste del crecimiento radial en función de la temperatura para cinco cepas de *A. niger* aislados de frutos cítricos al Modelo Cardinal con Inflexión (CMI). $R^2 > 87.1$.....53
Figura 16. Raíz cuadrada del inverso de tv ($\sqrt{1/t_v}$) contra temperatura indicando el tiempo en que el micelio se hace visible en *A .niger* aislada de frutos cítricos. 55
Figura 17. Efecto antagónico de la levadura *D. hansenii* sobre los mohos micotoxigénicos. 57
Figura 18. Posible actividad killer de la levadura sobre el crecimiento de los mohos. 59
Figura 19. Mortalidad de nauplios de *A. salina* causada por las micotoxinas presentes en los extractos de cultivos de mohos tratados con *D. hansenii* (Dhh03). * p < 0.05 60

Lista de tablas

Tabla I. Algunos mohos y micotoxinas encontradas en productos para consumo humano y animal.....3
Tabla II. Límites establecidos para micotoxinas en algunos productos alimentarios. 9
Tabla III. Estudios realizados para el control biológico de patógenos en postcosecha de cítricos.....13
Tabla IV. Secuencias específicas de genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas en los mohos estudiados. 20
Tabla V. Composición del limón.....21
Tabla VI. Secuencias (5'-3') de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR en *A. niger* para genes micotoxigénicos *aflL* y *FUM*1 que interviene en la síntesis de aflatoxina y fumonisina respectivamente.....27
Tabla VII. Tratamientos realizados en el limón Persa para determinar la protección *in vivo* con las levaduras marinas o con la toxina killer. 34
Tabla VIII. Contenido de micotoxinas en los extractos de cultivos en caldo limón (CL) de los mohos fitopatógenos de limón Persa (*Citrus latifolia* T.) para su uso en microcalorimetría Isotérmica.....43
Tabla IX. Niveles codificados codificados para los factores controlados en el análisis estadístico por superficie de respuesta (SR). 45
Tabla X. Valores cardinales estimados de temperatura (T) y velocidad (μ_{max}) en cinco cepas de *A. niger* aisladas de frutos cítricos, sobre agar limón (AL). El inóculo utilizado fue aproximadamente 50 esporas.....54
Tabla XI. Valores cardinales estimados para temperatura (T) y tiempo de aparición 55
Tabla XII. Velocidad radial de crecimiento y tiempo en que se hace visible la colonia (t_v) calculado en limón Persa. 56
Tabla XIII. Eficacia de la levadura *D. hansenii* en el control del crecimiento de diferentes mohos patógenos y micotoxigénicos aislados de cítricos, en medio YPD.....58
Tabla XIV. Metabolitos secundarios cuantificados en los extractos de cultivos seleccionados, utilizados en el ensayo de absorción de micotoxinas por la levadura *D. hansenii*.....60
Tabla XV. Inhibición de mohos micotoxigénicos con *D. hansenii* y con el sobrenadante de su cultivo, en limón Persa artificialmente infectado y almacenado en cámara húmeda a 25 °C 61

Abreviaturas

μ	Velocidad radial de crecimiento
AA	Agar albedo
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ADNc	Ácido desoxirribonucléico complementario
Af	Accuracy factor o factor de precisión
AL	Agar limón
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
a_w	Actividad de agua
Bf	Bias factor o factor de sesgo
cel	Células
CL	Caldo limón
CMI	Modelo Cardinal con Inflexión
h	Horas
HPLS-MS/MS	Cromatografía Líquida de Alta Precisión acoplada a Masas
HR	Humedad Relativa
LD_{50}	Dosis letal media
min	Minutos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKS	Policetona sintetiza
ROS	Especies reactivas al oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SR	Superficie de Respuesta
T_{max}	Temperatura cardinal máxima
T_{min}	Temperatura cardinal mínima
T_{opt}	Temperatura cardina óptima
t_v	Tiempo en que se hace visible la colonia
λ_{max}	Fase lag en las condiciones de máximo crecimiento

1. INTRODUCCIÓN

En el año 2014, México formaba parte de los cinco primeros países productores de limas y limones con más de 1 millón de toneladas en limón Persa, y una producción en aumento. Las perspectivas de crecimiento en la producción de cítricos en México, proyectadas para el 2010, siguieron la tendencia esperada hasta el 2014 (FAO, 2003). Se prevé estabilidad en su mercado, ya que estos frutos parecen capaces de permanecer en la preferencia de los consumidores. Para el 2016, la tendencia continuó a la alza y se espera siga en los siguientes años (FAO, 2017). El consumo de limón es principalmente fresco, no obstante, existe una importante industria asociada en la que diversos subproductos pueden ser utilizados en la alimentación humana y animal (Amorós, 2003; UACh-SE, 2009).

El limón se cultiva en zonas tropicales y estas regiones se ven sometidas a precipitaciones frecuentes, con una humedad relativa ambiental elevada y temperaturas de aproximadamente 30 °C. En conjunto éstas características estimulan la reproducción de plagas de insectos, así como el desarrollo de mohos y/o levaduras que comprometen la calidad y la inocuidad de los cítricos (FAO, 2014a). Los mohos u hongos filamentosos son los principales deterioradores de productos frescos causando grandes pérdidas económicas hasta un 50% de la producción (Gonzáles-Sánchez y Silva-Echeverría, 2003). El pH ácido del limón hace que sea susceptible al ataque de mohos como principal contaminante (Moss, 2007). Sin embargo, la proliferación de mohos deterioradores son también el resultado de una serie de medidas precautorias incluidas en un sistema de manejo postcosecha (Gonzáles-Sánchez y Silva-Echeverría, 2003). El deterioro comienza a partir de las heridas causadas durante la manipulación. La aparición de moho verde y azul son las podredumbres más frecuentes en cítricos, causadas por *Penicillium italicum* y *P. digitatum.* Sin embargo, existen otros géneros como *Alternaria* y *Aspergillus* capaces también de producir deterioro (Agrios, 2005; Pitt y Hocking, 2009).

Específicamente en las enfermedades postcosecha de frutas causadas por mohos, las infecciones pueden comenzar tan pronto como las esporas se depositan en el fruto y continuar hasta la cosecha. Dado que el clima influye en la epidemiología de la enfermedad en campo,

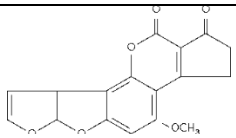
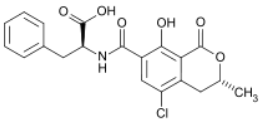
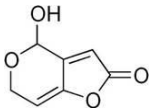
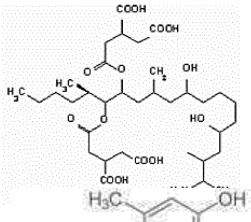
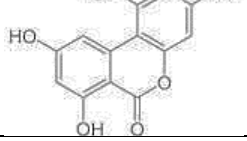
la incidencia de la enfermedad en postcosecha depende de tres factores: 1) la incidencia de infecciones latentes que inician en campo, 2) de la contaminación de esporas o fragmentos miceliales adquiridos durante la cosecha, y 3) del tratamiento efectivo en postcosecha y de las condiciones de almacenamiento y comercialización del fruto. Una contaminación latente involucra el parasitismo de esporas o fragmentos miceliales en la superficie del fruto hospedero que no germinan hasta que el fruto madura, o cuando el fruto es dañado por insectos u otro mecanismo. La latencia involucra una fase asintomática en la que eventualmente se desarrollaran los síntomas visibles si las condiciones lo favorecen. Por otro lado, la infección quiescente es aquella que es visible microscópicamente pero el desarrollo del micelio se ve detenido después de la infección y se reactiva cuando el fruto madura (Michailides *et al.,* 2009).

Uno de los principales problemas en el desarrollo de mohos es la producción de micotoxinas, metabolitos secundarios que se sintetizan de manera natural en los frutos y granos. Se ha encontrado que los mohos pueden producir más de una micotoxina (Speijers *et al*., 2004), y las producidas por mohos del género *Aspergillus* son de gran preocupación en la industria agroalimentaria. Algunas de estas micotoxinas reciben mayor atención por sus efectos carcinogénicos, nefrotóxicos, teratogénicos e inmunosupresores tales como las aflatoxinas y ocratoxinas (IARC, 2002). La mayoría de los mohos deterioradores sintetizan micotoxinas, y dependiendo de las características del fruto, éstas pueden migrar hacia el interior, lo que representa un riesgo indirecto a la salud. Esto resulta relevante a nivel agroindustrial, ya que los frutos de menor calidad suelen ser valorados utilizándolos en la elaboración de productos derivados en los que la integridad física del fruto es menos importante o son completamente procesados (Gonzáles-Sánchez y Silva-Echeverría, 2007). Algunos ejemplos de dichos procesos son: la obtención de aceites esenciales, jugos, jaleas, mermeladas, etc. Son en estas prácticas donde reside una preocupación creciente en cuanto a conocer mejor los patrones de contaminación, la calidad microbiológica y la inocuidad de los alimentos de este origen y naturaleza.

2. ANTECEDENTES

La causa más común de pudrición en cítricos a nivel mundial es por *P. italicum* y *P. digitatum* (pudrición azul y verde respectivamente) (Pitt-Hocking, 2009). Sin embargo, existen una gran variedad de géneros micotoxigénicos que causan gran daño y pérdidas en postcosecha, y que son poco abordados por las micotoxinas que producen (Tabla I). Se cree que la biosíntesis de estos metabolitos secundarios obedece a varios factores. Las teorías más fuertes indican que se producen cuando no hay balance en las condiciones de crecimiento y que le confieren ventaja selectiva en medio natural. De esta forma, la biosíntesis de micotoxinas está determinada por esos factores ambientales que desencadenan una serie de reacciones en cascada que provocan la activación de los genes responsables de la producción de estos compuestos (Gallo *et al.*, 2009; Magan *et al.*, 2011).

Tabla I. Algunos mohos y micotoxinas encontradas en productos para consumo humano y animal.

Micotoxinas	Estructura	Mohos productores
Aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2		*Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nonius*
Ocratoxina		*P. verrucosum, A. ochraceus, A. carbonarius*
Patulina		*P. expansum, A, clavatus, Byssochlamys nivea*
Fumonisinas B_1,B_2, B_3		*F. verticilloides, F. proliferatum, A. niger*
Toxinas de alternaría (AOH, AME, TA, ALT)		*A. alternata, A. solani*

Adaptado de AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), 2009.

2.1 Mohos fitopatógenos en cítricos

***Alternaria* sp.** Como fitopatógenos específico de cítricos, la pudrición negra (Black rot) es una enfermedad postcosecha que ocurre a nivel mundial y causa daño interno en todos los cítricos comerciales. Para la penetración del moho en el fruto es necesario una herida o una hendidura natural. Los síntomas externos son poco visibles, apenas una pequeña mancha café o negra normalmente en el pedúnculo del fruto, pero por dentro existe una gran extensión de la enfermedad (Agrios, 2005).

Micotoxinas de *Alternaria*. *A. alternata* produce algunas toxinas de las cuales el ácido tenuazónico (TA) es uno de los más importantes (Logrieco *et al.*, 2003). Se ha demostrado que este compuesto resulta tóxico para una amplia gama de plantas y animales, particularmente en ratones y embrión de pollo (Logrieco *et al.*, 2003). En humanos se han asociado altos niveles de TA con disturbios hematológicos (Bottalico y Logrieco, 1998). Arternariol (AOH) y arternariol-monometil-éter (AME) han sido encontrados normalmente en combinación y muestran efectos teratogénicos y fetotóxicos en ratones preñados (Bottalico y Logrieco, 1998). *A. alternata* es la principal productora de altertoxina I, II y III, toxinas que han recibido mayor importancia debido a su mutagenicidad, en particular la altertoxina III cuyo daño es tres veces menor que la aflatoxina B1 (Bottalico y Logrieco, 1998). Estas toxinas han sido reportadas en diversos productos frescos, incluyendo frutos cítricos (Logrieco *et al.*, 1990). Se han llevado estudios acerca de su estabilidad y se ha encontrado que el AOH, AME y TA resultan estables al calentamiento constante durante 90 minutos en harina de girasol, y su concentración decrece hasta un 50 % después de 90 minutos a 121°C (Combina *et al.*, 1999).

***Aspergillus* sp.** es una de las especies de mayor importancia económica por su uso en la biosíntesis de productos químicos, enzimas o en la fermentación de alimentos; así como por el deterioro de alimentos y la producción de las micotoxinas (Bennet, 2010; Pitt y Hocking, 2009). *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuido en una gran diversidad de sustratos principalmente como saprófitos en alimentos y forrajes. Algunas especies están entre los típicos patógenos de frutas y vegetales frescos y como patógenos en postcosecha (Barkai-

Golan, 2008). *Aspergillus* tiene la capacidad de crecer a temperaturas más altas y sus esporas son más resistentes a la luz UV o a agentes químicos (Pitt y Hocking, 2009).

Los *Aspergillus*, desde el punto de vista de las micotoxinas que producen se pueden dividir en tres grupos principales: 1) *Aspergillus* aflatoxigénicos: *A. flavus*, *A. parasiticus*, y *A nonius* entre otros; 2) *Aspergillus* ocratoxigénicos: *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* y relacionados, *A. tubingensis*, *A. sclerotium*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. alliaceus*, *A. aculeatus* y *A. japonicus;* y 3) productores de otros metabolitos, los productores de esterigmatocistina por *A. flavus*, *A. flavipes*, *A. nidulans* y *A. vesicolor*; los productores de ácido ciclopiazónico por *A. flavus*, *A. tamarii* y *A. vesicolor*; de aflatremina producida por *A. flavus*; de citrinina producida por *A. flavipes*, *A. carneus*, *A. niveus*, y *A. terreus* y de patulina producida por *A. terreus* (Barkai-Golan, 2008).

Micotoxinas de *Aspergillus*. *Aflatoxinas*. Las aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 son derivados altamente sustituidos de la difuranocumarina, además de otras biotransformadas como la aflatoxina M_1 y M_2, metabolitos 4-hidroxilados que ocurren en la leche y la orina después de haber consumido aflatoxina B1 y B2 (Frisvad *et al.*, 2007; Barceloux, 2008). *Aspergillus* sección flavi (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nonius*, *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamarii*) es la especie productora de aflatoxinas más común en países tropicales, afectando principalmente al maíz, cacahuate, y algodón (Frisvad *et al.*, 2007). La aflatoxina B_1 ha sido reconocida como la de mayor toxicidad aguda en animales, seguida por las aflatoxinas G_1, B_2 y G_2. La aflatoxina B_1 también ha sido reconocida como la más carcinogénica, causando tumores malignos en animales a nivel de hígado y considerado por la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer (IARC, 2002) como la causa principal de hepatocarcinoma en el humano (Barkai-Golan, 2008). En estudios de estabilidad se ha encontrado que la AFM_1 se reduce en menos del 20 % después de la pasteurización la leche, y hasta un 36 % de reducción en la fermentación de yogurt (Sanly *et al.*, 2012). La cocción reduce las aflatoxinas en 41 %, mientras que la nixtamalización elimina del 50 al 80 %. Su descomposición completa se observa a 237-306 °C, temperatura que no es compatible con el procesamiento de alimentos (Kabak, 2009).

*Ocratoxina***.** Estos son compuestos derivados de la isocumarina ligada a una L-fenilalanina y clasificadas como pentacetonas. A diferencia de la mayoría de las micotoxinas, la OTA contienen átomos de cloro y es la más abundante y tóxica (Barceloux, 2008). La principal fuente de OTA han sido los cereales, leguminosas, café, cacao, uvas, uva pasa, nueces y especias, e inclusive productos cárnicos como resultado de la contaminación de la alimentación de los animales (Frisvad y Thrane, 2007; Barkai-Golan y Paster, 2008). En las últimas décadas, el consumo de OTA se ha visto incrementado por la ingesta de vinos y jugos de uva contaminados por lo que se ha dado seguimiento a su ocurrencia en este tipo de productos a nivel mundial. El origen de la ocratoxina que se reporta en climas templados ha sido atribuido generalmente a *P. verrucosum*, mientras que en zonas tropicales y de clima cálido esta comúnmente asociada a *Aspergillus* negros como *A. carbonarius* o *A. niger* (Marino *et al.*, 2009; El Khoury y Atoui, 2010). Su acción en nefrotóxica y altamente carcinogénica y ha sido considerada como uno de los principales factores de riesgo a la salud humana y principal causa de la nefropatía endémica de los Balcanes y en el desarrollo de tumores del tracto urinario (Paradells *et al.*, 2014). La OTA es muy estable a la temperatura. En procesos de horneado a 200 °C disminuye del 0 al 12 %; horneado a 100 °C durante 120 m destruye el 50 % y la destrucción completa se observa a 250 °C (Kabak, 2009).

Otras micotoxinas del género *Aspergillus*. Las *Fumonisinas* (FB) son micotoxinas carcinogénicas producidas principalmente por especies de *Fusarium*. Existen varias fumonisinas diferentes, siendo la fumonisina B2 la más tóxica. Se ha asociado a cáncer esofágico y se ha visto involucrada en leucoencefalomacia en equinos (Frisvad y Thrane, 2007). Sin embargo se ha reportado de la producción de este y otros tipos de micotoxinas por algunas especies de *A. niger*, moho considerado como GRAS (Generally Recognized as Safe), y mohos relacionados (Blumenthal, 2004; Frisvad *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2013). El análisis filogenético indica homología entre los genes responsables de la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticilloides* y *A. niger*, aunque no necesariamente se exprese fenotípicamente ya que esto depende de diversos factores (Frisvad *et al.*, 2007).

***Penicillium* sp.** Este es uno de los géneros más abundantes y de mayor distribución geográfica, asociado comúnmente a la contaminación de alimentos y forrajes, y son de gran

importancia económica. (Barkai-Golan, 2008). Entre los principales contaminantes de cítricos en postcosecha se encuentran *P. italicum y P. digitatum*, comúnmente llamados mohos verde y azul, cuya presencia y deterioro ocurre tanto en empacadoras como en puntos de venta (Palou *et al.*, 2001, 2008; Frisvad *et al.*, 2004; Smilanick *et al.*, 2006). Estos mohos penetran los tejidos a través de heridas, por lo que puede extenderse la infección si el fruto infectado está en contacto con otro sano pero con alguna pequeña lesión. El moho se desarrolla en cuanto el ambiente es húmedo y cálido. Su actividad es más severa a temperaturas mayores a 25 °C, sin embargo, una vez que comienza a desarrollarse la pudrición en el tejido, esta continúa inclusive a temperaturas tan bajas como 0 °C (Agrios, 2005). De estos mohos se han determinado algunos metabolitos tóxicos, unos por medio de bioensayos donde se demostró la toxicidad de los extractos de cultivos sobre *Bacillus megaterium*, *Artemia salina*, *Laepidium sativum* o en embrión de pollo (*Gallus domesticus*) (Faid y Tantaoui-Elaraki, 1989); y otros por métodos analíticos, identificando compuestos como ácido italínico, verrucolona, ácido fúlvico, xantocilinas, entre otras (Frisvad *et al.*, 2004).

Patulina. El principal moho productor de patulina es *P. expansum* responsable de la pudrición azul en manzanas y el más investigado debido a sus implicaciones en la salud humana por producir esta micotoxina durante el desarrollo de la enfermedad. La exposición humana a esta micotoxina ha sido reportada a través de sus productos procesados como jugos o compotas, donde se ha demostrado su estabilidad en el proceso de pasteurización. Se tienen reportes de la ocurrencia de patulina en otro tipo de frutas como peras, uvas cereza, durazno y naranjas (Barkai-Golan, 2008). La patulina puede provocar congestión y edema pulmonar, hepático e intestinal. Se han observado sarcomas en animales a los que se les han administrado altas dosis de patulina. Su mecanismo de toxicidad aun no es bien conocido (Bräse *et al.*, 2009).

Micotoxinas y salud. Las micotoxicosis son raras en humanos y sólo se han reportado pocos casos de intoxicaciones agudas como el ocurrido en Kenia en 2004 con 317 casos de

aflatoxicosis de los cuales 127 resultaron en muertes (CDC, 2004). Las micotoxinas no tuvieron un papel muy importante dentro de la investigación en la salud por un tiempo considerable. Fue hasta que se determinó que el principal causante de la nefropatía endémica de los Balcanes era la ocratoxina A, producida por granos de consumo local contaminados con mohos, que recobró relevancia (Barceloux, 2008). Diversas investigaciones han demostrado que la ingesta de micotoxinas a través de los alimentos puede causar efectos a 3 niveles: 1) Leves, como diarrea y otros síntomas gastrointestinales; 2) Mayores, como la supresión del sistema inmune, o 3) Graves que involucran daño renal, cáncer, teratogénesis, entre otros (Bath *et al.*, 2010; CDC, 2012). Conviene remarcar que la toxicidad puede variar considerablemente de una toxina a otra, y el riesgo no siempre está ligado a la toxina misma, sino que puede provenir de sus metabolitos (AFSSA, 2009).

Normativa. Las micotoxinas son consideradas un peligro químico que no debería estar presente en un alimento, ni en sus ingredientes, ni en su material crudo de origen. Sin embargo, sus niveles son aceptables cuando su presencia es inevitable aún después de un excelente manejo, y no comprometen la salud pública. Las micotoxinas como contaminantes químicos poseen una legislación específica para los niveles permitidos en alimentos, y así, proteger al consumidor de sus efectos nocivos (Shephard, 2008) (Tabla II)**.**

Tabla II. Límites establecidos para micotoxinas en algunos productos alimentarios.

Producto	Máximo de micotoxina	(µg/Kg)
Semillas y cereales para consumo directo	AFB_1	2.0
Fruta pasa	AFtotales	4.0
Leche	AFM_1	0.050
Uva pasa	OTA	10.0
Vino y vinos de frutas	OTA	2.0
Zumo de uva	OTA	2.0
Zumos de frutas, néctar o jugos reconstituidos	Patulina	50.0
Productos sólidos a base de manzana (puré, compota)	Patulina	25.0
Bebidas a base de jugo de manzana	Patulina	50.0
Productos sólidos a base de manzana para lactantes o infantes	Patulina	10.0

Datos tomados de: Reglamento (EU) No. 165/2010 No. L50 (Modificación M5. Reglamento (CE) No. 1881/2006)

La Organización Mundial de la Salud (WHO, World Health Organization) junto con la Autoridad Europea para la Inocuidad Alimentaria es quien dirige las investigaciones en cuanto a la evaluación del riesgo asociado al consumo de micotoxinas. Inclusive se han dado a la tarea de revisar y re-evaluar ciertas micotoxinas en diversos productos, de ahí la incorporación a la normativa de un mayor número micotoxinas. Muchas de estas regulaciones conciernen a frutas y vegetales, de las cuales, en sentido estricto, es la patulina la que está mayormente regulada a pesar de que las investigaciones indican que la patulina causa menor problemas de salud comparado con las aflatoxinas y la ocratoxina (Barceloux, 2008; Van-Egmond y Jonker, 2008).

2.2 Presencia de mohos micotoxigénicos en cítricos

Entre los primeros estudios relacionados con mohos y micotoxinas en cítricos, Stinson *et al.* (1981), investigaron sobre *Alternaria* sp., moho que tiene la capacidad de producir micotoxinas, demostrando por primera vez la producción de éstas en limón infectado. Varma y Verma (1987) analizaron la producción de aflatoxinas por *A. flavus* en naranja infectada y Logrieco *et al.* (1990) encontraron ácido tenuazóico y alternariol producidos por *A. alternata* aislada de frutos infectados, lo que considera un potencial peligro si se transfiere a sus productos procesados.

Otro tipo de investigaciones sobre mohos micotoxigénicos, Palou *et al.* (2001) investigaron la micobiota epífita y ambiental en campos de mandarina; Lugauskas *et al.* (2002) investigaron la producción de micotoxinas por diferentes mohos sobre frutas, entre éstas, los cítricos y lo relevante de esta investigación es que la mayoría de los mohos micotoxigénicos que encontraron presentes pertenecen a los géneros *Penicillium, Aspergillus* y *Fusarium*. Bamba y Sumbali (2005) demostraron que el limón mexicano es un buen sustrato para la producción de aflatoxina B1 y ácido ciclopiazónico por *A. flavus*. Marino *et al.* (2009) retomaron la importancia de las micotoxinas en frutos cítricos al investigar sobre la incidencia de la producción de OTA en naranjas y su jugo usando como modelo un *Aspergillus* ocratoxigénico e infectando artificialmente las naranjas, encontrando que las altas temperaturas tienen gran influencia en el crecimiento del moho como en la producción de la OTA. En América Latina los mohos han sido estudiados por su patogenicidad desde un punto de vista agronómico, con la caracterización de la micobiota presente en frutos cítricos o en su ambiente postcosecha, encontrando una amplia variedad de géneros, incluyendo mohos micotoxigénicos (Ochoa *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2009; Sandoval-Contreras, 2011).

2.3 Control de mohos fitopatógenos y micotoxinas

El uso de pesticidas es común en el control de mohos en postcosecha, sin embargo, tanto consumidores como las autoridades han tomado conciencia de los efectos nocivos de los residuos de pesticidas en alimentos y en el ambiente por lo que éstos han sido sujeto de estrictas normas regulatorias. Asociado a esto, en las últimas décadas los pesticidas han perdido eficacia debido a la resistencia que algunos mohos han desarrollado hacia este tipo de compuestos (Errampalli *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2008). Por estas razones, diversos métodos alternativos para el manejo de las enfermedades fúngicas han sido intensamente explorados en los últimos años. El uso de microorganismos antagónicos biológicos, ha surgido como un compromiso prometedor en el control tanto de mohos en pre y postcosecha, como para el control de micotoxinas. Se han probado diversos organismos, por su habilidad de reducir la contaminación. En este punto, el uso de levaduras antagónicas han sido de especial interés (Liu *et al.*, 2013).

Levaduras como *Candida oleophila, C. guilliermondii, C. famata, Debaryomyces hansenii, Rhodotorula glutinis, Cryptococcus laurentii, Kloeckera apiculata* y *Pichia anomala* entre otras, que presentan diversos modos de acción en su actividad biocontroladora, han sido estudiadas (Palou *et al.*, 2008). Es importante que estas levaduras sean tolerantes al estrés abiótico, ya que el ambiente al que se enfrentan como antagonistas tanto en campo como en empacadoras es adverso (temperaturas extremas, falta de nutrientes, estrés oxidativo, pH adverso y baja humedad). La fuente original para aislar levaduras antagónicas (la superficie de los frutos) ha sido expandida a otros ambiente como heridas de los frutos, aguas marinas o suelos antárticos, con el fin de encontrar, bajo ambiente estresantes, cepas más resistentes para el biocontrol (Cubaiu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Mecanismo de acción de las levaduras antagónicas. Este es un mecanismo en el que se asume que involucra una compleja interacción entre el hospedero (fruto), el patógeno (moho), el antagonista (levadura) y factores ambientales como temperatura, estrés oxidativo, pH y a_w pueden influenciar su viabilidad y eficacia (Palou, 2012; Liu *et al*., 2013).

Competencia por espacio y nutrientes. Este es el modo de acción más importante de las levaduras antagónicas. Después de su aplicación sobre la superficie del fruto, ocupa también las heridas ocasionadas durante la cosecha y la manipulación subsecuente. Las levaduras crecen rápidamente las primeras 24 h en las heridas dando como resultado la falta de nutrientes y la ocupación del espacio de la herida, y eso tiene efecto directo en la germinación de esporas (Nunes, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Formación de sideróforos. Bajo una deficiencia de hierro muchos microorganismos forman sideróforos quelantes. Esto ocasiona un agotamiento del hierro tan importante en numerosos procesos del crecimiento fúngico como la síntesis de desoxinucleótidos, la respiración, el ciclo de los ácidos tricarboxilicos y la síntesis de aminoácidos, lípidos y esteroles (Wachowska y Borowska, 2014).

Capacidad de fijación de las levaduras al micelio del moho patógeno y la producción de enzimas líticas: La levadura se fija fuertemente a la hifa y secreta β-(1-3)-glucanasa, serina

proteasa o exoquitinasa, las cuales degradan la pared celular del patógeno provocando su muerte (Bar-Shimon *et al.*, 2004; Nunez, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Inducción de mecanismos de defensa del hospedero. Otra característica de las levaduras en la habilidad de estimular una respuesta de defensa en el tejido del hospedero hacia el patógeno. Esta defensa incluye la producción de inhibidores de enzimas que degradan la pared celular del hospedero, compuestos con actividad antifúngica como compuestos fenólicos y fitoalexinas, especies reactivas al oxígeno (ROS) (anión superóxido y peróxido de hidrógeno), o reforzamiento de la pared celular del hospedero. Esto implica algunas reacciones químicas o bioquímicas en el tejido hospedero incluyendo cambios en la estructura y producción de proteínas relacionadas con la patogénesis que se expresan localmente o de manera sistémica (Droby *et al.*, 2002; Nunes, 2012). Es importante señalar que las levaduras soportan altos niveles de ROS, y esto parece ser una característica esencial para un biocontrol efectivo. Inclusive se ha incrementado *in vitro* la tolerancia al estrés oxidativo para aumentar la eficacia del agente biocontrolador (Lui *et al.*, 2013).

Formación de biopelículas. Los frutos con heridas responden a varios compuestos, normalmente componentes de la pared celular u otros compuestos excretados por la levadura, que desencadenan los mecanismos de defensa. Éstos regulan la densidad de la población de la levadura, cambios en el pH, producción de compuestos oxidativos, o inducen un cambio en su morfología. A su vez, la levadura se adhiere al tejido hospedero o a la pared celular del patógeno formando biopelículas y secretando enzimas degradantes de la pared celular (Liu *et al.*, 2013). La capacidad de la levadura antagónica como agente de biocontrol es debida también a la facultad de alcanzar una densidad celular específica en el sitio de la infección y la habilidad de adherirse entre ellas mismas hacia el tejido del hospedero y a las esporas o hifas del patógeno. Cuando esto se lleva a cabo, existen cambios fundamentales en la expresión de genes y metabolismo de la levadura, dando como resultado la formación de una biopelícula (Liu *et al.*, 2013). Las biopelículas son entonces, comunidades de microorganismos que crecen dentro de una matriz generada por ella misma, que contiene, entre otros componentes, exopolisacáridos. Además de servirle como protección en su entorno, le ayuda a mantener el agua y asegura la adquisición de nutrientes (Breierová *et al.*,

2004). En algunas levaduras, los exopolisacáridos presentes en la matriz extracelular participa en la adherencia de sustratos inorgánicos a las células hospedera y mejora sus defensas y su resistencia a agentes antifúngicos (Shepperd *et al*., 2016).

Producción de toxinas killer. Estas exotoxinas son generalmente proteínas o glicoproteínas que son capaces de matar células susceptibles pertenecientes a su mismo género, o géneros relacionados. Las levaduras productoras son inmunes a la actividad de su propia toxina. El fenómeno killer ha sido también detectado en otros géneros como *Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Hanseniaspora, Hansenula, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Ustilago, Torulopsis, Williopsis* y *Zygosaccharomyces* (Schmitt y Breinig, 2002). Esta actividad depende de diversos factores como el pH, generalmente de 3 a 5.5, de la salinidad y de la temperatura (Magliani *et al.*, 1997; Baeza *et al.*, 2008). La presencia del fenotipo killer se ha asociado a la presencia de dsRNA viral, plásmidos lineales de DNA o genes nucleares en algunas levaduras. Sin embargo, aún falta mucho por conocer de sus bases genéticas (Magliani *et al.*, 1997).

2.4 Levaduras en el biocontrol postcosecha de cítricos

En la última mitad del siglo pasado comienza la búsqueda de alternativas para el control postcosecha de productos frescos. En la tabla III se enumeran algunos de los estudios realizados con fines de biocontrol.

Tabla III. Estudios realizados para el control biológico de patógenos en postcosecha de cítricos

Referencia	Objetivo del Biocontrol estudiado y levadura utilizada
Chalutz-Wilson, 1990	*P. digitatum* con *D. hansenii*
El-Ghaouth *et al.*, 2000	*B. cynerea, P. expansum* y *P. digitatum* con *C. saitoana*
Eayre *et al.*, 2003	*P. digitatum* con *Galactomyces citri-auranti*
Usall *et al.*,2008	*P. digitatum* con *P. agglomerans* + $NaHCO_3$
Pimienta *et al.*, 2010	*P. digitatum* con *S. crataegensis* + $NaHCO_3$
Luo *et al.*, 2012	*P. italicum* y *P. digitatum* con *P. membranaefaciens*
Lu *et al.*, 2014	*P. digitatum* con *R. paludigenum* + quitosano
Sperandio *et al.*, 2015	*P. digitatum* con *Aerobasidium* sp.

Es importante señalar que a la fecha se siguen buscando levaduras con capacidad antagónica de una amplia variedad de ambientes para su uso potencial en el biocontrol postcosecha de cítricos (Sperandio *et al.*, 2015). El limón Persa es un fruto importante en la dieta humana con un aporte de vitaminas y minerales, así como compuestos antioxidantes. Los países productores como México, Argentina, Brasil, India, y Egipto entre otros, presentan un alto consumo *per cápita*. Potencias como América del norte y Europa también son altos consumidores de limón. Con el aumento de la demanda se prevé un aumento en la producción de este fruto, de las cuales, las dos terceras partes aproximadamente serán para el mercado fresco debido a sus bondades. El incremento de su consumo requiere también el incremento de su calidad e inocuidad, es decir, que sea un producto libre de peligros como microorganismos patógenos o las micotoxinas, y libres de residuos de pesticidas (FAO, 2014a; Nicosia *et al*., 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

México es el segundo productor de limones y primer exportador del fruto fresco y procesado a nivel mundial. Como gran productor de cítricos, tiene una amplia variedad de subproductos asociados con calidad de exportación, como los jugos de limón estabilizados y concentrados, o los aceites esenciales. Estos productos deben regirse por la normativa en inocuidad del país a quien se le exportan. Los principales importadores como los Estados Unidos, la Unión Europea y Japón cuentan con una reglamentación estricta en cuanto al contenido de microorganismos patógenos y micotoxinas en alimentos, dado sus efectos altamente nocivos a la salud. Los mohos que forman parte de su micobiota epífita de los cítricos representan una potencial fuente de contaminación de sus subproductos pues también producen micotoxinas que pueden comprometer la inocuidad del producto. Es importante la producción de frutos de calidad, mayor vida de anaquel, libres de peligros y aptos para su consumo, por lo cual, el conocimiento del carácter micotoxigénico de mohos patógenos y su comportamiento en cítricos nos ayudará a evidenciar el riesgo de contaminación que representan las micotoxinas en los limones, y generar estrategias para su biocontrol en postcosecha. El estudio de mohos y micotoxinas en cítricos adquiere entonces gran relevancia, pues se cuenta con información limitada sobre su comportamiento en este tipo de frutos. Teniendo una mayor base de datos sobre mohos fitopatógenos y micotoxinas en cítricos se podrán generar las mejores estrategias tan necesarias para su control y así evitar pérdidas económicas postcosecha y sobre todo, daños a la salud.

4. HIPÓTESIS

Si las levaduras marinas antagónicas al desarrollo de mohos micotoxigénicos limitan su crecimiento, entonces limitarán también la producción de sus micotoxinas, por lo cual, el tratamiento de limón Persa con levaduras marinas ofrecerá una alternativa de biopreservación.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los mohos fitopatógenos aislados de limón Persa (*Citrus latifolia* T.) con capacidad micotoxigénica y su inhibición por levaduras marinas.

5.1 Objetivos específicos

I. Identificar los mohos fitopatógenos con potencial micotoxigénicos aislados de la filosfera de cítricos, determinar la capacidad de síntesis de micotoxinas e identificar y cuantificar las micotoxinas producidas.

II. Investigar la bioacumulación de micotoxinas en limón Persa y su proceso de difusión dentro del fruto.

III. Determinar las condiciones para el biocontrol de los mohos micotoxigénicos con la levadura marina *D. hansenii* y su especificidad para la inhibición.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

En la figura 1 se muestra el diagrama global de la metodología. Se partió de 17 cepas patógenas para el limón Persa (*Citrus latifolia* T.) recuperadas en estudios previos (Ascencio, 2012). Primeramente, se identificó el potencial micotoxigénico mediante la búsqueda de genes participantes en el proceso de biosíntesis de micotoxinas de acuerdo a su especie. A los mohos positivos a genes micotoxigénicos, se les determinó la habilidad para producir metabolitos secundarios tóxicos y/o micotoxinas en un medio de cultivo complejo formulado específicamente para este estudio, a base de pericarpio de limón, en diferentes condiciones de pH, temperaturas y tiempos de incubación. Se analizó la síntesis tanto en medio sólido como en medio líquido, La detección de metabolitos secundarios tóxicos se realizó por medio de bioensayos de toxicidad con *A. salina*, además se identificaron y cuantificaron las micotoxinas por HPLC-MS-MS. Los diseños experimentales fueron multifactoriales con tres niveles tanto para las cinéticas de síntesis, como para determinar las condiciones El análisis estadístico se realizó a través de ANOVA multifactorial, regresión lineal múltiple y análisis de componentes principales (CP) para las correlaciones entre las micotoxina encontradas, además de utilizar el método de superficie de respuesta (SR) aplicado a la optimización de dos variables, en la evaluación de la mortalidad de *A. salina* (StatGraphics Centurion XV.II). Posteriormente, se determinó la bioacumulación de micotoxinas en limón Persa infectando artificialmente. Se analizó el contenido de micotoxinas por HPLC-MS de los extractos obtenidos de las diferentes partes del limón. La significancia estadística se analizó por medio de ANOVA (StatGraphics Centurion XV.II). Finalmente, se investigó el control de mohos en postcosecha de cítricos. En la primera etapa se modelizó la velocidad de crecimiento fúngico en función de la temperatura, además del tiempo en que se hace visible la colonia (parámetro utilizado en la determinación de vida de anaquel) utilizando técnicas de Micología Predictiva. Se realizaron cultivos de cinco cepas de *A. niger* aisladas de frutos cítricos en un amplio margen de temperaturas, bajo una atmósfera saturada y a_w constante y se realizó la simulación de acuerdo a la metodología desarrollada por Baranyi *et al.* (1994) y Rosso y Robinson (2001). En la segunda etapa del control, se determinó la inhibición de mohos fitopatógenos con potencial micotoxigénico mediante el uso de levaduras marinas. Se utilizó la levadura de origen marino *D. hansenii* Dhh03 perteneciente a la colección del

CIBNOR, (cepario número CLT20) que en estudios previos demostró tener capacidad para inhibir a *P. italicum*, moho patógeno de limón mexicano (*C. airantifolia* S.). Se investigó las condiciones para el antagonismo de la levadura marina en el biocontrol de los mohos patógenos y micotoxigénicos encontrados. Se estudió la habilidad de producción de toxinas killer de la levadura *D. hansenii* Dhh03 y su capacidad para inhibir los mohos. Se analizó la posible absorción de micotoxinas por la levadura y, por último, se indagó la capacidad de ésta para la protección del limón Persa *in vivo*. El diseño experimental fue un modelo unifactorial por bloques, y se analizó por medio de ANOVA (StatGraphics Centurion XV.II).

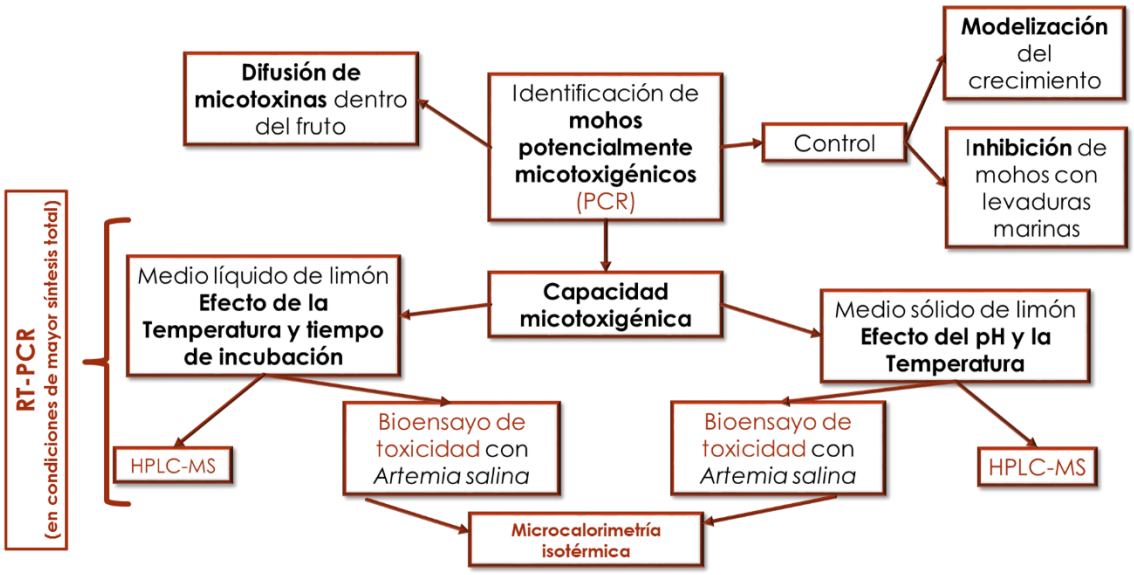


Figura 1. Diagrama general de metodología.

6.1 Identificación de mohos potencialmente micotoxigénicos aislados de la filosfera de cítricos.

A partir del ADN de 17 cepas de mohos fitopatógenos de limón Persa, en resguardado del Laboratorio de Patogénesis Microbiana del CIBNOR, se investigó la presencia de secuencias específicas conforme a su especie, unas reportadas en la bibliografía, otras bajo diseño y que participan el algún paso dentro del proceso de biosíntesis de micotoxinas. Las

amplificaciones se realizaron por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Como control, se utilizó como negativo el ADN de alguna otra cepa no micotoxigénica. Los productos se enviaron a la empresa Genewiz Inc. (USA) para su secuenciación. En tabla IV se indican las secuencias utilizadas para el análisis del potencial micotoxigénico de los mohos y los genes para la micotoxina que producen.

Tabla IV. Secuencias específicas de genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas en los mohos estudiados.

Gen	Secuencia (5')	Secuencia (3')	Referencia
PKS#	tgg gtg ttg atg ttt ccg	atc ttc ggg tcc att ggc	Tseng *et al.* (2011)
	ttc cat gcg tga ggc tac tg	ctg ggc cga aac ctt agc a	
aflL ☼	ttc agc gga aat ggt gta	acc ttg tcc caa aag tcg	Este estudio
*FUM*1**	cga ggc ccg agc gag cac tgg	gat caa gct cgg ggc cgt tca tag	Baird *et al.* (2008)

La ruta de las policetonas (PKS), está presente en la biosíntesis de muchas micotoxinas, y es específica en cada especie. En *Alternaria* sp. participa en la síntesis de melanina, precursor de diversas toxinas. ☼ Los genes aflL que participan en la biosíntesis de aflatoxinas, anteriormente se denominaban VerB. ** Se utilizó un gen homólogo de *F. moniliformis* para la búsqueda de genes participantes en la síntesis de FB en *A. niger*.

6.2 Capacidad de síntesis de micotoxinas de los mohos fitopatógenos con potencial micotoxigénico

La actividad micotoxigénica se evaluó en dos diferentes ensayos con cultivos realizados en un medio específico diseñado a partir de pericarpio de limón: i) Bioensayo de micotoxigenicidad para evaluar la cinética de producción de micotoxinas y, ii) Microcalorimetría isotérmica.

Desarrollo del medio de cultivo a base de limón. El objetivo de diseñar un medio de cultivo a base de limón Persa fue determinar si los mohos son capaces de tomar los componentes del limón Persa como sustrato para la síntesis de micotoxinas. Siendo los mohos microorganismos que se implantan principalmente en la superficie del fruto, para el diseño del medio se tomó en cuenta la composición del pericarpio del limón (Tabla V).

Tabla V. Estructura y commposición del limón.

Estructura	Composición
Pericarpo	
Cutícula	Células epidérmicas y estomas.
Epicarpio o flavedo	Carotenoides, vitaminas y aceites esenciales (0.4%)
Mesocarpo o albedo	Celulosa (33 % en base seca), carbohidratos solubles, aminoácidos, vitaminas y sustancias pécticas (protopectinas y pectinas); 20 % en base seca.
Endocarpo	Calpelos que contienen celdillas o septos de hemicelulosa, protopectina y flavonoides, aminoácidos, vitamina C y minerales. Dentro se encuentran los tricomas con jugo y semillas. Contenido de humedad total: 75 – 80 %.Constituyentes solubles: glucosa, fructosa, sacarosa, ácidos orgánicos (ácido cítrico), vitaminas B y C, y material péctico.

Adaptado de: Cerutti y Newmayer, 2004; Stechina, 2005.

Con base al contenido de celulosa y sustancias pécticas en la cáscara de limón, se tomaron diferentes combinaciones entre albedo y flavedo de limón Persa (*C. latifolia* T.). El medio se formuló para contener un 3% aproximadamente de carbohidratos (celulosa y sustancias pécticas). Un medio máximo comercial contiene 4 % de carbohidratos (Agar dextrosa Sabouraud ADS) mientras que un medio mínimo como el agar dextrosa papa (ADP), contiene 2 % de carbohidratos.

Se tomó la formulación que resultó con un desarrollo extensivo sobre la placa de Petri y con un patrón morfológico característico del desarrollo y esporulación del moho a 25 °C y después de 10 días de incubación. La formulación resultante, a excepción del agar, fue también utilizada en la preparación de caldos de cultivo en la investigación de las cinéticas de síntesis de micotoxinas (Fig. 2).

Figura 2. Albedo y flavedo de limón utilizados en la preparación del medio de cultivo.

Como medio de cultivo de referencia en la investigación, se utilizó caldo Dextrosa Sabouraud (CDS, Bioxon®), realizándose cultivos en paralelo.

Evaluación de la actividad micotoxigénica de los mohos fitopatógenos por medio de cinéticas de síntesis

Cepas utilizadas. Se evaluaron tres mohos aislados de la filósfera de frutos cítricos que presentaron un carácter micotoxigénico. Estas fueron *A. alternata* cepa 5a, *A. carbonarius* cepa 40 y *A. niger* cepa 24. Éstas presentaron secuencias de genes que participan en la biosíntesis de micotoxinas como el gen PKS para *A. alternata*; la enzima PKS para *A. carbonarius* y genes *aflL* (antes *Ver*B) y *FUM*1 para *A. niger*. Como control positivo a micotoxinas se utilizó *A. flavus* SRRC1273 y como control negativo la cepa *P. italicum* 36H2. Los mohos se cultivaron en agar dextrosa papa (Bioxon®) a 25 °C de 5 a 7 días, tiempo necesario para obtener cultivos esporulados, de los cuales se prepararon suspensiones de aproximadamente 6 log esporas/mL en una solución acuosa de Tween-80 al 0.05 % (Pose *et al.*, 2010). Las esporas fueron contabilizadas en cámara de Newbauer® (Germany).

Bioensayo de micotoxigenicidad para evaluar las cinéticas de síntesis de micotoxinas en caldo limón. Se analizó el efecto de la temperatura en la síntesis de micotoxinas y el tiempo de incubación mediante cinéticas de síntesis de micotoxinas en caldo limón (CL) pH 5.5 ± 0.2 y en caldo dextrosa Sabouraud (CDS), este último como referencia. Por triplicado, fueron

inoculados 250 mL de caldo con 15 µL de una suspensión con 10^6 esporas/mL del moho en cuestión y se incubaron de forma estática durante 28 días a diferentes temperaturas: un lote a 20 °C, otro a 25 °C y un tercero a 30 °C. Cada siete días fueron tomadas muestras para la extracción de micotoxinas.

Extracción de micotoxinas. De los caldos de cultivo fueron tomadas alícuotas de 20 mL de sobrenadante libre de células y se colocaron en embudo de separación al que se agregaron 25 mL de cloroformo, esta mezcla se agitó fuertemente durante tres minutos y se dejó en reposo para la separación y filtración (papel Wathman No. 4) de la fase clorofórmica. Este procedimiento se realizó dos veces; se juntaron las fases y se dejaron evaporar a sequedad para su posterior análisis (Brzonkalik *et al.*, 2011; FDA-BAM, 2001).

Bioensayo. Para realizar los bioensayos de toxicidad, fueron eclosionados nauplios de *A. salina* a 28 ºC en agua de mar sintética a 30 gL^{-1} de NaCl, utilizados después de 24 h de incubación bajo luz y aireación continua (Vanhaecke y Persoone, 1981). Se tomaron 10 nauplios y se colocaron en una placa de cultivo celular de 6 pocillos con 5 mL de agua de mar sintética. Se tomó un disco de 7 mm de diámetro de papel Wathman No. 4 que fue impregnado con el extracto de micotoxina (aproximadamente 30 µL/disco), al que se le evaporó totalmente el solvente, y posteriormente se colocó en la placa con los nauplios. Cada prueba se realizó por triplicado. Los bioensayos fueron incubados a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24 h. Al final del tiempo de incubación, las placas fueron examinadas bajo un microscopio estereoscópico y los nauplios muertos fueron contabilizados. Finalmente fue determinado el grado de toxicidad midiendo el porcentaje de mortalidad con respecto a un control sin extracto; se utilizó la siguiente fórmula:

$$M(\%) = \left[\frac{Nt - Nc}{Nc}\right] X\ 100 \qquad (1)$$

Donde *M* es el porcentaje de mortalidad de nauplios, *Nt* y *Nc* son los nauplios muertos en la prueba y en el control respectivamente. La toxicidad de los extractos se evaluó tomando el criterio reportado por Harwing y Scott (1971): 0 a 9 % de mortalidad de nauplios: no tóxico

(NT); 10 a 49 % de mortalidad: ligeramente tóxico (LT); 50 a 89 % de mortalidad: tóxico (T); 90 a 100 % de mortalidad: muy tóxico (MT).

Análisis de micotoxinas. Después de realizado el bioensayo, los extractos se volvieron a evaporar a sequedad para posteriormente ser reconstituidos nuevamente con 1 mL de una mezcla de acetonitrilo/agua/ácido acético (79/20/1), filtrados (Acrodisc® PTFE) y analizados por Cromatografía Líquida de Alta Precisión acoplada a Masas (HPLC-MS) en un equipo Shimadzu (UFLC Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado con una columna 50 X 2.1 mm, (Kinetex 2.6 µ, C 18; Phenomenex, Germany) a 45 °C. Tanto la elusión en modo gradiente como la detección se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo propuesto por Vishwanath *et al.* (2009) en el análisis de multitoxinas.

Microcalorimetría Isotérmica. Para evaluar el grado de toxicidad, se realizó un estudio por microcalorimetría isotérmica de 6 canales TAM III (TA Instruments, Waters LLC. New Castle, DE), previamente calibrado a 24 h a 25 °C, para medir el flujo de calor de los nauplios, utilizando para ello nauplios de *A. salina*. Se utilizaron extractos previamente analizados del cultivo líquido en CL de *A. carbonarius* a pH 5.5 a 25 °C, y del cultivo sólido en AL de *A flavus* a pH 4.0 y 30 °C. Estos se escogieron por su diferente contenido en micotoxinas. Por otro lado, fueron eclosionados nauplios de *A. salina* por el método anteriormente descrito (Vanhaecke y Persoone, 1981). El extracto del cultivo evaporado se reconstituyó con 1 mL de cloroformo y se prepararon diluciones decimales (1:10, 1:100, 1:1000). De los 6 viales del microcalorímetro, en el primero se colocó 1 mL de agua de mar estéril (vial blanco); en el segundo se colocó 1 mL de agua de mar estéril y se agregó un nauplio de *A. salina* (vial control). Del tercer al sexto vial, se agregó primero 20 µL de cada una de las diluciones del extracto del cultivo, comenzando con el extracto crudo y se dejó evaporar completamente el solvente en un flujo de aire. Una vez evaporado, se agregó 1 mL de agua de mar estéril y un nauplio de *A. salina*. Los viales fueron sellados y colocados en los canales del microcalorímetro para las mediciones. Se registró el flujo de calor continuo durante 72 horas. Las muestras se analizaron por duplicado. Para determinar el efecto de las micotoxinas presentes en el extracto del cultivo sobre el nauplio de *A. salina*, se examinaron las curvas de flujo de calor activo, comparado con el flujo de calor del control no tratado del nauplio. La

medición del flujo de calor activo liberado en el tiempo por el nauplio, durante su metabolismo, forma un línea recta (Y = kX + b). La pendiente de la recta que se forma en esta etapa de flujo de calor indica la velocidad constante de crecimiento k es medido en nW/h (Braissant *et al.*, 2010). Este parámetro se ve afectado cuando el nauplio de *A. salina* se enfrenta a sustancias tóxicas. El efecto inhibitorio del extracto del cultivo sobre un nauplio de *A. salina*, se define con la siguiente fórmula:

$$I\ (\%) = \left[\frac{(Ko - Kc)}{Ko}\right] * 100 \qquad (2)$$

Donde K_0 (nW/h) representa la constante de crecimiento del nauplio de *A. salina* del control, y K_c (nW/h) indica la constante de crecimiento del nauplio cuando se le adiciona al sistema el extracto de la micotoxina a una determinada concentración *c*. *'I'* indica el grado de inhibición de que ejerce el extracto (Zhao *et al.*, 2013).

Análisis estadístico: Para determinar La significancia estadística en la síntesis de micotoxinas, primero se llevó a cabo un análisis por medio de ANOVA multifactorial para determinar las diferencias entre las temperaturas y tiempo de incubación de los mohos en la síntesis de cada una de las micotoxinas cuantificadas. Al ser variables de carácter heterogéneo, se analizaron luego los datos por el método de componentes principales. Por último, se analizaron las correlaciones existentes entre las micotoxinas sintetizadas bajo las diferentes condiciones estudiadas para determinar su comportamiento.

6.3 Evaluación de las condiciones de pH y temperatura para la síntesis de micotoxinas.

Se realizó un diseño multifactorial con tres niveles para evaluar el efecto del pH y la temperatura en la síntesis de micotoxinas. Los rangos de valores a analizar fueron de 4.0, 5.5 y 7.0 para el pH, y 20, 25 y 30 °C para la temperatura. Las variables fueron codificadas para facilitar el análisis por regresión múltiple utilizando el método de superficie de respuesta (SR) aplicado a la optimización de dos variables, con el programa StatGraphics Centurion XV.II (Maryland, USA).

Se prepararon, por triplicado, placas de Agar limón (AL) utilizando HCl 1M o NaOH 1M para el ajuste del pH, las cuales fueron inoculadas al centro con 15 µL de la suspensión de esporas de cada uno de los mohos. Se utilizó Agar Dextrosa Sabouraud como referencia. Para cada valor de pH fueron incubados lotes de placas a 20, 25 y 30 °C. El tiempo de incubación, en todos los casos, fue de 10 días. Al final de la incubación se realizó la extracción de micotoxinas con el método anteriormente descrito. Se midió el grado de toxicidad por medio de bioensayo con *A. salina* por el método descrito anteriormente.

Extracción de micotoxinas. Para la extracción de micotoxinas, cada muestra (tres placas de Petri por cada réplica) se pesó el agar con el moho y se colocó en un vaso de vidrio, donde se molió con 2.5 veces su peso en cloroformo (FDA-BAM; 2001), posteriormente se filtró (papel filtro Wathman No. 4) y se evaporó a sequedad. El residuo se reconstituyó con 1 mL de cloroformo para la realización de los bioensayos de toxicidad en *A. salina.*

Expresión de los genes *aflL* y *FUM1* positivos a la producción de micotoxinas en *A. niger* mediante el uso de RT-PCR.

Se utilizó el método de RT-PCR para amplificar los genes *Afl*L, *FUM*1 y *EF1*-A (gen del factor de elongación alfa de expresión constitutiva) para la cepa *A. niger* 24. Se utilizaron los cebadores AnEF1AqPCR151, AfVerBqPCR204 y AnFUM1qPCR185 respectivamente (Tabla VI), diseñados con el programa Primer3Plus (en línea) utilizando secuencias de ARNm que participan en estos pasos durante la biosíntesis, reportados en la base de datos pública NCBI. Se verificó la calidad del diseño del cebador con el programa OligoEvaluator (Sigma-Aldrich, en línea). Se realizaron cultivos en ADP (Bioxon) ® de la cepa *A. niger* 24, durante cinco días, en dos diferentes condiciones: temperatura ambiente (25 ± 3 °C a pH 4.5 como tratamiento problema; y 30 °C a pH 5.5 como tratamiento control). La extracción del ARN se realizó con el FastRNA Red Kit® (MP Biomedicals, USA), mientras que el cDNA fue obtenido con el GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) según las instrucciones del fabricante.

Tabla VI. Secuencias (5'-3') de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de RT-PCR en *A. niger* para genes micotoxigénicos *aflL* y *FUM*1 que interviene en la síntesis de aflatoxina y fumonisina respectivamente.

Gen amplificado	Nombre	Secuencia 5'-3'
Factor de elongación *EF*1-alpha	AnEF1AqPCR151	tcc ccc aag ttc atc aag tc cct tga taa cac cga cag ca
Cetorreductasa	AnVerBqPCR	caa ctt tac tca cgc cga ca cca gtc ttg ccc aca tcc
Policetona sintetasa (PKS) (*FUM*1)	AnFUM1qPCR185	agg gtc agc gtc aac tcg cgc act tcc atc ttc atc g

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real Rotor Gene AMP 6000 system (Corbet Life Science, Australia), utilizando "SYBR® Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems, USA). Esta mezcla incluye las cantidades predeterminadas de enzima 'AmpliTaq Gold® DNA Polymerase', dNTPs, $MgCl_2$ y el tampón de PCR, e incorpora el colorante SYBR Green I que detecta ADN de doble hélice, intercalándose en ella y generando una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. Las muestras se amplificaron por triplicado. Las condiciones para la amplificación para todos los genes analizados fueron: un ciclo inicial de 10 minutos a 95 ºC (activación enzimática), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 ºC y 1 minuto a 60 ºC (desnaturalización y extensión). En todos los análisis, se incluyeron controles negativos carentes de ADNc.

El método utilizado para analizar los datos de este estudio fue el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$, o método de cuantificación relativa de los niveles de expresión del gen problema (*aflL* y *FUM*1) respecto del gen endógeno o constitutivo (*EF1*-A) (Livak *et al.*, 2001). El gen *EF1*-A se utilizó para normalizar la cantidad de mRNA del gen problema (*AflL* y *FUM*1) por diferencias en la cantidad total de ADNc en cada reacción.

El método consiste en determinar el valor de ΔCT restando la media de los valores de CT obtenidos para el gen endógeno de la media de los valores de CT del gen problema. El CT (ciclo de umbral) es el número de ciclos en que la cantidad de objetivo amplificado alcanza un umbral fijo, indicando que los productos de PCR son detectables. El valor de ΔΔCT se obtiene restando cada ΔCT al valor de ΔCT de un control, que es la muestra utilizada como

base o referencia (muestra cultivada a 30°C y pH 5.5), para obtener el valor relativo de las demás muestras. Su desviación estándar se calcula aplicando la fórmula: $(S_1^2 + S_2^2)^{1/2}$; donde S^1 y S^2 son las desviaciones estándar de la media de los valores de CT obtenidos para el gen problema y el gen endógeno, respectivamente. Al ser una resta de un valor arbitrario, la desviación del ΔΔCT es la misma que la del ΔCT. Una vez obtenidos estos valores, la cantidad de un gen problema, normalizado a una referencia endógena y relativa a un calibrador, se obtiene mediante la fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001).

6.4 Determinación de la bioacumulación de micotoxinas sobre el limón Persa

Se utilizaron las cepas *A. niger* 24 y *A. carbonarius* 40 para esta etapa del estudio, de los cuales se preparó una suspensión de esporas, descrito anteriormente. Se adquirió limón Persa en un mercado local sin tratamientos de protección postcosecha. Se lavó y se desinfectó por inmersión, agitando suavemente, en una solución de NaOCl (1 %) durante dos minutos. Los frutos se enjuagaron tres veces con agua estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 h. A cada fruto se le realizó una herida (3 mm de largo y 1 mm de profundidad) con la ayuda de un escalpelo estéril, seguido de la inoculación de 15 µL de la suspensión de esporas del moho (10^6 esporas/mL) y fueron incubados durante 10 días a 25 °C. Después de la incubación se caracterizó la infección y las diferentes partes del limón fueron separadas y pesadas: flavedo, albedo, los septos del calpelo y los tricomas con el jugo. Se colocaron en un matraz para la extracción de micotoxinas, de la forma descrita anteriormente.

La incidencia de la enfermedad se midió en base al número de limones infectados sobre el total de frutos inoculados, utilizando la fórmula siguiente:

$$I(\%) = [{}^{Li}/_{Lt}] * 100 \qquad (3)$$

Donde *I* (%) en la incidencia de la infección; *Li* es el número de limones infectados con la pudrición, y *Lt* es el número total de limones calculada en base al número de frutos con pudrición. La severidad de la enfermedad se evaluó de forma relativa a partir del diámetro

de la lesión: de 2 a 10 mm: severidad baja; de 11 a 30 mm: severidad media; un diámetro mayor de 30 mm: severidad alta.

6.5 Control de mohos micotoxigénicos

Modelización del crecimiento de mohos.

Se utilizaron las cepas *A. niger* 02, *A. niger* 24, *A. niger* 33, *A. niger* 36, *A. niger* 37 aisladas de la filosfera de cítricos (Ascencio, 2012). Las cepas se cultivaron en placas de Petri con Agar Dextrosa Papa (ADP) Bioxon ® durante 7 días a 25 °C hasta obtener cultivos altamente esporulados de las cuales se preparó una suspensión de aproximadamente 10^6 esporas/mL en una solución acuosa de Tween-80 (0.01 %) utilizando una cámara de Newbauer® (Germany) para la contabilización de las esporas. La suspensión final se diluyó hasta obtener una concentración aproximada de $5x10^3$ esporas/mL, dando como inóculo bajo inicial de aproximadamente 50 esporas en 10 µL (Huchet *et al.*, 2013).

Placas con Agar limón (pH 5.5 ± 2) se inocularon, por triplicado, al centro con 10 µL de la suspensión diluida de esporas de cada uno de los mohos. Se incubaron en contenedores herméticos a temperaturas de 8 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C y 40 °C. Los cultivos se observaron registrando el tiempo en que se hace visible la colonia, después diariamente. Se midió y se registró el diámetro de crecimiento en mm utilizando una regla y sin abrir las cajas. Las mediciones se realizaron el tiempo necesario hasta alcanzar un máximo de 45 mm, considerándose el diámetro inicial de la gota de inóculo de 2/3 mm (Huchet *et al.*, 2013).

Modelos matemáticos. La modelización se realizó en dos etapas: la obtención del modelo primario donde se estiman los parámetros cinéticos de velocidad máxima de crecimiento, la fase lag, y el tiempo en que aparece la colonia, y del modelo secundario para cuantificar el efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos obtenidos.

Para obtener el modelo primario, se obtuvieron gráficos de velocidad de crecimiento contra el tiempo de incubación por medio de regresión no lineal utilizando el modelo de Baranyi (1994) para el ajuste de los datos:

$$R = R_0 + \mu A - \ln\{1 + \frac{[\exp(\mu_{max}A)-1]}{\exp(R_{max}-R_0)}\} \qquad (4)$$

Donde

$$A = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}}\right)\ln[\exp(-\mu_{max}t) + \exp(-\mu_{max}\lambda) - \exp(-\mu_{max}t - \mu_{max}\lambda) \qquad (5)$$

En la ecuación, R es el radio de la colonia (mm); R_0 es el radio de la colonia al tiempo t = 0, R_{max} es el radio máximo de la colonia en las cajas de Petri, y *A* es una integral variable que va desde 0 a t en función de la curvatura de la gráfica: μ_{max} (mm/d) es la velocidad de crecimiento máxima; λ (d) es el tiempo lag y *t* (d) es el tiempo. El ajuste de la curva se realizó utilizando el algoritmo Marquardt en el programa StatGraphics Centurion XV.II (Maryland, USA) con 95 % de confianza (Baranyi *et al.*, 1994; García *et al.*, 2009).

A partir de este modelo, utilizando la función Solver de Mycrosoft Excell® se obtiene el tiempo necesario para que la colonia se haga visible (t_v) después de su fase lag, asumiendo que el diámetro visible a simple vista es de 2 mm.

El modelo predictivo secundario para describir la fase de crecimiento se realizó utilizando el Modelo Cardinal con Inflexión (CMI) propuesto por Rosso y Robinson (2001) (6), donde la velocidad μ_{max} a una temperatura dada T se calcula a partir de los valores cardinales de las temperaturas (T_{min}, T_{opt} y T_{max}) (García *et al.*, 2009).

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{opt}(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{(T_{opt}-T_{\min})\{(T_{opt}-T_{min})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min}-2T)\}} \qquad (6)$$

Para el tiempo en que se hace visible la colonia se parte del mismo modelo asumiendo que t_v puede ser calculado sustituyendo en la ecuación $1/\lambda_{max}$ y $1/\lambda_{opt}$ por $1/t_{v\ otp}$ y $1/t_{v\ max}$ respectivamente (7).

$$1/tvmax = \frac{\frac{1}{tv_{opt}}(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{T_{opt}-T_{\min})\{(T_{opt}-T_{min})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min}-2T)\}} \quad (7)$$

Finalmente, para entender el comportamiento del moho en la superficie de los limones y determinar la sensibilidad del modelo, se llevó a cabo la infección de limón Persa (*C. latifolia* T.) a diferentes temperaturas. Los frutos fueron desinfectados con NaOCl (1%, v/v) agitando suavemente durante dos minutos y se enjuagó con agua destilada estéril. Se realizó una herida de tres mm de largo por un mm de profundidad utilizando un escalpelo estéril, seguido de la inoculación con 10 µL de una suspensión de 5X103 esporas/mL de la cepa *A. niger* 24. Una vez inoculados, lotes de 10 limones por tratamiento fueron incubados en cámaras con atmósfera saturada (HR = 85 – 95 %) a 25, 30, 35 y 37 °C, temperaturas dentro del rango utilizado en el modelo. Cuando un micelio de 2 mm fue observado, el tiempo de aparición fue registrado y comparado con el tiempo de aparición obtenido por el modelo, luego se registró el diámetro de la colonia diariamente durante 10 días. El radio de la colonia fue graficado contra el tiempo y los datos fueron ajustados al modelo de Baranyi (1994) previamente descrito. Para evaluar el desempeño del modelo se utilizó el método descrito por Ross (1996) mediante la siguientes fórmulas:

$$Bf = 10^{[\Sigma(Log(\mu pred/\mu obs)/n]} \quad (8)$$

$$Af = 10^{[\Sigma|(Log(\mu pred/\mu obs)|/n]} \quad (9)$$

Donde el factor de sesgo *Bf* indica qué tan alejado están los valores observados de la línea de equivalencia, y en concordancia perfecta entre los valores predichos y observados, Bf =1.0. El factor de precisión *Af* es la medida promedio de la desviación entre las predicciones y las observaciones. Para un mayor valor de Af, menor es la precisión del modelo (Ross, 1996).

Inhibición de mohos micotoxigénicos con levaduras marinas.

Antagonismo de la levadura contra los mohos *in vitro*

Cepas utilizadas. Se utilizaron las cepas patógenas y micotoxigénicas *A. alternata* 35a; *A. carbonarius* 40 y *A. niger* 24. Las cepas fueron cultivadas en ADP (Bioxon®), de las cuales se prepararon suspensiones de esporas a diferentes concentraciones aproximadas (10^2, 10^4, 10^6 esporas/mL) por los métodos anteriormente descritos. En el caso particular de *A. alternata*, el ensayo de antagonismo se realizó utilizando un cuadro de aproximadamente 3 mm^2 del micelio de un cultivo puro en ADP, en lugar de las diluciones de esporas. La levadura antagónica fue *D. hansenii* DHH03 aislada de ambientes marinos, cultivada en caldo YPD (por cada 1000 mL: Extracto de levadura, 10 g; Peptona 20 g; Dextrosa 20 g; pH 6.5 ± 0.3, durante 24 h a 100 rpm) a partir de un cultivo previo en agar YPD. Se prepararon suspensiones a tres distintas concentraciones (10^6, 10^4 y 10^2 cel/mL).

Ensayo de antagonismo. Por extensión en superficie, placas de agar YPD fueron inoculadas con 20 µL de cada una de las suspensiones de levaduras y se incubaron durante 8 h a 25 °C. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron de manera puntual tres inóculos de 20 µL de la suspensión de esporas a diferentes concentraciones de cada uno de los mohos previamente seleccionados. Finalmente, las placas se incubaron durante 7 días a 25°C, al final se midieron diámetros de crecimiento. Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición con respecto al crecimiento normal del moho sin levadura como control, utilizando la siguiente fórmula:

$$I = \left[\frac{(Dc - Dx)}{Dc}\right] * 100 \qquad (10)$$

Donde *I* es el porcentaje de inhibición que ejerce la levadura sobre el moho; *Dc* es el diámetro de crecimiento del moho control y *Dx* es el diámetro de crecimiento del moho inhibido.

Determinación de la posible actividad killer de *D. hansenni* contra los mohos micotoxigénicos

Preparación del medio killer. La levadura *D. hansenii* DHH03 fue cultivada en caldo YPD suplementado de 3 % de NaCl (w/v) (Llorente *et al.*, 1997) y ajustado a pH 5.0 ± 0.3 con buffer citrato-fosfato (ácido cítrico [0.1 M] + Na_2HPO_4 [0.2 M]) (Santos y Marquina, 2004). Se incubó a 25 °C durante 48 h, el sobrenadante fue separado por centrifugación a 402 x *g*

durante 15 min y se filtró (filtro 0.2 ThermoScientific Nalgene Syringe filter). Con el sobrenadante se prepararon placas de YPD pH 5 en proporción 1:1 (v/v) del agua que se utilizó en la preparación del medio.

Ensayo de actividad killer. Las placas de agar YPD fueron inoculadas puntualmente con 20 µL de suspensión de esporas a diferentes concentraciones (10^2, 10^4 y 10^6 esporas/mL) de los mohos micotoxigénicos *A. carbonarius* y *A. niger*. Para *A. alternata* se inoculó la porción de micelio anteriormente descrito. Las placas fueron incubadas durante 7 a 10 días. Se reportó en porcentaje de inhibición con respecto a un control sin sobrenadante utilizando la fórmula previamente descrita en la ecuación 8.

Ensayo de absorción de micotoxinas por la levadura *D. hansenii.* Se seleccionaron extractos representativos de cada uno de los mohos analizados: *A. niger, A. carbonarius* y *A. alternata* con concentraciones conocidas de micotoxinas. Por otra parte, se cultivó *D. hansenii* en caldo YPD (pH 6) a 25 °C, 100 rpm durante 72 h. Pasado este tiempo, las células fueron lavadas en buffer fosfato (solución 'A': $NaHPO_4.H_2O$, 2.26 %; solución 'B': NaOH, 2.52 %. Se mezclan 41.5 mL de la solución 'A' con 8.5 mL de la solución 'B'; pH final: 7.3) y ajustado a 10^9 cel/mL, aproximadamente. En otro tubo se agregaron 25 µL del extracto del cultivo del moho seleccionado, previamente diluido en cloroformo (1 mL) y se evaporó el solvente bajo flujo de aire. Se agregó 1 mL de la suspensión de levadura y se mezcló vigorosamente. Los tubos fueron incubados a 25 °C en agitación (200 rpm) durante 3 h. Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 1118 x *g* durante 15 min y se colectó el sobrenadante (Shetty *et al.*, 2007). Con el sobrenadante se realizaron los bioensayos de toxicidad con nauplios de *A. salina*. Se realizaron pruebas con la levadura sola (control negativo), además de las micotoxinas solas (control positivo).

Protección in vivo del limón Persa (Citrus latifolia T.) con levaduras marinas.

Cepas utilizadas. Se utilizaron las cepas micotoxigénicas *A. carbonarius 40* y *A. niger* 24, de las cuales se prepararon suspensiones de 10^4 esporas/mL, aproximadamente. Como antagonista se utilizó la cepa *D. hansenii* Dhh03. Se realizó un cultivo en caldo YPD suplementado de NaCl (3 % w/v), ajustado el pH a 5.0 ± 3 con buffer citrato-fosfato (Santos

y Marquina, 2004). La levadura fue incubada a 25 °C durante 24 h. Se centrifugó (45 x *g*, 15 m) y se filtró (Thermo Scientific Nalgene Syringe filter 0.2 µm). Del precipitado se preparó una solución de 10^6 cel/mL, y el del sobrenadante se preparó una dilución 1:1 (v/v) con agua destilada estéril.

Por otro lado, limón Persa fue adquirido de un mercado local, sin tratamiento protector, con un grado comercial de madurez, sin heridas ni infecciones y de tamaño uniforme. La superficie del limón se lavó y se desinfectó con NaOCl (1 %) agitando suavemente durante 2 min. Se enjuagó tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 h.

Actividad de la levadura y del sobrenadante crudo de su cultivo, contra los mohos patógenos productores de micotoxinas, sobre limón Persa. Se tomaron lotes de 10 limones, y por duplicado se realizaron pruebas de inhibición, primero: inhibición de los mohos por la levadura, y segundo: inhibición de los mohos por el sobrenadante. A cada limón tratado se le realizó una incisión de 3mm de largo por 1 mm de profundidad con un escalpelo estéril y se inoculó con 20 µL de la suspensión de esporas del moho en cuestión. Para la inoculación de frutos, se realizaron los tratamientos que se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Tratamientos realizados en el limón Persa para determinar la protección *in vivo* con las levaduras marinas o con la toxina killer.

Tratamiento	Estatus
Limón Persa sin tratamiento	Control
Limón + levadura marina	Testigo negativo
Limón + sobrenadante del cultivo	Testigo negativo
Limón sin levadura ni sobrenadante + moho	Testigo positivo
Limón + levadura + Moho	Problema
Limón + sobrenadante del cultivo + moho	Problema

Cada uno de los tratamientos fueron incubados en cámaras húmedas a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) y humedad relativa del ambiente entre 85 y 90 % durante 21 días. Al final de la

incubación se caracterizó el tipo de lesión si ésta apareció, y se midió la incidencia con respecto al número total de limones infectados.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de mohos potencialmente micotoxigénicos aislados de cítricos.

De las 17 cepas fitopatógenas analizadas, tres presentaron secuencias que participan en la síntesis de micotoxinas. Una de ellas fue la cepa 35a de *A. alternata* (GeneBank: HQ014678.1), que fue positiva al gen *PKS*, el cual codifica la poli-condensación de cetonas en la producción de melanina; la cepa 24 de *A. niger* (GeneBank: GU082483.1) resultó positiva tanto a la secuencia del gen *FUM*1 que codifica la enzima Pks participante en la biosíntesis de fumonisinas así como a la de *aflL* (antes *VerB)* participante en la biosíntesis de aflatoxinas (Fig. 3) y la cepa 40 de *A. carbonarius* (GeneBank: FJ629325.1) resultó positiva a la secuencia que codifica la enzima *Pks* que intervienen la biosíntesis de ocratoxina A en *Aspergillus* ocratoxigénicos.

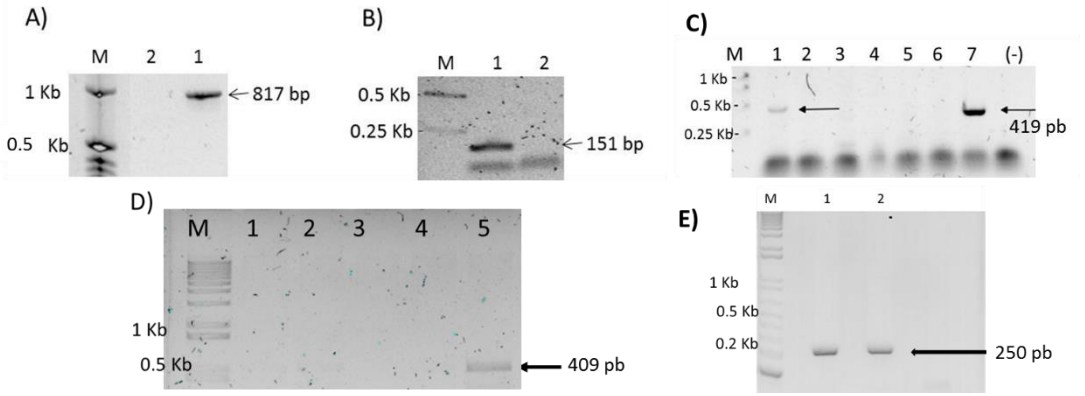


Figura 3. Identificación de secuencias de los genes *PKS-A*, *FUM1*, *aflL* y *PKS*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. *A. alternata* (A y B); *A. niger* (C y D) y *A. carbonarius* (E). Carril M: marcador de peso molecular 1 Kb (Promega ®) en todos los casos. Las flechas indican el tamaño del producto esperado. A) y B): Carril 1*: A. alternata*; carril 2: control negativo; Primers: AaPKS-TEand AaPKS respectivamente. C): Carril 1: *A. niger*-24, carril 2: *A. niger*-29; carril 3: *A. niger*-31; carril 4: *A. niger*-32; carril 5: *F. equiseti*-18; carril 6: *F. equiseti*-19: Carril 7: *M. fragilis*; Primers: GmFUM1. D): carril 1: *A. japonicus*, carril 2: *A. niger*-32, carril 3: *A. flavipes*, carril 4: *A. Tamarii*, carril 5: *A. niger*-24; Primers: AfVerB. E): Carriles 1 y 2: *A. carbonarius*, primers: AoPKS.

Solamente las secuencias para los genes *Afl*L (*Ver*B) y *FUM*1 en *A. niger* se confirmaron por qPCR y se demostró la síntesis de las micotoxinas en cuestión: aflatoxinas (AF) y fumonisina (FB) respectivamente.

7.2 Capacidad de síntesis de micotoxinas de los mohos fitopatógenos con potencial micotoxigénico.

Desarrollo del medio de cultivo a base de pericarpio de limón. La formulación del medio conteniendo ambos albedo y flavedo de limón, al que llamamos agar limón, permitió **MEJOR** desarrollo y esporulación en todos los mohos cultivados (Fig. 4). Este medio sólido se utilizó para la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento. El agar limón (**AL**) contiene por cada 1000 mL, 57.5 g de pericarpio de limón fresco molido finamente y 15 g de agar. El pH fue de 5.5 ± 0.2. La excepción, para el cultivo de *P. italicum* con la utilización únicamente el albedo de limón Persa, ya que éste resultó el sustrato en el que mostró su mejor desarrollo característico junto con un alto grado de esporulación y se le denominó agar albedo (**AA**). Para las cinéticas se utilizó caldo preparado con las mismas proporciones de albedo y flavedo, excepto el agar, a los que se les llamó caldo limón (**CL**) y caldo albedo (**CA**), este último para el cultivo de *P. italicum*. En los diferentes mohos utilizados se observó un desarrollo característico en AL. *A. alternata* mostró colonias planas algodonosas de color café oscuro, borde bien definido con micelio aéreo algodonoso y reverso negro. *A. carbonarius* presentó colonias granulosas color negro, borde irregular, superficie rugosa con esporas grandes y visibles. Para *A. niger* las colonias fueron granulosas, negras, borde irregular y de superficie rugosa elevada, esporas más pequeñas y visibles.

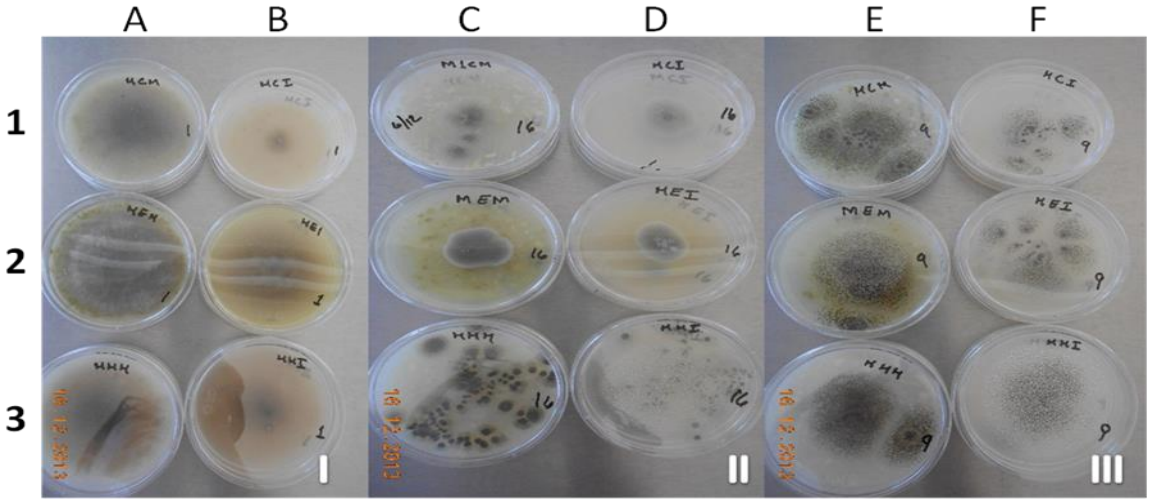


Figura 4. Crecimiento de algunos mohos en diferentes medios de cultivo AL ensayados. I- *A. alternata*: 1A: pericarpio molido, 1B: pericarpio infusionado, 2A: flavedo molido; 2B: flavedo infusionado; 3A: albedo molido, 3B albedo infusionado; II – *A. niger*: 1C: pericarpio molido, 1D pericarpio infusionado, 2C: flavedo molido; 2D: flavedo infusionado; 3C: albedo molido, 3D albedo infusionado; III – *P. italicum*: 1E pericarpio molida, 1F pericarpio infusionado, 2E: flavedo molido; 2F: flavedo infusionado; 3E: albedo molido, 3F albedo infusionado.

Evaluación de la actividad micotoxigénica de los mohos fitopatógenos: Cinéticas de producción de micotoxinas en caldo limón (CL). El efecto de la temperatura y el tiempo de incubación en la síntesis de micotoxinas se muestran en la figura 5. Para *A. alternata* existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de micotoxinas, viéndose favorecida a temperatura de 20 °C **(**Fig. 5A) donde mantuvo la tasa de mortalidad en el tiempo con baja variabilidad (12% aproximadamente; $p > 0.05$). *A. carbonarius* (Fig. 5B) genera las micotoxinas en toda la gama de condiciones analizadas ($p > 0.05$). A 25 °C se observa el desarrollo de micotoxinas los primeros 14 días de cultivo, para luego disminuir. A 20 y 30 °C la mortalidad es acumulativa hasta el día 21 de crecimiento, siendo a 30 °C el punto máximo (15.6 %), para descender al 5 % al final del desarrollo. En los extractos de *A. niger*, a 20 °C muestra diferencias significativas con índices de mortalidad de nauplios acumulativas hasta el día 14 (Fig. 5C), donde alcanza el punto máximo (13.3 %) para luego disminuir a medida que avanza el tiempo. A 30 °C las micotoxinas se producen los primeros 7 días después de su inoculación (aproximadamente 8 %), las cuales disminuyen conforme e

desarrollo hasta el día 21, donde se observa un punto de inflexión en el que vuelven a acumularse ($p < 0.05$). A 25 °C se obtiene la mortalidad la más baja de los diferentes tiempos y temperaturas ensayadas.

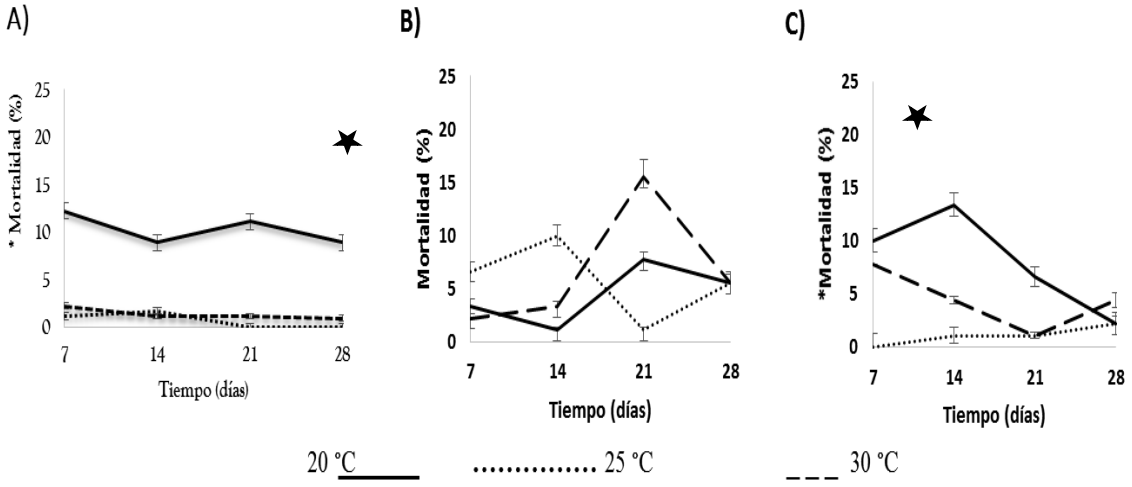


Figura 5. Mortalidad de nauplios de *A. salina* frente a extractos de cultivos estáticos de los mohos en caldo CL, a diferentes temperaturas y tiempos de incubación. A) *A. alternata*; B) *A. carbonarius;* C) *A. niger.* ***** indica que existen diferencias significativas en la mortalidad en las condiciones de temperatura analizadas ($p < 0.05$).

Análisis de micotoxinas por HPLC-MS. El análisis por HPLC-MS permitió la identificación y cuantificación de más de una micotoxina de interés alimentario durante los diferentes tiempos de incubación, entre éstas, aflatoxinas: AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, fumonisina B_1 (FB_1) y algunos antibióticos como penicilina G (PG), cicloheximida (Cy) y cloranfenicol (Chl). Para *A. alternata* (Fig. 6A1), a 20 °C se cuantifican las mayores concentraciones de micotoxinas, mostrando diferencias significativas para AFB_1, AFB_2 y los antibióticos PG y Chl. La síntesis de AFB_1 y AFB_2 se observan en concentración máxima el día 14 (148 y 950 ng/mL) mientras que los primeros siete días se observa la mayor cantidad de AFG_1: 340 ng/mL y AfG_2: 530 ng/mL respectivamente). Todas las AF disminuyen al final de la incubación. Los antibióticos también se sintetizan en cantidades máximas ($p < 0.05$) los primeros días (suma de PG y Chl = 80650 ng/mL) (Fig. 6A2).

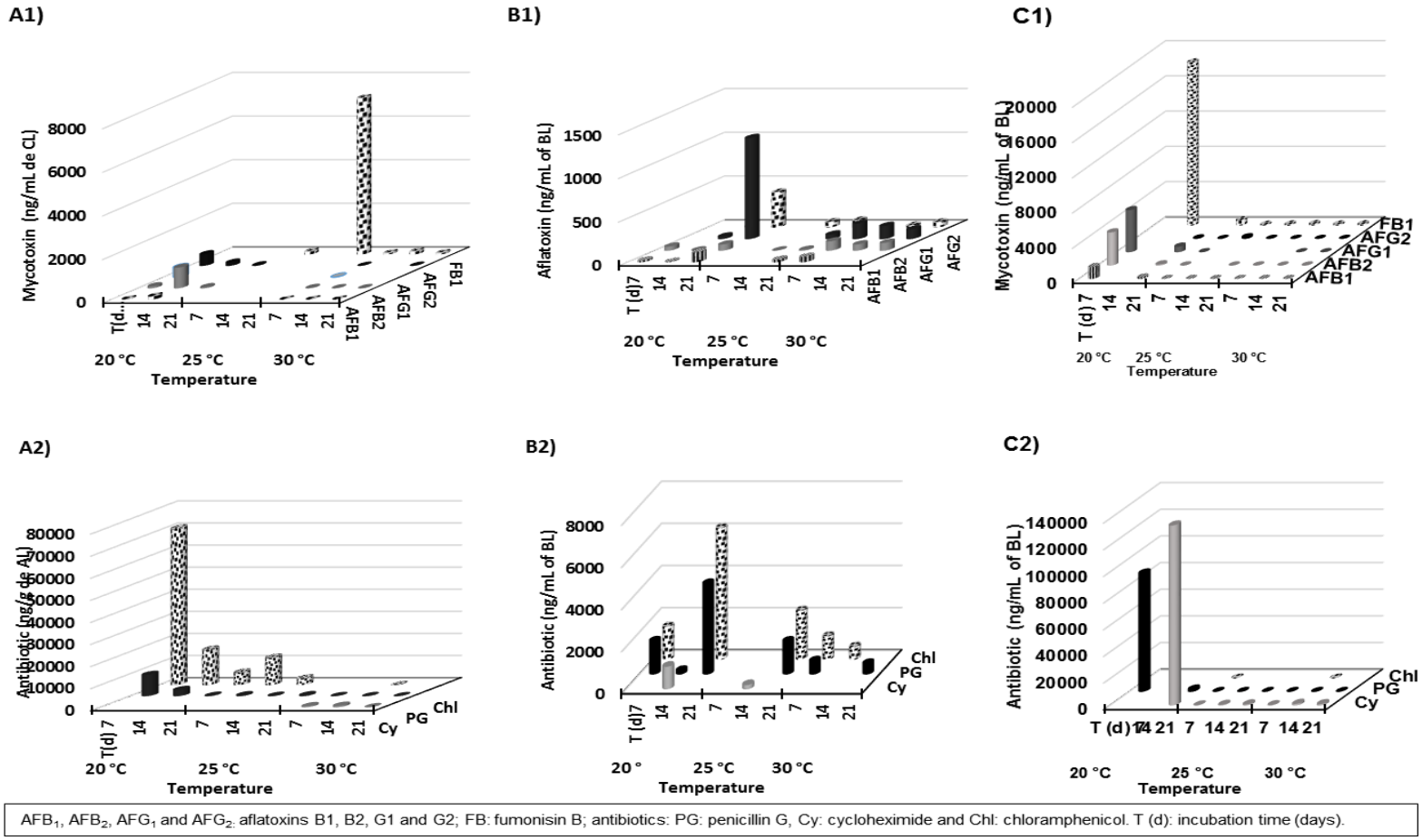


Figura 6 . Síntesis de micotoxinas medidos por HPLC-MS-MS, en caldo CL, a diferentes temperaturas y tiempos de incubación. A1) *A. alternata*, micotoxinas. $p < 0.05$ para FB_1 a 25 °C (día 21). A2) *A. alternata*, antibióticos. $p < 0.05$ para Chl a 20 °C y 7 días de incubación. B1) *A. carbonarius*, micotoxinas. $p < 0.05$ para FG1 a 20 °C (día 21). B2) *A. carbonarius*, antibióticos. $p < 0.05$ para PG y Chl a 20 °C, 21 días de incubación. Coeficiente de correlación (CC) entre las concentraciones de AFt y antibióticos con respecto al tiempo: 0.9 ($p < 0.05$). C1) *A. niger*, micotoxinas. $p < 0.05$ a 20 °C para AFB_1, AFB_2 y AFG1 el día 7, y FB_1 el día 14 de incubación. C2) *A. niger*, antibióticos. p < 005 para PG (día 7) y Cy (día 21) a 20 °C.

El análisis de componentes principales en los datos obtenidos para *A alternata* a 20 °C indica que las micotoxinas sintetizadas de manera preponderante son la AFG_1, AFG_2, y los antibióticos PG y Chl sintetizados en los primeros siete días de incubación (Fig. 7A). Esta técnica descriptiva permite reducir la complejidad debido a la alta variabilidad y al gran número de variables dependientes. El primer componente CP1 es el que explica el mayor porcentaje de la variabilidad de los datos originales y nos indica en qué medida los componentes están influenciados entre sí en esas condiciones, es decir, determina la preponderancia de una micotoxina sintetizada en esas condiciones, con respecto a las otras igualmente sintetizadas. Por otro lado, es a 25 °C donde la FB_1 se cuantifica en mayores cantidades (7167 ng/mL de CL) hasta día 21 de incubación ($p > 0.05$). Existe una correlación positiva ($R^2 = 73.22$; $p < 0.05$) entre las concentraciones cuantificadas de AFt y la suma de los antibióticos, e indican que la mayor síntesis de estos compuestos se lleva a cabo en las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

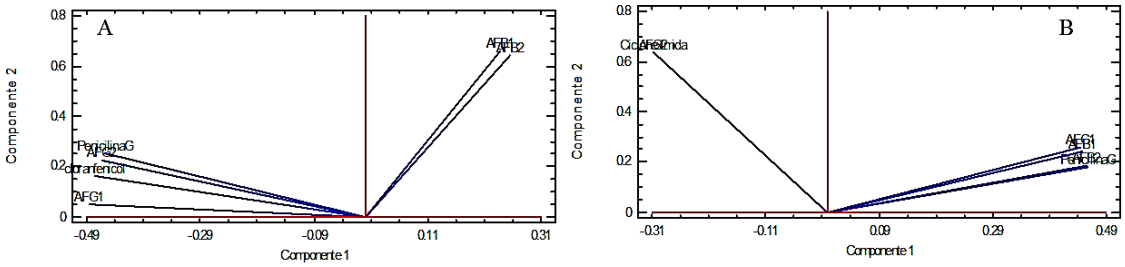


Figura 7. Representación gráfica de los componentes principales en las cinéticas de síntesis de micotoxinas. Datos tomados del análisis de datos de: A) *A.alternata*, a 20 °C, y B) *A. niger* a 20 °C.

En *A. carbonarius* (Fig. 6B1) se observó la presencia de aflatoxinas en todas las temperaturas ensayadas, mostrando solamente diferencias significativas la AFB_2 a 30°C ($p < 0.05$). A 20 °C, las cantidades detectadas en los primeros 7 días de incubación disminuyen para el día 14, y para volver a aparecer y llegar a su punto máximo al final de la incubación, siendo los valores de AFB_1: 113 ng/mL, AFB_2: 71 ng/mL; AFG_1: 1155 ng/mL y AFG_2: 400 ng/mL.

Cantidades más bajas se observaron a 25 y a 30 °C sin que mostraran diferencias significativas ($p > 0.05$). Los antibióticos cuantificados se observan también en las diferentes temperaturas y tiempos de incubación, siendo el máximo para penicilina G y cloranfenicol (4300, 6250 ng/mL respectivamente (Fig. 6B2) al final de la incubación. La máxima concentración de cicloheximida (1070 ng/mL) se observó el día 14 a 20 °C. También existe una correlación positiva entre la suma de las AF y la suma de los otros metabolitos secundarios producidos por *A. carbonarius* ($R^2 = 90.54$; $p < 0.05$), indicando también la mayor síntesis a 20 °C. El análisis de componentes principales en todas las temperaturas analizadas para *A. carbonarius* indican correlaciones similares en todas las micotoxinas cuantificadas, lo cual corrobora que en todas las temperaturas y tiempo de incubación existe una síntesis activa de metabolitos secundarios (datos no mostrados).

En los cultivos de *A. niger* se observó un mayor efecto de la temperatura en la síntesis de micotoxinas (Fig. 6C1 y C2) mostrando diferencias significativas a 20 °C para las aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2, siendo esta temperatura donde ocurre la síntesis máxima (AFB_1: 1340 ng/mL; AFB_2: 3760 ng/mL y AFG_1: 4780 ng/mL), al inicio de la incubación ($p < 0.05$), y sus correlaciones positivas ($R^2 = 99.9$, $p < 0.05$) con respecto a la temperatura y tiempo de incubación. El análisis de componentes principales (Fig. 7B) indican que la AFB_1, AFB_2, AFG_1 y PG son las mayormente sintetizadas por *A. niger* a 20 °C. Las micotoxinas detectadas tienden a desaparecer con el tiempo (día 14) para luego volver a sintetizarse. A 20 °C se obtiene el máximo de FB_1 (18500 ng/mL) en el día 14. Los antibióticos, también se sintetizan en mayor proporción a 20 °C (Cy: 88900 ng/mL, día 7 y PG: 1350000 ng/mL, día 21) ($p < 0.05$).

Análisis por Microcalorimetría Isotérmica. Para el análisis microcalorimétrico, se tomaron extractos producidos en CL a pH 5.5 y 25 °C *A. carbonarius* y *A. flavus* a pH 4 a 30 °C. El contenido de micotoxinas se muestra en la tabla VIII y son representativos de un contenido relativamente alto en aflatoxinas en el caso de *A. flavus*, y *A. carbonarius* con FB_1 en cantidades menores, para ejemplificar el efecto de las micotoxinas, prácticamente solas, o combinadas.

Tabla VIII. Contenido de micotoxinas en los extractos de cultivos en caldo limón (CL) de los mohos fitopatógenos de limón Persa (*C. latifolia* T.) para su uso en microcalorimetría Isotérmica.

Micotoxina	***A. carbonarius***	***A. flavus***
(ng/g de AL)	pH 5.5; 25 °C	pH 4.0; 30 °C
AFB_1	-	115627
AFB_2	-	30414
AFG_1	-	55
AFG_2	-	-
FB_1	427	-
Otras toxinas*	51	1712

*Antibióticos: penicilina G y/o cloranfenicol.

Durante el análisis se observa el efecto inhibitorio que estos extractos provocan en el nauplio de *A. salina*. El extracto crudo de *A. flavus* resultó muy tóxico (I = 98 %), según la escala de Harwing - Scott (1971) con la muerte del nauplio en los primeros minutos del experimento. Las siguientes diluciones del extracto de *A. flavus* mostraron menor grado de inhibición, donde se observan correlaciones negativas ($r = -0.98$, $p > 0.05$) entre el valor del porcentaje de inhibición I que ejerce el extracto, y la dilución decimal del mismo, indicando que la inhibición es menor conforme aumenta el número de diluciones (I = 20 - 0 %) (Fig. 8).

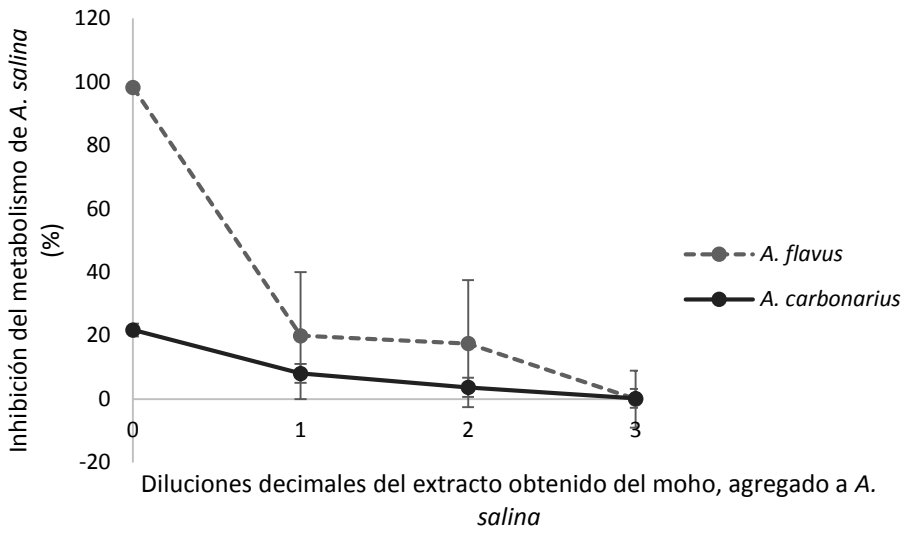


Figura 8. Inhibición de nauplios de *A. salina* por la presencia de micotoxinas medido por microcalorimetría isotérmica. La escala de toxicidad se adaptó según el criterio reportado por Harwing - Scott (1971): 0 a 9 % de inhibición del metabolismo del nauplio: no tóxico (NT); 10 a 49 % de inhibición: ligeramente tóxico (LT); 50 a 89 % de inhibición: tóxico (T); 90 a 100 % de muy tóxico (MT).

El extracto crudo de *A. carbonarius* conteniendo principalmente FB_1, ejerció menor inhibición (I = 22 %), situando al extracto como ligeramente tóxico (LT). La inhibición fue decreciendo (de 8 a 0.22 %) conforme las diluciones ($r = -0.94$, $p > 0.05$), resultando no tóxicas.

7.3 Evaluación de las condiciones de pH y temperatura para la síntesis de micotoxinas.

Resultados obtenidos por bioensayos de mortalidad. El efecto del pH y temperatura en la síntesis de micotoxinas de los mohos analizados, se muestra en las figura 9A-C. Para *A. alternata* (Fig. 9A) se observa mayor mortalidad (3 %) para el extracto obtenido a temperatura de 30 °C y pH 7.0. No se observó mortalidad a pH 4 en las diferentes

temperaturas analizadas. *A. carbonarius* (Fig. 9B) muestra el máximo de mortalidad (7 %) en los extractos del cultivo a 25 °C y pH 5.5. Para *A. niger* (Fig. 9C) la mortalidad de nauplios se observa en un rango más amplio, tanto de pH como de temperatura, siendo el punto máximo para el extracto cultivado a pH 4.0 a 25 °C (10 % aproximadamente).

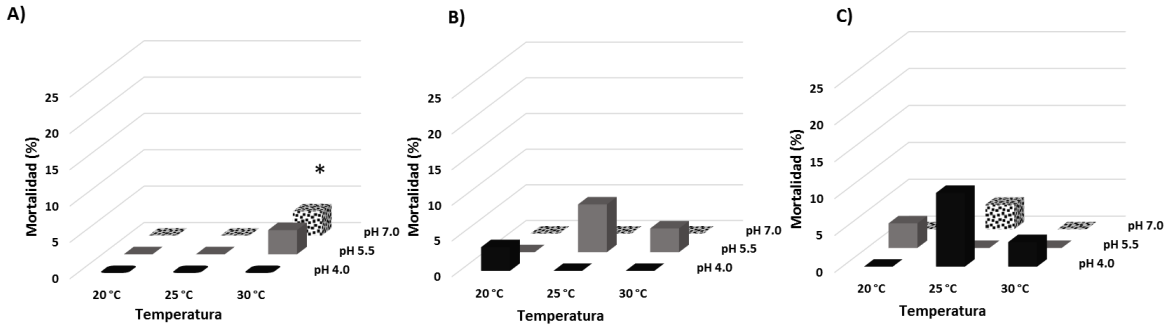


Figura 9. Mortalidad de nauplios de *A. salina* frente a extractos de cultivos de mohos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura en agar limón. *p > 0.05.

El análisis estadístico fue realizado por el método de superficie de respuesta (SR) evaluando el efecto de los factores en su interacción. (Liyana-Pathirana *et al*., 2015). Los factores fueron codificados para facilitar el análisis (Tabla IX) del modelo estadístico ajustado, se obtiene un coeficiente de correlación R^2, el cual explica la variabilidad en la mortalidad, y es utilizado solo con fines estadísticos.

Tabla IX. Niveles codificados codificados para los factores controlados en el análisis estadístico por superficie de respuesta (SR).

Factor	**Código de nivel**		
	+1	0	-1
pH	7.0	5.5	4.0
Temperatura	30 °C	25 °C	20 °C

En este análisis *A. alternata* muestra que solo la temperatura tiene un mayor efecto en la mortalidad de los naplios con significancia estadística ($R^2 = 87.5$; $p < 0.05$). El punto máximo de síntesis calculado fue a pH 7.0 y 30 °C, con una mortalidad óptima calculada de 4 %. (Fig. 10A). Para *A. carbonarius*, el estadístico de SR no arroja diferencias significativas en las diferentes combinaciones de pH y temperatura (Fig. 10B). Se observa un margen considerable alrededor de los valores de cero (codificados para el pH y la temperatura, $R^2 = 48.03$; $p > 0.05$), que en el gráfio el valor cero corresponde a un pH 5.5 y T 25 °C. La mortalidad calculada óptima fue de 5 % en estas condiciones. La prueba por SR para *A. niger* tampoco exhibe diferencias significativas en la combinación de los diferentes factores (pH y temperatura) que favorezca la síntesis de micotoxinas ($R^2 = 53.13$; $p > 0.05$). La mortalidad mantiene valores similares en un amplio margen de pH, a 25 °C (en el gráfico: valor cero en ambos ejes) (CME = 0), lo que indica un mayor efecto de la temperatura en la síntesis de micotoxinas. El punto óptimo calculado (7 % mortalidad; $p > 0.05$; Fig. 10C) fue a pH 4.0 y 25 °C.

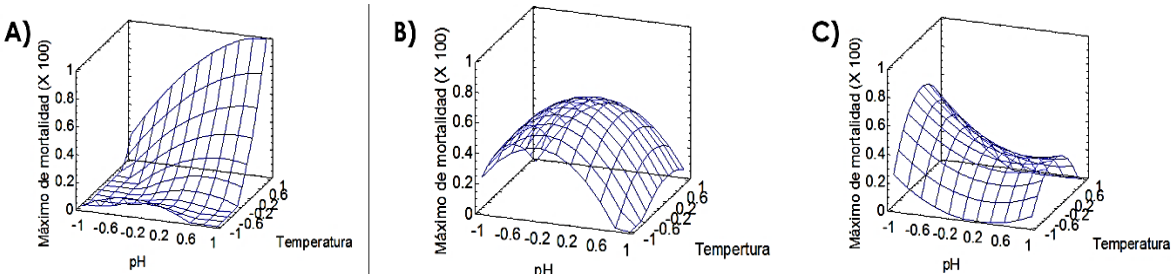


Figura 10. Gráfico de Superficie de respuesta (SR) de la mortalidad de nauplios de *A. salina* frente a extractos clorofórmicos de cultivos de mohos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, en Agar limón. A): *A. alternata*, B): *A. carbonarius* y C): *A. niger*.

Resultados obtenidos por HPLC-MS. En todos los mohos analizados se identificaron y cuantificaron más de una micotoxina de interés alimentario, así como antibióticos. Tanto el pH como la temperatura ejercen influencia en la síntesis, dependiendo del moho y la micotoxina en cuestión.

Para los extractos de *A. alternata* (Fig. 11A1 y A2) se identificaron y cuantificaron aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 (reportadas como AF_t = 110 ng/g de AL) máximo a 20 °C y pH 5.5 con un marcado efecto tanto de la temperatura, como del pH (Levene = 5.7; $p < 0.05$). También están presentes los antibióticos PG y Chl como otros metabolitos secundarios sintetizados en un rango variable de pH y temperatura ($p > 0.05$), siendo la máxima concentración de 52200 ng/g de AL a 30 °C y pH de 4.0. En *A. carbonarius* (Fig. 11B1 y B2), las AF so observa en amplio rango de pH y temperatura, siendo la máxima síntesis de AF_t (2837 ng/g de AL) a 25 °C y pH 7 ($p < 0.05$). También se observaron antibióticos (suma de PG y Chl; $p > 0.05$) en todas las condiciones (mayores: 5052 ng/g; pH 4, 20 °C). Para los cultivos de *A. niger-24* se cuantifican aflatoxinas (reportado como AF_t), un máximo de 447 ng/g a 20 °C, pH 4.0 (Fig. 11C1 y C2). A pH 4.0 se observa que la concentración de AF_t disminuye conforme aumenta a la temperatura ($r = 0.75$; $p < 0.05$). Los antibióticos PG y Chl también están presentes en máxima proporción a pH de 7 y 25 °C (34840 ng/g).

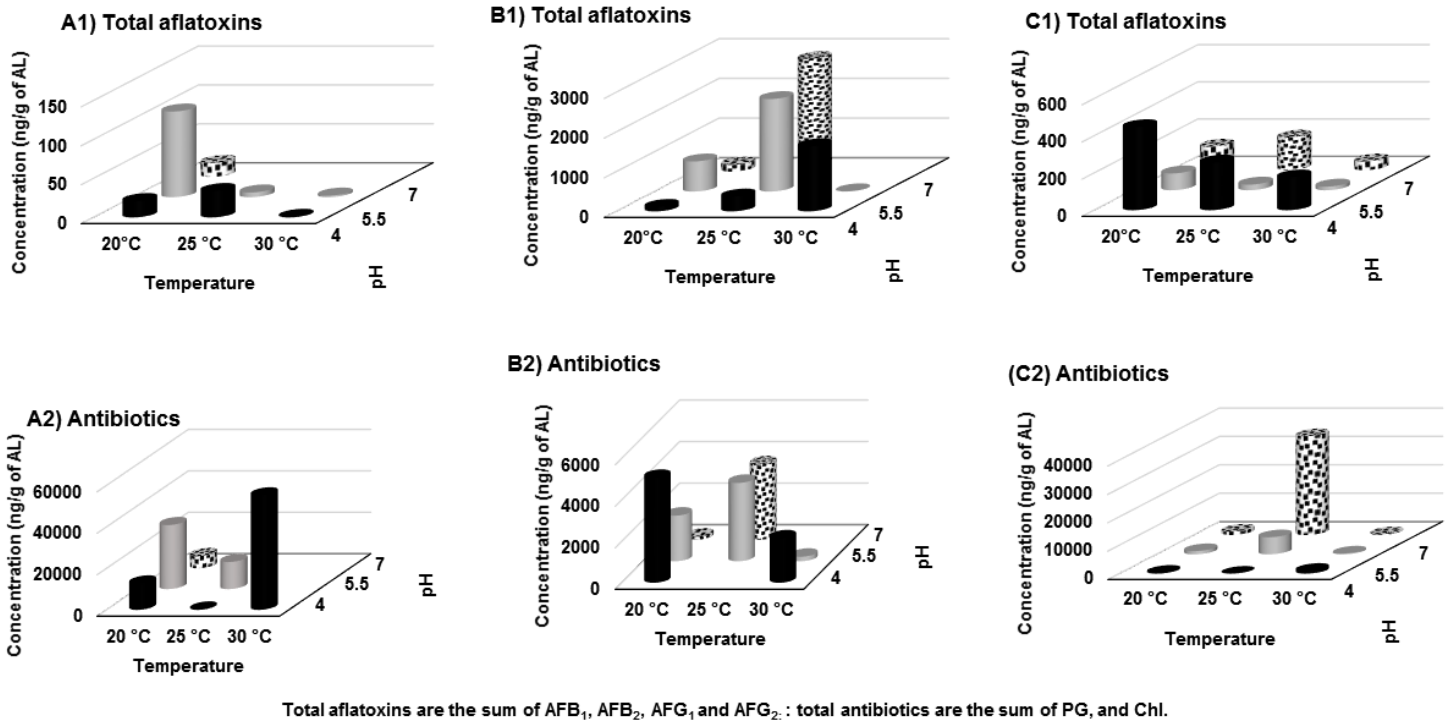


Figura 11. Síntesis de micotoxinas en medio AL a diferentes condiciones de pH y temperaturas, medidos por HPLC-MS. Las aflatoxinas totales (Af_t) es la suma de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2. Los antibióticos es la suma de penicilina G, cicloheximida y cloranfenicol. A1): Contenido total de aflatoxinas (Af_t): $p < 0.05$ at 20° C, pH 5.5. A2): Antibióticos: $p > 0.05$. B1): Contenido de aflatoxinas (Af_t): ($p < 0.05$) at 25° C, pH 7.0. B2): Antibióticos, ($p > 0.05$). C1): Contenido de aflatoxinas totales (Aft): ($p < 0.05$) at 20° C, pH 4.0. C2): Antibióticos, ($p < 0.05$) at 25° C, pH 7.0.

Expresión de los genes aflL y FUM1 que participan en la biosíntesis de micotoxinas en *A. niger*.

En la figura 12 A y B se muestra la expresión relativa de los genes *aflL y FUM*1 de la cepa *A. niger*-24 cultivada a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) y pH 4.0, condiciones en que se observó la mayor cantidad, en suma, de micotoxinas. Los valores obtenidos para ambos genes fueron normalizados con los valores obtenidos para el gen *EF1*A. El valor del gráfico representa las veces que el gen *AflL* y *FUM*1 se expresaron comparados con su calibrador o control (cultivo de *A. niger* a 30 °C y pH 5.5).

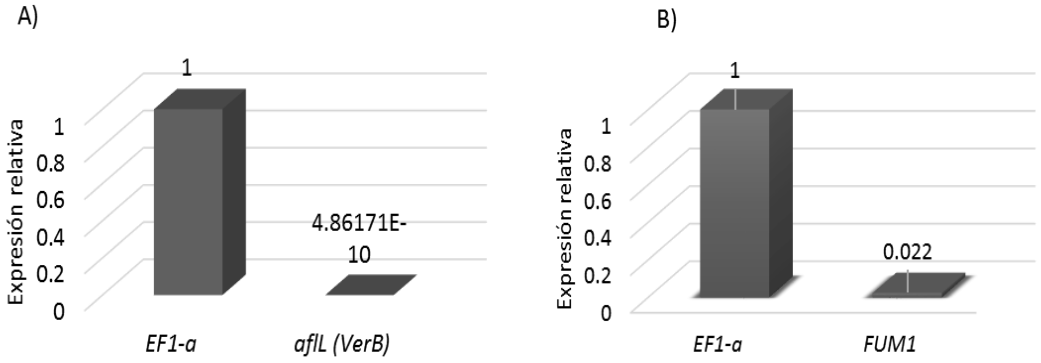


Figura 12. Representación gráfica de la expresión relativa de *AflL* y *FUM1* en *A. niger*-24. A): *AflL* y B): *FUM1*. El cultivo de la cepa fue 25 ± 3 °C durante 5 días. La expresión obtenida en ambos genes son relativas a los datos obtenidos para su calibrador: el cultivo de *A. niger*-24 a 30 °C a pH 5.5. Desviación estándar para: *EF1*-A = 0.08; *AflL* = 9.33E-08. (B):*FUM*1. Desviación estándar para: EF1-A = 0.08; FUM1 = 0.14.

Los resultados obtenidos muestran una expresión positiva cercana a cero, lo que indica que se expresa de forma basal respecto al gen constitutivo para ambos genes. Cabe hacer mención de que las concentraciones máximas de aflatoxinas fueron observadas a 20 °C a pH 4.0, y las máximas de fumonisina B_1, a 20 °C y pH 5.5.

7.4 Determinación de la bioacumulación de micotoxinas sobre limón Persa

Durante la infección de limón Persa (*Citrus latifolia* T.) con la cepa micotoxigénica *A. niger* (Fig. 13) la incidencia de la enfermedad resultó baja (30 %) y la severidad media, con lesiones menores a 30 mm de diámetro, observándose micelio solo en la herida. Al final de la incubación la incidencia aumentó al 100%, pero la severidad se mantuvo media. En general el moho se mantiene integrado al flavedo, el albedo se observa completamente reblandecido, los septos se degradan en las infecciones más severas y los tricomas cambian su aspecto turgente a muy suave.

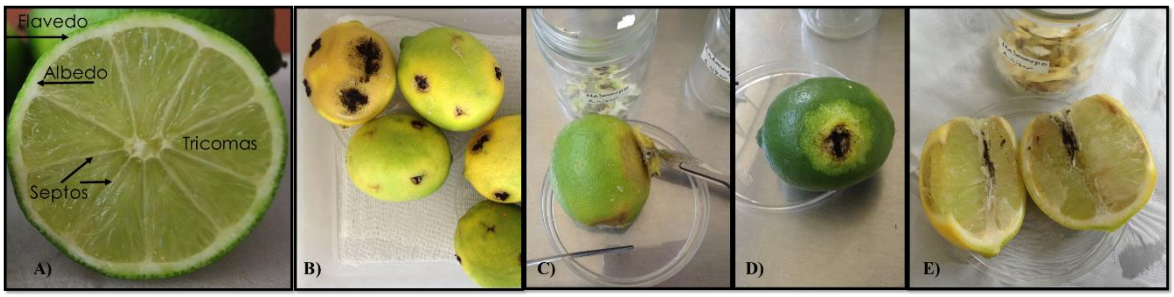


Figura 13. Esquema de las partes de un limón Persa e infección con la cepa de *A. niger*. A) Componentes del limón Persa y de los cítricos en general; B) limón infectado mostrando la incidencia y la severidad de la lesión; C) flavedo infectado; D) albedo infectado; E) interior del fruto mostrando la infección de los septos y tricomas.

El análisis de micotoxinas por HPLC-MS (Fig. 14A) muestra que el flavedo, donde se encontraba la mayor parte del micelio, las concentraciones resultan bajas o no detectables. En el albedo las concentraciones aumentan, y la mayor cantidad se encuentra en los septos (AFt = 2892 ng/g; otras toxinas (antibióticos cloranfenicol y cicloheximida = 90451 ng/g) para luego disminuir en los tricomas ($R^2 = 0.99$; $p < 0.05$).

En la infección de limón Persa con *A. carbonarius* (Fig. 14B), la incidencia de la enfermedad fue del 100 % desde los primeros días de la incubación, observándose todos los limones infectados La severidad al final de la incubación fue alta (mayor de 30 mm de diámetro). El

aspecto del desarrollo del moho sobre el limón Persa resultó similar a la observada por *A. niger*.

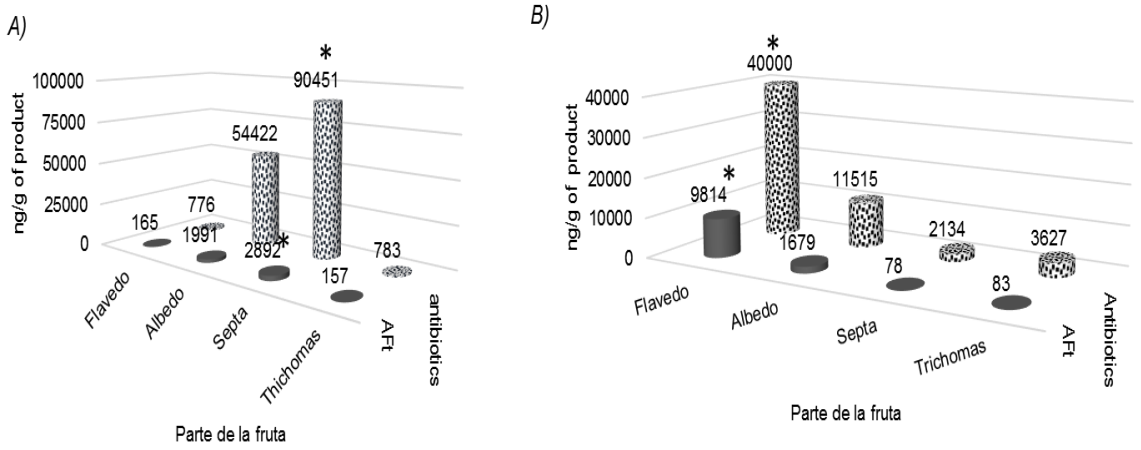


Figura 14. Micotoxinas cuantificadas en las diferentes partes del limón Persa infectado artificialmente. A) Micotoxinas producidas por *A. niger*. B) Micotoxinas producidas por *A. carbonarius.* AF_t: aflatoxinas totales. Otras toxinas: suma de los antibióticos cloranfenicol y cicloheximida. * $p < 0.05$.

La mayor concentración de micotoxinas se observó en el flavedo con 9814 ng/g de AF_t y 40000 ng/g de antibióticos (cicloheximida y cloranfenicol). A mayor profundidad del fruto, las concentraciones disminuyeron gradualmente mostrando correlaciones positivas ($R^2 = 99$; $p < 0.05$).

7.5 Control de mohos micotoxigénicos

7.5.1 Modelización del crecimiento fúngico

Los modelos de crecimiento se desarrollaron a partir de las curvas de crecimiento de cinco diferentes aislamientos de *A. niger*, con tres réplicas cada una, a ocho diferentes temperaturas: 8, 15, 20, 25, 30, 35, 37 y 40 °C. No se observó crecimiento a temperaturas de 8, 15 y 40 °C (temperaturas extremas). El desarrollo de las diferentes cepas de *A. niger* en

general fue variable en cuanto al tiempo en que comienza el crecimiento y la velocidad aparente en la que se desarrolla. Con base al análisis de homocedasticidad de los datos se observan diferencias significativas por lo que cada uno de los mohos se analizó individualmente. El modelo de Baranyi fue el que mostró un buen ajuste de los datos con $R^2 > 95.00$ (datos no mostrados). El máximo de velocidad (μ_{max}) y el tiempo de la fase las (λ) fueron estimados a través de este modelo. En estos resultados se obtienen velocidades de crecimiento más bajas a 20, 25 y 37 °C ($p < 0.05$) mientras que los valores más altos se observan a 30 y 35 °C, es decir, la velocidad de crecimiento aumenta conforme aumenta la temperatura, llegando a un máximo para luego descender en temperaturas extrema (20 y 37 °C). La fase lag estimada también disminuye conforme aumenta la temperatura y se observan en general tiempos más cortos ($p < 0.05$) mostrando los tiempos menores a 30 y 35 °C.

Utilizando el modelo secundario de la ecuación (3) de Rosso y Robinson (2001), el efecto de la temperatura sobre μ_{max} fue calculado y se determinaron los valores cardinales de temperatura (óptima, mínima y máxima). Las curvas ajustadas que indican la influencia de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento (μ_{max}) y se muestran en la figura 15. Del modelo se obtiene un buen ajuste para los datos experimentales.

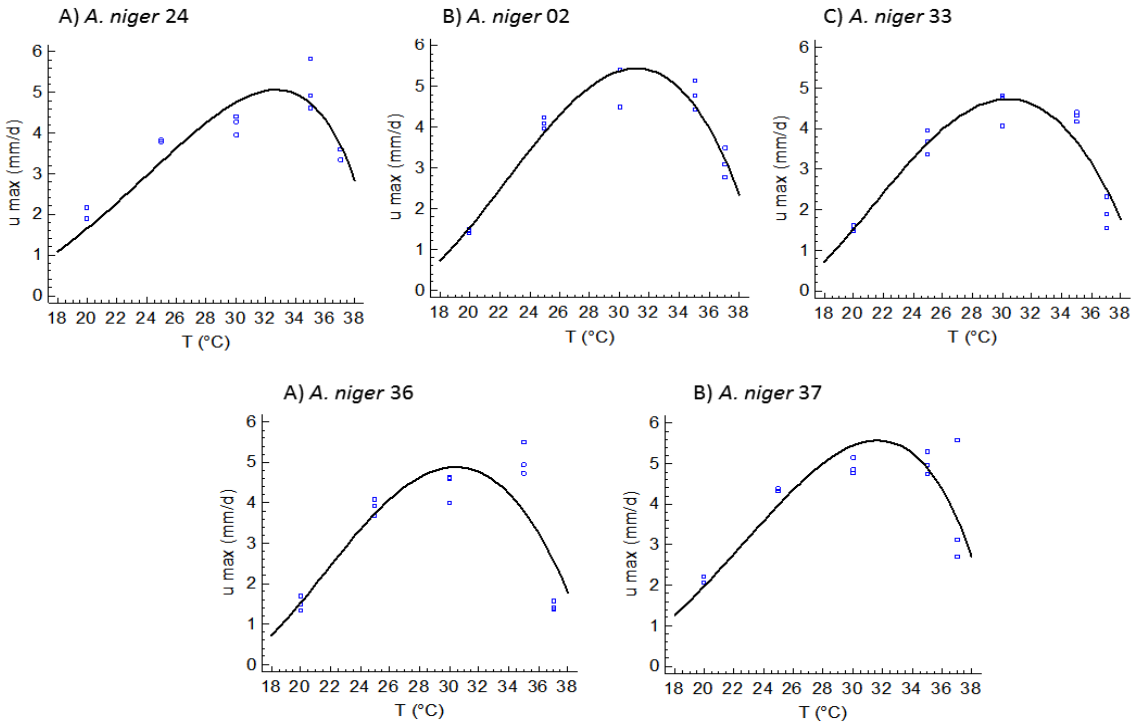


Figura 15. Gráficos del ajuste del crecimiento radial en función de la temperatura para cinco cepas de *A. niger* aislados de frutos cítricos al Modelo Cardinal con Inflexión (CMI). $R^2 >$ 87.1.

El ajuste resulta mejor en *A. niger* -24, *A. niger* -002, *A. niger* -33 y *A. niger* -36, con $R^2 >$ 92.0 sin transformación de los datos. Para *A. niger* -37, el mejor ajuste se logró con una $R^2 =$ 87.35. El análisis estadístico de los parámetros estimados (Tabla X) presenta diferencias significativas. La velocidad máxima observada entre las diferentes cepas muestran un coeficiente de variación CV de 6.7 %. T_{max} y T_{opt} muestran un CV < 5 %. La mayor variación fue para T_{min}, con un CV = 16.85 %.

Tabla X. Valores cardinales estimados de temperatura (T) y velocidad (μ_{max}) en cinco cepas de *A. niger* aisladas de frutos cítricos, sobre agar limón (AL). El inóculo utilizado fue aproximadamente 50 esporas.

Moho	T_{min} (°C)[a]	T_{max} (°C)[b]	T_{opt} (°C)[c]	μ_{opt} (mm/d)[d]	R^2	CME[e]
A. niger 24	10.14 ± 2.0	40.0 ± 0.18	32.68 ± 0.55	5.07 ± 0.21	94.82	0.30
A. niger 02	14.26 ± 1.26	40.00 ± 0.15	31.12 ± 0.30	5.43 ± 0.15	97.76	0.11
A. niger 33	14.46 ± 1.55	39.87 ± 0.24	30.36 ± 0.46	4.73 ± 0.17	95.18	0.19
A. niger 36	14.53 ± 0.78	39.79 ± 0.39	30.42 ± 0.78	4.88 ± 0.31	87.35	0.60
A. niger 37	11.19 ± 1.92	40.05 ± 0.26	31.66 ± 0.55	5.57 ± 0.25	92.17	0.42

a: Coeficiente de variación (CV) = 16.85%. b y c: CV < 5 %. d: CV= 6.96%. e: Cuadrado medio del error.

El inverso del tiempo para que el micelio se haga visible $1/t_v$ fue modelizado por el método descrito por Rosso *et al.* (1993). No se ajustaron adecuadamente los datos, por lo que fue necesario la transformación de la ecuación (7) con el objetivo de estabilizar las varianzas y lograr un mejor ajuste (Dantigny y Bensoussan, 2008).

Transformación de la ecuación de Rosso

$$(1/tvmax)^{0.5} = \left\{\frac{\frac{1}{tv_{opt}}(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{T_{opt}-T_{\min})\{(T_{opt}-T_{min})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min}-2T)\}}\right\}^{0.5} \quad (12)$$

Los modelos ajustados para $\sqrt{1/t_v}$ se muestran en la figura 16. Se observan diferencias significativas en los parámetros estimados. El mejor ajuste para los modelos resultantes en las cepas estudiadas fue razonablemente bueno, en base a la suma de los cuadrados medios del error (CME), con R^2 entre 77.35 y 86.97.

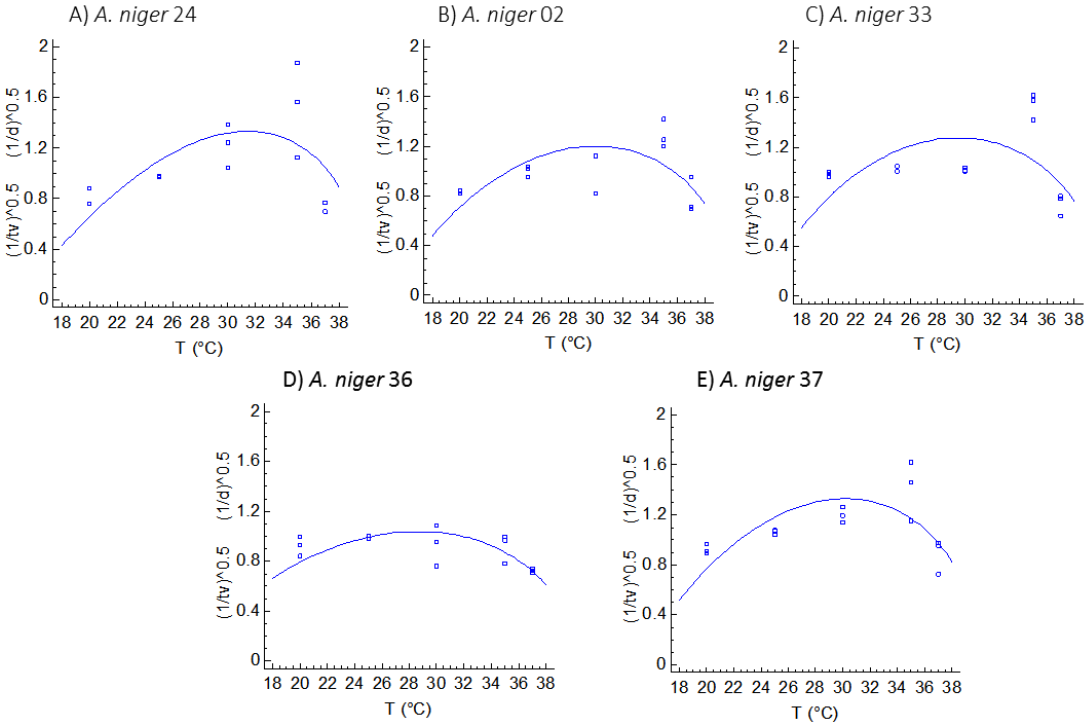


Figura 16. Raíz cuadrada del inverso de tv ($\sqrt{1/t_v}$) contra temperatura indicando el tiempo en que el micelio se hace visible en *A .niger* aislada de frutos cítricos.

Tanto T_{max} como T_{opt} muestran un coeficiente de variación CV < 5 %. La más alta variación fue para T_{min}, con un CV = 22.73 %. Los valores cardinales para la temperatura T (mínimo, máximo y óptimo) del modelo secundario, así como los parámetros estadísticos se describen en la Tabla XI.

Tabla XI. Valores cardinales estimados para temperatura (T) y tiempo de aparición (t_v) de la colonia para *A. niger*. Cepas aisladas de frutos cítricos cultivadas sobre agar limón (AL). El diámetro considerado para que el micelio se haga visible fue de 2 mm.

Moulds	T_{min} (°C)[a]	T_{max} (°C)[b]	T_{opt} (°C)[c]	(t_v)[d]	R^2	CME[e]
A. niger-24	9.59±3.53	39.96±0.35	32.03±0.99	1.41±0.1	84.73	0.07
A niger-02	8.10±3.30	40.02±0.35	31.46±0.83	1.29±0.1	84.44	0.04
A. niger-33	6.15±4.66	39.97±0.39	31.83±1.05	1.34±0.11	77.35	0.08
A. niger-36	11.35±0.87	40.55±0.56	28.50±0.68	1.13±0.64	86.97	0.03
A. niger-37	7.87±3.05	40.02±0.32	31.60±0.76	1.41±0.82	86.53	0.04

a: Coeficiente de variación (CV) = 22.73%. b y c: CV < 5 %. d: CV = 8.79%. e: Cuadrado medio del error

De los valores obtenidos se puede observar que el tiempo para que la colonia se haga visible es relativamente corto en las condiciones óptimas. La temperatura máxima de crecimiento es de aproximadamente 40 °C mientras que la óptima está entre 28 y 32 °C. La temperatura mínima es la que muestra mayor variabilidad, entre 6 y 11 °C.

Se llevó a cabo la validación sobre limón Persa, verificando previamente que el pH de pericarpio de limón es de 5.5 ± 0.5. Utilizando un inóculo bajo, (5 x 10^3 esporas/mL), el porcentaje de limones infectados fue bajo y con gran variabilidad (28.6 ± 14.3%) en todas las temperaturas analizadas. La velocidad fue calculada a diferentes temperaturas a partir de la ecuación de Baranyi y Roberts (1994) con un buen ajuste (R^2 = 95.9 ± 0.034). No se encontraron diferencias significativas en la velocidad obtenida a 30 y 35 °C y con alta variabilidad. Para evaluar el desempeño del modelo predicho y observado en el limón para μ_{max} se comparó los valores del factor de sesgo (Bf = 1.3) y el factor de precisión (Af = 1.5), indicando una predicción conservadora. El tiempo en que se hace visible la colonia se calculó directamente sobre el limón Persa. Los valores de velocidad de crecimiento y del tiempo en que se hace visible la colonia se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Velocidad radial de crecimiento y tiempo en que se hace visible la colonia (t_v) calculado en limón Persa.

Cepa	Temperatura (°C)	μ (mm/día)	lag (días)	R^2	t_v para 1 mm de radio
A. niger 24	35	6.09	3.1	94	3.19
	35	3.53	2.65	96	2.80
	35	2.82	2.5	98	3.79
	30	2.31	4.19	99	4.42
	30	4.37	4.31	97	4.43
	30	1.58	4.7	89	5.04
	25	2.96	5.83	99	6.01
	25	3.02	5.11	99	5.29
	25	2.68	6.8	98	6.98

Para evaluar el desempeño del modelo, se comparó el tiempo t_v predicho y el observado utilizando el método propuesto por Ross (1996). El factor de sesgo (Bf) fue de 0.24, y el

factor de precisión (Af) fue de 3.72, indicando discrepancias: *A. niger* crece significativamente más lento sobre el limón Persa que en AL, particularmente a bajas temperaturas. En un ajuste perfecto, Bf = 1, y para un valor grande para Af, menos preciso es el promedio estimado. *A. niger* creció significativamente más lento en el limón que en el AL, especialmente a temperatura baja. Se observó una correlación positiva entre el logaritmo de ($t_{vpredicho}/t_{vobservado}$) y la temperatura: a altas temperaturas los valores tienden a cero. En un ajuste perfecto, log ($t_{vredicho}/t_{vobservado}$) es cero.

7.5.2 Inhibición de mohos micotoxigénicos con levaduras marinas.

Efecto de la levadura *D. hansenii* contra los mohos micotoxigénicos *in vitro*. En el ensayo de antagonismo, de la levadura *D. hansenii* mostró tener la capacidad de inhibir el crecimiento de los mohos micotoxigénicos ensayados en co-cultivo (Fig. 17). La mayor concentración de la levadura con acción inhibitoria fue de 10^6 cel/mL ($p < 005$) con todos los mohos ensayados.

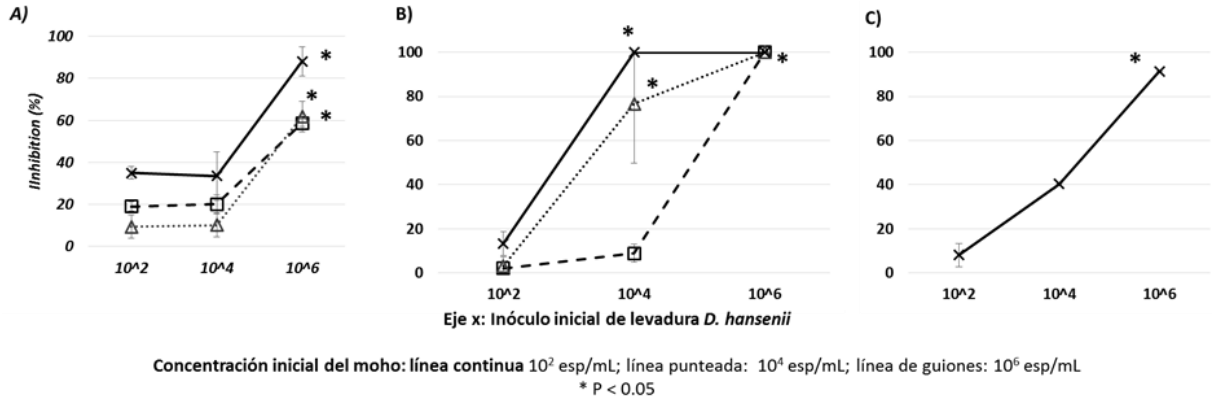


Figura 17. Efecto antagónico de la levadura *D. hansenii* sobre los mohos micotoxigénicos. A): *A. niger*; B): *A. carbonarius*; C): Inóculo inicial de *A. alternata*: 3 mm^2. Las barras indican el error estándar. * $p < 0.05$.

La tabla XIII muestra los resultados *in vitro* obtenidos para la inhibición de los diferentes mohos micotoxigénicos por el efecto de la levadura marina. La concentración inicial de levadura de 10^6 cel/mL utilizada fue la más eficaz en la inhibición, independientemente de la cantidad de esporas iniciales del moho estudiado.

Tabla XIII. Eficacia de la levadura *D. hansenii* en el control del crecimiento de diferentes mohos patógenos y micotoxigénicos aislados de cítricos, en medio YPD.

Moho		Inhibición (% ± desviación estándar) Levadura antagónica *D. hansenii* (cel/mL)		
	esp/mL	10^2	10^4	10^6
A. niger	10^2	35.0 ± 3.0	33.5 ± 11.5	88 ± 7.0
	10^4	9.6 ± 2.4	10.8 ± 7.0	61.5 ± 9.3
	10^6	19.0 ± 2.3	20.0 ± 4.3	59.0 ± 1.7
A. carbonarius	10^2	13.3 ± 5.3	100	100
	10^4	3.1 ± 4.2	76.6 ± 27	100
	10^6	2.1 ±3.1	8.8 ± 4.0	100
*A. alternata**	-	8.1 ± 9.5	40.3 ± 9.7	91.4 ± 4.1

*Inóculo inicial: 3 mm^2 de micelio aproximadamente. En el caso particular de *A. alternata* se trabajó con un inóculo inicial del moho de 3 mm^2 de micelio. La inhibición del crecimiento del moho resultó creciente conforme aumentó la concentración de la levadura *D. hansenii*, hasta llegar a un 91 % ($p < 0.05$)

La inhibición del crecimiento de *A. niger*-24 resultó hasta 88 % ($p < 0.05$). En el caso de *A. carbonarius*, la levadura ejerció mayor efecto antagónico al inhibir completamente al moho ($p > 0.05$) particularmente cuando los niveles de inóculo inicial fueron de 10^2 y 10^4 esporas/mL. Por su parte, cuando se utilizó micelio, *A. alternata* resultó inhibido hasta el 91 % con el inóculo más alto de levadura.

Determinación de la posible actividad killer de *D. hansenii* contra los mohos micotoxigénicos.

El efecto inhibitorio de los sobrenadantes libres de levadura hacia el crecimiento de *A. niger* y *A. alternata* en placas de cultivo fue menor en comparación con la levadura, sin embargo no se observaron diferencias significativas (Fig. 18).

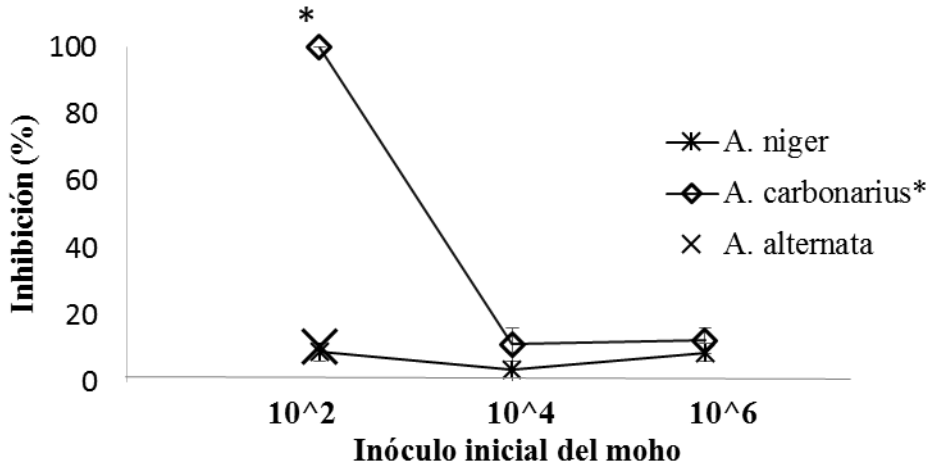


Figura 18. Posible actividad killer de la levadura sobre el crecimiento de los mohos. En *A. alternata,* el inóculo inicial fue un trozo de micelio de 3 mm^2 aproximadamente. **A. carbonarius*, $p < 0.05$.

Por su parte, en los retos de *A. carbonarius* con los sobrenadantes libres de células del cultivo de levaduras, se observó la total inhibición en el nivel bajo de inóculo inicial del moho (10^2 esp/mL, $p < 0.05$), mientras que en concentraciones más altas iniciales del moho, la inhibición de su crecimiento fue menor.

Ensayo de absorción de micotoxinas por la levadura *D. hansenii.*

En la determinación de la posible absorción o utilización de las micotoxinas por la levadura *D. hansenni*, los extractos de mohos utilizados, analizados previamente por HPLC-MS/MS, fueron seleccionados de manera representativa para ejemplificar la variedad de micotoxinas sintetizadas por cada uno de los mohos estudiados y su contenido en los extractos (Tabla XIV).

Tabla XIV. Metabolitos secundarios cuantificados en los extractos de cultivos seleccionados, utilizados en el ensayo de absorción de micotoxinas por la levadura *D. hansenii***.**

Micotoxina (ng/mL de medio)	**Extractos de cultivos de**		
	A. niger	***A. carbonarius***	***A. alternata***
AFB1	67.5	29	264
AFB2	188	0	91
AFG1	239	7184	430.5
AFG2	0	3356	530
PG	4445	3330	9650
Chl	0	76298	71000

Para medir la toxicidad de las micotoxinas presentes en el extracto del cultivo, antes y después de tratar los extractos con levaduras, se utilizó el bioensayo de mortalidad con nauplios de *A. salina*. De estos extractos se obtiene mortalidad inicial entre 50 y 75 %, mismas que disminuyeron de forma significativa ($p < 0.01$) a valores entre 0 y 4 % después del tratamiento del extracto del cultivo con la levadura (Fig. 19).

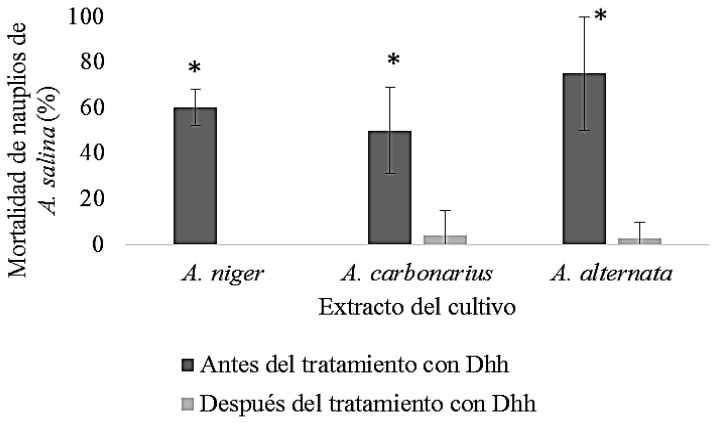


Figura 19. Mortalidad de nauplios de *A. salina* causada por las micotoxinas presentes en los extractos de cultivos de mohos, sin tratar (barras negras), y tratados con *D. hansenii* Dhh03 (barras grices). * $p < 0.05$.

Los resultados anteriores indican que la levadura marina *D. hansenii* degrada o utiliza de alguna manera los metabolitos secundarios sintetizados por los mohos *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. alternata*.

7.5.3 Protección in vivo del limón Persa (Citrus latifolia T.) con levaduras marinas

La levadura *D. hansenii* utilizada en una concentración de 10^6 células/mL resultó eficaz en la protección de limón Persa contra *A. carbonarius* y *A. niger* (Tabla XV). Después de inóculo inicial de 10^4 esp/mL de *A. carbonarius*, la levadura protegió al fruto hasta por 6 días, cuando comienzan los primeros síntomas de la enfermedad. A los 14 días del inóculo, la incidencia de la enfermedad de ésta es baja (10 %), aunque la severidad mayor. En la infección con *A. niger*, la protección fue mayor hasta por 10 días, en que comienzan a desarrollarse otro tipo de mohos diferentes de *A. niger*.

Tabla XV. Inhibición de mohos micotoxigénicos con *D. hansenii* y con el sobrenadante de su cultivo, en limón Persa artificialmente infectado y almacenado en cámara húmeda a 25 °C

Limón Persa infectado con:	***A. carbonarius***		***A. niger***	
Tratamiento	*D. hansenii*	Sobrenadante	*D. hansenii*	Sobrenadante
Porcentaje de protección de frutos (%)	90	70	100	80
Tiempo de protección (días)	6	10	13	10
Incidencia enfermedad (%)	10	30	0	20
Severidad*	Alta	Alta	-	Media

*Severidad baja: diámetro de la lesión entre 2 y 10 mm; media: entre 11 y 30 mm; alta: mayor de 30 mm.

El sobrenadante del cultivo de *D. hansenii* también mostró tener posible actividad killer contra los mohos, logrando proteger al limón hasta por 10 días contra *A. niger* y 7 días contra *A. carbonarius*. Al final del experimento el día 14, tanto la incidencia de la enfermedad, como la severidad continuaron bajos en ambas especies de mohos.

8. DISCUSIÓN

Los frutos cítricos contienen una micobiota normal presente en su superficie desde la cosecha y durante el empaque. A pesar de que *A. niger* no es un moho específico de cítricos, si es uno de los mayormente aislados de la filosfera debido a su amplia distribución en la naturaleza, aunado a que varias especies de *Aspergillus* han sido reportadas como productoras de AF, OTA o FB, entre otros (Pitt y Hocking, 2009). La presencia de uno o más genes participantes en la síntesis de micotoxinas, en los mohos patógenos, resulta una fuerte evidencia del riesgo que representa la presencia de estos microorganismos en los alimentos, pues en cuanto encuentren las condiciones adecuadas las producirán contaminando el alimento (Palou *et al.*, 2008). En esta investigación se amplificaron dos secuencias en *A. niger*: el gen *FUM*1 para fumonisinas y el gen *aflL* (*Ver*B) (aflatoxinas). Esto prueba el potencial para producir dos de las micotoxinas de más alto riesgo debido a que los genes utilizados para su amplificación eran claves en la biosíntesis de la micotoxina. Resultados semejantes encontraron Gallo *et al.* (2012) quienes, además, desarrollaron un método de detección rápida de *Aspergillus* aflatoxigénicos basado en la detección de genes participantes en la biosíntesis de micotoxinas, método que puede ser muy útil dado el corto tiempo que toma el análisis comparado con los métodos tradicionales de cultivo e identificación en micología. Dentro de sus investigaciones encontraron que todos los *Aspergillus* aflatoxigénicos que aislaron fueron positivos para amplicones involucrados en la biosíntesis. Atoui *et al*. (2007) también investigó la presencia de secuencias del gen *Pks* en aislamientos de *Aspergillus* negros de uvas resultando ser *A. carbonarius* positivo al gen; encontrando una correlación positiva entre la concentración de ocratoxina con su contenido de ADN por PCR tiempo real. La OTA es una nefrotoxina teratogénica, genotóxica e inmunosupresora, clasificada por la IARC dentro del grupo 2B como posible carcinogénico (AFSSA, 2009; Barceloux, 2008). Siendo *Aspergillus* el género recuperado con mayor frecuencia y que muchas de sus especies son reportadas como aflatoxigénicas u ocratoxigénicas (Frisvad y Thrane, 2007), resulta importante su hallazgo por lo que la búsqueda de medidas tendientes a disminuir su presencia en cítricos es necesaria. Por otro lado, de las cepas positivas a genes micotoxigénicos recuperadas en esta investigación, *A. alternata* es la que más metabolitos secundarios produce, aunque se cuenta con poca información sobre los efectos que pudieran generar

estando presentes en alimentos (Lou *et al.*, 2013). Algunas de estas micotoxinas intervienen en el proceso de colonización del fruto, lo que sugiere que inclusive antes de que la pudrición sea evidente, ya existe la producción de toxinas que puedan comprometer la salud humana y animal (Barkai – Golan, 2008).

El medio AL diseñado en esta investigación a base de pericarpio de limón resultó favorable para la síntesis de micotoxinas, demostrando que los mohos micotoxigénicos encontrados son capaces de tomar a los componentes del limón Persa como sustrato, desarrollarse y sintetizar más de una micotoxina de interés alimentario (Pitt y Hocking, 2009). La utilización del medio complejo a base del pericarpio del limón Persa arroja resultados similares a los obtenidos por Pose *et al.*, (2010). En sus investigaciones, analizaron la capacidad de producción de *A. alternata* en un medio complejo a base de tomate, observando la acumulación de TA en el medio a 21 °C y 0.982 aw, sugiriendo que sus resultados pudieran aplicarse en la prevención de la contaminación y/o la calidad e inocuidad de productos procesados de tomate. Esta situación puede bien ser aplicada en limón Persa.

La utilización de los bioensayos de mortalidad con *A. salina*, BSLA (Brin Srhimp Lethaly Assay, por sus siglas en inglés) de manera preliminar para determinar la presencia de metabolitos secundarios tóxicos resultó adecuada en esta investigación. A pesar de que estos bioensayos no miden la micotoxina directamente, sí miden el efecto tóxico de los metabolitos directamente en un organismo vivo (Lu *et al.*, 2011), resultando conveniente para metabolitos fúngicos tóxicos a bajas concentraciones. Dado el interés en determinar de manera rápida la presencia de micotoxinas en productos frescos, este bioensayo constituye una prueba rápida no específica para determinar la toxicidad. Además de ser estandarizada, permite ser una prueba confiable de toxicidad en corto tiempo y con reproductibilidad aceptable (Vanhaecke y Persoone, 1981). Se hace énfasis en que las dosis que se usan pueden ser muy tóxicas para *A. salina* debido a su tamaño, y esto es útil como un indicativo de la presencia de algún químico que puede causar daño al humano en dosis más altas (Lumor *et al.* 2010). Los resultados obtenidos en mortalidad en los diferentes extractos analizados alertan de la posible presencia de micotoxinas.

Las cinéticas de mortalidad de todas las cepas evaluadas tienden a ser equiparables a las cinéticas de cuantificación de micotoxinas observadas en nuestra investigación. El total de las micotoxinas cuantificadas en etapas posteriores muestran valores similares en cuanto a la tendencia. Esto nos da una clara idea de las condiciones donde estos metabolitos tóxicos son mayormente sintetizados, marcando una alerta sobre el riesgo toxicológico. *Aspergillus carbonarius* y *A. alternata* presentan un patrón de síntesis y degradación similar al obtenido por Esteban *et al.* (2004), estudios en los cuales observaron que el contenido de OTA en *Aspergillus* negros decrece conforme aumenta el tiempo de incubación, sugiriendo que probablemente la cepa asimila la OTA como fuente de nitrógeno. Lo anterior indica que los mohos analizados en nuestro estudio producen micotoxinas que pueden ser degradadas por él mismo con el tiempo, y el nauplio de *A. salina* es capaz de detectarlo. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por Brown, (1969), quien observó mortalidades del 15 % en *A. salina*, con niveles de OTA-A de 1 µg/mL. Por el contrario, González *et al.* (2007) determinaron la toxicidad de extractos de mohos aislados de alimentos y plantas medicinales mediante bioensayos con *A. salina*, encontrando mortalidades hasta del 65 % para extractos de *A. niger*. En estudios más recientes, Zainudin y Perumal (2015) reportan 75 % de mortalidad de nauplios de *A. salina* con extractos de *Aspergillus* aislados de maíz, con 156 mg/L de AFB_1, y 40 % de mortalidad para el extracto de *Fusarium* con 250 mg/L de FB_1. Esta diferencia puede ser debida la cantidad de micotoxinas obtenidas por el solvente utilizado. Ellos utilizaron maíz en su medio de cultivo, específico para el crecimiento de *Fusarium*, mientras que en nuestra investigación, utilizamos el pericarpio de limón donde existen sustancias que tienden a inhibir el crecimiento de mohos (Ben-Yehoshua *et al*., 1995). Harwing y Scott (1971) encontraron la dosis letal media (DL_{50}) para la mortalidad de nauplios de *A. salina*, expuesta por 16 h: AfG_1 (1.3 µg) y OTA-A (10.1 µg).

Por otro lado, el análisis microcalorimétrico refuerza los resultados obtenidos con *A. salina*, permitiendo con ello evidenciar la utilidad y sensibilidad del bioensayo frente a las micotoxinas. Todo proceso metabólico en un organismo genera calor dentro de las células, éste puede ser monitoreado con precisión por microcalorimetría. Con las curvas de calor generadas pueden obtenerse parámetros cinéticos como la velocidad de crecimiento

constante, o picos de calor obtenidos de la actividad del organismo vivo. De la misma manera, la interacción de diversos compuestos sobre el organismo puede ser evaluado (Zhao *et al.*, 2013). Cada sistema contiene una única, distintiva y consistente curva de calor bajo determinadas condiciones (BTAF: Biothermal Active Fingerprint, por sus siglas en inglés) que puede ser alterada por la influencia de diversas sustancias (Ren *et al.*, 2012). En el análisis por microcalorimetría, los extractos de *A. flavus* y *A. carbonarius* resultaron idóneos para ejemplificar el efecto de la toxicidad debida a la presencia de una o varias micotoxinas. La muerte del nauplio en los primeros minutos con los extractos de *A. flavus* puede ser posiblemente por la mayor concentración de AF que presentó, a la sinergia entre las micotoxinas presentes, a algún tipo de interacción entre éstas, o la existencia de algún otro metabolito tóxico no identificado. Respecto a este último punto, Zainudin y Perumal (2015) analizaron extractos de mohos sin micotoxinas por medio de bioensayos con *A. salina*, resultando tóxicos para los nauplios, e indicando la presencia de algún otro tipo de metabolito no identificado. En cuanto a la interacción entre micotoxinas, a pesar de que es un riesgo poco estimado se tienen evidencias de interacción entre AF y FB y AF y OTA en alimentos para ganado contaminados, dando lugar a mermas en la producción (Grenier y Oswald, 2011; Stoev, 2015). Pocos estudios se tienen en relación a la interacción de FB con otro tipo de micotoxinas (Ribeiro *et al.*, 2010). Las fumonisinas han sido relacionadas con casos de cáncer esofágico en Sudáfrica, y responsable de leucoencefalomancia en caballos y edema pulmonar en cerdos cuando son expuestos de manera crónica. En animales de laboratorio tiene efectos carcinogénicos. Se ha demostrado también que especies de *Aspergillus* la producen (Varga *et al.*, 2010).

Una vez que se identificaron y cuantificaron las micotoxinas, se demostró la capacidad que tienen estos mohos fitopatógenos del limón Persa para sintetizar diferentes tipos de micotoxinas sobre el AL, confirmando que los mohos y la síntesis de micotoxinas puede ocurrir en una gran variedad de sustratos (Frisvad y Thrane, 2007). Los mohos analizados en esta investigación fueron capaces de crecer y sintetizar micotoxinas de interés agroalimentario como aflatoxinas y fumonisina en diversas condiciones de pH, temperatura

y tiempos de incubación, así como los antibióticos penicilina G, cicloheximida y cloranfenicol. El rango de temperaturas seleccionadas en este estudio representan las temperaturas promedio a las cuales pueden manejarse los cítricos en diferentes regiones: zonas frescas (20 °C), templadas (25 °C) y cálidas (30 °C). Nuestros resultados muestran que las micotoxinas de interés alimentario se sintetizan principalmente a 20 °C los diferentes mohos, a excepción de la FB_1 de *A. niger* que se sintetizan a 25 °C. Los patrones de síntesis y degradación que se observaron se asemejan a los obtenidos por Huynh y Lloyd (1984) donde se observó que el micelio joven sintetiza el máximo de AF el día 14 de incubación, y comienza a degradarse conforme el cultivo envejece, siendo el micelio viejo el responsable de la degradación. También observó que la adición de cicloheximida a los cultivos previene la degradación de las aflatoxinas, como se observa en *A. carbonarius* a 20°C: las AF_t aumentan considerablemente en el tiempo a partir de la detección de cicloheximida el día 14, situación que no se observó a 30 °C donde no se detectó cicloheximida. Esto pudiera ser una de las causas de la gran variabilidad en la cuantificación de micotoxinas bajo diferentes condiciones.

En los extractos de los cultivos de *A. alternata* y *A. carbonarius*, se identificaron aflatoxinas y antibióticos (penicilina G, cicloheximida y cloranfenicol); además de identificar fumonisina en *A. alternata*, y *A. niger*. La secuencia genómica de muchos *Aspergillus* incluyendo la notación de las rutas biosintéticas de aflatoxinas, esterigmatocistina y penicilina G, han provisto de mucha información acerca de la producción de metabolitos secundarios, con lo cual se puede facilitar la investigación de nuevos metabolitos secundarios en otros *Aspergillus* (Inglis *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren profundizar en el estudio de PG, Cy y Chl ya que su presencia puede ser un riesgo alimentario causado por mohos (Graham *et al.*, 2014). La resistencia antimicrobiana de las bacterias generada por el uso indiscriminado de antibióticos se ha convertido en problema de salud a nivel mundial. La resistencia a antimicrobianos amenaza la capacidad de solucionar las infecciones respiratorias agudas, enfermedades diarreicas, paludismo y tuberculosis, entre otras. Muchos de estos casos son resistentes a la penicilina. El uso excesivo y con frecuencia empírico de

los antimicrobianos para el tratamiento de diferentes situaciones clínicas ha conducido a modificaciones de la ecología bacteriana, lo que puede determinar consecuencias fatales para la salud pública (Cires – Pujol, 2002). La exposición a bajas concentraciones del antibiótico, selecciona a bacterias que adquirieron la resistencia permitiéndoles desarrollarse más favorablemente que las bacterias que no la adquirieron (Phillips *et al.*, 2004; Silva-Sánchez, 2006). La presencia de antibióticos sintetizados por mohos en productos agroalimentarios es una fuente de contacto para las bacterias que pueden adquirir la resistencia. Su consumo entonces requiere una supervisión estricta en cuanto al contenido de antibióticos, debido a su ocurrencia de manera natural producida por mohos (Barkai-Golan y Paster, 2008).

Las máximas concentraciones de metabolitos secundarios se determinaron en condiciones bien específicas de pH y temperatura favorables a su síntesis, aunque se observó la presencia de mínimas cantidades en todas las condiciones analizadas. De manera similar, Franca *et al.* (2014) evaluaron la influencia de la temperatura, el pH y la a_w en el crecimiento y producción de OTA en cepas de *A. carbonarius* y *A. niger* en un medio sintético de uvas, encontrando valores amplios para la síntesis: en *A. carbonarius* desde 20 a 33 °C y niveles de pH entre 5 y 6.5 (0.96 – 0.98 a_w); y para *A. niger* determinaron temperaturas entre 24 y 37 °C, a niveles de pH entre 4 y 6.5 (0.95 a_w).

La presencia de aflatoxinas y fumonisinas sintetizadas por los diferentes mohos estudiados representan un peligro para la salud (Barkai-Golan y Paster, 2008). *A. carbonarius* y *A. niger* han sido de poco interés en cítricos, no obstante que los *Aspergillus* micotoxigénicos pueden desarrollarse en cítricos y sus derivados (Stinson *et al.*, 1981; Ariza *et al.*, 2002; Bamba y Sumbali, 2005). En lo que refiere a aflatoxinas, en un estudio similar, se han encontrado cepas aisladas de pudriciones en naranjas (*Citrus reticulata*) productoras de AFB_1 en medio semi-sintético, en cantidades hasta de 162.5 g/25 mL del medio, mostrando también un decremento en la concentración respecto al tiempo de incubación (Varma y Verma, 1987). En India se han encontrado cepas de *A. flavus* causante de deterioro en limón mexicano

(*Citrus aurantifolia* S.) con capacidad de producir AFB_1 (141.3 - 811.7 µg/kg) y ácido ciclopiazónico (CPA) (250.0 - 2501.3 µg/kg) en el tejido del fruto (Bamba y Sumbali, 2004). La probabilidad de que mohos como *Aspergillus* se desarrolle en limón Persa, como ha sido demostrado a nivel experimental con otros cítricos, aumenta la probabilidad de que, de manera indirecta, se contaminen los productos derivados del limón, con el peligro que implica si además estos mohos producen micotoxinas, que además, son estables durante su procesamiento (Kabak, 2009). Los jugos naturales o concentrados son unos de los principales subproductos de limón Persa con fines de exportación (FAO, 2017). La síntesis de micotoxinas en jugos cítricos ya ha sido demostrada. Alemandri *et al.* (2004) determinó la capacidad micotoxigénica en cepas de *A. clavatus* y *A. flavus* aisladas de jugos cítricos, confirmando la producción de aflatoxinas en medio sintético a base del jugo. Xing *et al.* (2015) desarrolló un método de extracción y análisis por HPLC para determinar la presencia de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 simultáneamente en extractos de jugo de naranja (*C. reticulata*), logrando un límite de cuantificación de 0.044 a 1.2 µg/kg. Esto indica que, de producirse las micotoxinas, éstas se pueden cuantificar.

Con respecto a las fumonisinas, desde que se descubrió el clúster del gen para la fumonisina en *A. niger, y* se demostró que algunas de estas especies tienes la habilidad de producirla (Frisvad *et al.*, 2007), se han incrementado las investigaciones relacionadas con los *Aspergillus* negros como potenciales productores en diversos productos. Varga *et al.* (2010) reportaron por primera vez la síntesis de FB_1 por *A. niger* aislado de uva-pasa (5.16 mg/kg promedio). En estudios similares, Morgensen *et al.* (2010) reportaron concentraciones más bajas (171 - 7841 µg de FB_2 y 14 - 1157 µg de FB_4), encontrando cepas capaces de producir FB_2 y B_4 (12 - 672 µg/kg) en las uvas.

Una asociación recurrente se observa entre aflatoxinas y fumonisinas, que ha sido calificada con efecto sinérgico o aditivo (Grenier y Oswald, 2011). Este punto resulta muy importante para la evaluación del riesgo que representa el desarrollo de estos mohos en cítricos y la

posible contaminación de sus derivados, tomando en cuenta que las ascosporas de *Aspergillus* son capaces de sobrevivir a la pasteurización (Pitt y Hocking, 2009). Si bien los *Aspergillus* no son considerados los patógenos más importantes en plantas, sus especies son responsables de contaminar diversos frutos y sus derivados en cualquier etapa de su procesamiento y la mayor consecuencia de su presencia, es la contaminación por micotoxinas (Filtenborg *et al.*, 1996; Agrios, 2005; Perrone *et al.*, 2007).

Otros metabolitos secundarios de gran impacto a la salud que debe tomarse en consideración en cítricos son las ocratoxinas. La incidencia de OTA por *A. westerdijkiae*, en naranja infectada y jugos de naranja ha sido evaluada: este moho sobrevive y produce OTA bajo una gran influencia de la temperatura (Marino *et al.*, 2009).

Los estudios realizados en cítricos son principalmente con *Alternaria* y sus micotoxinas. Zhao *et al.* (2014) investigando la incidencia de toxinas de alternaria en cítricos y productos derivados, encontró 36 % de las muestras de jugo contaminadas naturalmente con toxinas de alternaria en concentraciones hasta de 4.3 µg/kg, por lo que sugiere una vigilancia sistemática en productos frescos como procesados, con el fin de proveer bases científicas para la evaluación del riesgo a la exposición alimentaria de estas toxinas. AOH y AME han sido encontradas normalmente en combinación y muestran efectos teratogénicos y fetotóxicos en ratones preñados (Logrieco *et al.*, 1990). En 1992, Chen *et al.* observando la similitud estructural y funcional de la FB_1 con la altertoxina AAL, decidieron buscar la presencia de FB_1 en cultivos de *A. alternata* aislada de tomate, confirmando su presencia por HPLC-MS-MS, que hasta ese momento solo se había reportado para cepas de *Fusarium*. Nuestra investigación confirma ese hallazgo al cuantificar FB en la cepa de *A. alternata* investigada. Esto implica reevaluar y ampliar el estudio sobre las micotoxinas específicas para una determinada especie micotoxigénica desde el punto de vista fisiológico.

De los metabolitos secundarios producidos por los mohos, las aflatoxinas y fumonisinas, entre otras, son de las más importantes desde el punto de vista de inocuidad alimentaria. En la regulación de la biosíntesis de estos compuestos químicos indeseables, están involucrados varios genes que están ligados al desarrollo del moho, además de diversos factores ambientales y nutricionales, como la fuente de nitrógeno, fuente de carbono, temperatura de cultivo, pH, etcétera. Es de vital importancia entonces, diferenciar una especie productora de micotoxinas de otra que no lo es. A pesar de conocer muchas generalidades en la síntesis de micotoxinas, los factores que regulan su producción permanecen poco esclarecidas (Price *et al.*, 2005).

Luego de haber identificado secuencias *AflL* y *FUM*1 que pertenecen a genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas, y confirmado la síntesis de AF y FB_1 en *A. niger*, la expresión de los genes positivos *AflL* y *FUM*1 fue analizada en las condiciones de temperatura en que se observaron las mayores concentraciones de ambas micotoxinas. Nuestros resultados muestran una expresión basal. En el caso del gen *AflL* de la aflatoxina, dado la gran homología que existe en el clúster de la biosíntesis de AF en diversos mohos aflatoxigénicos, la presencia de una secuencia de mARN puede diferenciar una cepa aflatoxigénica de otra que no lo es. La simple detección por RT-PCR podría correlacionarse con una especie productora. Scherm *et al*. (2004), correlacionaron de manera consistente la presencia de los genes reguladores *AflD, AflO,* y *AflP* con la capacidad aflatoxigénica en *A. flavus* y *A. parasiticus*, aunque otros genes estructurales variaron en su expresión relacionada con la habilidad aflatoxigénica.

La temperatura de síntesis de AF, ha sido reportada entre 28 y 30 °C (Price *et al*., 2005). En estudios sobre la relación de la expresión de los genes reguladores *Afl*R/*Afl*S bajo diferentes condiciones de temperatura y a_w en *A. parasiticus*, observaron que la temperatura óptima de crecimiento no es la óptima para la síntesis de AF. La temperatura para la síntesis de AFG_1 resultaron ser más bajas que la temperatura de crecimiento, entre 20 y 30 °C; o más altas en

el caso de AFB_1 (37 °C). Como resultado de sus investigaciones concluyeron que la temperatura influye mayormente en la síntesis de AFB_1, mientras que la a_w influye más en la síntesis de AFG_1 (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010). En el análisis de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis en aflatoxinas en *A. flavus* por medio de microarreglos, se ha encontrado que existe actividad aflatoxigénica de todo el clúster en un amplio margen de a_w, pH y de temperatura (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009). Los anteriores estudios coinciden con nuestros resultados, en la que en ambas condiciones de tratamientos se observa una expresión basal, y la síntesis de micotoxinas se observa en un amplio margen de condiciones. Sin embargo, otros investigadores afirman que en condiciones de estrés, a 20 °C y alta a_w los genes reguladores *AflR* y *AflS* se encuentran sobre-expresados, aunque con las mismas cantidades producidas de aflatoxinas (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009).

En cuanto al gen *FUM1* que codifica en la ruta de la fumonisinas en *A. niger,* este ha sido abordado por a su homología con el clúster del género *Fusarium* y la relación de la presencia de estos genes con la síntesis de FB en *A. niger* (Frisvad *et al.*, 2007). En otro tipo de investigaciones se ha encontrado que el tiempo de incubación en el cultivo de *F. verticilloides* juega un papel significativo en la síntesis de FB y la expresión del gen *FUM*2, encontrando una mayor expresión y síntesis de FB después de 21 días de iniciado el cultivo, independientemente de la a_w o la temperatura (Lazzaro *et al.*, 2012).

La expresión de los genes analizados en esta investigación resulta en forma basal. Esto indica que se contienen el mensaje para su síntesis. Resulta claro que los genes se pueden expresar positivamente en múltiples condiciones (Schmidt-Heydt *et al*., 2009), y que en *A. niger*, la síntesis de AF está muy ligada al ambiente y a las condiciones de desarrollo del moho (Georgianna y Payne, 2009). Tomando en cuenta la estabilidad de las micotoxinas, una vez que se han producido después de la activación de sus rutas biosintéticas, implica un riesgo de contaminación que debe ser considerado (Inoue *et al.*, 2013).

La difusión de las micotoxinas dentro de frutas ha sido tema de investigación debido a la estabilidad de estas en algunos productos procesados, como jugos de manzana o jaleas, ya que generan un serio problema en productos pasteurizados (Laidou *et al.*, 2001). Dependiendo del tipo de fruto, la difusión de las micotoxinas de un área infectada hacia otra sana tiene consecuencias en el producto final, como ha sido el caso de patulina en manzanas y peras procesadas (Laidou *et al.*, 2001; Rychlik y Schieberle, 2001). Debido a la gran estabilidad térmica, las micotoxinas que se difunden en frutos y pasan a sus derivados no pueden ser removidas de algunos productos, ya que los tratamientos de decontaminación son caros y poco eficientes. Por estos motivos resulta importante el conocimiento de las propiedades de difusión de las micotoxinas en un producto dado (Rychlik y Schieberle, 2001). En nuestros resultados de la infección de limón Persa con *A. niger*, las micotoxinas que se producen al parecer migran hacia el interior del fruto. Las micotoxinas se difunden hacia los septos, que es donde se encuentra la mayor concentración. *A. niger* es un moho utilizado en biotecnología para la producción de ingredientes alimentarios, farmacéuticos y enzimas industriales. En su hábitat natural, *A. niger* secreta una gran cantidad de enzimas capaces de generar una gran cantidad de nutrientes a partir de biopolímeros (Pel *et al.*, 2007). Muy probablemente esta sea la causa por la que las micotoxinas se difunden hacia el interior del limón: debido a su actividad enzimática reblandece el pericarpio, y como consecuencia, las micotoxinas son permeables en el fruto. Estos resultados difieren con los reportados por Marino *et al.* (2009) en el que infectó naranja con *A. westerdijkiae* ocratoxigénico y encontró la mayor concentración de OTA en la superficie. Este comportamiento fue similar al observado en la infección con *A. carbonarius*, donde la mayor concentración de micotoxinas se observó en el flavedo. Magnani *et al.*, (2007) detectó AOH y AME, 0.90 y 17.40 g/kg respectivamente, en flavedo de tangerina infectada por *Alternaria*. En el albedo no encontró estas micotoxinas, sugiriendo que el flavedo actúa como una barrera. Rychlik *et al.* (2001) por su parte estudió la difusión de micotoxinas en diferentes matrices alimentarias, concluyendo que la difusión se facilita en productos con mayor cantidad de agua (melón, uva, tomate) que en matrices viscosas (manzana) y se ve obstaculizada por la presencia de

polisacáridos estructurales. Las diferencias en la difusión de las micotoxinas entre *A. niger* y *A. carbonarius* observadas en nuestra investigación puede ser resultado de las diferencias entre ellos al tratarse de especies con cualidades diferentes y se comportan de diferente manera sobre los cítricos.

Los hallazgos discutidos anteriormente se pueden remarcar y complementar con lo siguiente:

Los mohos deterioradores están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Herrera y Ulloa, 2004). En cítricos, además de los patógenos del género *Penicillium* y *Alternaria*, que destacan por ser huésped-específico, existen otros géneros presentes en la filosfera de los frutos con potencial para producir micotoxinas altamente nocivas para la salud (Ochoa *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2009; Sandoval-Contreras, 2011). Esporas o fragmentos de micelio pueden permanecer sobre la superficie de los frutos sin que la pudrición sea evidente (Michailides *et al*., 2010). Existe una interacción huésped-específico de las esporas en estado de germinación de algunos mohos fitopatógenos con la temprana síntesis de toxinas en el proceso se patogénesis, hecho que ha sido documentado en *Helminthosporiun victoriae* y *A. alternata*, como las toxina AK y las toxinas AF que son derivados del ácido epoxi-decatrienoico (Hayashi *et al*., 1990). Diferentes patotipos de *A. alternata* atacan diferentes plantas y produce algunos compuestos relacionados que son tóxicos solamente para un hospedero en particular, para cada patotipo. Las toxinas AK en la fruta japonesa “peat fruit”; la toxina AAL causante del chancro en tomate; las AF, mencionadas anteriormente, en fresas; la AM en manzana; la ACT en tangerina; la ACL en limón y la HS en caña de azúcar (Agrios, 2005). Factores externos también regulan la micotoxigénesis y la esporulación. Durante estas fases, el perfil del metabolismo secundario cambia en mohos como *Aspergillus* y *Fusarium*. El metabolismo secundario y la esporulación están asociados temporal y funcionalmente, incluyendo la síntesis de micotoxinas una vez que el moho esporula. Por ejemplo, algunos metabolitos secundarios protegen las esporas o tienen actividad antimicrobiana como una defensa química. En *A. nidulans*, la esterigmatocistina está presente como agente protector (Brodhagen y Keller, 2006). Esto significa que las esporas ya contienen micotoxinas una vez

que se depositan en el fruto a infectar -que bien pueden ser también tóxicos para el humano- para luego comenzar la señalización química necesaria para la germinación y el desarrollo subsecuente de la pudrición. Sin embargo, este proceso aun no es visible al ojo humano. Esto aumenta la el riesgo de exposición de la población a las micotoxinas, situación que ha sido poco evaluado en frutas y vegetales (IARC, 2002).

Por otra parte, la contaminación de la mayoría de las frutas es causada por el crecimiento fúngico, sin considerar la formación de micotoxinas. El examen microbiológico de rutina no es recomendado y solamente existen algunas micotoxinas reportadas con potencial de estar presentes asociadas a un producto específico, como la PAT y OTA en la manufactura de jugos, únicas micotoxinas que han sido consideradas de relevancia en frutas. La presencia de PAT en jugos es clara evidencia de que una fruta contaminada ha sido utilizada en su manufactura (Dombrink y Kurtzman, 2008). Las micotoxinas se difunden dentro del fruto y dependiendo del tipo de micotoxina, de la textura del tejido del fruto y de la cantidad de agua disponible se difundirá más o menos al interior. En tomates, por ejemplo, la PAT se difunde mayormente comparado con manzanas, situación que puede prevalecer en otro tipo de fruta con alto contenido de agua, como se observó en limón Persa en nuestra investigación, o en otro tipo de vegetales. La AF por su parte, se difunde más rápidamente que la PAT en frutas de alta a_w (Rychlik y Schieberle, 2001). Nuestros resultados coinciden con lo señalado por Restani (2008) en su revisión, donde reporta la difusión de las micotoxinas dentro del fruto dependiendo de sus características. El comparativo entre manzanas, peras o limones puede no ser tan preciso por exponer diferentes matrices alimentarias, sin embargo representa una buena base para la evaluación del limón producido en México, y puede ser utilizado como prototipo y aplicarse para los mohos presentes cítricos y las micotoxinas involucradas (Battilani *et al*., 2008). Bajo estos argumentos, la presente investigación confirma el riesgo de contaminación por micotoxinas en derivados de cítricos y la posible exposición de la población a este peligro químico.

Se hace hincapié en que la mayoría de los patógenos en postcosecha de cítricos son mohos oportunistas que invaden los tejidos normalmente a través de hendiduras naturales o de heridas causadas durante el proceso (Pitt y Hoching, 2009). Esto afecta a directamente a su vida de anaquel y su desarrollo depende principalmente de dos factores externos que determinan la capacidad de un moho para crecer en alimentos: la actividad de agua (a_w) y la temperatura. La determinación de la vida de anaquel en condiciones normales se basa normalmente en pruebas y retos realizados en las empacadoras. Una alternativa rápida y más flexible es la **Micología Predictiva** a través de la modelización del desarrollo fúngico. Desde el punto de vista de la calidad e inocuidad alimentaria, muchas de las investigaciones han sido desarrolladas para modelar el crecimiento fúngico en función de la temperatura y la a_w. En nuestra investigación el efecto de la a_w no se tomó en cuenta debido a que el limón Persa de alta calidad mantiene una a_w estable durante su almacenamiento, aproximadamente de 6 a 8 semanas (PC-012-2004).

Resulta difícil hacer un comparativo de los resultados obtenidos en la modelización del crecimiento de *A. niger* debido a la falta de información que existe en torno a ello. La mayoría de estudios refieren a la modelización de *A. niger* respecto a la a_w en combinación con la temperatura en pastelillos ya que resulta ser el principal causante de deterioro (Huchet *et al.*, 2013), donde el control de la actividad acuosa juega un papel muy importante en su vida de anaquel. En nuestro caso se trabajó a un a_w fija definida por la a_w máxima del limón, y en general de las frutas, que es aproximadamente 0.99 (Pitt y Hocking, 2009). En este estudio se muestra el comportamiento, con respecto a la temperatura, de las diferentes cepas de *A. niger* aisladas de cítricos. Los valores de temperatura cardinales obtenidos en esta investigación, concuerdan con lo reportado anteriormente para *A. niger*. Pitt y Hocking (2009) reportan valores que resultan muy similares: T_{min} entre 8 - 12 °C; T_{max} a 45 – 47 °C y T_{opt} entre 35 – 37 °C. Gougouli *et al.*, (2012) modelizó el crecimiento de *A. niger* en yogurt, alimento de alta a_w, a diferentes temperaturas, utilizando el modelo CMI de Rosso, obteniendo resultados similares para T_{min} (9.6 °C), T_{max} (46.9 °C) y T_{opt} (35.0 °C). Sin embargo, para esos valores de temperatura, obtiene una velocidad de crecimiento μ_{opt} de 1.32

mm/h, mientras que en este estudio se obtienen valores menores, entre 4.5 y 6 mm/d (0.19 – 0.25 mm/h). Esta diferencia puede ser muy probablemente por la diferencia en la matriz utilizada ya que los mohos tienden a comportarse de diferente e manera dependiendo del sustrato en la que se desarrollen (Rychlik y Schieberle, 2001).

En micología predictiva, modelizar el tiempo en el que se hace visible la contaminación es un parámetro útil, pues un producto se considera deteriorado en cuanto la colonia es visible a simple vista. Éste es un valor más confiable en lugar de utilizar como parámetro la fase lag. (Baert *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010; Huchet, *et al.*, 2013). El resultado de esta investigación muestra que cuando el moho se va acercando a la temperatura óptima, en la velocidad de crecimiento aumenta haciéndose la colonia visible en un tiempo menor. A una menor temperatura tardará más en desarrollarse. Silva *et al.* (2010) obtuvieron valores similares en la modelización del crecimiento de *A. niger* en néctar de mango, sin embargo, ellos modelizaron la fase lag, encontrando diferencias significativas entre los parámetros estimados y la validación. No consideraron el tiempo t_v en que aparece visible la colonia, y como lo recomiendan varios autores (Burgain *et al.*, 2013; Gougouli *et al.*, 2011). Huchet *et al.* (2013) por su parte, modelizaron el tiempo t_v para *A. candidus* en pastelillos utilizando también el modelo CMI de Rosso (2001) obteniendo un buen ajuste del tiempo previsto y el tiempo observado durante la validación sobre los pastelillos directamente. Los resultados obtenidos en este trabajo de velocidad y t_v coinciden con los parámetros teóricos de crecimiento reportados para *A. niger* indicando un comportamiento teórico normal de las diferentes cepas. Sin embargo, la validación sobre el fruto es importante.

Para entender el comportamiento del moho en la superficie del fruto, se modelizó el crecimiento de *A. niger* directamente sobre limón Persa. Sorpresivamente, se observó que el moho crece significativamente más lento sobre el limón Persa tanto a bajas como a altas temperaturas mostrando alta variabilidad. Se observó que cerca de las condiciones óptimas de crecimiento la temperatura ejerce poca influencia sobre la velocidad μ_{max}. Conforme

aumenta la temperatura, el tiempo en que el moho es visible decrece. Garcia *et al*. (2010) estudio el efecto de la temperatura en condiciones extremas en la variabilidad intraespecífica en el crecimiento y producción de OTA en A. carbonarius. Encontraron diferencias significativas entre la velocidad, la fase lag y los niveles de OTA utilizando un gran número de aislados. Observaron que el comportamiento de todas las cepas fue consistente. De manera similar, en nuestra investigación, las cinco cepas utilizadas de *A. niger* muestran variabilidad en el crecimiento en condiciones subóptimas, siendo esta natural y normal, como lo observaron García *et al*. (2010). Esto implica que los resultados del modelo se verán afectados por esa variabilidad. En este caso, las especies pueden ser representadas por una sola cepa, de comportamiento variable, en el experimento de validación, sin demeritar el modelo.

Baert *et al.* (2007) modelizaron el efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento y la fase lag de *P. expansum* en manzanas, encontrando diferencias entre los valores obtenidos para la fase lag entre el medio complejo de manzana y en las manzanas frescas, por lo que decidieron modelizar el efecto del tamaño del inóculo inicial sobre el crecimiento del moho (Baert *et al.*, 2008). Ellos encontraron que, con un inóculo bajo, se obtienen fases lag más largas y con alta variabilidad, indicando un crecimiento más lento del moho. En nuestro estudio se observó que la infección del limón con *A. niger* ocurre en aproximadamente el 28 % de los frutos utilizando un inóculo bajo (5×10^3 esporas/mL). Esto indica que no todas las esporas presentes germinan, influenciando los parámetros estimados para *A. niger* dando valores mayores de t_v. Es posible observar diferencias entre la velocidad μ y el tiempo t_v bajo la influencia de factores externos. Estas especies fúngicas pueden infectar el limón, y serán las condiciones ambientales las que determinarán si se desarrolla la pudrición (Pardo *et al*., 2005; Burgain *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestra investigación, el tamaño del inóculo inicial y a_w fueron constantes, por lo que la temperatura fue el factor principal que influencia el crecimiento del moho, por lo cual es necesario generar información más precisa sobre el impacto y la relación de este factor en condiciones óptimas y marginales sobre la germinación, crecimiento y producción de micotoxinas de *A. niger* sobre el limón Persa.

La germinación es un paso importante a considerar, pues tan pronto el moho es visible, el fruto se considera contaminado. La variabilidad en el tiempo de germinación ha sido observada cuando las esporas sufren estrés. Dagnas *et al.* (2015) estudiando la variabilidad en la germinación de esporas en *P. corylophilum* bajo diferentes concentraciones de extracto de semillas de col morada, encontraron que cuando aumentaba la concentración de los extractos, el rango de germinación era menor. Por otro lado, un proceso fitopatógeno activo comienza inmediatamente después de que las esporas son depositadas en el tejido, mientras que otros patógenos pueden permanecer en la cutícula inmadura inactivos durante meses hasta que el fruto madura (Prusky *et al.*, 2009). En el caso del limón existen barreras mecánicas en el pericarpio que protegen el fruto. La lignificación de las heridas, por ejemplo, induce la resistencia a las infecciones fúngicas. Otro ejemplo es el citral presente en el flavedo, que ha sido investigado por su actividad contra *P. digitatum* (Ben-Yehoshua *et al.*, 1995). Este tipo de protección es muy probablemente la causa del crecimiento lento de *A. niger* en los limones, pues no permite el acceso a los nutrientes comparado con el medio de agar, y reduce el crecimiento.

Este trabajo fue la primera aproximación de la modelización de la velocidad de crecimiento μ y el tiempo t_v para *A. niger* en limón Persa. Este estudio demostró que para los aislados analizados, μ y t_v predichos no son significativamente diferentes de los comparados con las referencias, pero sobre los limones, situación real, los mohos tienen diferente comportamiento. Es más probable que el limón por sí mismo sea la causa de las diferencias entre los valores predichos y observados para la velocidad de crecimiento y el tiempo en que se observa el micelio. Las barreras químicas y mecánicas en la piel de los cítricos, las diferencias en la matriz alimentaria, así como la cantidad de inóculo inicial para una germinación eficiente deben tomarse en cuenta con el fin de elaborar el mejor modelo en el marco del desarrollo de las estrategias de control de la contaminación fúngica.

Resulta evidente que con el control la contaminación por mohos se previene la exposición a las micotoxinas, sin embargo, las micotoxinas son invisibles al ojo humano y muchas veces, debido a las carencias alimentarias, algunas poblaciones se ven obligadas a consumir alimentos contaminados (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014). Actualmente el control de mohos se realiza por medio de fungicidas sintéticos para evitar las pudriciones en postcosecha, no obstante, la demanda de los consumidores de productos libres de residuos químicos, y de la resistencia desarrollada por algunos mohos patógenos a los fungicidas ha estimulado el desarrollo de alternativas para el control de mohos más seguras y amigables con el medio ambiente (Nicosia *et al.*, 2016). Entre los microorganismos con potencial para el control biológico, las levaduras son de particular interés debido a su capacidad para colonizar heridas durante largo tiempo en condiciones de baja humedad, además de desplegar diversos mecanismos de antagonismo (Cubiau *et al.*, 2012).

Las levaduras antagónicas deben permanecer viables a pesar de las condiciones desfavorables que encuentran. La levadura *D. hansenii* inoculada en nuestra investigación 8 horas antes del reto resultó eficaz en la inhibición de los mohos *A. alternata*, *A. carbonarius* y *A. niger*. Resultados similares encontraron Chalutz y Wilson (1990) en la inhibición de *P. digitatum* con *D. hansemnii* inoculado simultáneamente o antes del inóculo del patógeno, inclusive a temperaturas bajas, normalmente utilizadas en la industria citrícola durante el transporte, observando ineficacia cuando se inoculó la levadura después del moho. La inhibición resultó dependiente de la concentración inicial de levaduras, siendo la concentración de 10^9 cel/mL la que resultó más efectiva. En estudios similares, Droby *et al.* (1989) encontraron también 10^9 cel/mL de *D. hansenii* efectivas contra *P. digitatum*, concentraciones más altas que en nuestra investigación. En estudios previos, la misma cepa de *D. hansenii* de origen marino utilizada en este estudio, se utilizó para la inhibición de *P. digitatum* en limón mexicano (*C. aurantifolia* S.), obteniendo resultados de inhibición en proporciones similares a las obtenidas sobre *A. niger*, *A. alternata* y *A. carbonarius* (Hernández-Montiel *et al.*, 2010). Otras levaduras han sido utilizadas con éxito en el control de patógenos en postcosecha. *C. sake* y *P. agglomerans* resultaron efectivas contra *P.*

expansum productor de patulina en manzanas, donde también observó que *P. agglomerans* es más eficaz en el control de la difusión de patulina en el fruto (Morales *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha utilizado *K. thermotolerans* en el control de *Arpergillus* sección Nigri ocratoxigénico, observando que el grado de antagonismo depende de la cepa, de la a_w y la temperatura en que se realiza la inhibición (Ponsone *et al.*, 2011). Más aún, la levadura *D. hansenii* ha demostrado tener capacidad de inhibir el crecimiento y la producción extracelular de OTA en *A. westerdijkiae* (Gil-Serna *et al.*, 2011).

En cuanto a la protección del fruto debido a la posible presencia de toxinas killer de levaduras, los mohos muestran un comportamiento muy diferente. En nuestra investigación se observa una baja inhibición, con diferencias significativas solo para *A. carbonarius*. Este moho resultó ser sensible a la inhibición muy probablemente debida a la acción de toxinas killer, pero solo en bajas concentraciones de inóculo inicial del moho. La actividad killer se ha detectado en levaduras de diferentes orígenes y al parecer, la propiedad killer no parece estar uniformemente distribuida (Llorente *et al.*, 1997). La actividad killer y su papel ecológico es todavía objeto de estudio, lo cual nos indica que se debe profundizar sobre la obtención de estas proteínas para estimular y optimizar su producción. Se ha encontrado que altas concentraciones de NaCL estimula la producción de toxinas killer, tal es el caso de *P. anómala* que aumenta la actividad killer con 2 % de NaCl (Wang *et al.*, 2007). *D. hansenii* es una levadura presente normalmente en ambientes marinos y en alimentos con altas concentraciones de sal (Prista *et al*., 2005). Se ha observado que es un contaminante común en salmueras y su tolerancia a altas concentraciones de NaCL o KCl le confiere una ventaja selectiva adicional de la cepa killer en competencia contra el moho sensible (Llorente *et al.*, 1996). Investigaciones en nuestro laboratorio mostraron que *D. hansenii* presenta una alta actividad killer contra patógenos alimentarios (*Salmonella poona, Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli O157-H7*) cultivada con 3.5 % de NaCl (resultados no publicados).

Para determinar la posible absorción de las micotoxinas por la levadura *D. hansenii* se tomaron extractos representativos de cada uno de los mohos estudiados. La disminución significativa de la mortalidad de nauplios es indicativo de que algo sucede con las micotoxinas, muy probablemente sean absorbidas por las levaduras, mediante la unión directa de las moléculas de las toxinas a la pared celular, ya que éstas se utilizaron lavadas. La reducción de niveles de OTA por levaduras ha sido reportado que ocurre por diferentes mecanismos en procesos de vinificación: por absorción dentro de la superficie celular de la levadura, o debido a interacciones con su metabolismo (Cuabiu *et al.*, 2012). En el caso de *D. hansenii* esta ha sido estudiada como antagonista de mohos fitopatógenos de uvas, además de haber sido demostrada su eficacia en la reducción de OTA *in vitro*, donde altos niveles de OTA extracelular fueron absorbidos por la pared celular de la levadura, principalmente a pH bajo (hasta 98 % a pH 3), inclusive con células muertas, descartando completamente la absorción de OTA dentro de la célula o la degradación de la micotoxina por enzimas constitutivas de la levadura. Muy probablemente el estado iónico provocado por el bajo pH sea lo que favorece la remoción de la micotoxina por la levadura (Gil-Serna *et al.*, 2011). Utilizando una metodología similar a la nuestra, Shetty *et al.* (2007) analizaron la fijación de la AFB_1 por *S. cerevisiae* aislada de la biota normal de alimentos fermentados tradicionales de Gana, encontrando que la levadura, viable o no viable, es efectiva para fijar la micotoxina en la fase exponencial de su crecimiento, haciendo énfasis en la ventaja de su utilización en muchos productos fermentados.

Las levaduras presentan alto potencial en el control biológico debido a la capacidad de colonizar la superficie de plantas o heridas por largos períodos en condiciones de baja humedad, además de poseer varios mecanismos de antagonismo. En general un decremento significativo de los niveles de micotoxinas en co-cultivo con levaduras puede estar relacionado con la inhibición del moho. Sin embargo, el contenido de micotoxinas no siempre está relacionado proporcionalmente a la biomasa fúngica (Cuabiu *et al.*, 2012). La aplicación de *D. hansenii* puede resultar apropiada y proveer una protección integral de cítricos en

postcosecha al inhibir el crecimiento fúngico, así como para la remoción de micotoxinas si estas llegan a estar presentes.

El consumo de limón deteriorado es poco probable, sin embargo, la posibilidad de su utilización en la elaboración de subproductos es más factible. Hasta el momento, el presente estudio indica que existe un potencial peligro de desarrollo de mohos micotoxigénicos en limón Persa (*C. latifolia* T.), y esto representa la etapa inicial en la evaluación del riesgo alimentario (FAO, 2014b), la cual indica que las micotoxinas tienen la oportunidad de estar presentes en los limones con la posible contaminación de sus derivados. Considerando la frecuencia con la que estos mohos se encuentran como parte de la biota epífita en cítricos y que pueden desarrollarse en el fruto, conociendo los efectos adversos de las micotoxinas, compuestos altamente tóxicos (IARC, 2002), que si bien se cuantifican en concentraciones bajas, son de efectos crónicos acumulativos, y que además, son estables a los procesos alimentarios (Álvarez *et al.*, 2005; Barceloux, 2008), aunado a que estas se difunden en el fruto y por su estabilidad pueden permanecer en los productos derivados de los cítricos, resulta imperativo controlar su **desarrollo**. El uso de la levadura marina *D. hansenii* resulta una buena alternativa de control biológico en postcosecha al ser efectiva contra estos mohos micotoxigénicos. *D. hansenii* ha sido analizada por sobrevivir bajo ambientes adversos y no ser tóxico para el humano, entre otros atributos (Banjara *et al.*, 2016). Es importante continuar investigando para optimizar los métodos que aseguren la inocuidad alimentaria, y que contribuyan a salvaguardar la salud de los consumidores. Gracias a esta investigación, se tiene por primera vez la evidencia de la síntesis sobre un medio a base de limón (AL) de más de una micotoxina producida por los mohos fitopatógenos, además de tener la evidencia de la síntesis de micotoxinas de interés alimentario sobre el fruto de limón Persa.

9. CONCLUSIONES

- Se identificaron mohos fitopatógenos con capacidad de sintetizar micotoxinas de interés alimentario, tomando como sustrato al limón Persa. Estas micotoxinas pueden ser detectadas a corto plazo y en bajas concentraciones por medio de bioensayos.
- La presencia de genes que participan en la biosíntesis de micotoxinas en los mohos fitopatógenos, pueden ser indicativo del potencial micotoxigénico y del peligro que representa el desarrollo de estos mohos en el limón Persa. La presencia de ARNm correlaciona al moho con la síntesis de la micotoxina involucrada de manera más directa.
- Se demostró que las toxinas pueden penetrar el fruto con la posible contaminación de sus derivados.
- Se demostró que las micotoxinas producidas por los mohos fitopatógenos en el limón Persa constituyen un riesgo alimentario con la muy probable contaminación de subproductos y el posible riesgo de la exposición humana a las micotoxinas.
- Las levaduras marinas, presentan actividad antagónica contra los mohos micotoxigénicos al inhibir su crecimiento, y son capaces de absorber o utilizar los metabolitos secundarios tóxicos, por lo cual, éstas pueden ser utilizadas como una alternativa para la biopeservación del limón Persa.

10. PERSPECTIVAS

La presente investigación abre la posibilidad de profundizar en diversos temas como los siguientes:

- Los resultados mostraron que *A. alternata, A. carbonarius* y *A. niger* producen micotoxinas diferentes a las tradicionalmente reportadas. Esto implica un estudio a profundidad desde el punto de vista genético en sus rutas biosintéticas, y/o desde el punto de vista de identidad taxonómica, muy compleja en los mohos u hongos filamentosos.
- Una vez que se demostró la síntesis y difusión de micotoxinas en el fruto, la investigación sobre la ocurrencia e incidencia de micotoxinas en derivados de cítricos como factor de riesgo alimentario es obligada.
- Con el fin de mejorar las estrategias de control de mohos patógenos en postcosecha, es importante continuar con estudios de modelización del crecimiento fúngico y el tiempo en que se hace visible la colonia sobre el limón Persa en función de factores externos como el tamaño del inóculo inicial; así como la modelización de la inhibición del crecimiento con levaduras antagónicas.
- La levadura *D. hansenii* demostró tener actividad antagónica contra mohos micotoxigénicos. El siguiente paso sería el estudio de los mecanismos de acción de las levaduras como agente de biocontrol, además de su formulación.

11. LITERATURA CITADA

AFSSA (Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments). 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Thomann- Fremy Ed. 308p.

Agrios G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Ed. Elsevier Academic Press Eds. Amsterdam. 922p.

Alemandri, V., M. Sobrero, M.L. Basilico, J.C. Sanchis, J.C. Basílico. 2004. Determinación de la capacidad toxigénica de mohos aislados de jugos cítricos. Revista FABICIB. 8(1): 241-248.

Álvarez, B. P., M.G. Jaén, C.V. Estévez, J.M. Expósito, C. Soldevilla. 2005. Hongos toxicogénicos asociados a trigos y cebadas de Castilla y León. Boletín de sanidad vegetal. Plagas. 31(4):519-529.

Amorós, M. 2003. Producción de Agrios. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 352p.

Ariza, M.R., T.O. Larsen, B.O. Petersen, H.O. Duus, A.F. Barrero. 2002. *Penicillium digitatum* metabolites on synthetic media y citrus fruits. J. Agric. Food Chem. 50(22): 6361-6365.

Ascencio, F. 2012. Validación De Un Paquete Tecnológico Para La Protección De Cítricos Contra Hongos Patógenos En Postcosecha Mediante La Aplicación De Levaduras. SAGARPA-CONACYT. La Paz, B. C. S. México.

Atoui, A., F. Mathieu, A. Lebrihi. 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification y ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. Int. J. Food Microbiol. 115(3):313–318.

Baert, K., A. Valero, B. De Meulenaer, S. Samapundo, M.M. Ahmed, M. L. Bo, J. Debevere, F. Devlieghere. 2007. Modeling the effect of temperature on the growth rate y lag phase of *Penicillium expansum* in apples. Int. J. Food Microbiol. 118(2):139-150.

Baert, K., F. Devlieghere, L. Debevere, J. Bo, B. De Meulenaer. 2008. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. Food Microbiol. 25:212–217.

Baeza, M.E., M.A. Sanhueza, V.H. Cifuentes. 2008. Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. Biol. Res. 41(2):173-182.

Baird, R., H.K. Abbas, G. Windham, P. Williams, S. Baird, M.P. Kelley, L. Hawkins, M. Scruggs. 2008. Identification of Select Fumonisin Forming Fusarium Species Using PCR Applications of the Polyketide Synthase Gene y its Relationship to Fumonisin Production *in vitro*. Int. J. Mol. Sci. 9:554-570.

Bamba, R., G. Sumbali. 2005. Co-occurence of aflatoxin B1 y cyclopiazonic acid in sour lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during pot-harvest pathogenesis by *Aspergillus flavus*. Mycopathologia. 159(3):407-411.

Banjara, N., K.W. Nickerson, M.J. Suhr, H.E. Hallen-Adams. 2016. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic Candida yeasts. Internat. J. Food Microbiol. 222:23-29.

Baranyi, J., T.A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23:277–294.

Barceloux, D.G. 2008. Medical Toxicology of Natural Substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants y Venomous Animals. A John Wiley y Sons, Inc. 621p.

Barkai-Golan R., N. Paster. 2008. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part one. World Mycotoxin J. 1(2):147-159.

Barkai-Golan, R. 2008. Alternaria mycotoxins. In: Barkai-Golan R, y Paster, N. (Eds). Mycotoxins in fruits y vegetables. Academic Press. San Diego. pp 185-203.

Bar-Shimon, M., H. Yehuda, L. Cohen, B. Weiss, A. Kobeshnikov, A. Daus, M Goldway, M. Wisniewski, S. Droby. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Curr. Genet. 45:140–148.

Battilani, P., C. Barbano, A. Logrieco. 2008. Risk assessment and safety evaluation of mycotoxins in fruits. In: Barkai-Golan R. and N. Paster. (Eds). Elsevier, Academic Press, Amterdam. pp. 1-26.

Ben-Yehoshua, S., V. Rodov, D. Qiu Fang, J. Jin Kim. 1995. Preformed Antifungal Compounds of Citrus Fruit: Effect of Postharvest Treatments with Heat y Growth Regulators. J. Agric. Food Chem. 43:1062-1066.

Blumenthal C.Z. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, y *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi/ Regulatory Toxicology y Pharmacology 39:214–228.

Bottalico, A., A. Logrieco. 1998. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. 65:108.

Braissant, O., D. Wirz, B. Göpfert, A.U. Daniels. 2010. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. FEMS Microbiol Lett. 303(1):1-8.

Breierová, E., Z. Hromádková, E. Stratilová, V. Sasinková, A. Ebringerová. 2005. Effect of salt stress on the production and properties of extracellular polysaccharides produced by *Cryptococcus laurentii*. Z. Naturforsch C. 60(5-6):444-450.

Brodhagen, M., N.P. Keller. 2006. Signaling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. Molec. Plant Pathol. 7(4):285-301.

Brown, R.F. 1969. The effect of some mycotoxins on the brine shrimp, *Artemia salina*. J. Am. Oil Chem. Soc. 46(2):119-119.

Brzonkalik, K., T. Herrling, C. Syldatk, A. Neumann. 2011. The influence of different nitrogen y carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. Int. J. Food Microbiol. 147(2):120–126.

Burgain, A., M. Bensoussan, P. Dantigny. 2013. Effect of inoculum size y water activity on the time to visible growth of *Penicillium chrysogenum* colony. Int. J. Food Microbiol. 163(2-3):180-3.

CDC (Centers of Disease Control y Prevention). 2012. Consultado 13/09/12. Disponible en http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html.

Cerutti, M., F. Neumayer. 2004. Introducción a la elaboración de aceite esencial de limón. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Rosario Ar. Invenio. 7(12):149-155.

Chalutz, E., C.L. Wilson. 1990. Postharvest Biocontrol of Green y Blue Mold y sour Rot of Citrus Fruit by *Debaryomyces hansenii*. Plant Dis. 74:134-137.

Chen, J., C.J. Mirocha, W. Xie, L. Hogge, D. Olson. 1992. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f.sp. Lycopersici. Appl. Environ. Microbiol. 3928-3931.

Cires-Pujol, M. 2002. La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. Revista Cubana de Medicina General Integral. 18(2):165-168.

Combina, M, A. Dalcero, E. Varsavsky, A. Torres, M. Etcheverry, M. Rodriguez, Q.H. Gonzalez. 1999. Effect of heat treatments on stability of altemariol, alternariol monomethyl ether y tenuazonic acid in sunflower flour. Mycotoxin Research. 15(1):33-38.

Cubaiu, L., H. Abbas, A.D. Dobson, M. Budroni, Q. Migheli. 2012. A *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strain Inhibits Growth y Decreases Ochratoxin A Biosynthesis by *Aspergillus carbonarius and Aspergillus ochraceus*. Toxins. 4(12):1468-1481.

Dagnas, S., M. Gougouli, B. Onno, K.P. Koutsoumanis, J.M. Membré. 2015. Modeling red cabbage seed extract effect on *Penicillium corylophilum*: Relationship between germination time, individual y population lag time. Int. J. Food Microbiol. 211:86–94.

Dantigny, P., M. Bensoussan. 2008. The logarithmic transformation should be avoided for stabilising the variance of mould growth rate. Int. J. Food Microbiol. 121(2):225-228.

Dombrink-Kurtzman, M.A. Economic Aspects of Mycotoxins in Fruits and Vegetables- En: Barkai-Golan R., N. Paster. (Eds). Elsevier, Academic Press. Amterdam. pp. 27-44.

Droby, S., E. Chalutz, C.L. Wilson, M. Wisniewski. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. Canadian Journal of Microbiology. 35(8):794-800.

Droby, S., V. Vinokur, B. Weiss, L. Cohen, A. Daus, E. Goldsmith, R. Porat. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Phytopathology. 92:393–399.

Eayre, C.G., M. Skaria, C.T. Bull, B. Mackey. 2003. An avirulent *Galactomyces* species that controls green mold of citrus caused by *Penicillium digitatum*. Subtropical Plant Science. 55:46-50.

El Khoury A., A. Atoui. 2010. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. Toxins. 2:461-493.

El-Ghaouth, A., J.L. Smilanick, M. Wisniewski, C.L.Wilson. 2000. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* y 2-deoxy-D-glucose. Plant Dis. 84(3):249-253.

Errampalli, D., N.R. Brubacher, J.R. DeEll. 2006. Sensitivity of *Penicillium expansum* to diphenylamine and thiabendazole and postharvest control of blue mold with fludioxonil in 'McIntosh'apples. Postharvest Biol. Tech. 39(1):101-107.

Esteban, A., M.L. Abarca, M.R. Bragulat, F.J. Cabañes. 2004. Effects of temperature y incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. Res. Microb. 155(10):861–866.

Faid M., A. Tantaoui-Elaraki. 1989. Production of Toxic Metabolites by *Penicillium italicum* y *P. digitatum* Isolated from Citrus Fruits. J. Food Protec.52 (3):194-197.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2014a. Documentos de la FAO Sobre Productos Básicos y Comercio 1. Perspectivas a Plazo Medio de los Productos Básicos Agrícolas. En línea. Consultado: 01/02/2017. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s00.htm#Contents.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2017. Estadísticas. En línea. Consultado 1/02/17. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2014b. Inocuidad de piensos. Consultado 1/02/2017. Disponible en http://www.fao.org/docrep/019/i1379s/i1379s.pdf.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2003. PROYECCIONES DE LA PRODUCCIÓN Y CONSUMO MUNDIALES DE CÍTRICOS EN EL AÑO 2010. Consultado: 02/02/17. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/MEETING/006/y8471s.htm#P74_27074.

FDA (Food y Drug Administration). BAM (Bacteriological Analytical Manual). 2001. Ch. 18. Yeasts, molds and mycotoxins. Methods for determining toxin production by molds. On line. Downloaded from http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm.

Filtenborg, O., J.C. Frisvad, U. Thrane. 1996. Moulds in food spoilage. Int. J. Food Microbiol. 33:85-102.

Fischer I.H., S. Afonseca, M. Bellato, L. Amorin. 2009. Characterization of the fungal population in citrus packing houses. Eur. J.Plant Pathol. 123:449-460.

Frisvad, J C., J.L. Smedsgaard, T.O. Larsen, R.A. Samson. 2004. Mycotoxins, drugs y other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Stud. Mycol. 49:201-241.

Frisvad, J.C., J.Smedsgaard, R.A. Samson, T.O. Larsen, U. Thrane. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. J. Agric. Food Chem. 55(23):9727–9732.

Frisvad, JC, U.R.A. Thrane. 2007. Samson. Mycotoxin producers. En: Dijksterhuis J, Samson R.A. (Eds). Food mycology: a multifaceted approach to fungi y food. CRC Press; Boca Raton, USA. p 135.

Gallo, A., G. Perrone, M. Solfrizzo, F. Epifani, A. Abbas Alan, D.W. Dobson, G. Mulè. 2009. Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. Int. J. Food Microbiol. 129(1):8–15.

Gallo, A., G. Stea, P. Battilani, A. Logrieco, G. Perrone. 2012. Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. Phytopathologia Mediterranea. 51(1):198−206.

García, D., A.J. Ramos, V. Sanchis, S. Marín. 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. Food Microbiol. 26(8):757-769.

García, D., A.J. Ramos, V. Sanchis, S. Marín. 2010. Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions y inoculum size. Food Microbiol. 27:909-917.

García-Cela, E., A. Crespo-Sempere, A.J. Ramos, V. Sanchis, S. Marin. 2014. Ecophysiological characterization of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* y *Aspergillus niger* isolated from grapes in Spanish vineyards. Int. J. Food Microbiol. 173:89–98.

Georgianna, D.R., G.A. Payne. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. Fungal Genet. Biol. 46(2):113–125.

Gil-Serna, J., B. Patiño, L. Cortés, M.T. González-Jaén, C. Vázquez. 2011. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. Int. J.Food Microbiol. 151(1):113-118.

González, A.M., M. Presa, M.G. Latorre, M.C. Lurá. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre Artemia salina. Rev Iberoam Micol. 24(1):59-61.

González - Sánchez F. y R. Silva - Echevarría. 2003. Caracterización de las Cadenas Prioritarias e Identificación de las Demandas Tecnológicas: Cadena de Limón Mexicano. Universidad de Colima y Fundación Produce Colima, A.C. (Eds). Colima, México. 122pp.

Gougouli, M., K. Kalantzi, E. Beletsiotis, K.P. Koutsoumanis. 2011. Development y application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. Food Microbiol. 28(8):1453-1462.

Gougouli, M. y K.P. Koutsoumanis. 2012. Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. Int. J. Food Microbiol. 152(3):153-161.

Graham, F., L. Paradis, P. Bégin, J. Paradis, Y. Babin y A. Des Roches. 2014. Risk of allergic reaction y sensitization to antibiotics in foods. Ann. Allerg Asthma Im. 113(3):329–330.

Grenier, B., I.P. Oswald. 2011. Mycotoxin co-contamination of food y feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. World Mycotoxin J. 4(3):285-313.

Hartl, M., H.U. Humpf. 2000. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. Food Chem Toxicol. 38(12):1097-1102.

Harwing J., P. M. Scott. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening for fungal toxins. Appl Microbiol. 21(6):1011-1016.

Hayashi, N., K. Tanabe, T. Tsuge, S. Nishimura, K. Kohmoto, H. Otani. 1990. Determination of host-selective toxin production during spore germination of *Alternaria alternata* by high-performance liquid chromatography. Phytopathol. 80(10):1088-1091.

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

Herrera, T., M. Ulloa. 2004. El reino de los Hongos. Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México. (Eds). México. 552p.

Huchet, V., S. Pavan, A. Lochardet, M.L. Divanac'h, F. Postollec, D. Thuault. 2013. Development y application of a predictive model of *Aspergillus candidus* growth as a tool to improve shelf life of bakery products. Food microbiology. 36(2)254 -259.

Huynh, V.L., A.B. Lloyd. 1984. Synthesis and degradation of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. I. Synthesis of aflatoxin Bl by young mycelium and its subsequent degradation in aging mycelium. Aust. J. Biol. Sci. 37(2): 37-44.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2002. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. IARC Press. Lyon, France. 590p.

Inglis, D.O., J. Binkley, M.S. Skrzypek, M B. Arnaud, G.C. Cerqueira, P. Shah, F. Wymore, J.R. Wortman, G. Sherlock. 2013. Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes y gene clusters of *Aspergillus nidulans, A. fumigatus, A. niger* y *A. oryzae*. BMC Microbiology. 13(1):91.

Inoue, T., Y. Nagatomi, A. Uyama, N. Mochizuki. 2013. Fate of mycotoxins during beer brewing y fermentation. Biosc. Biotech. Biochem. 77(7):1410-1415.

Kabak, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. 2009. J. Sci. Agric. 89: 549-554.

Laidou, I.A., C.C. Thanassoulopoulos, M. Liakopoulou-Kyriakides. 2001. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post- harvest pathogens. J. Phytopathol. 149(7-8):457-461.

Lazzaro, I., A. Susca, G. Mulè, A. Ritieni, R. Ferracane, A. Marocco, y P. Battilani. 2012. Effects of temperature y water activity on FUM2 y FUM21 gene expression y fumonisin B production in *Fusarium verticillioides*. Eur. J. Plant Pathol. 134(4):685-695.

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. 167:153–160.

Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 25:402–408.

Liyana-Pathirana, C., F. Shahidi. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chem. 93(1):47–56.

Llorente, P., D. Marquina, A. Santos, J.M. Peinado, I. Spencer-Martins. 1997. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. Appl. Environ. Microbiol. 63(3):1165-1167.

Logrieco, A., A. Bottalico, G. Mulé, A. Moretti, G. Perrone. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi y their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. Eur. J. Plant Pathol. 109(7):645-667.

Logrieco, A., A. Visconti, A. Bottalico. 1990. Mandarin fruit rot caused by *Alternaria alternata* y associated mycotoxins. Plant Dis. 74(6):415-417.

Lou, J., L. Fu, Y. Peng, L. Zhou. 2013. Metabolites from *Alternaria* Fungi y Their Bioactivities. Review. Molecules. 18:5891-5935.

Lu, Y., X. Xu, T. Li, Y. Xu. 2011. The Use of a Brine Shrimp (*Artemia salina*) Bioassay to Assess the Water Quality in Hangzhou Section of Beijing-Hangzhou Grand Canal Xu Wu. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 88:472-476.

Lugauskas, A., J. Stakènienè. 2002. Toxin producing micromycetes on fruit, berries, and vegetables. Ann. Agric. Environ. Med. 9:183-197.

Lumor, S. E.; F. Diez-Gonzalez, T. P. Labuza. 2011. Detection of warfare agents in liquid foods using the brine shrimp lethality assay. J. Food Sci. 76(1):16-19.

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

Magan, N.; A. Medina, D. Aldred. 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. Plant Pathol. 60:150–163.

Magliani, W., S. Conti, M. Gerloni, D. Bertolotti, L. Polonelli. 1997. Yeast Killer Systems. Clinical Microbiology Reviews. 7:369–400.

Magnani, R.F., G.D. De Souza, D. Rodrigues-Filho. 2007. Analysis of Alternariol y Alternariol Monomethyl Ether on Flavedo and Albedo Tissues of Tangerines (*Citrus reticulata*) with Symptoms of *Alternaria* Brown Spot. J. Agric Food Chem. 55(13):4980-6.

Marino, A., A. Nostro y C. Fiorentino. 2009. Ochatoxin A production by *Aspergillus westerdjkiae* in orange fruit y juice. Int. J. Food Microbiol. 132:185–189.

Marroquín-Cardona, A.G., N.M. Johnson, T.D. Phillips, A.W. Hayes. 2014. Mycotoxins in a changing global environment – a review. Food Chem. Toxicol. 69:220–30.

Michailides, T.J., D.P. Morgan, Y. Luo. 2009. Epidemiological assessments and postharvest disease incidence. In Postharvest Pathology. Springer Netherlands. pp. 69-88.

Morales, H., V. Sanchis, J. Usall, A.J. Ramos, S. Marín. 2008. Effect of biocontrol agents *Candida sake* y *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth y patulin accumulation in apples. Int. J.Food Microbiol. 122(1):61-67.

Morgensen, J.M., J.C. Frisvad, U. Thrane, K. F. Nielsen. 2010. Production of Fumonisin B2 y B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. J. Agric. Food Chem. 58(2):954–958.

Moss, M.O. 2007. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. J. Appl. Microbiol. ISSN 1364-5072.

Nicosia, M.G.L.D., S. Pangallo, G. Raphael, F.V. Romeo, M.C. Strano, P. Rapisarda, S. Droby, L. Schena. 2016. Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. Postharvest Biol. Tech. 114:54-61. Maria

Nunes, C.A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. Eur. J. Plant Pathol. 133:181–196.

Ochoa, J.L., L.G. Hernández-Montiel, H. Latisniere-Barragán, J.L. León-de-la-Luz, C.P. Larralde Corona. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L Osbeck cultivada en Baja California Sur, México, CyTA J. Food. 5(005):352-359.

Palou, L., J.L. Smilanick, S. Droby. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green y blue moulds. Stewart Postharvest Review, 4(2):1-16.

Palou L., J. Usall, J. Pons, M.C. Cerdà, I. Viñas. 2001. Micoflora en centrales citrícolas de Tarragona. Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales. 16(3):448-462.

Paradells, S., B. Rocamonde, C. Llinares, V. Herranz-Pérez, M. Jimenez, J.M. Garcia-Verdugo, I. Zipancic, J.M. Soria, M. Garcia-Esparza. 2014. Neurotoxic effects of ochratoxin A on the subventricular zone of adult mouse brain. J. Appl. Toxicol. 35(7):737-751.

Pardo, E., U. Lagunas, V. Sanchis, A.J. Ramos, S. Marín. 2005. Influence of water activity y temperature on conidial germination y mycelial growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on grape juice synthetic medium. Predictive models. J. Sci. Food Agric. 85:1681-1686.

Paulsch, W.E., E.A. Sizoo, H.P. Van Egmond. 1988. Liquid chromatographic determination of aflatoxins in feedstuffs containing citrus pulp. Association of Official Analytical Chemists 71(5):957-961.

PC-012-2004. Pliego de Condiciones para el uso de la marca oficial México Calidad Selecta en limón Persa. SAGARPA-SE.

Pel, H.J., J.H. de Winde, D.B. Archer, P.S. Dyer, G. Hofmann, P.J. Schaap, G. Turner, R.P. de Vries, R. Albang, K. Albermann, M.R. Andersen, J.D. Bendtsen, J.A.E. Benen, M. van den Berg, S. Breestraat, M.X. Caddick, R. Contreras, M. Cornell, P.M Coutinho, E.G.J. Danchin, A.J.M. Debets, P. Dekker, P.W.M. van Dijck, A. van Dijk, L. Dijkhuizen, A.J.M. Driessen, C. d'Enfert, S. Geysens, C. Goosen, G.S.P.Groot., P.W.J. de Groot, T. Guillemette, B. Henrissat, M. Herweijer, J.P.T.W. van den Hombergh, C.A.M.J.J. van den Hondel, R.T.J.M. van der Heijden, R.M. van der Kaaij, F.M. Klis, H.J. Kools, C.P. Kubicek, P.A. van Kuyk, J. Lauber, X. Lu, M.J.E C. van der Maarel, R. Meulenberg, H. Menke, M.A.M. Mortimer, J. Nielsen, S.G. Oliver, M. Olsthoorn, K. Pal, N.N.M.E. van Peij, A.F.J. Ram, U. Rinas, J.A. Roubos, C.M.J. Sagt, M. Schmoll, J. Sun, D. Ussery, J. Varga, W. Vervecken, P.J.J. van de Vondervoort, H. Wedler, H.A.B. Wösten, A. Zeng, A.J.J. van Ooyen, J. Visser and Hein Stam. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. Nature Biotechnology. 25(2):221-31.

Perrone, G. A., G. Susca, K. Cozzi, J. Ehrlich, J.C. Varga, M. Frisvad, P. Meijer, W. Noonim, L. Mahakarnchanakul, R.A. Samson. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Stud Mycol. 59:53–66.

Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, J. Waddell. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J. Antimicrob. Chemoth. 53(1):28-52.

Pitt, J.I., A.D. Hocking. 2009. Fungi y Food Spoilage. Third edition. Springer, N.Y. 519p.

Ponsone, M.L., M.L. Chiotta, M. Combina, A. Dalcero, S. Chulze. 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A y *Aspergillus* section Nigri in grapes. Int. J. Food Microbiol. 151(1):70-77.

Pose, G., A. Patriarca, V. Kyanko, A. Pardo, V. Fernández-Pinto. 2010. Water activity y temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. Int. J. Food Microbiol. 142(3):348-353.

Price, M.S., S.B. Conners, S. Tachdjian, R.M. Kelly, G.A. Payne. 2005. Aflatoxin conducive y non-conducive growth conditions reveal new gene associations with aflatoxin production. Fungal Genet. Biol. 42(6):506-518.

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

Prusky, D., N. Alkan, I. Miyara, S. Barad, M. Davidzon, I. Kobiler, S. Brown-Horowitz, A. Lichter, A. Sherman, R. Fluhr. 2009. Mechanisms Modulating Postharvest Pathogen Colonization of Decaying Fruits. En: D. Prusky y M.L. Gullino (Eds.), Postharvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century. Vol. 2, p43-53

Ren, Y, P. Zhanga, D.Yana, Y. Yana, L. Chena, L. Qiua, Z. Meib, X. Xiao. 2012. Application of microcalorimetry of *Escherichia coli* growth y discriminant analysis to the quality assessment of a Chinese herbal injection (Yinzhihuang). Acta Pharmaceutica Sinica B. 2(3):278-285.

Restani, P. 2008. Diffution of mycotoxins in fruits y vegetables, in Mouldy in fruits y vegetables. In: Barkai-Golan R., Paster N. (Eds). Elsevier, Academic Press, Amterdam. p105-114.

Ribeiro, D.H., F.L. Ferreira, V.N. Da-Silva, S. Aquino, B. Corrêa. 2010. Effects of aflatoxin B1 y fumonisin B1 on the viability y induction of apoptosis in rat primary hepatocytes. Int. J. Mol. Sci. 11(4):1944-1955.

Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. J. Appl. Bacteriol. 81:501-508.

Rosso, L., T.P. Robinson. 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. Int. J. Food Microbiol. 63:265-273.

Rosso, L., J.R. Lobry, S. Bajard, J.P. Flandrois. 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. J. Theor. Biol. 162:447-463.

Rychlik, M., P. Schieberle. 2001. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, y wheat bread. Eur. Food Res. Technol. 212(3):274-278.

Sandoval-Contreras, T. 2011. Caracterización fenotípica y genotípica de mohos y levaduras en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* S.) y limón Persa (*Citrus latifolia* T.) procedentes de campos de cultivo y empacadoras de Jalisco y Colima. Tesis de Maestría. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. México.

Santos, A., D. Marquina. 2004. Killer toxin of Pichia membranifaciens and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. Microbiology. 150(8):2527-2534.

Scherm, B., M. Palomba, D. Serra, A. Marcello, Q. Migheli. 2005. Detection of transcrios of the aflatoxin genes aflD, aflO and aflP by reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of the aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Int. J. Food Microbiol. 98:201-210.

Schmidt-Heydt, M., A. Abdel-Hadi, N. Magan, R. Geisen. 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity y temperature. Int. J. Food Microbiol. 135(3):231-237.

Schmidt-Heydt, M., C.E. Rüfer, A. Abdel-Hadi, N. Magan, N., R. Geisen. 2010. The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature y water activity is related to the ratio of *aflS* to *aflR* expression. Mycotoxin Res., 26(4):241-246.

Schmitt, M.J., F. Breinig. 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. FEMS Microbiol. Rev. 26:257-276.

Shephard, G. S. 2008. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. Food Addit. Contam. A. 25(10):1246-1256.

Sheppard, D. C., P. L. Howell. 2016. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from bacteria. J. Biol. Chem. 291(24), 12529-12537.

Shetty, P.H., B. Hald, L. Jespersen. 2007. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. Int. J. Food Microbiol. 113(1):41-46.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. En línea. Consultado: 02/02/17. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do.

Silva, A. R., A.S. Sant'Ana, P.R. Massaguer. 2010. Modelling the lag time y growth rate of *Aspergillus* section Nigri IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature y pH. J Appl Microbiol. 109(3):1105-16.

Silva-Sanchez, J. 2006. Resistencia a antibióticos. Rev. Latinoam. Microbiol. 48 (2):105-112.

Smilanick J. L., M. F. Mansour, D. Sorenson. 2006. Pre y postharvest treatments to control green mold of citrus during ethylene degreening. Plant Dis. 90:89-96.

Soares, C., T. Calado, T., A. Venâncio. 2013. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. Rev Iberoam Micol. 30(1):9-13.

Speijers, G.J.A., M.H.M. Speijers. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicol. Lett. 153(1):91-98.

Sperandio, E.M., H.M. Martins-Do-Vale, G.A.M. Moreira. 2015. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity y use in the biocontrol of citrus green mould. Fungal Biology. 119:984-993.

Stechina, D. E. 2005. Estudios de obtención de pectina aplicando procesos de membrana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Del Litoral. Argentina.

Stinson, E.E., S.F. Osman, E.G. Heisler, J. Siciliano, D.D. Bills. 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, y lemons. Journal of Agricultural y Food Chemistry. 29(4):790-792.

Stoev, S. D. 2015. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment y underestimated hazard of masked mycotoxins y joint mycotoxin effects or interaction. Environ. Toxicol. Phar. 39(2):794-809.

Tseng, M.N., P.C. Chung, S.S. Tzean. 2011. Enhancing the stress tolerance and virulence of an entomopathogen by metabolic engineering of dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis genes. Appl. Environ. Microbiol. 77(13):4508-4519.

UACh-SE (Universidad Autónoma Chapingo y Secretaría de economía). 2002. Unidad gestora de servicios tecnológicos. Estudio para dar valor agregado en cítricos. 4:92.

Usall, J., J. Smilanick, L. Palou, N. Denis-Arrue, N. Teixido, R. Torres, I. Vinas. 2008. Preventive y curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. Posth. Biol. Technol. 50:1-7.

Vanhaecke, P., G. Persoone. 1981. Report on an intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia* nauplii (ARC-Test). INSERM. 106:359-376.

Varga, J., S. Kocsubé, K. Suria, G.Y. Szigeti, A. Szekeres, M. Varga, B. Tóth,T.Bartók. 2010. Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin. Int. J. Food Microbiol. 143(3):143-149.

Varma, S.K., R.A. Verma. 1987. Aflatoxin B1 production in orange (*Citrus reticulata*) juice by isolates of *Aspergillus flavus* link. Mycopathologia. 97(2):101-104.

Vishwanath, V., M. Sulyok, R. Labuda, W. Bicker, R. Krska. 2009. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 395(5):1355–1372.

Wachowska, U., J. Borowska. 2014. Antagonistic yeasts competes for iron with winter wheat stem base pathogens. Gesunde Pflanzen. 66(4)141-148

Wang, X., C. Zhenming, L.Yue, J. Li, M. L.Wu. 2007. A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus Trituberculatus)* and an optimization of the toxin production. Microbiol. Res. 162 (1):77-85.

WHO (World Health Organization). International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2002. Lyon. IARCPress.

Xing, Y., L. Tong, N. Chen, Z. Yu, Y. Zhao. 2015. Simultaneous determination of four aflatoxins in *Citrus reticulata* Blanco by ultra-performance liquid chromatography coupled with immunomagnetic beads for enrichment y purification. Chinese J. Chromatog. 33(12):1320-1326.

Zainudin, N.A.I.M., N. Perumal. 2015. Mycotoxins production by *Fusarium* y *Aspergillus* species isolated from cornmeal. Int. J. Agric. Biol. 17:440-448.

Zhao, K., B. Shao, D. Yang, F. Li. 2014. Natural Occurrence of Four *Alternaria* Mycotoxins in Tomato and Citrus-Based Foods in China. J. Agric. Food Chem. 63(1):343-348.

Zhao, Y., L. Jia, J. Wanga, M. Gong, P. Zhang, P. Li, H. Liu, L. Wang, Y. Li, S.Liu, X. Xiao. 2013. Microcalorimetry with correspondence analysis for studying the antibacterial effect of ephedrine on *Escherichia coli*. Thermochim. Acta. 557(1):50-54.