

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS**



**ENSAYOS PARA EL CONTROL DE MOHOS ALTERANTES EN  
FRUTA DE HUESO MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS  
ANTAGONISTAS.**

**Máster Universitario en Gestión de la Calidad y Trazabilidad de Alimentos  
de Origen Vegetal.**

**Memoria de Trabajo Fin de Máster**

Nerea Escudero Albarca

Noviembre 2020

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**ENSAYOS PARA EL CONTROL DE MOHOS ALTERANTES EN  
FRUTA DE HUESO MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS  
ANTAGONISTAS.**

**Máster Universitario en Gestión de la Calidad y Trazabilidad de Alimentos  
de Origen Vegetal.**

**AUTOR: Nerea Escudero Albarca**

**TUTOR/ES: Alejandro Hernández León y Alicia Rodríguez Jiménez**

**Tutor: Alejandro Hernández León**

**Cotutor: Alicia Rodríguez Jiménez**

**Fdo:.....**

**Fdo:.....**

**Convocatoria: Noviembre 2020**

## ÍNDICE

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Principales Especies Fúngicas Alterantes Y No Productores De Micotoxinas.....	7
2.2 Especies Implicadas En Deterioro De Frutas Potencialmente Toxigénicas .....	12
2.2.1 Producción De Patulina Por <i>P. expansum</i> En Frutas.....	16
2.3 Métodos De Control Del Desarrollo Fúngico Y Reducción De La Contaminación Por Micotoxina En Fruta.....	18
2.3.1 Función De Levaduras Como Antagonistas .....	21
3. OBJETIVOS .....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
4.1. Material General .....	26
4.1.1 Reactivos .....	26
4.1.2 Instrumentación .....	26
4.2 Material Biologico .....	27
4.2.1 Caracterización de la fruta .....	28
4.3 Diseño Experimental .....	30
4.3.1 Tratamientos.....	30
4.3.2 Preparación de los inoculos .....	31
4.3.3 Inoculación .....	32
4.3.4 Determinación de la incidencia y severidad de <i>Penicillium expansum</i> .....	33
4.3.5 Determinación de la producción de patulina .....	34
4.3.6 Análisis de expresión de los genes implicados en la síntesis de patulina. ....	37
4.3.6.1 Extracción de ARN .....	37
4.3.6.2 Síntesis de ADNc .....	38
4.3.6.3 Reacciones de qPCR .....	38
4.3.6.4 Cálculo de la expresión génica relativa .....	39
4.3.7 Análisis Estadístico .....	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5.1 Resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.....	41
5.2 Incidencia y severidad de <i>Penicillium expansum</i> . ....	42
5.3 Producción de Patulina.....	53
5.4 Efecto de las levaduras en la expresión del gen <i>idh</i> implicado en la síntesis de micotoxinas por <i>Penicillium expansum</i> . ....	56
6. CONCLUSIONES.....	59

<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>
-----------------------------	-----------

# **CAPÍTULO I.**

## **RESUMEN**

## 1. RESUMEN

Las frutas son unos de los alimentos indispensables para llevar un estilo de vida saludable, por su alto porcentaje en agua, vitaminas y minerales, sin embargo, es un alimento altamente perecedero, debido a la acción que hacen sobre ella mohos fitopatógenos. Estos mohos causan podredumbres devastadoras en precosecha y postcosecha. Además, muchos de ellos son productores de micotoxinas. Esto supone un gran riesgo para el consumidor, ya que pueden no ser eliminados en las etapas de procesamiento y pasar al consumidor poniéndolo en riesgo. Por ello, se hace uso de distintos métodos de control de estos mohos, que pueden ser de naturaleza física, química, y biológica. Por lo que respecta a los métodos biológicos, se trata de unos métodos novedosos y respetuosos con el medio ambiente, donde se utilizan generalmente microorganismos, comúnmente levaduras por su gran versatilidad, para el control de los mohos fitopatógenos.

El objetivo de este estudio es evaluar la capacidad de las levaduras *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672 como agentes de biocontrol frente al moho azul, *Penicillium expansum*, productor de patulina. Para el desarrollo de este trabajo se usó la cepa toxigénica *Penicillium expansum* CECT2280 como control, y se coinoculó con dichas levaduras en cuatro variedades de fruta de hueso (nectarina, melocotón, paraguayo y ciruela). La incubación se llevó a cabo en barquetas a temperatura ambiente durante 6 días. Se hizo un seguimiento del desarrollo de la podredumbre del moho para posteriormente determinar la incidencia y severidad del daño ocasionado a la fruta. Además, se evaluó la efectividad para controlar la producción de patulina, determinada mediante análisis de electroforesis capilar y mediante la expresión del gen *idh*, implicado en la biosíntesis de patulina, mediante técnicas de PCR en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR).

Los resultados obtenidos muestran que ambas levaduras ejercen un efecto inhibitorio y reductor de la enfermedad ocasionada por *Penicillium expansum* en las cuatro variedades de fruta, siendo mayor este efecto inhibitorio con la levadura *Metschnikowia pulcherrima* L672. En cuanto a la producción de patulina, el tratamiento con *Metschnikowia pulcherrima* L672 presenta un 100% de reducción de producción de patulina con respecto al control; exceptuando melocotón donde la reducción mayor la ejerce *Pichia kudriavzevii* L40, la cual no aporta reducción en las otras variedades de frutas. Por último, de los resultados obtenidos del estudio

de la expresión relativa del gen *idh* se pudo observar que las levaduras presentan patrones muy diferentes. Presentándose una mayor inhibición de la expresión del gen *idh* en presencia de *Pichia kudriavzevii* L40 en las cuatro variedades, en comparación con *Metschnikowia pulcherrima* L672 donde la expresión del gen se mantiene activa desde el inicio. Esta inhibición por parte de *Pichia kudriavzevii* L40 puede ser esencial en la industria alimentaria para la aplicación de medidas preventivas y/o la aplicación de esta estrategia para evitar la acumulación de patulina en el alimento.

Por todo esto se puede evidenciar la actividad como agentes de biocontrol de ambas levaduras sobre el crecimiento del moho, producción de patulina y sobre la expresión del gen *idh*.

**CAPÍTULO II.**  
**INTRODUCCIÓN**

## 2. INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas son alimentos altamente perecederos, por ello, durante el tiempo que transcurre entre la cosecha de estas, y su consumo, puede producirse sobre los productos la pérdida de su calidad debido a cambios físicos, químicos y microbiológicos.

Los deterioros ocasionados por métodos físicos pueden ser más o menos fáciles de controlar, ya que muchos de ellos son ocasionados por el hombre, por ejemplo, los daños mecánicos, como pueden ser los golpes, apretones a la hora de recoger la fruta, la colocación de unas cajas encima de otras, entre otros, que pueden ocurrir en las etapas de cosecha o empaquetado de los productos por parte de los manipuladores (Chun-Ta Wu, 2010). El problema de estos daños es que muchas veces las lesiones producidas dan pie a que se desarrollen daños de otro tipo, generalmente biológico; que es la entrada de patógenos en etapas postcosecha, y, por ende, deteriorando más el fruto y con ello su calidad. Otros problemas físicos pueden ser la temperatura de almacenaje y distribución de estos productos, ya que si esta no es adecuada puede ocasionar una maduración repentina de los frutos en cámara. Nuevamente este hecho puede ocasionar el desarrollo de alguna enfermedad de tipo fúngico, y posteriormente se pueden extender al resto del lote, lo que provocaría pérdidas importantes para el proveedor, ya que esa fruta no podría comercializarse (Chun -Ta Wu., 2010; Redondo, 2018).

El mayor problema de índole químico viene asociado al uso de pesticidas; estos son sustancias destinadas a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución de un producto. Pese a ello, los plaguicidas tienen efectos adversos muy relevantes, como puede ser el deterioro de los suelos agrícolas debido a los residuos químicos, contaminación de las aguas por filtraciones de estas sustancias en el suelo, y la contaminación de los mismos frutos, ya que muchos de ellos son capaces de retener estas sustancias en la piel incluso incorporarlas al interior del mismo. Inclusive muchos de estos plaguicidas tienen efectos muy dañinos sobre la salud del hombre, tanto a corta como a larga exposición a los mismos. Algunos de ellos son capaces de estimular el desarrollo de cáncer. Por los efectos tan perjudiciales en el ecosistema y en los seres vivos que en el habitan, estas sustancias están en constante revisión, y se recomienda su uso como última medida, si por otros medios se puede erradicar las plagas. Así mismo, la presencia de estos plaguicidas en los frutos, no debe sobrepasar unos límites estipulados en la legislación (Schirra et al., 2011).

En cuanto a los cambios producidos por agentes biológicos, no solo supone una pérdida de calidad, sino que además causa pérdidas económicas, así como, riesgo para la salud del consumidor por la posible presencia de toxinas o de microorganismos patógenos. Las superficies expuestas de la fruta se contaminan a través del suelo, agua, aire, animales, insectos, excrementos, etc. en las etapas precosecha. Posteriormente pueden contaminarse por el contacto con el equipo de procesamiento. El daño microbiano puede ser ocasionado por bacterias, levaduras y mohos. La presencia microbiana varía según la fruta, la procedencia de esta y su crecimiento. Como las frutas son usualmente ácidas con un rango de pH próximo a 4-5, lo que les proporciona mayor resistencia frente a las bacterias. Esto no sucede en hortalizas, ya que al tener un pH cercano al neutro son igualmente vulnerables tanto a hongos como a bacterias (Pitt y Hocking., 1990). Debido a este bajo pH de las frutas se selecciona el crecimiento de levaduras y mohos, predominando el de este último grupo y, además el de las bacterias lácticas. Las bacterias patógenas no proliferan por el bajo pH, pero pueden sobrevivir el tiempo suficiente como para desarrollar una enfermedad. Lo más habitual son gastroenteritis, sin embargo, también nos podemos encontrar con enfermedades más perjudiciales como botulismo o listeriosis, generalmente asociada por el contacto con heces o agua contaminada (Juliarena y Gratton, 2015).

Las levaduras, en general, no presentan el mismo nivel de patogenicidad que los mohos. Estas, pese a parecer en gran número en las superficies de las frutas frescas junto con los mohos, no tienen los mecanismos necesarios para invadir los tejidos, lo que los cataloga como agentes secundarios en el deterioro (Alzamora et al., 1995).

Los mohos son hongos que crecen en forma de filamentos multicelulares llamados hifas. Un conjunto de hifas interconectadas con varios núcleos idénticos se denomina micelio. Aunque los mohos crecen en la materia orgánica en la naturaleza, su presencia sólo se puede percibir cuando se han formado colonias visibles a simple vista. Algunos mohos atacan cultivos y plantas ornamentales, otros causan podredumbre en alimentos o productos básicos utilizados para la elaboración de alimentos. Casi todos juegan un papel importante en la biodegradación natural de la materia orgánica y unos pocos son utilizados en la producción de alimentos, bebidas, antibióticos y enzimas (Morales, 2011).

Entre las especies más comunes de mohos causantes de podredumbre encontramos *Monilia*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Geotrichum* (Zinedine y El Akhdari, 2019).

Estos mohos pueden causar deterioros postcosecha, algunos de ellos son: crecimiento de mohos en la superficie de los frutos, antracnosis o chancro (ennegrecimiento de los tejidos asociado a varios hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Gloesporium* y *Coniothyrium*), distintos tipos de podredumbre como por ejemplo la gris causada por *Botrytis cinerea*, o la azul asociada a *Penicillium expansum*. Cabe destacar que estos deterioros dependen de la madurez de la fruta, cuanto más madura este, más susceptibles al deterioro porque la producción de defensa contra microorganismos fúngicos disminuye y además las paredes celulares van sufriendo degradaciones. Así mismo, factores ambientales como son altas temperatura o altas humedades después de la cosecha también favorecen la aparición de microorganismos y con ellos el deterioro de los frutos. (Morales., 2011).

Las enfermedades postcosecha pueden deberse también al resultado de infecciones previas a la cosecha y que se mantienen en estado latente o a infecciones por heridas en etapas posteriores a la cosecha. Las diferencias entre ambas infecciones, es que las latentes están presentes, pero no se manifiesta o exterioriza. Esta forma latente de los mohos generalmente es asociada a condiciones medioambientales desfavorables para su crecimiento; por ejemplo, temperaturas elevadas, bajos niveles de oxígeno o escasez de nutrientes. En consecuencia, a estos factores, el moho en vez de morir se queda en estado latente y se reactiva cuando las condiciones vuelven a ser las idóneas. Debido a la presencia a ambos tipos de infecciones, se pueden separar las especies fúngicas en 2 grupos, los patógenos de infección latente, como *Alternaria* spp., *Fusarium avenaceum*, *Glomerella cingulata*, *Pezicula malicortitis* y *Sphaeropsis pyriputrescens*, o patógenos causantes de infecciones por heridas como *B. cinerea*, *Penicillium expansum*, *Monilinia* spp. y *Mucor pyriformis* (Sanzani et al., 2009, Gowing et al., 1990).

Algunos mohos pueden incluso producir micotoxinas, tanto antes como después de la cosecha. Estas son compuestos químicos producidos de forma natural (no antropogénicos) en el metabolismo secundario de algunos géneros de hongos. Estos compuestos químicos producen efectos nocivos en una gran amplitud de especies animales, en las que se incluye el hombre (Ramos, 2011). Las especies más comunes de mohos asociadas a la producción de micotoxinas son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Fusarium* (Zinedine y El Akhdari., 2019).

Las consecuencias de la presencia de estos mohos en frutales, por ejemplo, en frutales de hueso, afecta al estado general de la planta, marchitez, decaimiento o la muerte. A veces

solamente afecta a una parte concreta de la planta, en tal caso se pueden observar lesiones en la parte aérea, clorosis, manchas necróticas, podredumbre, necrosis en frutos, tumores en el sistema radicular; entre otros. Sin embargo, una vez se realiza la recolección, aparecen las enfermedades postcosecha en las etapas de almacenamiento, distribución y comercialización, generalmente en forma de podredumbres (Arroyo-Cordero et al., 2016).

Se han descrito numerosos hongos patógenos que pueden infectar a distintas especies cultivadas de *Prunus*, siendo las enfermedades del cribado, el oidio, la lepra, la roya, la podredumbre marrón o moniliosis, y la antracnosis en melocotonero, las más destacadas por su gravedad e incidencia (Arroyo-Cordero et al., 2016). Esto convierte a las enfermedades fúngicas, sin duda, en las más importantes en los frutales de hueso, afectando a diversas partes del árbol, tanto aéreas como de cuello y raíz.

En cítricos, se han descrito más de 20 tipos diferentes de enfermedades postcosecha (Chen et al., 2019). Las principales de todas ellas son las causadas por *Penicillium digitatum* (moho verde), *Penicillium italicum* (moho azul) y *Geotrichum citri-aurantii* (pudrición acida). *Penicillium digitatum*, por sí sola, es responsable de aproximadamente el 90% de las pérdidas totales de postcosecha (Regnier et al., 2014). Además, el crecimiento de hongos en la fruta puede conducir a la producción de micotoxinas, incluidos posibles agentes cancerígenos como la citrinina y la patulina, así como compuestos tremórgenos, por ejemplo, las triptoquivalinas (Ariza et al., 2002).

En manzanas, más de 90 especies de hongos pueden causar pudrición (Gowing et al., 1990). Los deterioros pueden estar causados por varios géneros, como *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Fusarium* (Konstantinou et al., 2011). El moho gris causado por *Botrytis cinerea* y el moho azul causado por *Penicillium expansum* se consideran las principales enfermedades postcosecha de la fruta de pepita (Jijakli et al., 2004). Al igual que los anteriores ejemplos, las pérdidas por pudrición en manzana no solo afecta de manera cuantitativa, sino cualitativa, por una posible contaminación por la producción de algunos de estos mohos de micotoxinas. Esto es de gran relevancia para la salud de los consumidores, ya que a menudo estas frutas de menor calidad son usadas en procesamiento para la elaboración de zumos, pudiendo entonces pasar las micotoxinas a la línea de producción y por ende contaminar aquellos frutos no infectados por la toxina y a su vez si no se detecta a tiempo, ser comercializado poniendo en riesgo la salud de los clientes (Morales et al., 2008).

Atendiendo a estos ejemplos, cabe remarcar, la suma importancia de hacer un riguroso control tanto antes como después de la cosecha, para prevenir y/o reducir al máximo las pérdidas de producto y calidad por infección de mohos, haciendo mayor hincapié en aquellos que producen micotoxinas, porque ya no solo estaríamos hablando de pérdidas económicas, sino del bienestar tanto de consumidores como de animales.

## **2.1 Principales especies fúngicas alterantes y no productores de micotoxinas**

Como anteriormente se citó, dentro de los principales mohos alterantes de la fruta encontramos:

- *Monilia* spp.

La moniliosis, podredumbre marrón o momificado es una enfermedad criptogámica (enfermedad de las plantas causada por un hongo u otro organismo filamentosos parásito) que afecta a distintas partes de la planta, principalmente al fruto, pero también infecta la flor y los brotes tanto vegetativos como reproductivos (Arroyo-Cordero et al., 2016). Esta enfermedad es causada por las especies *Monilinia laxa*, *M. fructigena* y *M. fructicola*. Las dos primeras están distribuidas por toda Europa mientras que *M. fructicola* es originaria de América. No obstante, pese a su procedencia se han registrado infecciones de *M. fructicola* en zonas de Europa como son Italia y España en frutas como ciruela y melocotonero. Esto ha determinado que a esta especie se la considere como un organismo de cuarentena A1 (los organismos de cuarentena son aquellos agentes nocivos o causantes de daños sobre la vegetación que no existen previamente en un lugar determinado y pueden ser introducidos a través de diferentes medios), representando un problema para las exportaciones (Redondo et al., 2018).

Se trata de una pudrición seca que le confiere un aspecto momificado y representa una importante fuente de inóculo para la campaña siguiente si no se retiran del árbol. Las temperaturas suaves, de 15 a 22 °C, y la elevada humedad favorecen el desarrollo de esta enfermedad (Gell., 2008; Figura 2.1) El hongo pasa el invierno en dichos frutos momificados y también en los pequeños chancros de ramitas, y por ello resulta casi obligatorio su eliminación del árbol. A finales de invierno, con condiciones favorables se desarrollan los esporodocios que infectan a la brotación de flores y hojas, donde progresa desde la zona de inserción. Una vez desarrollado los frutos, los períodos de lluvia favorece la infección, a menudo facilitada por las picaduras de insectos y aves, especialmente en ciruelo, cuya piel más gruesa y cubierta de cera dificulta la penetración inicial del patógenos (Redondo et al., 2018).



Figura 2.1. Distintos frutos infectados por Monilia. (a) melocotón, (b) cerezas y (c) ciruelas (Gell, 2008).

El control de esta enfermedad resulta muy difícil y para ello se combinan todas las estrategias existentes, cuestión sobre la que se tratará en el epígrafe “1.3 Métodos de control” de este documento.

- *Rhizopus* spp.

Es un hongo filamentoso con elevada capacidad saprofítica. La sintomatología puede aparecer en el campo, aunque, generalmente el desarrollo mayoritario es en postcosecha (Casals et al., 2018; Figura 2.2). La enfermedad causada por este hongo se conoce como podredumbre blanda. *Rhizopus stolonifer* es un patógeno postcosecha importante que contribuye al deterioro considerable de una gran variedad de frutas y hortalizas. Entre los géneros susceptibles a este hongo podemos citar *Allium*, *Ananas*, *Brassica*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Fragaria*, *Lycopersicon*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Solanum* y entre otros.

Generalmente infecta fruta sana que presente heridas recientes o golpes por su manipulación. Sin embargo, en estudios recientes, se ha corroborado que es capaz de penetrar en el fruto sin este presentar heridas o golpes, siempre y cuando disponga de una fuente de nutrientes (Baggio et al., 2016).



Figura 2.2. Fruto en el suelo afectado por *Rhizopus* spp. (Innovagri, 2008).

Actualmente, a diferencia de *Monilinia* spp., para *Rhizopus* spp. no se dispone de información en relación a su epidemiología en nuestra zona productora y se dispone de poca información de las relaciones entre temperatura, horas de humectación y tiempo necesarias para que infecte en campo, en función del estado fenológico de la fruta, así como las condiciones que favorecen su desarrollo una vez se ha producido la infección (Casals et al., 2018).

No obstante, se conoce que, las conidias pueden permanecer viables en los embalajes utilizados para la cosecha favoreciendo la infección de más frutos, lo que indica la importancia de desinfectarlos debidamente. Otro punto crítico de infección es en la central hortofrutícola, concretamente, en el vaciado de la fruta en la balsa del agua, la que deberá ser desinfectada, para también evitar nuevas infecciones (Casals et al., 2018).

Finalmente, durante la postcosecha de la fruta se pueden dar las condiciones, principalmente de temperatura, que favorezcan el desarrollo del hongo. En este sentido, la mayoría de estudios indican que *Rhizopus* spp. puede crecer desde 4,5-5°C hasta 37°C, no obstante, en un estudio han determinado que *Rhizopus* spp. es capaz de desarrollarse en la fruta a 0°C siendo la temperatura óptima 20-21°C (Michailides y Spotts, 1990).

- *Geotrichum* spp.

El hongo *Geotrichum* spp., causante de la podredumbre amarga en frutales de hueso, es un patógeno emergente que hasta hace unos 2 años no estaba presente en nuestra zona, aunque causaba considerables daños en diversas partes del mundo. Tiene un aspecto gelatinoso (Figura 2.3), responsable del efecto de pelado en los frutos, que suele aparecer en momento de alta humedad relativa y alta temperatura en campo. En estudios previos de IRTA Fruitcentre, la investigadora Elena Costa ha determinado que para conseguir una buena esporulación se necesita incubar en una cámara húmeda, y además este hongo puede sensibilizar el tejido pudiendo aparecer infecciones secundarias por *Rhizopus* spp. o *Monilinia* spp.

Este hongo es muy perjudicial en una central frutícola debido a su gran efecto de diseminación, ya que en la línea de clasificación puede causar pérdidas en fruta envasada en bolsas destinadas a contenedores (Costa, 2020).

Desgraciadamente en la actualidad no existe ningún producto para combatirlo, por lo que hay que tomar unas ciertas medidas de profilaxis.

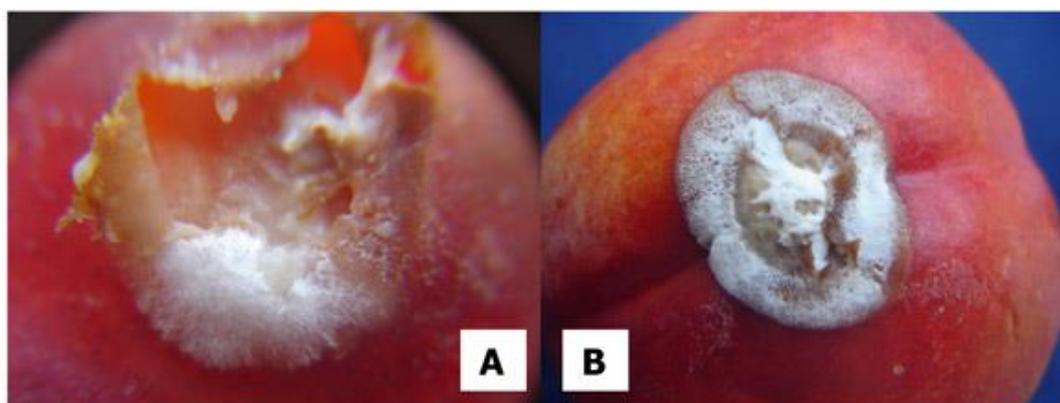


Figura 2.3. (A) Pudrición blanda caracterizada por una conspicua maceración de los tejidos, característica de la pudrición ácida causada por *Geotrichum candidum*. (B). Desarrollo de micelio blanco en condiciones de humedad alta (Henríquez, 2012).

- *Botrytis* spp.

La especie *Botrytis cinerea* es la causante de la pudrición gris en las flores, frutos, hojas, brotes y raíces de más de 200 plantas. El hongo se considera necrótrofo; sin embargo, también puede considerarse un verdadero patógeno vegetal por las pérdidas que ocasiona tanto en cosecha como después de esta (Vannini y Chilosi, 2013). Ataca principalmente fruta como uvas

(*Vitis vinifera*), fresas (*Fragaria ananassa*), frambuesas (*Rubus idaeus*). *Botrytis* provoca que los frutos pierdan agua, quedando deshidratado. Como métodos actuales de control puede tratarse con biofungicidas como *Alternaria oudemansii* (*Ulocladium oudemansii*), o bacterias como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces griseoviridis* (Moraes et al., 2019).

*Botrytis cinerea* en uvas ocasiona pérdidas económicas importantes, puede estar presente en forma latente en los órganos y tejidos de la vid, pero donde más daño inflige es en los racimos. La humedad prolongada también puede favorecer a que se incremente los daños, provocando la pudrición de las bayas. Esto reduce la calidad de los vinos afectando al sabor y color de los mismos (Elad et al., 2004).

En la fresa, al igual que en la uva también causa grandes pérdidas por todo el mundo, debido a la capacidad de permanecer latente y su resistencia tanto a condiciones de humedad como secas. En este cultivo es difícil de identificar en etapas tempranas del desarrollo debido a esta capacidad latente, infectando los tejidos internos; en concreto la flor, y no siendo visible la infección hasta que la planta va desarrollando. Entonces el hongo se activa, provocando una pudrición dura, que a simple vista se observa de color marrón en el cáliz en aquellas frutas todavía no maduras (Figura 2.4). La fruta bien madura es especialmente susceptible a las infecciones de *Botrytis* después de daño físico, lo cual permite que el patógeno colonice rápidamente el tejido dañado y que se propague por toda la fruta (Koike y Bolda, 2016).



Figura 2.4. Deterioro color marrón en el fruto y el pedículo que resulta de la infección de la flor de fresa.

## 2.2 Especies implicadas en deterioro de frutas potencialmente toxigénicas

Dentro de las especies de mohos más comúnmente asociadas al deterioro postcosecha de frutas y hortalizas, y productoras de micotoxinas, nos encontramos:

- *Fusarium*

Este moho habita en el suelo en forma de micelio o en cualquiera de las formas de esporas. Es un género que infecta tanto plantas como animales, incluso a personas. Sin embargo, de las más de cien especies descritas solo una docena son perjudiciales para los seres humanos. Generalmente, lo podemos encontrar en cucurbitáceas, coles, plátano, patata, tomate y gramíneas, ocasionando marchitez vascular o pudrición de raíz y tallos. También causa pudrición en manzanas y peras. Se observa como una necrosis circular marrón, blanda y acuosa, que se extiende gradualmente sobre el tejido infectado, que se hunde ligeramente, a veces con un micelio denso blanquecino. En estudios recientes, se determinó la pudrición por *Fusarium* en cuatro cultivares de manzana, obteniendo una sintomatología similar en todas ellas, que se resume con una necrosis suave circular marrón de diferente extensión, cubierta de esporulación blanquecina, amarillenta o rosada (Figura 2.5), o sin esporulación visible (Server,2012).



Figura 2.5. Síntomas de pudrición por *Fusarium* en manzanas (Server, 2012).

Posee una alta capacidad de sintetizar una amplia variedad de micotoxinas, las cuales las podemos clasificar en 3 grandes grupos: sesquiterpenos (tricotecenos tipos A y B), derivados de policétidos (fumosinas (FBs)) y lactonas (zearalenona (ZEA)) (Morales, 2011). Dentro de estas micotoxinas cabe destacar la beauvericina (BEA) y las enniatinas (ENN) las cuales se han detectado en piensos y en ingredientes de los mismos en unos porcentajes que rozan el 100% (Fraeyman et al., 2017). Estas micotoxinas contaminan la mayoría de los cereales, en los que se incluye el trigo, avena, cebada y centeno. Los productos alimenticios a base de cereales son

los contribuyentes más importantes a la exposición alimentaria aguda y crónica. Podemos asociar estas micotoxinas con el desarrollo de cuadros de toxicidad celular, efectos sobre el crecimiento y el desarrollo de los animales. Así mismo, podemos atribuirle su implicación en el desarrollo de cánceres en humanos y animales domésticos (EFSA, 2014).

- *Alternaria* spp.

Género de mohos ubicuo que incluye especies saprófitas (obtienen sus nutrientes a partir de materiales orgánicos inertes como restos de vegetales y animales), endofíticas (establecen relaciones simbióticas de mutualismo con plantas, habitando dentro de ellas sin causar síntomas aparentes) y patógenas. Las especies de *Alternaria* requieren condiciones de alta humedad y tienden a encontrarse en alimentos con mucha humedad, como los granos antes de la cosecha y las frutas y verduras. La infección por *Alternaria* de frutas y verduras se ha observado en manzanas, naranjas, tomates y pimientos (Bullerman, 2003). Las especies de *Alternaria* son patógenas de plantas graves, causando pérdidas importantes en una amplia gama de cultivos. Algunos taxones, además, son importantes patógenos, agentes causantes de la feohifomicosis (infección poco común causada por hongos negros llamados demateáceos) en inmunocomprometidos o alérgenos en el aire (Woudenberg et al., 2013).

La *Alternaria* es muy fácil de distinguir; casi siempre porque suele provocar manchas en hojas, tallos y pétalos muy características por presentar anillos concéntricos negros o marrones causados por la esporulación (Figura 2.6).



Figura 2.6: Anillos concéntricos negros o marrones causados por la esporulación de *Alternaria*.

Fuente: [www.buddhagenetics.com](http://www.buddhagenetics.com)

*Alternaria*, también es productor de micotoxinas. Dentro de este género se ha confirmado que las especies *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. japonica* se encuentran en productos alimenticios y producen varios metabolitos secundarios tóxicos (Simmons, 2007). Los principales metabolitos secundarios se encuentran en los alimentos y piensos y son: alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), ácido tenuazónico (TA), ácido iso-tenuazónico (iso-TeA), altertoxinas (ATX), tentoxina (TEN), altenueno (ALT) y AALtoxinas (toxinas *Alternaria alternata* f. Sp. *Lycopersici*) (Akimitsu, 2014).

Entre las toxinas elaboradas y acumuladas por cepas del género *Alternaria*, destaca la producción y acumulación del ácido tenuazónico (TA) que posee una elevada toxicidad. Los investigadores Scott y Stolotz (1980) demostraron la capacidad de este compuesto de inhibir la síntesis proteica y del DNA. Esta toxina se ha relacionado con desordenes de tipo hematológico, en el hombre, en países tercermundistas, como en el sur de África o el Sahara.

Estas micotoxinas, una vez infectado los productos, son capaces de sobrevivir al procesado de determinados productos, incluso aumentar. Esto ocurre en zumos de frutas, se ha demostrado que el proceso de pasteurización no es capaz de eliminar las micotoxinas, incluso crea un medio rico para su propagación (Zwickel et al., 2016).

- *Penicillium* spp.

*Penicillium* es bien conocido y es uno de los hongos más comunes que ocurren en una amplia gama de hábitats, desde el suelo hasta la vegetación, el aire, los ambientes interiores y varios productos alimenticios. Tiene una distribución mundial y un gran impacto económico en la vida humana. Su función principal en la naturaleza es la descomposición de materiales orgánicos, donde las especies causan podredumbres devastadoras como patógenos antes y después de la cosecha en los cultivos alimentarios, así como produciendo una amplia gama de micotoxinas (Frisvad et al., 2004). Este hongo requiere la presencia de heridas para poder infectar, ya que no produce apresorios (modificación de las hifas para la infección de una célula epidérmica del huésped) y por lo tanto no puede penetrar en la epidermis de las frutas y hortalizas (Amiri y Bompeix, 2005). Aunque según las investigaciones de Vilanova et al. (2012) pueden producirse diferentes reacciones por parte de la fruta a estas heridas; estas pueden

volverse más resistentes a la infección por mohos, donde las heridas envejecidas fueron más resistentes que las heridas recién formadas a la infección por *Penicillium expansum*, y no solo eso sino que aumentaron el número de taninos, ligninas y diversas sustancias fenológicas en las paredes celulares adyacentes a estas heridas, como mecanismos de defensa.

La especie *P. expansum* se puede encontrar en sustancias orgánicas en descomposición y es un hongo común en el aire, capaz de inducir una reacción alérgica en individuos sensibles (Errampalli, 2014). Se ha detectado la presencia la especie *P. expansum* en una gran variedad de alimentos, entre los que se incluye frutos de pepita (manzana y pera), frutales de hueso (melocotones, nectarinas, albaricoques, ciruelas y cerezas), uvas, fresas, frambuesas, caquis, mango, maracuyá, aguacate y; diversas hortalizas como, cucurbitáceas, zanahorias, cebollas y tomates (Errampalli, 2014). Este hongo se conoce como moho azul por el color de los conidios. Los síntomas de la enfermedad en la fruta aparecen al principio como lesiones blandas y acuosas de color marrón claro y, a medida que la lesión envejece, los conidios se vuelven verde azulados (Figura 2.7). Pese a que este moho, al igual que los de su mismo género necesita la presencia de heridas para infectar también puede causar descomposición a través de una infección en el extremo del tallo, el tubo del cáliz abierto o las lenticelas. Pero este tipo de infección suele ocurrir en frutos demasiado maduros o cuando las lenticelas se han lesionado (Amiri y Bompeix, 2005).

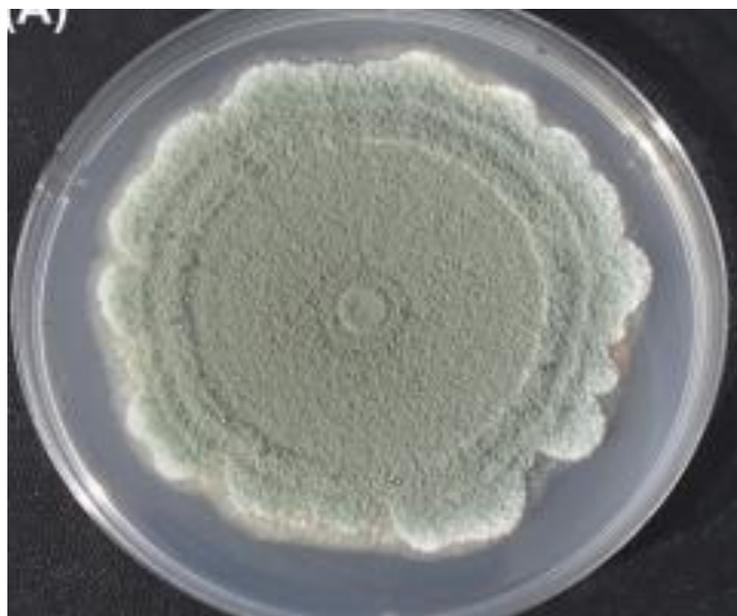


Figura 2.7. Colonia de *Penicillium expansum* sembrada en medio PDA (Errampalli, 2014).

Pese a que la naturaleza de este género es producir el deterioro, existen especies con impactos positivos, por ejemplo, su capacidad de producción de penicilina (Fleming., 1929). Pero no solo tiene efectos positivos en medicina, sino también en la industria alimentaria,

por ejemplo, algunas especies son usadas en la elaboración de quesos concretamente en quesos Camembert o Roquefort (Giraud et al., 2010). Pese a estos efectos beneficiosos, este género posee especies que causan podredumbres devastadoras en los cultivos y a la vez produce una amplia gama de micotoxinas.

Las especies *P. digitatum* y *P. italicum* han sido aisladas de cultivares de cítricos, pero también de otros géneros que están relacionados con estos frutos como *Fortunella*, *Poncirus* o *Citrofortunella* (Farr y Rossman, 2013). Ambos, al igual que *P. expansum*, son patógenos que solo infectan la fruta a través de las heridas que hay en la epidermis debida a manipulación y procesamiento antes y después de la cosecha. Se ha encontrado otra especie, *P. ulaiensis*, que también es patógena de cítricos, pero de una manera mucho menos exhaustiva que las anteriores (Frisvad et al., 2004).

La infección por estos géneros se observa a simple vista a partir del 3 día de la incubación, al principio rodeando la herida se observa el tejido más blando y decolorado. A medida que crece, se forma un micelio blanco aéreo en el centro de la lesión y se va expandiendo radialmente, cuando comienza la esporulación se va formando radialmente una capa coloreada de color verde o azulada respectivamente dependiendo del mohó. Con el paso del tiempo pasará por cubrir todo el fruto. Ambos géneros, necrotróficos, producen enzimas hidrolíticas, como poligalacturonasas y celulasas, que provocan la maceración del tejido durante el desarrollo de la enfermedad (Palou, 2014)

En estudios recientes, determinaron los efectos de la infección y colonización de *P. digitatum* y *P. expansum* en nectarina en la etapa de almacenamiento postcosecha, a nivel molecular y físico. Los resultados fueron que *P. digitatum*, pese a tener menor incidencia de infección, cuando esta aparecía el diámetro de las lesiones era mayor que *P. expansum* (Louw y Korsten, 2019).

*Penicillium expansum* es el principal productor de varios compuestos tóxicos, entre las más importantes se encuentran la patulina (PAT), citrinina (CIT) y roquefortina (Morales, 2011).

### **2.2.1 Producción de patulina por *Penicillium expansum* en frutas**

La patulina es una micotoxina producida principalmente por *P. expansum*, aunque otras especies como *Aspergillus* y *Byssochyllum* son capaces de producirla. Se puede encontrar como contaminante natural de frutos de pepita, fruta de hueso, zumos y compotas de fruta y

quesos. La patulina tiene propiedades citotóxicas, genotóxicas e inmunosupresoras (Moake et al., 2005). Esta micotoxina es inmunosupresiva, es decir, la inhibición de uno o más componentes del sistema inmunitario adaptativo o innato (Gimeno y Martins, 2011). En los últimos años, se han publicado unos pocos estudios sobre la toxicidad *in vivo* de la patulina. La mayoría de los estudios toxicológicos han utilizado modelos *in vitro* y se han centrado en los efectos inmunotóxicos y genotóxicos de la toxina (Puel et al., 2010).

La Unión Europea fijó niveles máximos permitidos en jugos de manzana (50 ppb), purés (25 ppb) y alimentos para bebés (10 ppb) de esta micotoxina, por los problemas anteriormente dichos (Reglamento (UE) nº1881/2006).

La contaminación de productos por *P. expansum* se da principalmente en las etapas de almacenamiento, siendo el principal causante de la podredumbre en manzana y pera en las cámaras de almacenamiento, y en las industrias de producción de derivados de estas frutas (zumos, purés, alimentación infantil, etc.). Sin embargo, también es responsable de podredumbre en postcosecha en ciruelas, albaricoques, melocotones, cerezas, uvas, melones, grosellas y fresas y puede producir micotoxinas en algunos de ellos (Salomao et al., 2009; Spadaro et al., 2010).

*Penicillium expansum* es capaz de crecer a muy bajas temperaturas y producir PAT incluso bajo condiciones de atmósfera modificada, por lo que es obvia su difícil eliminación en las distintas etapas de procesado de estas frutas, debido a que pueden sobrevivir con las temperaturas de almacenamiento y en los procesos de envasado que usen atmósfera modificada para su preservación. Esto se traduce en una gran incidencia de la podredumbre producida por este moho.

Algunos ejemplos, de la producción de patulina en fruta: Reddy et al. (2010), estudiaron 10 cepas de *P. expansum* aisladas previamente de manzanas en la Universidad de Torino. Prepararon suspensiones de esporas de cada una de las cepas de *P. expansum* de manera individual en una concentración final de  $10^5$  conidios/mL. Posteriormente cogieron manzanas, albaricoques, kiwis, melocotones y ciruelas y les inocularon 30  $\mu$ l de suspensión de conidios en una herida previamente hecha. Parte de los frutos se incubaron a 25°C y otros a 4°C. Las concentraciones fueron determinadas por HPLC. Como resultados obtuvieron que *P. expansum* puede colonizar y posteriormente producir cantidades superiores a las permisivas ( $> 50 \mu\text{g/kg}$ ) de patulina a altas temperaturas (25 °C) y también a bajas temperaturas (4 °C).

En un estudio similar se cogieron 60 muestras de zumos de manzana y de frutas variadas, sidras, purés, salsas, jaleas, manzanas enlatadas y compota de frutas mixtas. Las muestras

solidas se hicieron puré, todas fueron tratadas con Pectinex (Protea Industrial Chemicals, Sudáfrica) durante 1 h a 58 °C para eliminar las pectinas. Se purificaron de acuerdo con un método modificado descrito por la BSDA (British Soft Drinks Association). Los extractos purificados se analizaron mediante HPLC isocrática de fase inversa. Como resultado se obtuvo que todas las muestras estaban por debajo de lo que estipulaba la legislación, siendo las concentraciones menores en las sidras, por lo que la fermentación alcohólica es reductora de la micotoxina (Leggotty Shephard, 2000).

Oteiza et al. (2017) estudiaron la influencia de la producción sobre la presencia de patulina y ocratoxina A en jugos de frutas y vinos de Argentina. Demostraron que el 33,5% de las muestras de jugos de frutas contenían PAT y solo el 1,6% de los jugos de frutas y vinos estaban contaminados con OTA. Los valores de las concentraciones de PAT y OTA variaron mucho entre las muestras con respecto al año, el tipo de fruta y el tipo de producto.

Esta micotoxina también puede infectar el pienso de animales, por lo que supondría un riesgo mayor para el ser humano, por la posibilidad de entrar en nuestra cadena alimentaria (Zbyňovská et al., 2016)

### **2.3 Métodos de control del desarrollo fúngico y reducción de la contaminación por micotoxina en fruta**

Los métodos de control tienen como finalidad controlar las enfermedades postcosecha, así como prevenir las infecciones y suprimir el desarrollo de patógenos en la superficie de las frutas y hortalizas antes de la cosecha, mantener la calidad de los productos y alargar su vida útil en almacenamiento. Existen tres grupos de métodos de control del desarrollo fúngico: químicos, físicos y biológicos. Los métodos químicos se basan principalmente en el uso de fungicidas. La aplicación de fungicidas puede realizarse en el campo en etapas previas a la cosecha o en postcosecha, justo al momento, o en etapas posteriores como almacenamiento o empaquetado en cajas. Los tratamientos precosecha, son quizás de mayor interés, ya que la aplicación de compuestos antifúngicos antes de cosechar puede reducir la población de mohos en la superficie de las frutas, protegiendo las heridas que puedan formarse en la epidermis de estas o inducir resistencia como parte del manejo integrado de plagas (Xiao et al., 2011).

En el caso de *P. expansum* hay varios estudios que determinan que la aplicación de estos antifúngicos a tiempo reduce y controlan la presencia del moho. Por ejemplo, la aplicación de ciprodinil en manzanas, las cuales presentaban heridas y fueron inoculadas con los mohos. Tres

semanas antes de la cosecha de estas controla la aparición de moho azul (*P. expansum*) y moho gris (*Botrytis cinerea*) (Sholberg et al., 2005). La aplicación de pirimetanil antes de cosechar también es capaz de controlar la aparición de moho azul en manzanas, que también fueron heridas e inoculadas con el moho, y fueron almacenadas en frío durante 4 meses (Errampalli, 2010).

En el caso de los fungicidas postcosecha, su aplicación sirve para controlar la aparición de mohos durante largos periodos de almacenamiento. Los derivados de benzimidazol fueron los primeros fungicidas sistémicos que estuvieron disponibles para el control de patógenos postcosecha (Delp, 1988). Desde entonces se han aplicado muchos de ellos en forma de soluciones acuosas en las etapas de almacenamiento prolongado, por ejemplo, el TBZ (tiabendazol). Es un fungicida derivado del benzimidazol, uno de los pocos fungicidas aprobados para uso postcosecha en manzanas, peras y cítricos como empapado, inmersión o rociado en línea. En etapas de almacenamiento también se usa la difenilamina (DPA), un antioxidante, sobre todo en fruta de pepita para evitar la escaldadura. Sin embargo, los mohos pueden desarrollar resistencia hacia estos fungicidas, o no hacerles efecto desde el principio, por ejemplo, el TBZ no es efectivo contra *P. expansum* (Errampalli, 2006). La resistencia al fungicida benzimidazol en *P. expansum* está relacionada con la mutación en el codón 198 del gen de la  $\beta$ -tubulina en el patógeno (Yin y Xiao, 2013). En la etapa de envasado, justo antes de esta, los fungicidas se administran en forma de aerosoles, incluso a veces, se hacen combinación de fungicidas con ceras.

En el caso de *Penicillium*, entre los tratamientos químicos capaces de prolongar la vida útil encontramos el ácido giberélico, las poliaminas que tienen actividad y los metiljasmonatos para prevenir de los daños por frío (Campos, 2015). Para controlar las podredumbres durante la postcosecha se usan como en los casos anteriores fungicidas de síntesis como el tiabendazol. Actualmente existen estudios (Contreras, 2010) donde se están observando diversos agentes químicos naturales de baja toxicidad, como las sales inorgánicas, parabenos y agentes de control biológico, con el mismo objetivo que los fungicidas.

Sin embargo, el uso comercial de estos agentes químicos naturales sigue siendo limitado, especialmente debido a la excesiva especificidad, la falta de actividad curativa, las dificultades para desarrollar productos estables y confiables (Teixidó et al., 2013).

Los tratamientos físicos pese a sus limitaciones, son unos métodos de control no contaminantes, simples, baratos, de fácil aplicación y fáciles de combinar con otros métodos,

ya bien sean físicos también, químicos o biológicos, alternativos a los químicos. Algunos de estos tratamientos pueden ser los tratamientos térmicos o las irradiaciones. Los tratamientos térmicos para frutas frescas generalmente se basan en baños de agua caliente cepillado con agua caliente y curado. En este último se expone la fruta durante cierto tiempo (depende de la fruta, en cítricos de 2-3 días) a una atmósfera cuyo aire está a temperaturas superiores a los 30°C y HR (humedad relativa) del 90% (Palou, 2014). Estos métodos tienen la desventaja de que es imposible controlar grandes cantidades de fruta bajo unas condiciones determinadas, pudiendo ocasionar pérdidas de peso por deshidratación debidas a periodos térmicos excesivos o incontrolados (Palou, 2009). Algo similar ocurre con las inmersiones de la fruta en agua caliente por poco tiempo, se ha demostrado que su aplicación puede reducir la presencia de mohos en la superficie de los frutos (Schirra et al., 2004). Sin embargo, la necesidad de tanques grandes para albergar el mayor número de fruta en el menor tiempo posible, con el fin de agilizar el procesado, hace difícil su control. Entre los factores influyentes en este proceso tenemos el fruto, que este sea más susceptible o no a las temperaturas; a su vez las temperaturas efectivas tienen un margen muy estrecho, ya que temperaturas por encima de ese rango podrían suponer la pérdida de frutos y su calidad, y temperaturas inferiores, puede que no prevengan la aparición del moho. Otras limitaciones son el espacio para un tanque de tales dimensiones y los costes de energía y agua que eso supondría para la industria (Palou, 2014).

En cuanto a las irradiaciones, la aplicación de luz UV se ha demostrado que tiene efecto germicida frente a los patógenos y que no afecta de manera perjudicial a las calidades organolépticas del fruto, aunque puede alterar su metabolismo. Aunque esto no afecta al ser humano, este es reacio a comprar productos irradiados. La aplicación de luz UV además se puede combinar con los tratamientos térmicos anteriormente citados, dando como resultado una mayor protección frente a patógenos (Pan et al., 2004).

También prácticas culturales, como la eliminación y retirada de momias, y brotes infectados, constituyen medidas muy adecuadas para reducir el inóculo y de este modo la extensión de la enfermedad. También, el uso de variedades tolerantes al patógeno, representa una estrategia de cierta importancia, a tener en cuenta. De este modo, se han observado diferencias de susceptibilidad entre especies y cultivares. Los frutos de melocotoneros y albaricoqueros son más susceptibles a moniliosis que los de ciruelos y cerezos, de piel más gruesa y cerosa, por su mayor cantidad de pruina, que le confieren mayor resistencia a la podredumbre marrón. Los cerezos, en cambio, son más susceptibles a la marchitez de los brotes.

Actualmente se está incrementando más el control biológico como alternativa al control convencional de los patógenos. Este método de control consiste en el empleo de microorganismos antagónicos, la aplicación de sustancias naturales antimicrobianas, la inducción de defensa y el empleo de productos sintetizantes o sustancias llamadas GRASS (Sustancias generalmente reconocidas como seguras).

El control biológico de *Alternaria alternata* y *A. solani* es posible con cepas específicas de *Bacillus subtilis*, el cual genera metabolitos antifúngicos que desplazan al patógeno. *Alternaria solani* en patata puede tratarse efectivamente con *Pseudomonas* aplicadas a los tubérculos en el momento de la plantación (Solfrizzo, 2017).

Actualmente para controlar el desarrollo de *Fusarium* se hace uso de fungicidas sistemáticos, aunque estos están siendo recientemente remplazados por *Trichoderma*, un hongo beneficioso que actúa como antagonista de *Fusarium*, protegiendo de esta forma las plantas. Estudios recientes demuestran buenos resultados de la aplicación de este hongo en el tomate (Manayay et al., 2016). *Trichoderma* forma colonias en las raíces de las plantas impidiendo la reproducción de *Fusarium*. Además, este antagonista mejora la absorción de nutrientes del suelo, así como, su disponibilidad.

Algunas cepas de *Penicillium frequentans*, y de *Bacillus subtilis* han mostrado actividad antagonista y antimicrobiana frente a *Monilinia* spp. pero los resultados solo se han comprobado en condiciones in vitro y se necesita comprobar su potencial como agente biocontrol en ensayos experimentales (Gell, 2008).

### **2.3.1 Función de levaduras como antagonistas**

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales. Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar las siguientes características generales: a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos y de persistir en ellas de manera efectiva, b) mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes, y c) capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales (Wisniewski y Wilson, 1992). Además, se deben considerar otras características específicas del microorganismo antagonista, como su estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, bajos requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente (Wilson y Wisniewski,

1989). Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso de los mismos, y para la selección de nuevos antagonistas efectivos. Hasta ahora, los conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Actualmente, múltiples estudios persiguen encontrar alternativas al control convencional, centrándose en los antagonistas microbianos para prevenir diferentes enfermedades en diversos tipos de cultivos. Varios agentes antagónicos como *Candida oleophila* (Guerrero et al., 2014), *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Agrobacterium tumefaciens* (Wang et al., 2016), *Lactobacillus plantarum* (Nayyeri et al., 2017), *Hanseniopsis opuntiae*, *Metschnikowia pulcherrima* (de Paiva et al., 2017), *Rhodotorula mucilaginosa* y *Rhodotorula kratochvilovae* (Zheng et al., 2017) han demostrado habilidades para controlar el crecimiento de *P. expansum* y la acumulación de patulina.

Entre los diferentes grupos microbianos propuestos como posibles antagonistas, destacan las levaduras. Las levaduras, son microorganismos eucariotas clasificados como hongos de vida microscópica y unicelular, usada comúnmente en la fermentación debido a su capacidad de descomponer la materia orgánica. Las levaduras son más utilizadas que las bacterias para controlar las enfermedades postcosecha y en menor grado los mohos; debido a que las levaduras tienen propiedades importantes como que son inocuas para animales, vegetales y humanos, tienen mecanismos de adaptación al medio ambiente como baja disponibilidad de agua, cambios bruscos de temperatura, radiación UV y gran versatilidad fisiológica por lo que son fáciles de cultivar (Uribe, 2007). Las levaduras empleadas como antagonistas han mostrado efecto antifúngico sobre diferentes patógenos postcosecha; los mecanismos de acción no han sido del todo establecidos, aunque se sugiere que existe la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia (El Ghaouth y Wilson, 1995). Los ácidos grasos insaturados producidos por las levaduras son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas en la superficie de los frutos (Uríbe, 2007).

Además, las levaduras aisladas de fuentes como la filosfera, las raíces, el suelo y el agua de mar también han demostrado ser buenos antagonistas (Liu et al., 2013). Por ejemplo, se descubrió que la levadura psicrotrofica *Leucosporidium scotti*, aislada del suelo antártico, era un buen agente de biocontrol contra el moho azul y gris en la manzana (Vero et al., 2012). Nally

et al. (2012) mostraron que las levaduras aisladas del mosto fermentado ejercen un efecto inhibitorio contra *Botrytis cinerea* en las uvas de mesa.

En estudios llevados a cabo en la Universidad de Extremadura (Ruiz-Moyano et al., 2016) seleccionaron in vitro levaduras antagónicas (*Hanseniaspora opuntiae* L479 y *Metschnikowia pulcherrima* L672) aisladas de cultivos de higos. Fueron enfrentadas a distintos mohos aislados de higos, entre ellos *Penicillium expansum*. Las levaduras redujeron el crecimiento radial de mohos en PDA entre 45,23% y 66,09%. Además, esta interacción entre los mohos y las levaduras se analizaron utilizando manzanas y nectarinas heridas, con reducciones significativas en el porcentaje de infección y el tamaño de la lesión para todos los mohos probados (Figura 2.8).



Figura 2.8. Imagen comparativa de los tratamientos control y las levaduras *Hanseniaspora opuntiae* L479 y *Metschnikowia pulcherrima* L672 en *Cladosporium cladosporoides* (izq) y de *Monilia laxa* (drch) (Ruiz-Moyano et al., 2016).

Otros ejemplos podrían ser los estudios de Assaf et al. (2020), el cual tuvo como objetivo seleccionar levaduras nativas aisladas de microambientes fermentativos y la superficie de uvas refrigeradas para su posible uso en el control biológico de *P. expansum* en uvas de mesa almacenadas en cámaras frigoríficas. Obteniendo resultados satisfactorios contra *P. expansum* en 3 aislados de *M. pulcherrima*: Mp22, Mp36 y Mp43 reduciendo la incidencia y la gravedad de la enfermedad. Sugar y Basile (2008), en su estudio determinaron que 3 levaduras y una bacteria redujeron la descomposición en las heridas de la pera inoculadas con *P. expansum*

hasta 14 días después de la inoculación con el patógeno, pero se encontró que eran ineficaces cuando se aplicaron 28 días después inoculación (Sugar y Basile, 2008).

## **CAPÍTULO III.**

### **OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster fue determinar y evaluar la actividad de las levaduras *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672 como agentes de biocontrol frente al moho azul, *Penicillium expansum*, productor de patulina. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos.

1. Determinar el efecto biocontrol de las levaduras anteriormente mencionadas sobre el crecimiento de *P. expansum* y la producción de patulina.
2. Determinar el efecto de las levaduras sobre la expresión del gen *idh* implicado en la biosíntesis de patulina.

**CAPÍTULO IV.**  
**MATERIALES Y MÉTODOS.**

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material General

En este apartado se detalla el material de uso general usado para el desarrollo del presente trabajo.

#### 4.1.1 Reactivos

- Cloroformo calidad HPLC de la marca comercial Fisher Chemical.
- Metanol de la marca comercial Fisher Chemical
- Fenolfaleina (1% en etanol) de la marca comercial Scharlau

#### 4.1.2 Instrumentación

- Para la inoculación de los microorganismos y el pipeteo de los reactivos se utilizaron micropipetas BIOHIT de 5-20  $\mu$ L, 50-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L y micropipetas PLURIPET KARTELL de 0,5-2  $\mu$ L y de 2-20  $\mu$ L.
- Durante determinadas etapas del desarrollo de este trabajo se utilizaron vasos de precipitados y matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 mL y 1000 mL de la marca Glassco, así como, probetas de 1000 mL, 500 mL, 100mL y 50mL de la marca Glassco para la medición de sustancias requeridas en cada caso.
- Los tubos tipo Eppendorf de distintos tamaños fueron de la marca EPPENDORF.
- Las jeringas empleadas en la filtración de las micotoxinas fueron de 1 mL y de la marca BD PlastipaK™.
- Los viales utilizados para la detección de micotoxinas fueron de la marca Labbox.
- Pastillas desinfectantes efervescentes de la marca comercial Badalimp.
- Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizaron agitadores magnéticos calefactables de la marca Nahita Blue modelo 692.
- El autoclave utilizado para la esterilización de los medios de cultivo y del resto de material con requerimientos estériles en el transcurso de la investigación, fue de la marca SELECTA PRESOCLAVE 75.
- Para el recuento de las levaduras y esporas de los mohos utilizados en el presente trabajo se utilizó un microscopio óptico OLYMPUS mod. CX40 y acompañado de una cámara de Neubauer de MARIENFELD.

- Para anotar el peso de las muestras, se utilizó una balanza electrónica de la marca SIGMA-ALDRICH modelo KERN EMB de precisión 0,01g.
- Se hizo uso de un congelador de -80°C marca FORMA SCIENTIFIC, para guardar las muestras las recogidas para su posterior extracción de ARN, cuantificación de micotoxinas y para la conservación del material genético.
- En la extracción del ARN se utilizó un termobloque marca SELECTA, modelo TEMBLOC.
- La centrifuga utilizada en la extracción del ARN fue de la marca Eppendorf, modelo MiniSpin plus.
- Para cuantificar el ARN obtenido y medir su calidad se utilizó un NanodropThermoScientific NANODROP 2000C Spectrofotometer.
- El termociclador empleado para la retrotranscripción del ARN a ADNc fue de la marca Eppendorf, modelo NexusGradient.
- El equipo de qPCR utilizado fue el 7300 Real Time PCR System.
- El rotavapor y el speedvac utilizados en la extracción de paulina fueron de las marcas Heidolph LABOROTA 4000 y Fisher GenevacmiVac, respectivamente.
- El equipo de electroforesis capilar usado para determinar la cantidad de micotoxina en las muestras fue de la marca comercial Agilent Technologies modelo 7100, acoplado a un ordenador Samsung Syncmaster EX1920
- Para la limpieza y desinfección de la fruta se usó un Hrydro-coolingDS1000 MÓVIL de la marca comercial KRONEN.
- pHmetro Basic 20+ de sobremesa sin electrodos, de la marca comercial Letslab
- Para medir los grados Brix de la fruta se usó el refractómetro Brixrefractometer, digital, sugar Código RS 667-2159 Fabricante Hanna Instruments.
- Aparte de lo anteriormente citado, se hizo uso de imanes, cucharillas, embudos, cuchillas, morteros, tubos de centrifuga, etc.

## 4.2 Material Biológico

### ▪ Fruta

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizaron cuatro tipos de fruta de hueso: Melocotón, ciruela negra, nectarina y paraguayano pertenecientes a las variedades: Romea, Black gold, Nectavista y Flat beauty, respectivamente. Todas estas frutas provenían de la finca El Escobar, concretamente de la Finca “La Adelantada” (Grupo Catalá) (Diseminado la

Adelantada, 36, 06011 Badajoz). Antes del desarrollo experimental la fruta fue almacenada en cámaras frigoríficas a 1°C hasta su uso.

#### ▪ **Microorganismos**

En el presente trabajo se utilizaron dos cepas de levaduras previamente caracterizadas como antagonistas por el grupo de investigación de Calidad y Microbiología de los Alimentos (CAMIALI) de la UEx:

- L40 *Pichia kudriavzevii* (Cabañas, 2019)
- L672 *Metschnikowia pulcherrima* (Ruiz-Moyano et al., 2016, De Paiva et al., 2017).

Además, se utilizó un moho, adquirido en la Colección Española de Cultivos Tipo, perteneciente a la especie *Penicillium expansum* CECT2280 productor de patulina.

#### **4.2.1 Caracterización de la fruta**

Para determinar la calidad organoléptica de la fruta utilizada en este ensayo, en poco tiempo y de manera fiable se realizaron los siguientes análisis.

#### ▪ **Análisis microbiológico**

Se cogieron 2 piezas de cada fruta. Con una cuchilla estéril se sustrajeron varios trozos de cada pieza de fruta, teniendo un total de 4 trozos por fruta. Se pesaron, se anotó su peso y se pasaron a bolsas estériles a las que se les añadió agua de peptona, la cantidad de esta era 9 veces el peso de los trozos

Una vez realizada la dilución inicial, se realizaron sucesivas diluciones decimales en agua de peptona.

Seguidamente se procedió a sembrar 100 µL de cada dilución en tres medios de cultivo diferentes: PCA (para recuento de aerobios mesófilos totales), PDA (patata dextrosa agar) y RBCA (agar rosa de bengala cloranfenicol), ambas para recuento de mohos y levaduras. Las placas de RBCA y PDA se incubaron a temperatura ambiente (20-25°C), mientras que las de PCA se incubaron en estufa a 30°C.

Posteriormente se procedió al conteo de las placas de manera visual diferenciando las levaduras y mohos presentes. Se seleccionaron placas con entre 30-300 colonias. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de muestra.

Con el fin de que los resultados fueran más fáciles de manejar y comparar, se pasaron los datos de ufc/g a su logaritmo (log ufc/g).

▪ **Análisis fisicoquímico**

Para los análisis fisicoquímicos se cogieron tres piezas de fruta, y se trituraron con una batidora.

Con el triturado se midió el contenido en sólidos mediante el uso de un refractómetro. Para ello previamente se limpió con agua destilada el prisma de vidrio donde se va a depositar la muestra. Los resultados se expresaron como °Brix, y los análisis se realizaron por triplicado para cada tipo de fruta.

Para la acidez titulable (AT) se diluyeron 5g del triturado de fruta con 50mL de agua destilada. Para medir la acidez se utilizó una técnica de valoración con NaOH 0,1M, utilizando como indicador del viraje del pH un par de gotas de fenolftaleína (1% en etanol). Los mL necesarios para el viraje del color del medio fueron utilizados para el cálculo de la AT utilizando una fórmula matemática para transformar la cantidad de mL gastados en datos de acidez.

$$Acidez = ((GB)*(N))/P_{eq}$$

Donde:

- GB= Gasto de bureta en mL
- N= Normalidad del agente titulante, en este caso el ácido mayoritario es el málico, cuyo valor es 0,67045.
- P<sub>eq</sub>= Peso en gramos de la muestra

Los resultados se expresan en % de ácido málico.

Para medir el pH se pesaron 2g del triturado de fruta y se diluyeron con 18mL de H<sub>2</sub>O. La determinación se realizó con un pHmetro, el cual previamente se calibró siguiendo las instrucciones de dicho aparato. El análisis se realizó por triplicado.

### 4.3 Diseño Experimental

#### 4.3.1 Tratamientos.

Antes de comenzar con los tratamientos se higienizó la fruta durante 3 minutos en el Hrydro-cooling, al que se añadieron previamente 4 pastillas desinfectantes efervescentes (Figura 4.1).



Figura 4.1. Equipo Hrydro-cooling DS1000 MÓVIL de la marca comercial KRONEN para la limpieza y desinfección de la fruta.

Como se indica en la Tabla 4.1 se hicieron 3 tipos de tratamiento por fruta: un control al que solo se le inoculaba el mohó, otro al que se inoculaba la cepa L40 (*Pichia kudriavzevii*) más el mohó y el último con L672 (*Metschnikowia pulcherrima*) más el mohó, en este caso el mohó era *Penicillium expansum*. Por cada tratamiento se utilizaron 25 frutos. El desarrollo experimental se llevó a cabo a T<sup>a</sup> ambiente.

Tabla 4.1. Tratamientos del desarrollo experimental.

Tratamiento	Características del tratamiento.
Control	2,5 µL de <i>Penicillium expansum</i>
L40+PE	10 µL de levadura L40 +2,5 µL de <i>Penicillium expansum</i>
L672+PE	10 µL de levadura L672 +2,5 µL de <i>Penicillium expansum</i>

### 4.3.2 Preparación de los inóculos.

Los inóculos de levaduras fueron sembrados en PDA e incubados durante 48h a T<sup>a</sup> ambiente, en condiciones de esterilidad. Estas placas se usaron para posteriormente inocular los matraces previamente preparados con YPD broth (yeast extract peptone dextrose) de la marca comercial Condalab, para el mantenimiento y desarrollo de levaduras; preparado siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos matraces fueron incubados durante 1 día a 4°C.

Para la recogida de los inóculos de levaduras se concentraron los cultivos previamente incubados. Para ello, se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, retirando el sobrenadante. Este proceso se repitió hasta agotar el contenido de los matraces. Los cultivos fueron lavados con agua destilada dos veces, para finalmente resuspender las células en aproximadamente 20 mL de agua destilada estéril.

La cepa de *Penicillium expansum* fueron cultivadas siguiendo las instrucciones de la Colección Española de Cultivos Tipo. Fue sembrada en placas de PDA a una temperatura de 25°C durante 8-10 días, hasta observar que el moho estaba en una fase de esporulación completa.

Una vez pasado este tiempo se procedió a extraer las esporas, que se realizó de la siguiente manera:

- En la misma placa donde tenemos sembrado el moho, añadimos 6 mL de agua con tween 80 (0,05 % v/v). Con el asa de siembra lo arrastramos lentamente para la resuspensión de las esporas en el líquido. Finalmente, con la pipeta cogemos todo el líquido obtenido y lo llevamos a un tubo cónico estéril.

Seguidamente se procedió al conteo de las esporas para determinar su concentración. La concentración fue determinada en el microscopio con una cámara de Neubauer (Figura 4.2)

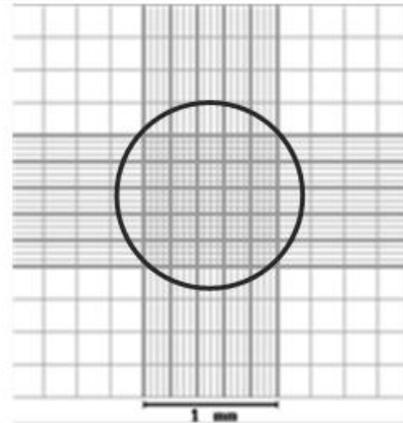


Figura3.2. Imagen de la visión al microscopio de la cámara de Neubauer.

Para determinar la concentración se añadieron una gota de la solución de esporas a la cámara y se sitúa encima un cubreobjetos. Con el objetivo de obtener una concentración estimada adecuada se procedió a contar las células presentes en 5 de los cuadrados que aparecen dentro del espacio señalado en la imagen. Seguidamente se realizó la media de estos cuadrados, y se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración.

$$n^{\circ} \text{ microorganismos/ml} = \frac{n^{\circ} \text{ microorganismos}}{0,04 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \times 0,001 \text{ m/mm}^3} \cdot \text{factor dilución}$$

Este mismo proceso fue realizado para las levaduras, partiendo de las células resuspendidas en 20mL de agua destilada estéril.

Finalmente, las soluciones de microorganismos se llevaron a las concentraciones finales para su inoculación, que fueron  $10^8$  células/mL para las levaduras, y el moho a  $10^5$  conidios/mL.

### 4.3.3 Inoculación

A cada fruta se le hicieron 3 heridas (a excepción de la ciruela que debido a su tamaño se hicieron solamente 2 heridas) repartidas equidistantemente por el ecuador del fruto, excepto para los paraguayos que se realizaron en una de las caras frontales, con ayuda de una punta de pipeta. Las heridas presentaron un tamaño aproximado de 4 mm de diámetro por 4 mm de profundidad. En dichas heridas se inoculó previamente 10  $\mu$ L de levadura en aquellos tratamientos que la llevasen (Figura 4.3), se esperó aproximadamente 1h y 30 min antes de la inoculación con el moho, del cual se inocularon 2,5 $\mu$ L (Tabla 4.1).



Figura 4.3 Inoculación de levaduras en la planta piloto de la Escuela de Ingenierías agrarias de la Universidad de Extremadura.

#### **4.3.4 Determinación de la incidencia y severidad de *Penicillium expansum***

Una vez que toda la fruta fue inoculada se procedió a almacenarla en envases. Para ello se utilizaron 2 tipos de envases: barquetas de polipropileno de 26 cm x 16 cm x 5 cm (Barquetas gastronorm - 1/4 GN2 42 transparentes) donde se envasaron las ciruelas (6-7 frutos/barqueta) y paraguayo (5frutos/barqueta); barquetas de propileno de 26cm x 160cm x 100cm(Barqueta 1/4 gastronormGC0100 blancas) en las que se envasaron los melocotones (3-2 frutos/barqueta) y nectarina (3-2 frutos/barqueta). Posteriormente las barquetas fueron cubiertas con film transparente, al que se le realizaron 6agujeros de unos 9 mm de diámetro homogéneamente distribuidos. Las barquetas fueron dejadas a T<sup>a</sup> ambiente durante un periodo de 6 días (Figura 4.4).

Diariamente se registraban las heridas con síntomas de infección. Además, a las heridas con síntomas se les media el tamaño y anotaba el diámetro del daño que presentaba. Gracias a estos datos se determinó la incidencia (% de heridas infectadas por lote) y severidad (las dimensiones de la herida medidas en mm).



Figura 4.4. Imagen de paraguayo tratado con L40 y PE correspondiente al día 4 de tratamiento antes del recuento de infectados y medida de la severidad.

#### **4.3.5 Determinación de la producción de patulina**

Para la determinación de la producción de patulina se recogieron muestras del día 4 de tratamiento. Con ayuda de un cuchilla, en condiciones de plena esterilidad se tomaron muestras de las heridas y de su perímetro, y se depositaron en tubos cónicos de 50 mL de capacidad. Las muestras fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para los análisis posteriores.

Para la determinación de patulina se sacaron las muestras del día 4, y se siguió el siguiente esquema para llevar a cabo la extracción.

- 1 • Descongelar tres heridas de cada muestra guardadas en falcons a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 2 • Echar las tres heridas de cada muestra en una bolsa stomacher y pesar.
- 3 • Pasara muestra a un matraz y añadir  $100\mu\text{L}$  de cloroformo. Homogenizar. Esperar una hora en oscuridad
- 4 • Filtrar sobre matraz añadiendo una cucharada sopera de sodio sulfato anhídrido al embudo
- 5 • Evaporar en rotavapor a  $30-35^{\circ}\text{C}$
- 6 • Resuspender con  $4\text{mL}$  de cloroformo y separar el contenido en dos alícuotas de  $2\text{mL}$
- 7 • Evaporar en Minivac y guardar muestras en frigorífico  $4^{\circ}\text{C}$

Figura 4.5. Protocolo de extracción de patulina usado en este trabajo.



Figura 4.6. Rotavapor Heidolph LABOROTA 4000 usado en la extracción de patulina.

Con la técnica de Electroforesis capilar (equipo: Agilent Technologies modelo 7100; Figura 4.7) se consiguió cuantificar la presencia de la patulina. Para ello se usó un capilar de  $75\mu\text{m}$  de diámetro interno y  $57\text{cm}$  de longitud. Las condiciones en la que se efectuó el análisis

fueron de 6 segundos de inyección a alta presión, con un voltaje de 15 kV, y una corriente de 150  $\mu$ A. Cada carrera tuvo una duración de 15 minutos, el capilar termostatzado se mantuvo a una temperatura de 25°C, con una polaridad positiva.

Antes de comenzar la carrera se realizó un lavado con NaOH 0,2 M durante 20 minutos para el lavado de los capilares.

Para que la electroforesis trabajase de manera automática, el siguiente paso fue programar el acondicionamiento de carrera de tal manera que, en cada acondicionamiento primeramente se inyectara NaOH 0,2 M durante 2 minutos y después 1 minuto de tampón de carrera, seguido de la inyección de la muestra, las cuales habían sido resuspendidas con 0,5 mL de tampón de carrera que contenía 25 mM de tetraborato sódico y 50 mM de SDS previamente microfiltrado (tamaño de poro 0,2  $\mu$ m), que duró 15 minutos y terminando con 1 minuto y medio de tampón de carrera para el lavado del capilar.

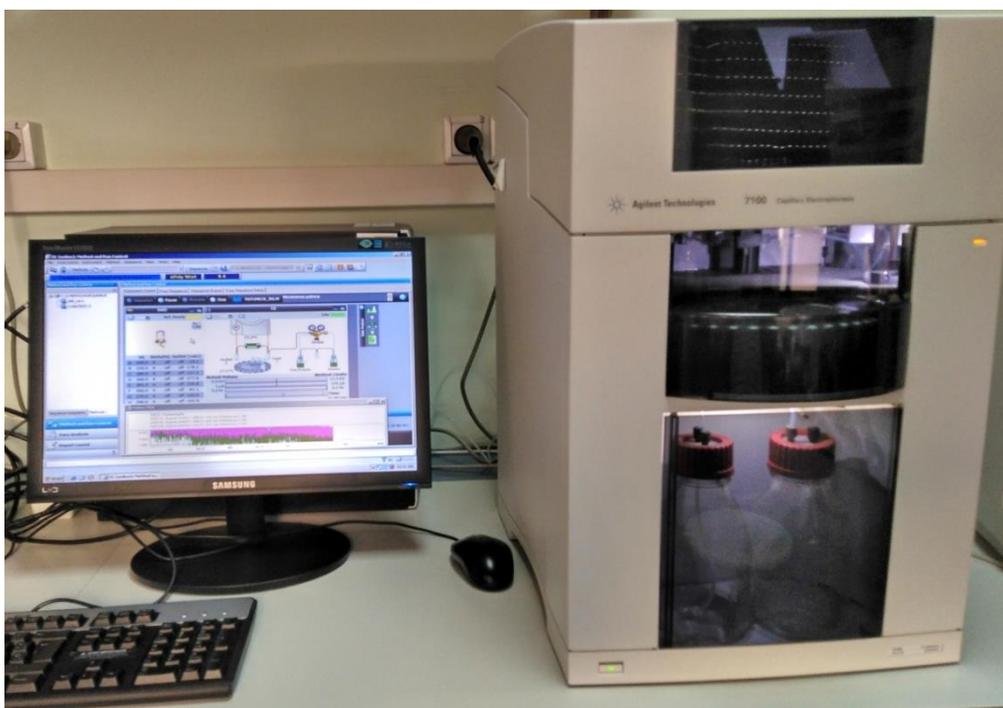


Figura 4.7. Equipo de electroforesis capilar.

Partiendo de un patrón de detección de patulina pura realizado con anterioridad en la Universidad de Extremadura, se pudo establecer el límite de detección y de cuantificación, así como la ecuación que determinó la relación entre el área que define al pico y la cantidad de patulina, las cantidades de micotoxinas producidas fueron expresadas en partes por millón. Para ello se hizo uso de una recta patrón, previamente realizadas por el grupo de investigación

CAMIALI de la Universidad de Extremadura. El límite de detección es 0,238ppm (mg/mL) y el de cuantificación 3,568ppm. Fiabilidad de la recta es igual a 0,9642.

### **4.3.6 Análisis de expresión de los genes implicados en la síntesis de patulina**

#### **4.3.6.1 Extracción de ARN**

Para la extracción del ARN se utilizaron las muestras preservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , que fueron inmediatamente depositadas en nitrógeno líquido. Antes de comenzar se preparó el sitio de trabajo en condiciones de esterilidad, y todo el material necesario para el proceso se autoclavó con anterioridad. Cada muestra se pulverizó en un mortero de cerámica, al que se le añadió nitrógeno líquido, para facilitar la pulverización y preservar el ARN. Finalmente, las muestras pulverizadas fueron preservadas en un microtubo de 1,5mL de capacidad criogenizadas mediante nitrógeno líquido. Posteriormente pasamos todas las muestras a un recipiente con hielo.

- Se usó el Kit de extracción de ARN de la marca comercial Sigma-Aldrich, Spectrum TM Plant total RNA

Primeramente, a cada microtubo de 1,5 mL con muestra fueron añadidos 500 $\mu\text{L}$  de tampón de Lysis + ME (mercaptoetanol) (por cada 1mLLysis se adiciona 10 $\mu\text{L}$  de ME). A continuación, se incubaron a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 3-5 minutos en un termociclador. Después se centrifugaron durante 3 minutos a 14000rpm (la velocidad fue la misma para centrifugaciones posteriores). El sobrenadante se pasó a una columna de filtración. Se centrifugó durante 1 minuto, conservando el eluido. Seguidamente fueron añadidos 500 $\mu\text{L}$  de Binding solution, mezclándose con ayuda de una micropipeta. La mezcla fue cargada en una columna de unión, y centrifugada durante 1 minuto; descartando el eluido. Este paso se repitió con el volumen restante de la mezcla. Se realizaron lavados con 500  $\mu\text{L}$  de Wash Solution 1 (solución de lavado 1), centrifugando 1 minuto y descartando el filtrado. Después se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de Wash Solution 2 (solución de lavado 2), centrifugando durante 30 segundos y eliminando el filtrado. Este último paso se realizó 2 veces. Posteriormente se centrifugó 1 minuto sin adicionar nada. Finalmente, se eluyó el ARN mediante la adición a la columna de 50  $\mu\text{L}$  de solución de elución y centrifugando durante 1 minuto.

La concentración y la calidad del ARN obtenido se midió mediante el equipo Nanodrop y posteriormente se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 4.3.6.2 Síntesis de ADNc.

A continuación, se procedió a la síntesis de ADNc. Se hizo uso del Kit: NZ y First-Strand CDNA. Primeramente, se preparó la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla 2. A continuación, se pipetearon 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción en microtubos de PCR, más 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ARN cuya concentración se había ajustado previamente a 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Después se colocaron los tubos de PCR en el termociclador y se procedió al desarrollo de la reacción de transcripción inversa según el protocolo mostrado en la Tabla 4.3

Tabla 4.2. Reactivos del kit de síntesis de cDNA.

Reactivos	Para 1 muestra
Master Mix	10 $\mu\text{L}$
EnzymeMix	2 $\mu\text{L}$
DEPC- TreatedWater	3 $\mu\text{L}$

Tabla 4.3. Protocolo del programa usado para la síntesis de cDNA.

1	25°C/10 min
2	50°C/30min
3	98°C/5min
4	4°Chasta uso

Una vez terminado el programa, las muestras se mantuvieron en hielo. Se añadió a cada microtubo 1  $\mu\text{L}$  de RNAasa H y se incubó en termociclador durante 20min a 37°C. Después se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### 4.3.6.3 Reacciones de Qpcr.

Una vez obtenido el ADNc, se llevó a cabo la amplificación del gen *idh* implicado en la biosíntesis de patulina. También se amplificó el gen  *$\beta$ -tubulina* (gen estructural presente en todos los mohos).

En primer lugar, las muestras de ADNc se tomaron del congelador de -20°C y se descongelaron en hielo. Las muestras de ADNc fueron diluidas decimalmente con agua estéril para PCR. De cada muestra de ADNc diluido se cogieron 2,5µL y se pasaron a pocillos de una placa de PCR, en la cual previamente se había adicionado 10µL de la mezcla de reacción para el desarrollo de la PCR en tiempo real (Tabla3.4).

Tabla 4.4. Reactivos para las reacciones de amplificación.

Reactivos	Volúmenes (µL)	
	<i>Idh</i>	<i>β-tubulina</i>
SYBR Green	<b>6,25</b>	<b>6,25</b>
ROX	<b>1</b>	<b>1</b>
Cebador directo (10 µM)	<b>0,5</b>	<b>0,1</b>
Cebador reverso (10µM)	<b>0,875</b>	<b>0,1</b>
Agua destilada	<b>2,375</b>	<b>3,55</b>
ADNc	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>

Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo a 95°C durante 10 min, 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Finalmente, se realizó una curva de disociación mediante una rampa de temperatura desde 60°C a 95°C en 30 minutos, y se tomaron continuas medidas de fluorescencia para verificar los productos de amplificación esperados. El valor del ciclo de cuantificación (Cq) representa el ciclo de la PCR en el que para cada curva de amplificación se detecta el primer incremento de fluorescencia, sobre un umbral definido. El ensayo se realizó por triplicado.

#### 4.3.6.4 Cálculo de la expresión génica relativa

La cuantificación relativa de la expresión génica mediante RT-qPCR se utilizó para calcular cuánto variaban los niveles de expresión génica del gen diana (*idh*) en comparación con el gen endógeno (*β-tubulina*) en presencia de las dos levaduras. Para ello, es necesario el empleo de un “calibrador” (condiciones control) que son las muestras de *P. expansum* incubadas en cada una de las frutas (nectarina, melocotón, ciruela negra y paraguay) en ausencia de las levaduras a los 2, 4 y 6 días de incubación. Para llevar a cabo esta cuantificación relativa de la expresión génica se utilizó el método del  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

#### 4.3.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS para Windows (IBM Corp. SPSS Statistics, Version 22, Armonk, NY). Para el análisis de la incidencia y la severidad de las infecciones por *P. expansum* se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una y dos vías (tratamiento x tiempo). El resto de los parámetros determinados (producción de patulina y expresión génica) fue analizado con una vía. Los valores medios fueron separados para su comparación por la diferencia honestamente significativa de Tukey (DHS) ( $P \leq 0.05$ ).

Así mismo también se hizo uso del programa Microsoft Excel 2019 para la recopilación de datos y elaboración de gráficas/tablas.

**CAPÍTULO V.**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo fin de máster se estudió la capacidad antagonista de las levaduras L40 (*Pichia kudriavzevii*) y L672 (*Metschnikowia pulcherrima*) frente a los daños por podredumbre y producción de micotoxina del moho *Penicillium expansum* en frutales de hueso y; a su vez, determinar si hay diferencias en la actividad antifúngica entre ambas levaduras. Como se indicó en el apartado 1.2 de la introducción de este trabajo, el género *Penicillium* posee especies que causan podredumbres devastadoras en los cultivos y a la vez produce una amplia gama de micotoxinas. En concreto, *Penicillium expansum* es productor de varias micotoxinas entre las que se encuentra la patulina (Morales, 2011). Esta micotoxina tiene propiedades citotóxicas, genotóxicas e inmunosupresoras, lo que supone un riesgo potencialmente grave para la salud del consumidor (Moake et al., 2005) Por lo que la finalidad de este trabajo es buscar nuevas estrategia, de tipo biológico, que sean alternativas a los compuestos químicos antifúngicos habitualmente utilizados en el ámbito de la agricultura. Para conseguir este objetivo, las levaduras, dentro de los microorganismos de interés son la mejor opción debido a que son inocuas para los seres vivos y se adaptan fácilmente frente a condiciones cambiantes extremas, así como, por su gran potencial como agente biocontrol frente a mohos toxigénicos.

En estudios previos se ha comprobado el efecto biocontrol de las especies de levaduras usadas en este trabajo. Por ejemplo, Kamel et al., (2020) determinaron que *Pichia kudriavzevii* es capaz de inhibir significativamente la germinación de conidios patógenos de *Monilina fructigena* en un 67,6-89,2%. Además, para demostrar la capacidad de inhibición de *Pichia kudriavzevii* se enfrentó a *S. cerevisiae*, donde se demostró que de todas las levaduras usadas en ese estudio fue la de mayor potencial inhibiendo hasta 25mm de diámetro, debido a su gran capacidad de producir una toxina killer. En Cabañas 2019) también se demostró que esta levadura mostró un control efectivo contra el moho *B. cinerea* en un ensayo *in vivo*, siendo la actividad antagonista de *P. kudriavzevii* superior al de la otra especie de levadura de interés en este trabajo, *Metschnikowia pulcherrima*. En cuanto a esta última, De Pavia et al. (2017) demostraron que dicha especie era capaz de controlar el desarrollo de *P. expansum* y por consiguiente reducir la incidencia y severidad de la enfermedad en cerezas heridas y almacenadas a 1°C.

### 5.1 Resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos

En primer lugar, de los análisis microbiológicos de los cuatro tipos de fruta usados en este trabajo, después de haber sido tratados en *hydrocooling* tal y como detalla en el apartado 4.3.1 de la metodología, se obtuvieron los resultados generales representados en la siguiente tabla.

Tabla 5.1. Recuento de aerobios mesófilos totales, levaduras y mohos (log ufc/g) de las frutas en los medios de cultivo PDA, PCA y RBCA tras la higienización con hipoclorito sódico.

FRUTA	AEROBIOS MESOFILOS (log ufc/g)		LEVADURAS (log ufc/g)				MOHO			
	$\bar{x}$	SD	PDA		RBCA		PDA		RBCA	
			$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
	<b>3,27</b>	<b>0,90</b>	<b>2,74</b>	<b>0,54</b>	<b>3,54</b>	<b>0,94</b>	<b>2,35</b>	<b>0,48</b>	<b>3,45</b>	<b>0,88</b>

Los datos obtenidos en este análisis muestran una adecuada higienización, obteniendo recuentos muy bajos tanto de aerobios mesófilos totales como de mohos y levaduras. De esta manera, la fruta es apta para los tratamientos de inoculación con los microorganismos de interés.

Referente a los análisis fisicoquímicos, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5.2.).

Tabla 5.2. Datos del contenido en sólidos solubles (CSS), pH y acidez titulable de los 4 tipos de frutas.

FRUTA	CSS (°Brix)		pH		Acidez titulable (% ácido málico)	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
<b>Ciruela Negra</b>	<b>13,57</b>	<b>0,06</b>	<b>3,18</b>	<b>0,01</b>	<b>1,36</b>	<b>0,01</b>
<b>Melocotón</b>	<b>13,27</b>	<b>0,06</b>	<b>3,88</b>	<b>0,02</b>	<b>0,58</b>	<b>0,02</b>
<b>Nectarina</b>	<b>8,67</b>	<b>0,06</b>	<b>4,25</b>	<b>0,03</b>	<b>0,49</b>	<b>0,01</b>
<b>Paraguay</b>	<b>12,63</b>	<b>0,12</b>	<b>4,10</b>	<b>0,02</b>	<b>0,47</b>	<b>0,01</b>

Según la Tabla 5.2 podemos observar que en los 4 tipos de fruta la concentración de sólidos solubles (CSS) es superior a 8 °Brix que es el mínimo que indica la Unión Europea (UE) para la comercialización de este tipo de fruta en el Reglamento de la Comisión (CE) 1861/2004. Se ha determinado en distintos estudios que CSS que hace a este tipo de fruta de calidad óptima es superar los 11°Brix (Hilaire, 2003; Crisosto y Crisosto, 2005), lo que se puede observar en 3

de los 4 tipos de fruta, siendo el único por debajo de este parámetro la nectarina pero dentro de los límites estipulados por la legislación. En cuanto al pH, las nectarinas, paraguayos y melocotones deberían rondar sobre un 3,9 de pH para tener una calidad óptima (Martín et al., 2011). Si se observa la tabla 5.2, paraguayo y nectarina presentan los valores de 4,10 y 4,25 respectivamente, por lo que superan dicho valor. Sin embargo, los valores de pH de estas frutas pueden oscilar entre 2,8-5,5 para ser aptos para el consumidor, por lo que la fruta estaría dentro de los parámetros requeridos (Cantín, 2009). En lo referente a ciruela el pH medio de ésta es 3,18, el cual está dentro de los valores de pH que se consideran óptimos para ciruela, que son pH de 2,8 a 4,6 (Food-Info, 2017). Según el estudio de Sánchez (2015) la acidez óptima de la ciruela oscila entre 1-1,8, por lo que la ciruela se encuentra dentro de dichos parámetros con una acidez de 1,36 % ácido málico. La acidez para melocotón, nectarina y paraguayo debería estar en torno a 0,50-0,80% ácido málico, según estudios anteriores (Lleó et al., 1997), atendiendo a ello, dos de ellos estarían dentro de estos valores, salvo paraguayo que se encuentra ligeramente por debajo del 0,50 de acidez, con un 0.47% ácido málico.

## **5.2 Incidencia y severidad de *Penicillium expansum***

A continuación, se muestra el efecto de los tratamientos con levaduras antagonistas sobre el desarrollo de *P. expansum* en las diferentes frutas utilizadas en el presente estudio.

- Nectarina

Tal y como se muestra en la Figura 5.1, a simple vista se observaron diferencias entre los 3 tipos de tratamiento. La imagen corresponde a una comparativa entre tratamientos realizada el día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente. Existió una mayor afectación de las nectarinas en el tratamiento control con *P. expansum* (PE) en comparación con los tratamientos que además llevaban levaduras. En ambos tratamientos con levaduras se puede observar como el tamaño de las infecciones (severidad) fue menor al tratamiento control. En concreto, con la levadura L672 no se observó un aparente desarrollo del moho. Por lo que, a simple vista, además de una disminución de la severidad de la enfermedad, con esta levadura se obtuvo una importante disminución de la incidencia.

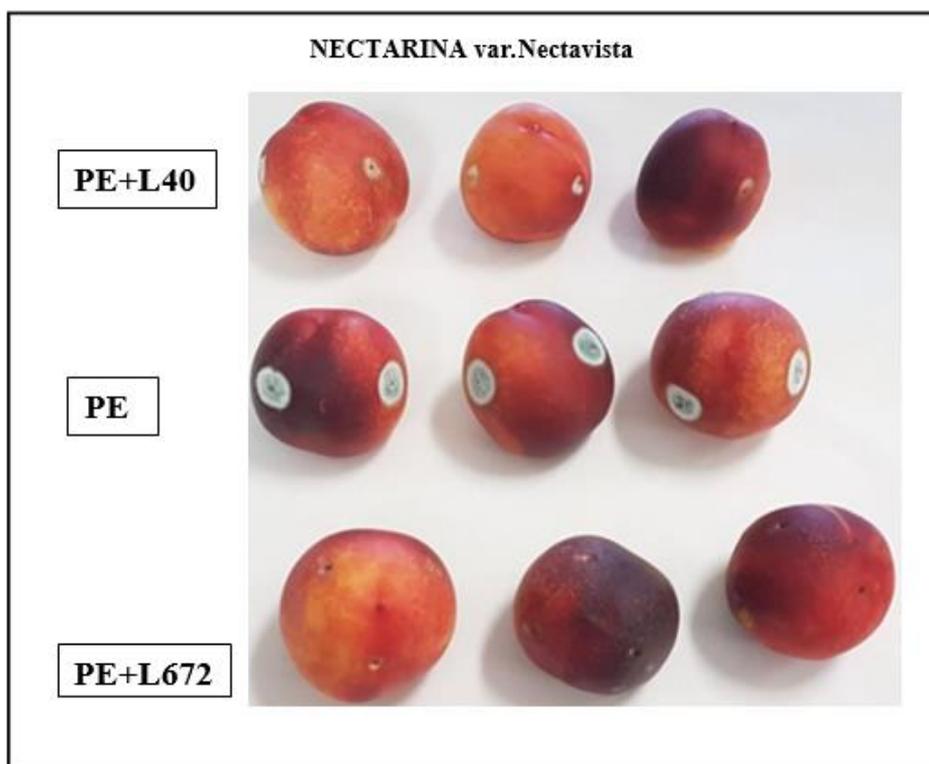
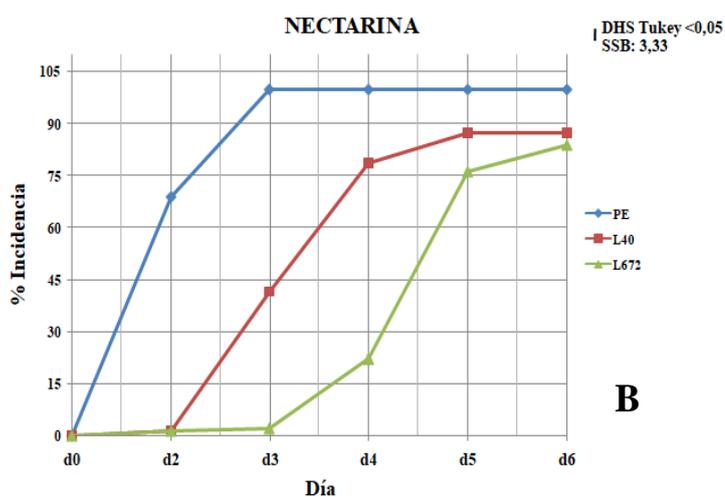


Figura 5.1. Comparativa del efecto de la inoculación entre los tratamientos control (*Penicillium expansum*), PE+L40 (*P. expansum* + *Pichia kudriavzevii*) y PE+L672 (*P. expansum* + *Metschnikowia pulcherrima*) en nectarina correspondientes al día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente.

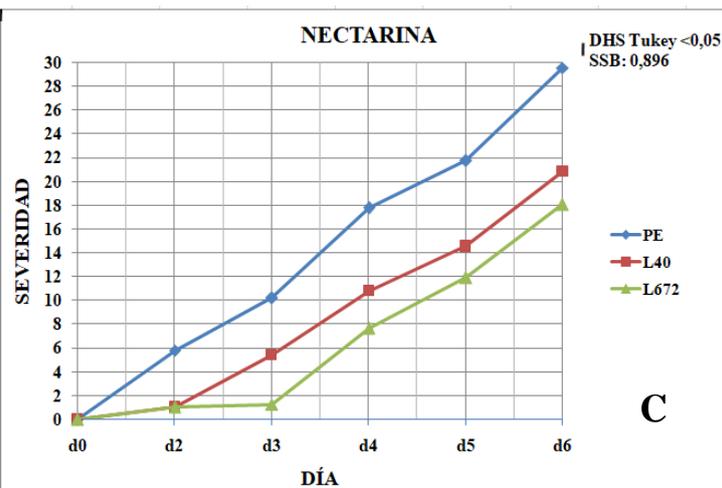
En lo relativo a los análisis cuantitativos, en la Figura 5.2 se puede observar que efectivamente existió un efecto de control desde el punto de vista estadístico. La tabla muestra los valores medios globales de incidencia y severidad, y los resultados indican que las levaduras *P. kudriavzevii* L40 y *M. pulcherrima* L672, ejercieron una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) sobre la incidencia de *P. expansum*. Del mismo modo, la severidad media de las infecciones por el moho descendió desde los 16,38 mm hasta los 12,71 mm cuando se aplicó la levadura L672.

Lote	Incidencia		Severidad	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
PE	93,94 <sup>c</sup>	12,74	16,38 <sup>b</sup>	8,34
PE+L40	75,34 <sup>b</sup>	25,08	13,31 <sup>a</sup>	6,32
PE+L672	64,59 <sup>a</sup>	31,55	12,71 <sup>a</sup>	6,53
$P^{trat}$	<0,001		<0,001	
$P^{trat \times día}$	<0,001		<0,001	

A



B



C

Figura 5.2. Incidencia y severidad de *Penicillium expansum* inoculado en nectarina cuando se confrontó con las levaduras antagonistas *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672: A) Tabla de valores medios de incidencia y severidad globales del estudio; B) evolución de la incidencia de *P. expansum* (% de infección) durante los días de ensayo; y C) evolución de la severidad (tamaño de la infección) durante los días de ensayo.

En las gráficas se observan los valores obtenidos a lo largo de los días de almacenamiento. Si se atiende al día 3 de confrontación, se observa cómo *P. expansum* tuvo una incidencia del 100%; mientras que la coinoculación con las levaduras presentaron incidencia de 40% y un 2% para L40 y L672 respectivamente, lo que supone una inhibición de 60% en el lote PE+L40 y casi del 100% para el lote PE+L672. Al final de tratamiento, en el día 6, se observó como los tratamientos con levaduras aumentaron su incidencia hasta un 87% y 83%, es decir, no alcanzaron una incidencia del 100% como ocurrió con *P. expansum*, lo que supone una inhibición del 13% y 17% con respecto al control cuando se aplicaron las levaduras L40 y L672, respectivamente.

En cuanto a la figura 5.2C, los resultados del día 2 muestran un escaso daño en los tratamientos con levaduras, siendo éste de 1mm en ambos casos, mientras que *P. expansum*, en el tratamiento control, presentó un valor de daño de alrededor de 6mm, por lo que se hablaría de una reducción de aproximadamente del 85%. En el gráfico se aprecia como el aumento de la enfermedad tuvo una tendencia lineal; y al final del tratamiento, en el día 6, se puede ver cómo *P. expansum* presentó una severidad de aproximadamente 30 mm, mientras que en las confrontaciones del moho con L40 y L672 se obtuvieron valores medios de 21 y 18 mm (reducción de la severidad de un 30% y un 40% respectivamente). Los resultados demuestran que en nectarina la levadura L672 fue más efectiva tanto en la inhibición como en la reducción del daño.

- Paraguayo

Al igual que pasaba con nectarina, a simple vista se observaron diferencias entre los 3 tipos de tratamiento (Figura 5.3). La imagen corresponde a una comparativa entre tratamientos realizada el día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente. Se observó una mayor afectación en paraguayos pertenecientes al tratamiento control con *P. expansum* en comparación con los tratamientos que además llevaron levaduras. Dentro de los tratamientos con levaduras se observó una mayor protección frente a la enfermedad en el tratamiento con la levadura L672, en la que no se observó el desarrollo del moho. Además, muchas de las heridas en los tratamientos con levaduras no presentaban síntomas de infección, por lo que también hay una reducción de la incidencia, según la observación visual.

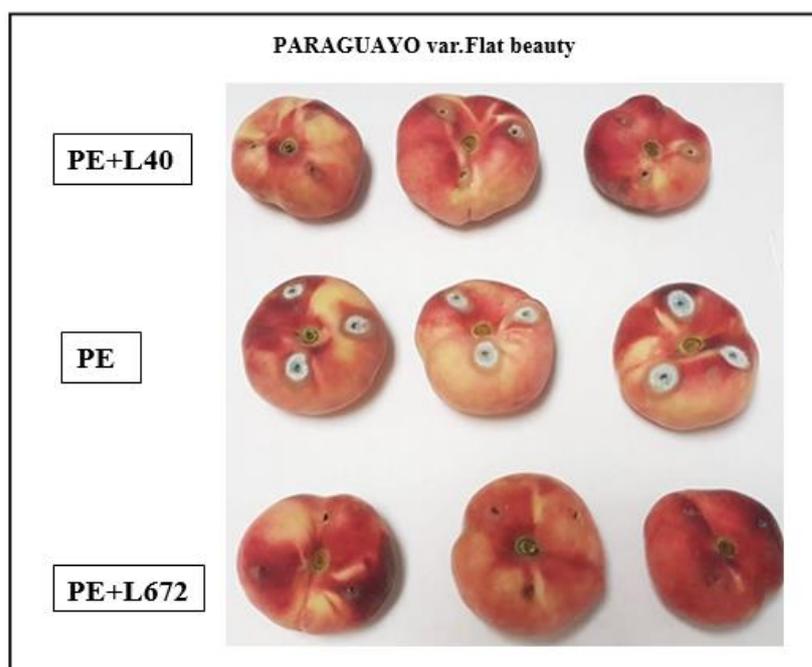
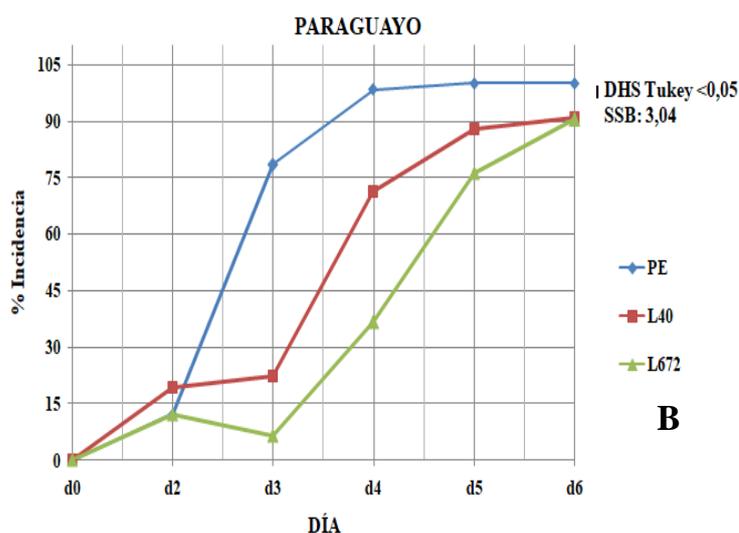


Figura 5.3. Comparativa del efecto de la inoculación entre los tratamientos control (*Penicillium expansum*), PE+L40 (*P. expansum* + *Pichia kudriavzevii*) y PE+L672 (*P. expansum* + *Metschnikowia pulcherrima*) en paraguayo correspondientes al día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente.

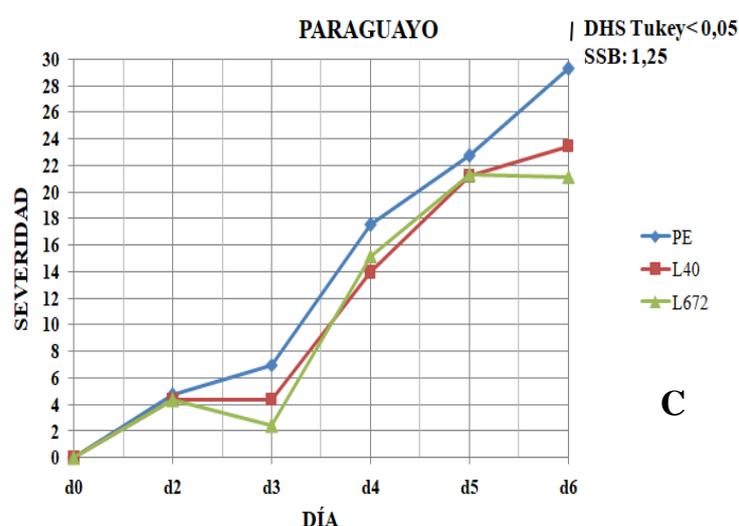
Según los resultados representados en la Figura 5.4 se puede apreciar que existió un efecto de control desde el punto de vista estadístico. En la tabla se representan los valores medios globales de incidencia y severidad, y dichos valores muestran una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) sobre la incidencia de *P. expansum* por parte de las levaduras *P. kudriavzevii* L40 y *M. pulcherrima* L672. Así mismo, se puede observar como la severidad media de las infecciones por el moho apenas decrecieron entre tratamientos.

Lote	Incidencia		Severidad	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
PE	91,86 <sup>c</sup>	18,22	18,80 <sup>b</sup>	9,09
PE+L40	74,15 <sup>b</sup>	27,00	17,23 <sup>a</sup>	7,40
PE+L672	67,66 <sup>a</sup>	29,47	18,27 <sup>ab</sup>	7,68
<i>P</i> <sub>trat</sub>	<0,001		<0,001	
<i>P</i> <sub>trat x día</sub>	<0,001		<0,001	

A



B



C

Figura 5.4. Incidencia y severidad de *Penicillium expansum* inoculado en paraguayo cuando se confrontó con las levaduras antagonistas *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672: A) Tabla de valores medios, de incidencia y severidad globales del estudio; B) evolución de la incidencia de *P. expansum* (% de infección) durante los días de ensayo; y C) evolución de la severidad (tamaño de la infección) durante los días de ensayo.

En Las figuras 5.4.B y 5.4.C se representan los valores obtenidos a lo largo de los días de almacenamiento a temperatura ambiente. En la figura 5.4B se observa como al principio del tratamiento no hubo diferencias entre los 3 tipos de tratamiento, y a partir del día 3 es cuando se observaron las diferencias entre los mismos. El control con *P. expansum* tuvo una incidencia de 78%, mientras que la coinoculación con las levaduras presenta una incidencia de 22% para el lote PE+L40 y del 6% para el lote PE+ L672, lo que supone una inhibición del 72% y del 98% respectivamente. En este caso, el tratamiento control con *P. expansum* presentaron una incidencia del 100% en el cuarto día de ensayo hasta el final, mientras que los tratamientos con levaduras presentaron un 90% de incidencia el último día, lo que equivale a una inhibición del 10% con respecto al control.

En el gráfico de severidad (Figura 5.4C) se puede observar que desde el inicio del estudio no existieron diferencias entre los tratamientos, y éstas solo fueron apreciables en el día 6, donde el control con *P. expansum* presentó una severidad de casi 30 mm, mientras la coinoculación con levaduras presentó una severidad de 23 mm y 21 mm para los lotes PE+L40 y PE+L672, respectivamente. Lo que supondría una reducción de entre un 25-30% aproximadamente.

- **Melocotón**

En la Figura 5.5 se puede apreciar visualmente que los melocotones de los tratamientos coinoculados con levaduras presentan menor afectación que el tratamiento control con *P. expansum*. Además, en los tratamientos con levaduras se apreciar como el diámetro de las infecciones (severidad) es menor que el control. Atendiendo a los tratamientos con levaduras se puede observar una ligera afectación superior en los melocotones tratados con L40, en comparación con la levadura L672.



Figura 5.5. Comparativa del efecto de la inoculación entre los tratamientos control *Penicillium expansum*, PE+L40 (*P. expansum* + *Pichia kudriavzevii*) y PE+L672 (*P. expansum* + *Metschnikowia pulcherrima*) en melocotón correspondientes al día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente.

Según los análisis cuantitativos se puede constatar que las levaduras *P. kudriavzevii* L40 y *M. pulcherrima* L672, ejercieron una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) sobre la incidencia de *P. expansum*. Por otro lado, en cuanto a la severidad se aprecia que los valores medios globales descendieron desde 19,87 mm hasta los 16,33 mm obtenidos en presencia de la levadura L672 (Figura 5.6 A).

Lote	Incidencia		Severidad	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
PE	92,44 <sup>c</sup>	19,31	19,87 <sup>c</sup>	10,14
PE+L40	93,91 <sup>b</sup>	18,99	17,60 <sup>b</sup>	10,24
PE+L672	85,90 <sup>a</sup>	20,00	16,33 <sup>a</sup>	8,83
<i>P<sub>trat</sub></i>	<0,001		<0,001	
<i>P<sub>trat x día</sub></i>	<0,001		0,054	

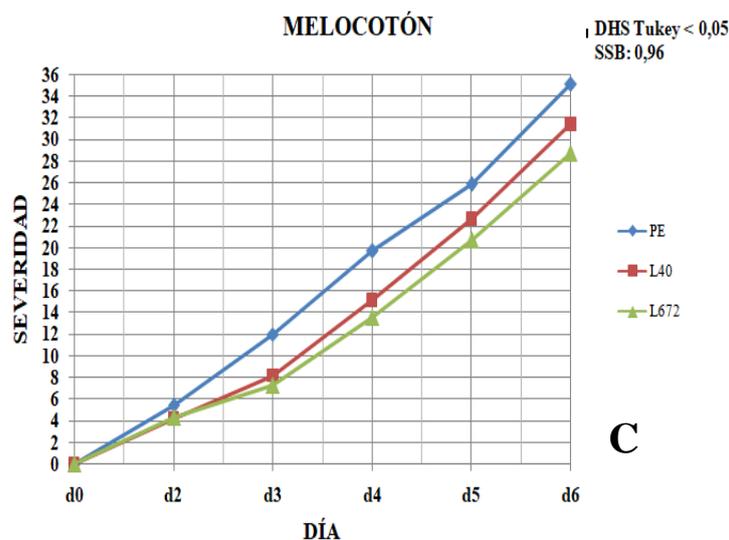
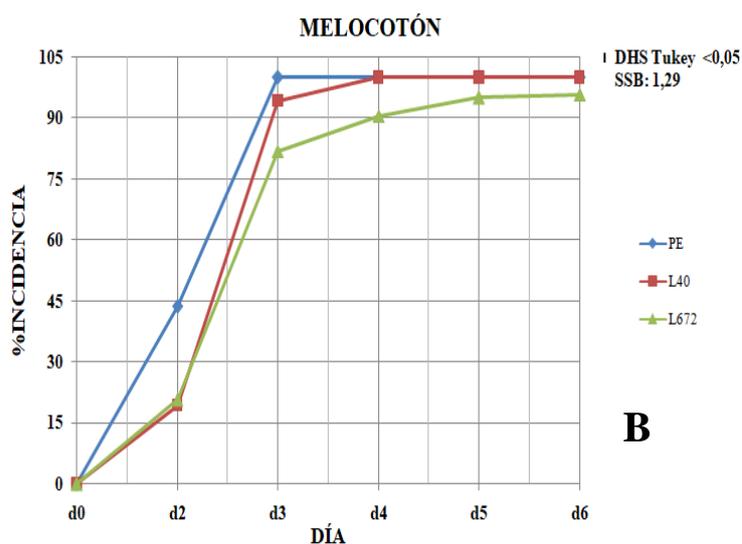


Figura 5.6. Incidencia y severidad de *Penicillium expansum* inoculado en melocotón cuando se confrontó con las levaduras antagonistas *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672: A) Tabla de valores medios de incidencia y severidad globales del estudio; B) evolución de la incidencia de *P. expansum* (% de infección) durante los días de ensayo; y C) evolución de la severidad (tamaño de la infección) durante los días de ensayo.

En la Figura 5.6B se puede observar como en los primeros días de tratamiento el porcentaje de incidencia fue mayor en el tratamiento control con *P. expansum* con un 43,5%; sin embargo, los tratamientos con levaduras presentan un 20%, lo que supone una inhibición de aproximadamente 50% con respecto al control. Con el transcurso de los días se puede corroborar como fueron aumentando las diferencias entre los tratamientos con levaduras, llegando la levadura L40 a un porcentaje de incidencia del 100% en el día 4 de la confrontación, sin embargo, la levadura L672 no alcanzó nunca el valor de incidencia del 100% durante los 6 días, llegando a este día con una incidencia del 95%. En cuanto a la Figura 5.6C se puede observar como el aumento de la enfermedad tuvo una tendencia lineal. En el caso del día 2 de tratamiento control con *P. expansum*, el melocotón presentó un daño de 5,3 mm mientras que cuando fue inoculado con levaduras, éste presentó valores de 4,2 mm. Sin embargo, a medida

que avanzaban los días la diferencia entre ambos tratamientos (L40 y L672) se hizo notable. Al final del tratamiento se confirmó que el tratamiento control presentó mayor afectación con un valor de 35 mm, mientras que las levaduras presentaron 31 mm y 28 mm para los lotes PE+L40 y PE+L672 respectivamente, lo que supondría una reducción del daño de 12% y 20%.

- Ciruela Negra

En la imagen siguiente (Figura 5.7) a simple vista se aprecian diferencias entre los 3 tipos de tratamiento, habiendo una mayor afectación en ciruelas tratadas con el control *P. expansum* en comparación con las coinoculadas con levaduras. En ambos tratamientos con levaduras se observó menor tamaño de infección que con el control; sin embargo, entre ellas no se aprecia diferencia aparente ni tampoco desarrollo del moho.

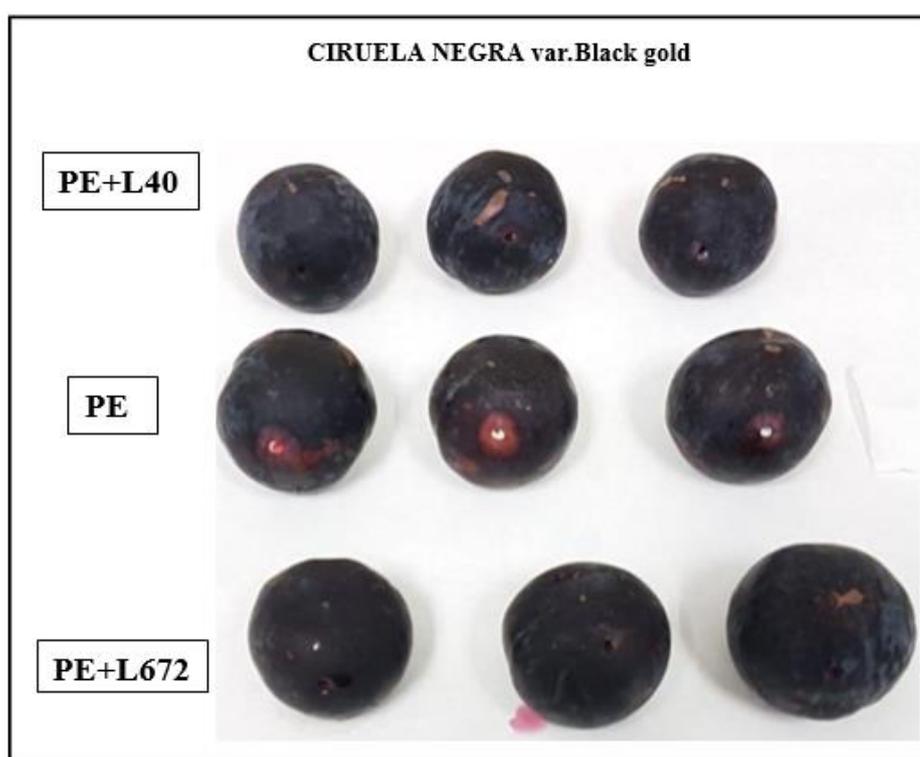


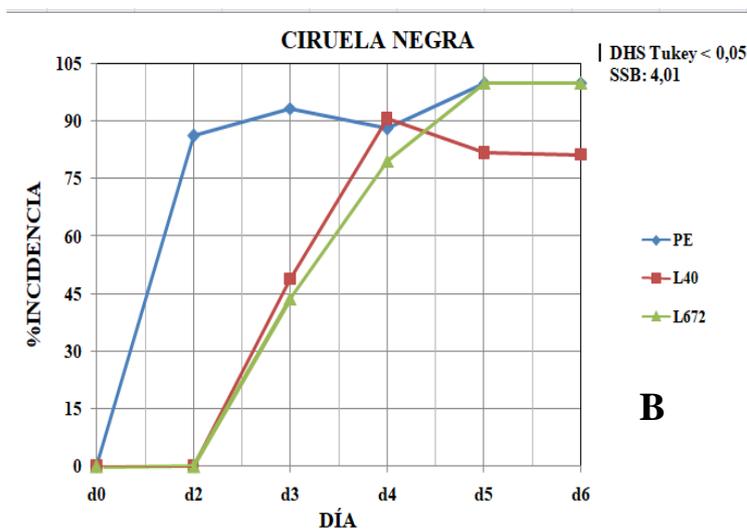
Figura 5.7. Comparativa del efecto de la inoculación entre los tratamientos control PE (*Penicillium expansum*), PE+L40 (*P. expansum* + *Pichia kudriavzevii*) y PE+L672 (*P. expansum* + *Metschnikowia pulcherrima*) en ciruela negra correspondientes al día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente.

En la figura 5.8 se puede constatar que existe un efecto de control desde el punto de vista estadístico. En la tabla de la figura 5.8 (A) se muestran los valores medios globales de incidencia y severidad, y los resultados indican que las levaduras *P. kudriavzevii* L40 y *M.*

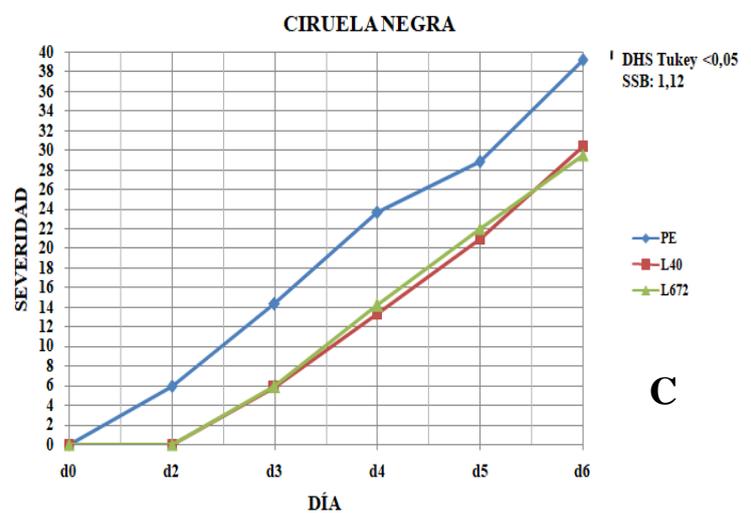
*pulcherrima* L672, ejercen una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) sobre la incidencia de *P. expansum*. Del mismo modo, la severidad media de las infecciones por el mofo descendió desde los 19,01 mm hasta los 16,06 mm obtenidos cuando a la ciruela se le añadió la levadura L40.

Lote	Incidencia		Severidad	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
PE	91,89 <sup>c</sup>	9,70	19,01 <sup>b</sup>	11,71
PE+L40	74,91 <sup>a</sup>	23,88	16,06 <sup>a</sup>	9,27
PE+L672	81,67 <sup>b</sup>	30,21	18,89 <sup>b</sup>	9,72
$P^{trat}$	$<0,001$		$<0,001$	
$P^{trat \times día}$	$<0,001$		0,058	

A



B



C

Figura 5.8. Incidencia y severidad de *Penicillium expansum* inoculado en ciruela negra cuando se confrontó con las levaduras antagonistas *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672: A) Tabla de valores medios de incidencia y severidad globales del estudio; B) evolución de la incidencia de *P. expansum* (% de infección) durante los días de ensayo; y C) evolución de la severidad (tamaño de la infección) durante los días de ensayo.

En las gráficas se observan los valores a lo largo de los días de tratamiento a temperatura ambiente. En la Figura 5.8B se puede apreciar al principio del estudio una gran inhibición por parte de las levaduras frente al desarrollo del mofo. Si se atiende al día 2 se observa como el valor de incidencia para el control con *P. expansum* es de 86% mientras que ambas levaduras presentan 0% de infección. Con el transcurso del estudio ambas levaduras presentaron un efecto similar hasta que en el día 5 del estudio, donde la levadura L672 alcanza un 100% de incidencia, mientras que la L40 se mantiene entorno en un 90% hasta el fin del estudio.

En la gráfica 4.8C se puede observar como la evolución del aumento de la enfermedad tuvo una tendencia lineal, y como la reducción de esta fue similar entre los tratamientos con levadura durante el transcurso de los 6 días del estudio. En el día 6 se puede corroborar como el control con *P. expansum* presentó un daño de 39mm mientras que los tratamientos con levaduras presentaron unos daños del 30 mm para ambas. Por lo que L40 y L672 redujeron el daño en un 23% en comparación con el control

En general, desde el punto de vista estadístico, se puede confirmar que la levadura *Metschnikowia pulcherrima* L672 ejerce un efecto inhibitorio y reductor de la enfermedad ocasionada por *Penicillium expansum* en las cuatro variedades de fruta. En estudios previos en la Universidad de Extremadura (Ruiz- Moyano et al., 2016) determinaron que esta levadura era un gran agente biocontrol para diversos mohos, entre ellos *Penicillium expansum*. Estos investigadores utilizaron nectarinas y manzanas, y enfrentaron la levadura L672 al moho durante 10 días a 25°C, obteniendo un porcentaje de inhibición de 69,4% y 56% para estas frutas respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos los primeros días de tratamiento en este estudio. Sin embargo, al final del estudio se obtiene entre un 30% de inhibición con respecto al control. *Metschnikowia pulcherrima* es capaz de colonizar la superficie de la fruta almacenada a temperaturas inferiores a 4 °C, característica que favorece su aplicación como levadura de biocontrol postcosecha. En de Pavía et al. (2017) reafirmaron el estudio anterior, esta vez usando cerezas. Estas fueron coinoculadas con *P. expansum* y la levadura L672 y fueron almacenadas en atmósfera modificada a 1°C durante 35 días, apareciendo únicamente el moho en el día 21 del estudio. Al final del estudio la severidad se redujo de 17 mm a 10,5 mm lo que supone una reducción del 39%, aproximadamente. Este estudio presentó unos valores de reducción del daño por parte de L672 similares a los citados por de Pavia et al. (2017). Dichos valores rondan entre un 20-40% de reducción en comparación con el tratamiento control con *Penicillium expansum*. Como anteriormente se comentó, este trabajo se llevó a cabo en condiciones de temperatura ambiente en meses de verano, donde la temperatura rondaba dentro de las instalaciones los 25°C de media, sin atmosfera modificada, lo que suponía unas mejores condiciones de desarrollo de los microorganismos e incrementaba la tasa respiratoria de la fruta y por consiguiente una evolución de la enfermedad mayor. En cuanto a *Pichia kudriavzevii*, Cabañas (2019) determinó que una cepa de la especie *Pichia kudriavzevii* que la levadura L40 redujo el crecimiento de una especie de *Penicillium* significativamente ( $p < 0,050$ ), con una reducción de más de 3 mm de media en uvas. Este estudio usó un sistema de doble placa, al igual que un estudio anterior de Sternad et al. (2017) donde se demostró en el sistema de doble

placa que *P. kudriavzevii* producía volátiles que redujo la germinación de los conidios. Sin embargo, hay estudios (Bajaj et al., 2012) que determinan que *Pichia kudriavzevii* posee efecto inhibitorio frente a determinados patógenos humanos, como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes* (con una reducción de 11-12 mm). Sin embargo, no se observó actividad inhibitoria contra *Penicillium spp.* y contra *Candida sp.* En este trabajo fin de máster se confirma que, dependiendo de la cepa, esta especie posee efecto inhibitorio sobre *Penicillium expansum*, y que dicho efecto al final del tratamiento fue en torno a valores de 10-30% según la variedad de fruta. Además, se obtuvieron valores de reducción del tamaño superiores a los obtenidos en Cabañas (2019) con unas cifras de entre 4-9mm, respecto a los 3mm de media de dicho estudio.

### 5.3 Producción de Patulina

En la siguiente figura se muestran los valores medios de la producción de patulina (en unidades arbitrarias de área, UAA) obtenidos en el 4 día de la confrontación de *Penicillium expansum* con las levaduras en 3 de los 4 tipos de frutas utilizadas (Figura 5.9). Sorprendentemente, en paraguayano no se detectó presencia de patulina. Se puede observar que la levadura L672 ejerce un efecto de control sobre la producción de patulina en los tres casos desde el punto de vista estadístico.

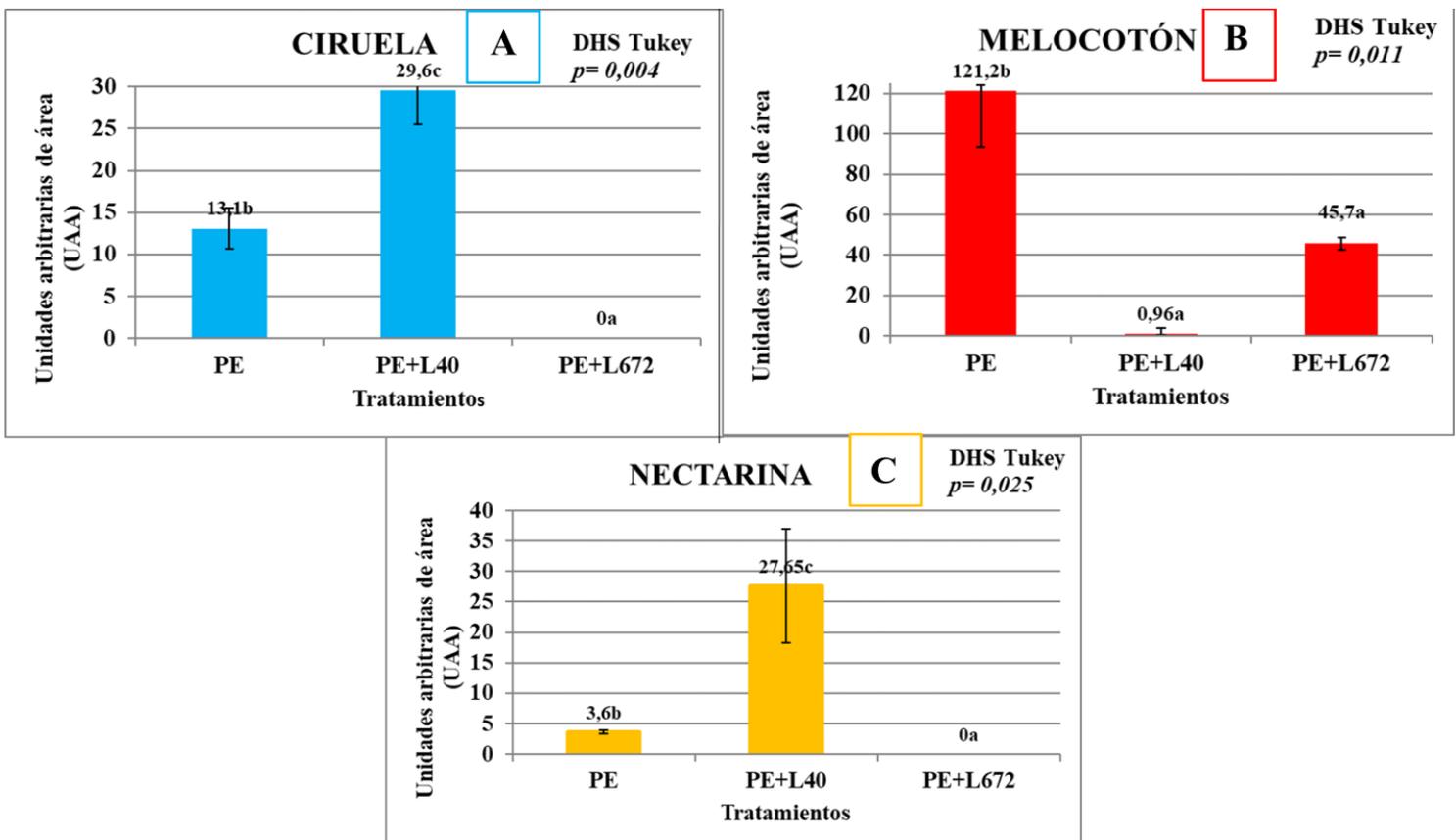


Figura 5.9. Representación gráfica de los valores medios de producción de patulina (unidades arbitrarias de área) en el día 4 del estudio para los tratamientos control PE (*Penicillium expansum*), PE+L40 (*P. expansum* + *Pichia kudriavzevii*) y PE+L672 (*P. expansum* + *Metschnikowia pulcherrima*) en ciruela negra, melocotón y nectarina.

En las inoculaciones pertenecientes a ciruela y nectarina (Figuras 4.9A y 4.9C) la producción de patulina mostró resultados similares. Se detectó presencia de patulina en el tratamiento control con *P. expansum* y en la coinoculación con la levadura L40, siendo el área bastante mayor en este último caso. Sin embargo, no se detectó presencia de patulina en el tratamiento con L672 por encima del límite de detección de la técnica. En ciruela y nectarina la levadura L672 ejerce una reducción significativa ( $p=0,004$  y  $p=0,025$ , respectivamente) de la producción de patulina por *P.expansum*.

Por el contrario, la producción de patulina en melocotón se comportó de manera diferente. En este caso los 3 tratamientos presentaron patulina, pero en este caso el valor de UAA menor es de L40 con 0,96 UAA, seguida de L672 con 46,7 UAA y por último PE con 121,2 UAA. En melocotón ambas levaduras *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672 ejercen una reducción significativa ( $p=0,011$ ) de la producción de patulina por *P.expansum*.

En los 3 tipos de fruta la levadura L672 presentó menor área que el control con *P. expansum*, y la levadura L40 presentó solamente menor área que el control en melocotón, siendo incluso un valor de área menor que el que presentó L672. Hablando en términos de concentración no es posible cuantificar todas las concentraciones de patulina, ya que la mayoría de los resultados presentaron un valor por debajo del nivel de cuantificación detallado anteriormente en el apartado 3.3.5 de la metodología. En aquellos casos que es posible cuantificar, por ejemplo, en melocotón, esta concentración para el tratamiento control es de 64,26 ppm mientras que para los tratamientos con levadura sería 14,16 ppm para L672 y para L40 un valor muy próximo a 0. Por lo que hablaríamos de una reducción en la producción de patulina de 78% en el caso de L672 y aproximadamente del 100% para L40. En el caso de ciruela solamente es posible cuantificar la concentración de L40 (3,47 ppm) ya que los otros valores están por debajo del nivel de cuantificación. En términos de porcentaje, el tratamiento con L672 presenta un 100% de reducción de producción de patulina con respecto al control; sin embargo, L40 presenta más del doble del valor del control. Esto último ocurrió de forma similar

en nectarina, donde L40 presentó valores muy por encima del control; sin embargo, L672 presentó una reducción total de la producción de patulina con respecto al control.

La producción de patulina es dependiente de las condiciones ambientales como son sustrato, temperatura y de la proporción de CO<sub>2</sub> y oxígeno en el aire entre otros. Por ejemplo, las condiciones óptimas de producción de patulina por *P. expansum* son pH igual a 6 y temperatura de 25°C en la pera y de 17°C en la manzana. Aunque la patulina, se puede formar entre 0 y 25°C (Víctor, 2011). Esto puede explicar que en el control encontremos mayor o menor producción de patulina según la variedad de fruta.

En lo referente a las levaduras, no se ha encontrado bibliografía previa sobre el efecto que tienen las especies *Pichia kudriavzevii* y *Metschnikowia pulcherrima* en la producción de patulina. Sin embargo, hay numerosos estudios que utilizan levaduras como agentes biocontrol de la producción de patulina; por ejemplo, Coelho et al. (2007) determinaron que de 44 levaduras usadas como posibles agentes de biocontrol frente al moho *P. expansum*, 20 tuvieron esta actividad, y de estas últimas 9 presentaron actividad killer positiva, lo que sugirió la participación de dicho factor como agente prometedor en el control de *P. expansum* productor de patulina. En otro estudio, Castoria et al. (2011) estudiaron la metabolización aeróbica de patulina por la levadura *Rhodospiridium kratochvilovae* LS11, obteniendo como resultados reducción de la micotoxina y producción de ácido desoxipatulínico, compuesto derivado de la metabolización de la patulina por la levadura.

La aplicación de antagonistas (generalmente microorganismos aislados de la superficie de la fruta), que compiten activamente contra un patógeno determinado, es un procedimiento cada vez más utilizado porque es un método saludable y respetuoso con el medio ambiente. En el caso muchos patógenos, incluidos *Penicillium expansum*, existe el problema de que hay pocas referencias que informen sobre la relación entre levaduras y acumulación de patulina (Morales et al., 2010). Por lo que se debería profundizar en estas cuestiones. Por ello mismo, se hace uso de métodos preventivos, como almacenamiento en atmosfera modificada, que se ha demostrado que es eficaz ralentizando la aparición de patulina.

Morales et al. (2010) propone que el mejor método para evitar la descomposición de la fruta y la acumulación de patulina debería ser una combinación de tratamiento con atmósfera controlada y antagonistas sobre la acumulación de patulina en almacenamiento a largo plazo.

#### 5.4 Efecto de las levaduras en la expresión del gen *idh* implicado en la síntesis de micotoxinas por *Penicillium expansum*.

En este trabajo se ha estudiado el comportamiento de la expresión relativa del gen *idh* (*patN*) de *P. expansum* en presencia y ausencia de las levaduras *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672, en las cuatro variedades de fruta, a lo largo del tiempo de incubación para determinar si existe algún efecto de la presencia de las mismas en la expresión del gen biosintético estudiado.

La ruta biosintética de la patulina consiste en 10 reacciones, según han sugerido varios estudios bioquímicos (Puel et al., 2010; Li et al., 2019); mientras que el cluster de genes está compuesto por al menos 15 genes (Tannous et al., 2014), donde el gen *patN* (anteriormente conocido como *idh*) codifica la enzima isoeoxidon deshidrogenasa (IDH), que ha sido descrita como un gen clave en la producción de patulina en *P. expansum*.

Para llevar a cabo este estudio se utilizó el método de la cuantificación relativa de la expresión génica  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  y la técnica de la PCR en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR). La utilización del método de la cuantificación relativa requirió el establecimiento de unas condiciones control (calibrador) que fue los lotes en los que *P. expansum* se inoculó aisladamente en cada una de las variedades de fruta analizadas y un control endógeno, que en este estudio se utilizó el gen  $\beta$ -*tubulina*, que es un gen estructural presente en todos los mohos.

En cuanto a la técnica seleccionada, ésta es una técnica que permite la cuantificación sensible, específica y reproducible de cantidades de ARNm transcrito por un gen. Sin embargo, las cantidades de ARNm varían con la fisiología, la patología y el desarrollo, lo que provoca que la transcripción sea flexible y variable; de ahí la elección de una cuantificación relativa de la expresión del gen *idh* en vez de una cuantificación absoluta.

En la Figura 4.10 se puede observar la expresión génica del gen *idh* de *P. expansum* cuando fue coinoculado con las levaduras L40 y L672 en los días 2, 4 y 6 de incubación a temperatura ambiente en nectarina, melocotón, ciruela negra y paraguay con respecto a las condiciones control (lote PE). De forma individual, en el caso de nectarina, se observa que la expresión del gen *idh* de *P. expansum* en presencia de L40 es inhibida en los días 2 y 6 de tratamiento mientras que se observa una estimulación de la misma en el día 4 de tratamiento; mientras que en presencia de L672 la expresión del gen en estudio fue siempre estimulada en los 3 días ensayados. En cuanto a melocotón la expresión del gen *idh* es inhibida en presencia de L40 en los días 2 y 4 de incubación, alcanzando el máximo de expresión al final del tiempo de incubación. Sin embargo, en el caso, de la expresión génica en presencia de L672 ésta varió

cíclicamente observándose un mínimo de expresión en el día 4 y una sobreexpresión los días iniciales y finales del ensayo. Con respecto a ciruela negra, no hubo diferencias en cuanto al comportamiento de la expresión del gen en presencia de la levadura L40 a lo largo del tiempo de incubación; mientras que la levadura L672 provocó un aumento de la expresión del gen los dos primeros días de tomas de muestras (días 2 y 4) mientras que no hubo diferencias con el control en el día 6. Por último, en el caso de paraguay, sólo se obtuvieron datos de los días 4 y 6, como se comentó anteriormente en la metodología. En este caso, la expresión del gen en presencia de L40, fue activada en el día 4 mientras que se inhibió dos días después. En cuanto a la levadura L672, se observó un incremento de la expresión génica en los dos días analizados. En términos generales, se puede observar que el perfil de expresión del gen *idh* (cambios de la expresión génica a lo largo del tiempo), es similar en presencia de ambas levaduras en nectarina y melocotón; en el caso de nectarina hay un máximo de expresión en el día 4, hecho que también ocurre en el caso de la ciruela negra en presencia de L672, mientras que en el caso de melocotón se observa un mínimo de expresión a este día de incubación en presencia de L40 y L672. En el caso del paraguay, se observa una disminución de la expresión génica a lo largo del tiempo en presencia de L40 observándose el efecto contrario en presencia de L672. Además, también es destacable que en general, existe una mayor inhibición de la expresión del gen *idh* de *P. expansum* en presencia de *Pichia kudriavzevii* L40 en las cuatro variedades, en comparación con *Metschnikowia pulcherrima* L672.

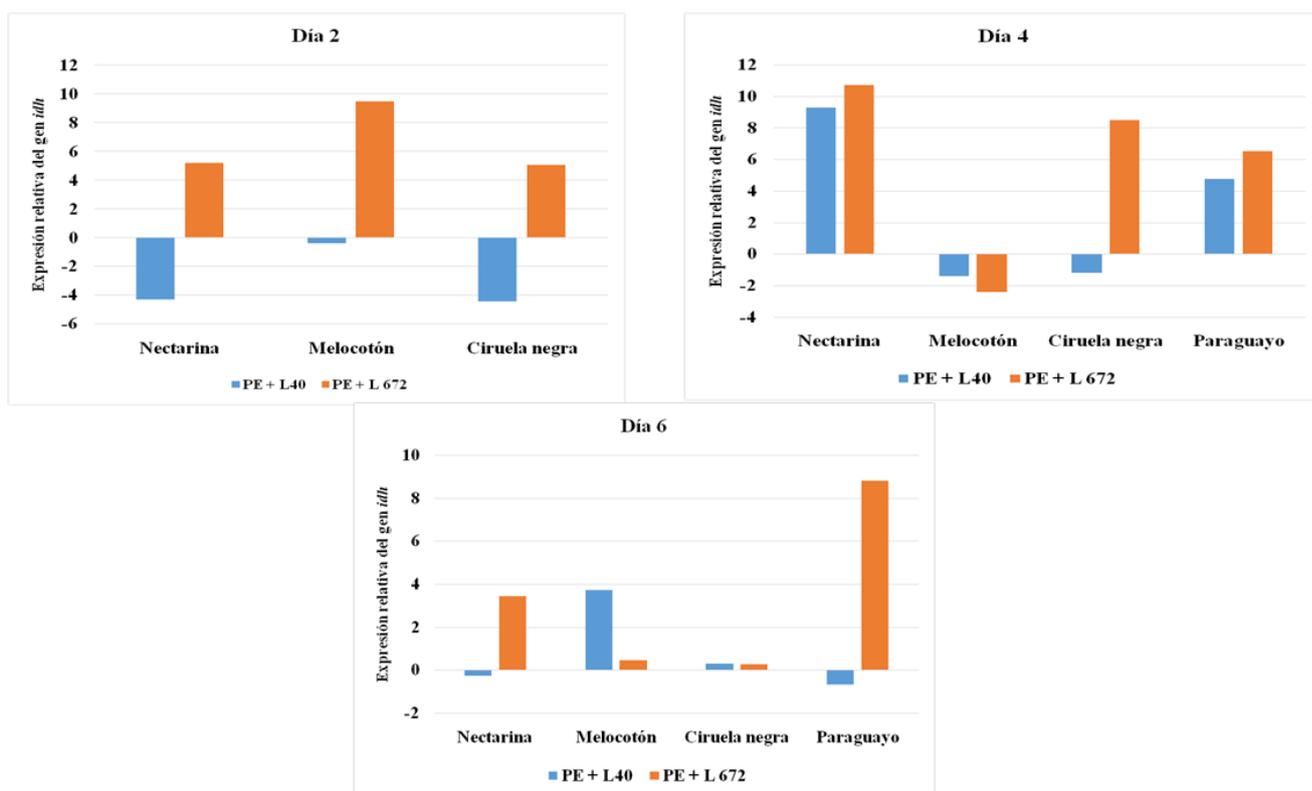


Figura 5.10. Expresión relativa del gen *idh* de *Penicillium expansum* en presencia de *Pichia kudriavzevii* L40 (columnas azules) y *Metschnikowia pulcherrima* L672 (columnas naranjas) los días 2, 4 y 6 del estudio. La expresión génica relativa está expresada en log<sub>2</sub> y está expresada en relación a las condiciones control (lote PE).

Las diferencias encontradas en cuanto a los valores de expresión génica relativa en los diferentes tiempos de incubación, las levaduras empleadas y en las variedades de fruta estudiadas eran esperables. Numerosos autores han demostrado que la expresión de genes implicados en la biosíntesis de diferentes micotoxinas producidas por mohos varía a lo largo del tiempo. Así, Rodríguez et al. (2014) demostraron que la expresión de los genes *otapks* y *otanps*, genes claves relacionados con la producción de ocratoxina A de *Penicillium nordicum*, variaba a lo largo del tiempo de incubación. Lozano-Ojalvo et al. (2013) mostraron que la expresión del gen *aflP*, gen estructural implicado en la producción de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus*, era cíclica, teniendo máximos y mínimos de expresión a lo largo del periodo que duró el experimento. Peromingo et al. (2017) también mostraron que los perfiles de expresión de los genes *aflR* y *aflS*, genes reguladores de la biosíntesis de aflatoxinas en *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, variaban a lo largo del tiempo. Schmidt-Heydt et al. (2009; 2010) también observaron el mismo comportamiento en la expresión de varios genes asociados con la

producción de aflatoxinas de las dos especies de *Aspergillus* más conocidas cuando investigaron distintas condiciones de temperatura y humedad relativa.

Las diferencias encontradas en la expresión del gen en las distintas frutas también eran esperables, pues se ha demostrado en estudios previos que los nutrientes afectan de forma fundamental a la expresión génica (Rodríguez et al., 2014; Peromingo et al., 2017). La concentración de azúcares generalmente se expresa en contenidos de sólidos solubles (SSC); en diversos estudios (Rozo-Romeo et al., 2015 y Álvarez-Herrera et al., 2015) se ha determinado que la ciruela presenta una elevada concentración de SSC, dicha concentración se mueve entre los valores de 13-14°Brix y se mantiene estable desde el inicio de la cosecha hasta el fin del almacenamiento al noveno día. Sin embargo, las otras variedades, melocotón, nectarina y paraguayo, su contenido en SSC varía según la madurez en la que se encuentre el fruto, siendo los más maduros, lo que presentan mayor concentración de SSC; esta variación oscila desde 10,6°Brix a 13,6°Brix (Bastidas et al., 2015). En Torre-Hernández et al. (2014) observaron que el tipo de carbohidratos presentes en los granos de maíz influye en la producción de fumonisinas; la cantidad de esta toxina es muy baja en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono es la amilosa. Sin embargo, aumenta cuando el hongo crece en amilopectina o dextrina; De igual modo, la transcripción de los genes FUM8 y FUM12 aumenta durante el desarrollo del grano, conforme se acumula amilopectina. Así mismo el gen HXK1 otro gen que participa en la percepción de azúcares y contribuye en la regulación de la síntesis de fumonisinas. Una mutación en este gen afecta el crecimiento del hongo en presencia de varias fuentes de carbono y también ocurre una reducción del 80% en la síntesis de la fumonisina. En Bluhm et al. (2008) determinaron que el gen FST1 implicado en la biosíntesis de fumonisinas requiere la presencia de ZFR1 (un gen regulador) para expresarse, y además este gen ZFR1 es necesario para que se activen otros transportadores de azúcares durante la colonización del grano, ya que el gen FST1 requiere de estos transportadores para el crecimiento durante la colonización del grano de maíz. Las diferencias existentes en la composición y los nutrientes de las frutas ensayadas parecen afectar de forma determinante a la expresión del gen *idh*.

En cuanto a las diferencias encontradas en la expresión del gen implicado en la producción de patulina debido a la aplicación de una u otra levadura, se ha demostrado en estudios previos que existen diferencias importantes en la expresión de genes biosintéticos debido a la utilización de una u otra cepa de levadura para controlar el crecimiento y/o producción de micotoxinas de distintas especies de moho. Así en Ianiri et al. (2016) se determinó que ciertas levaduras como *Sporobolomyces* IAM 13481 y la cepa LS11 de *Rhodosporidium kratochvilovae* son capaces de resistir la patulina y degradarla en los

compuestos menos tóxicos ácido desoxipatulínico y ascladiol. Se observó un efecto regulador el gen *PatE* de *P. expansum*, gen que codifica para la oxidorructasa de glucosa-metanol-colina (GMC), responsable en el último paso de la biosíntesis de PAT. Esta enzima es responsable de la conversión de PAT en ascladiol, una forma no perjudicial de patulina, aunque el método de actuación no está muy claro. Sin embargo, otras levaduras como, *Pichia ohmeri* y *Candida sake* usadas en dicho estudio, inhibidoras de la acumulación de PAT; sin embargo, las reducciones no se atribuyeron a la metabolización directa de PAT, sino a la protección de los frutos de la infección por *P. expansum* productor de PAT.

Hasta el momento no hay muchos estudios que hayan profundizado en el efecto de las condiciones ambientales, nutricionales o la aplicación de estrategias de biocontrol en la expresión de genes asociados con la síntesis de patulina. Pese a ello, existen determinados estudios que se centran en efecto de la temperatura en la expresión del gen *idh*. De Clercq et al. (2016) estudiaron como la expresión del gen podría variar según la temperatura y atmósfera en la que se encuentre, por ejemplo, a temperaturas bajas (4°C) y atmósfera controlada (niveles bajos de O<sub>2</sub>) se produce una reducción de la producción de patulina y una regulación a la baja de la expresión del gen. Estas condiciones se consideraron estresantes y determinaron que bajo estrés el gen *idh* tarda más en expresarse debido a que se produce un retraso en el metabolismo del hongo. Se obtuvieron unos niveles de expresión promedio (UA) de 0,02-1,34 UA. En Salomão et al. (2009) se informó que las manzanas incubadas a 20,5 °C produjeron cantidades de patulina significativamente mayores que las incubadas a 11 °C.

Si se relacionan los resultados obtenidos en la expresión del gen *idh* con los datos de producción de patulina a los 4 días en tres de las cuatro frutas estudiadas (ciruela, melocotón y nectarina), se observa en los lotes PE+L40 una activación (nectarina, ciruela negra) o inhibición (melocotón) de la expresión génica respecto al lote control PE. Así mismo, los resultados del día 2 concuerda con una mayor o menor cantidad de la micotoxina en el lote PE+L40 respecto al lote PE (control). En el caso de los lotes donde se inocularon la levadura L672, esta estrecha relación entre la expresión del gen *idh* y de la producción de patulina solo se encontró en melocotón. Esto indica, que el gen *idh*, puede ser utilizado como un indicador fiable de la producción de la micotoxina en las tres frutas estudiadas cuando se inocula la levadura L40; mientras que en el caso de la levadura L672 sólo podría aplicarse en el caso de melocotón. Seguramente en este último caso, otros genes implicados en la ruta biosintética de la patulina tienen un papel más relevante en la síntesis de dicha micotoxina. Estos resultados donde se demuestra la relación de un gen implicado en la ruta biosintética de una micotoxina con dicho

metabolito secundario han sido previamente publicados (Peromingo et al., 2017; Bernáldez et al., 2018).

Los resultados muestran que se requiere un estudio más profundo y exhaustivo de las levaduras de manera individual para analizar otros posibles genes de la ruta biosintética de la patulina implicados en la expresión de la misma con el fin de determinar con cuál de ellos estos agentes de biocontrol son lo más eficiente posible.

**CAPÍTULO VI.**  
**CONCLUSIONES**

## **6. CONCLUSIONES.**

### **PRIMERA**

Las levaduras *Pichia kudriavzevii* L40 y *Metschnikowia pulcherrima* L672 mostraron un control efectivo contra el moho *P. expansum* en los cuatro tipos de fruta de hueso (nectarina, melocotón, paraguay y ciruela) durante los 6 días de almacenamiento a temperatura ambiente, siendo la actividad antagonista de L672 superior al de la levadura antagonista L40.

### **SEGUNDA**

Los tratamientos coinoculados con la levadura *Metschnikowia pulcherrima* L672 presentaron menor concentración de la toxina en comparación con el control con *P. expansum* en 3 de las frutas estudiadas; en dos de ellas la reducción fue completa.

### **TERCERA**

Existe una estrecha relación entre la expresión del gen *idh* de *P. expansum* y la producción de patulina en presencia de *Pichia kudriavzevii* L40 en las variedades de frutas, pudiendo utilizarse este gene como un indicador fiable.

### **CUARTA**

Las discrepancias halladas en cuanto al comportamiento de la expresión del gen *idh* en relación a la producción de patulina en presencia de la levadura *Metschnikowia pulcherrima* L672 en las 4 variedades hacen necesario un estudio más exhaustivo de otros genes de la ruta biosintética de la patulina.

### **QUINTA**

La utilización de las dos levaduras de estudio, sobre todo la levadura *Metschnikowia pulcherrima* L672, como estrategia de biocontrol en frutas de hueso podría minimizar la presencia de patulina en estos cultivos frutícolas y en los productos derivados de los mismos, como zumos, compotas, purés, etc.

## **CAPÍTULO VII.**

### **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- Akimitsu, K., Tsuge, T., y Kodama, M. (2014). *Alternaria* host-selective toxins: determinant factors of plant disease. *Journal of General Plant Pathology*. Vol. 80, pg. 109–122.
- Álvarez-Herrera, J.G., Rozo-Romeo, L.X., y Reyes, A.J. (2015). Effect of ethylene on postharvest behavior of plum fruits (*Prunus salicina* Lindl.) at four stages of maturity. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. Vol. 9, pg. 46-59.
- Alzamora, S.M., Cerrutti, P., Guerrero, S., y López-Malo, A. (1995). Frutas mínimamente procesadas por métodos combinados.” En: Barbosa-Cánovas GV y Welti-Chanes J. (eds), *Conservación de alimentos por control de humedad. Fundamentos y aplicaciones*. Lancaster, Pensilvania: Technomic Publishing. Co. pg. 463 - 492.
- Amiri, A., y Bompeix, G (2005). Diversity and population dynamics of *Penicillium spp.* on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology*. Vol. 54(1), pg. 74-81.
- Ariza, J., Sánchez, C., Gomis, M., Barberán, J., y Barros, C. (2002). Infecciones osteoarticulares y de partes blandas. *Protocolos Clínicos SEIMC*. Vol. 6, pg. 3-26.
- Arroyo-Cordero, F.T., Casado Mármol, G., y Arenas, F.J. (2016). *Guía de Gestión Integrada de Enfermedades de Frutales de Hueso*. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Sevilla.
- Assaf, L.A.R., Pedrozo, L.P., Nally, M.C., Pesce, V.M., Toro, M.E., de Figueroa, L.I.C., y Vázquez, F. (2020). Utilización de levaduras de diferentes ambientes para el control de *Penicillium expansum* en uva de mesa a temperatura de almacenamiento”. *Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos*. pg. 108520
- Baggio, J.S., Gonçalves, F.P., Lourenço, S.A., Tanaka, F.A.O., Pascholati, F., y Amorim, L. (2015). Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot. *Plant Pathology*. Vol. 65(4), pg. 633–642.
- Bajaj, B. K., Raina, S., y Singh, S. (2012). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii*RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 53(8), pg. 645–656
- Bastidas, L.A., Puentes, G.A., y Lemus, A. (2015). Parámetros de calidad durante la cosecha de melocotón (*Prunus persica* L. Batsch cv. "Rubidoux"). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. Vol.6, pg. 145-153.
- Bernáldez, V., Rodríguez, A., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., y Córdoba, J.J. (2018). Análisis de expresión genética como método para predecir la acumulación de OTA en

- productos cárnicos curados en seco. *Anal de alimentos. Methods.* Vol. 11, pg. 2463–2471.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Delgado, J., Bermúdez, E., Rodríguez, A. (2018). Gene expression analysis to predict aflatoxins B1 and G1 contamination in some plant origin foods. *LWT.* Vol. 93, pg. 517-524.
- Bluhm, B.H., Kim, H., Butchko, R.A.E y Woloshuk, C.P. (2008). Participación de ZFR1 de *Fusarium verticillioides* en la colonización de granos y la regulación de FST1, un supuesto gen transportador de azúcar necesario para la biosíntesis de fumonisinas en granos de maíz. *Patología vegetal molecular.* Vol.9, pg. 203-211.
- Bullerman, L.B. (2003). Hongos en los alimentos: una descripción general. *Ciencias.* Vol.11, pg. 111-222.
- Cabañas, C. (2019). Levaduras Procedentes De Viñedos Como Potenciales Tratamientos Antagonistas Frente A Mohos Alterantes De Uva. Trabajo fin de grado. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura.
- Campos, F.K. (2015). Métodos de control postcosecha de la infección por el género *Penicillium* en cítricos. Peras y manzana. Tesis de Grado. Facultad de ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo.
- Cantín, C. (2009). Estudio Agronómico Y De La Calidad Del Fruto Del Melocotonero [P. *Persica* (L.) Batsch] En Diferentes Poblaciones De Mejora Para La Selección De Nuevos Cultivares. Tesis doctoral. Estación Experimental de Aula Dei Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Zaragoza.
- Casals, C., Teixidó, N., Torres, R., y Usall, J. (2018). *Rhizopus spp.*, una enfermedad de relevancia en el panorama actual de la fruta de hueso. IRTA, Postcollita-XaRTA. Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida. Obtenido de Innovagri: <https://www.innovagri.es/investigacion-desarrollo-inovacion/rhizopus-spp-una-enfermedad-de-relevancia-en-el-panorama-actual-de-la-fruta-de-hueso.html>
- Castoria, R., Mannina, L., Durán-Patrón, R., Maffei, F., Sobolev, A. P., De Felice, D. V., ... Wright, S. A. I. (2011). Conversion of the Mycotoxin Patulin to the Less Toxic Desoxypatulinic Acid by the Biocontrol Yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* Strain LS11. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 59(21), pg. 11571–11578.
- Chen, J., Shen, Y., Chen, C., y Wan, C. (2019). Inhibición de cepas fúngicas clave de postcosecha de cítricos por extractos de plantas in vitro e in vivo: una revisión. *Plantas.* pg. 8 - 26.
- Chun-Ta Wu. (2010). An Overview of Postharvest Biology and Technology of Fruits and Vegetables. AARDO Workshop on Tecnology on Reducing Post-harvest Losses and Maintaining Quality of Fruits and Vegetables. pg. 2-11.

- Coelho, A. R., Nóbrega, G. M. de A., Pagnocca, F. C., Hoffmann, F. L., Harada, K., & Hirooka, E. Y. (2011). Avaliação do potencial antagônico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. *Ciências Agrárias*. Vol. 32(4Sup1), pg. 1879.
- Contreras, A. (2010). Efecto de tratamientos poscosecha novedosos en la calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de cítricos. (Tesis Doctoral). Universitat Politècnica de València.
- Costa, E., Casals, C., Teixidó, N., y Plaza, P. (2020). Aplicación de fungicidas en poscosecha de frutas de hueso, una realidad. IRTA, Postcollita-XaRTA. Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida. Obtenido de ISSUU: [https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/aplicaci\\_n\\_de\\_fungicidas\\_en\\_poscosecha\\_de\\_fruta\\_de](https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/aplicaci_n_de_fungicidas_en_poscosecha_de_fruta_de)
- Crisosto, C. H. & Crisosto, G. M. (2005). Relationship between ripe soluble solids concentration (RSSC) and consumer acceptance of high and low acid melting flesh peach and nectarine (*Prunus persica* (L.) Batsch) cultivars. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 38(3), pg. 239–246.
- Cuál es el pH de los alimentos. (2017). Recuperado de Food- Info. <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp65.htm>.
- De Clercq, N., Vlaemynck, G., Van Pamel, E., Van Weyenberg, S., Herman, L., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., y Van Coillie, E. (2016). Isoepoxydon dehydrogenase (*idh*) gene expression in relation to patulin production by *Penicillium expansum* under different temperature and atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 220, pg. 50-57.
- De Pavía, E., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M.G., Villalobos, M.C., Casquete, R. y Hernández, A. (2017). Combined effect of antagonistic yeast and modifies atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in Sweet cherries cv. Ambrunés. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 241, pg. 276-282.
- Delp, C.J. (1988). Resistance management strategies for benzimidazoles. *Fungicide Resistance in North América*. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, pg. 41–43.
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal*. Vol. 12(12).
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., y Denle, N. (2004). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Errampalli, D. (2014). *Penicillium expansum* (Blue Mold)". *Postharvest Decay*. Pg. 189-231.
- Farr, D.F., y Rossman, A.Y. (2013). Fungal databases. *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*. Agricultural Research Service, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

- Fleming, A. (1929). Sobre la acción antibacteriana de los cultivos de un *Penicillium*, con especial referencia a su uso en el aislamiento de *B. influenzae*. Revista británica de patología experimental. Vol. 10 (3), pg. 226-236.
- Fraeyman, S., Croubels, S., Devreese, M., y Antonissen, G. (2017). Emerging *Fusarium* and *Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. Toxins. Vol. 9(7), pg 228.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., y Samson, R.A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Mycology. Vol. 49, pg. 201–241.
- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., et al. (2008). Relación entre la incidencia de infecciones latentes causadas por *Monilinia spp.* y la incidencia de la pudrición parda del melocotonero: factores que afectan la infección latente. European Journal of Plant Pathology. Vol. 121, pg. 487–498.
- Ghaouth, A., y Wilson, C. (1995). Análogos de azúcar como fungicidas potenciales para patógenos poscosecha de manzana y melocotón. AGRIS. Vol. 79(3), pg. 254-258.
- Gimeno, A., y Martins, M.L. (2011). Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. Special Nutrients, Florida. Pg. 50–53.
- Giraud, F., Giraud, T., Aguilera, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., y Dupont, J. (2010). Loci de microsátélites para reconocer especies para el iniciador de queso y cepas contaminantes asociadas con la fabricación de queso. Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos. Vol. 137 (2-3), pg. 204-213.
- Gowing, D.J.G., Davies, W.J., y Jones, H.G. (1990). A Positive Root-sourced Signal as an Indicator of Soil Drying in Apple, *Malus x domestica* Borkh. Journal of Experimental Botany. Vol. 41(12), pg.1535–1540.
- Guerrero, E., Vázquez del Mercado, E., y Arenas, R. (2014). Candida infections in a General Hospital: Clinico-epidemiological data and typification. DermatologíaCMQ. Vol. 12(1), pg. 18-23
- Henríquez, J.L., Alarcón, P., Guzmán, V., y Castelleti, E. (2012). Poblaciones epífitas de *Geotrichum candidum* de melocotón en Chile. Horticultura global. Vol 301, pg. 82.
- Hilaire, C., (2003). The peach industry in France: state of art, research and development. In: Marra, F., Sottile, F. (Eds.), Proceedings of the First Mediterranean Peach Symposium. Agrigento. Pg. 27–34.
- Ianiri, G., Idnurm, A. y Castoria, R. (2016). Respuestas transcriptómicas de la levadura basidiomiceto *Sporobolomyces* sp. a la micotoxina patulina. BMC Genomics. Vol. 17, pg 210.

- Janisiewicz, W., y Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. Revisión anual de fitopatología. Vol. 40: 1, pg. 411-441
- Jijakli, M.H., y Lepoivre, P. (2004). Estado del arte y desafíos del manejo de enfermedades postcosecha en manzanas. Fruit and Vegetable Diseases. Manejo de enfermedades de frutas y verduras. Vol 1.
- Juliarena, P. (2015). Capítulo 2. “Generalidades sobre alimentos. Obtenido de Tecnología, ambiente y sociedad: <http://www.exa.unicen.edu.ar/catedras/tecnoambiente/CAP02.pdf>
- Kamel-Madbouly, A., Abo-Elyousr, K.A.M., Mohamed-Ismail, I. (2020). Biocontrol of *Monilinia fructigena*, causal agent of brown rot of apple fruit, by using endophytic yeasts. Biological control. Vol. 144, pg. 104239.
- Koike, S., y Bolda, M. (2016). El Moho Gris, o Pudrición de fresa. Obtenido de UCANR: <http://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>.
- Konstantinou, S., Karaoglanidis, G.S., Bardas, G.A., Minas, I.S., Doukas, E., y Markoglou, A.N. (2011). Postharvest Fruit Rots of Apple in Greece: Pathogen Incidence and Relationships Between Fruit Quality Parameters, Cultivar Susceptibility, and Patulin Production. Plant Disease. Vol. 95(6), pg. 666–672.
- Li, X., Tang, H., Yang, C., Meng, X., y Liu, B. (2019). Desintoxicación de la micotoxina patulina por la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*. Food Control. Vol. 6, pg. 47 – 52.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., y Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. International Journal of Food Microbiology. Vol.167 (2), pg. 153–160.
- Livak, KJ y Schmittgen, (2001). TD Análisis de datos de expresión génica relativa utilizando PCR cuantitativa en tiempo real y el método 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C (T)). Methods. Vol. 25 , pg. 402–408.
- Lleó, L., Valero, C., y Ruiz-Altisent, M. (1997). Parametros de calidad organoléptica en melocotón. Dpto. Ing Rural. ETSIAgrónomos UPM (Madrid).
- Louw, J.P., y Korsten, L. (2019). Impact of ripeness on the infection and colonisation of *Penicillium digitatum* and *P. expansum* on plum. Postharvest Biology and Technology. Vol.149, pg. 148–158.
- Lozano-Ojalvo, D., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M. (2013) Influence of temperature and substrate conditions on the omt-1 gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production. International Journal of Food Microbiology. Vol. 166 N° 2, pg. 263-269.
- Manayay Guevara, C.A.L., Córdova Rojas, L.M., García López, J.W y Vásquez Vásquez, J.M. (2016). Efecto antagónico de una cepa de *Trichoderma spp.* sobre *Fusarium spp* en planta de tomate Río Grande (*Solanum lycopersicum*). UCH-HACER. N°1, Vol 5.

- Martín, L., Bernardi, C., Guemes, D., Pirovani, M., y Piagentini, A. (2011). Evaluación de variedades de duraznos destinadas al mínimo procesamiento Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. Vol. 12, núm. 1, pg. 51-56
- Michailides, T.J., y Spotts, R.A. (1990). Transmission of *Mucor pyriformis* to fruit of *Prunus persica* by *Carpophilus spp.* and *Drosophila melanogaster*. Plant Disease. Vol. 74, pg. 287–291.
- Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I., y Worobo, R.W. (2005). Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 4(1), pg. 8–21.
- Moraes Bazioli, J., Belinato, JR., Costa, JH., Akiyama, DY., Pontes, JGM., Kupper, KC., Augusto, F., de Carvalho, JE., Relleno, TP. (2019) Control Biológico de Fitopatógenos Postcosecha de Cítricos. Toxinas. Vol. 11 N.º 460.
- Morales- Valle, H. (2011). Mohos productores de micotoxinas. IBB/Centre for Biological Engineering. Universidad de Minho. Campus de Gualtar. 4710 Braga, Portugal.
- Morales, H., Marín, S., Ramos, AJ y Sanchis, V. (2010). Influencia de las tecnologías poscosecha aplicadas durante el almacenamiento en frío de manzanas en el crecimiento de *Penicillium expansum* y la acumulación de patulina: una revisión. Food Control. Vol. 21 (7), pg. 953–962.
- Morales-Valle, H., Barros, G., Marín, S., Chulze, S., Ramos, A.J., y Sanchis, V. (2008). Efectos de las variedades de manzana y pera y el pH sobre la acumulación de patulina por *Penicillium expansum*. Revista de ciencia de la alimentación y la agricultura. Vol. 88 (15), pg. 2738–2743.
- Nally, M.C., Pesce, V.M., Maturano, Y.P., Muñoz, C.J, Combina, M., Toro, M.E., Castellanos de Figueroa, L.I., y Vázquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. Postharvest Biology and Technology. Vol. 64, pg. 40-48.
- Nayyeri, N., Edalatian, M.R., y Habibi Najafi, M.B., (2017). Study the effect of *Lactobacillus plantarum* stages of production lighvan cheese on *Rodotorula mucilaginosa* as a spoilage indicator in fruits juice. Iranian Food Science and Technology Research Journal. N°5 (41). Vol 12, pg. 596-608.
- Oteiza, J.M., Khaneghah, A.M., Campagnollo, F.B., Granato, D., Mahmoudi, M.R., Sant'Ana, A.S., y Gianuzzi L. (2017). Influencia de la producción sobre la presencia de patulina y ocratoxina A en jugos de frutas y vinos de Argentina. LWT. Vol. 80, pg. 200–207.
- Palou, L. (2009). Control of citrus postharvest diseases by physical means”. Tree Forestry Sci. Biotechnol. Vol. 3, pg. 127–142.

- Palou, L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). Postharvest Decay. pg. 45–102.
- Pan, J., Vicente, A., Martínez, G., Chaves, A., y Civello, P. (2004). Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 84(14), pg. 1831- 1838.
- Peromingo, B., Rodríguez, M., Delgado, J., Andrade, M. J., y Rodríguez, A. (2017). Gene expression as a good indicator of aflatoxin contamination in dry-cured ham. *Food Microbiology*. Vol. 67, pg. 31–40.
- Pitt, J.I., y Hocking, A.D. (2007). *Fungi and food spoilage*. 3ª edición. London. Blackie Academic and Professional, Londres.
- Puel, O., Galtier, P., y Oswald, I. (2010). Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin”. *Toxins*. Vol. 2(4), pg. 613–631.
- Ramos, A., Sanchis, V., y Marín, S. (2011). La prehistoria de las micotoxinas: casos relacionados desde la antigüedad hasta el descubrimiento de las aflatoxinas. *Revista mundial de micotoxinas*. Vol. 4 (2), pg. 101-112.
- Reddy, K.R.N., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M.L. y Garibaldi, A. (2010). Potential of patulin production by *Penicillium expansum* strains on various fruits. *Mycotox*. Vol. 26, pg. 257– 265.
- Redondo, D., Oria, R., Arias, E y Venturini1, M.E. (2018). Control de *Monilinia laxa* en melocotón mediante extractos obtenidos a partir de los frutos del aclareo. Grupo de Investigación. Alimentos de Origen Vegetal”. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177, 50013. Zaragoza.
- Reglamento (CE) n° 1861/2004 de la Comisión, de 26 de octubre de 2004, por el que se establece la norma de comercialización de los melocotones y las nectarinas.
- Reglamento (CE) n° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios
- Regnier, T., Combrinck, S., Veldman, W. y Du Plooy, W. (2014). Aplicación de aceites esenciales como fungicidas multiobjetivos para el control de *Geotrichum citri-aurantii* y otros patógenos poscosecha de cítricos. *Cultivos y productos industriales*. Vol. 61, pg. 151-159.
- Rodríguez, A., Medina, A., Córodoba, J.J., y Magan, N. (2014). Influencia de la sal (NaCl) sobre los genes biosintéticos de ocratoxina A, el crecimiento y la producción de ocratoxina A por tres cepas de *Penicillium nordicum* en un medio a base de jamón curado en seco. *Revista internacional de microbiología alimentaria*. Vol. 178, pg 113-119.

- Rozo-Romeo, L.X., Álvarez-Herrera, J.G., y Balaguera-López, H.E. (2015). El etileno y los cambios durante la maduración en frutos de ciruela (*Prunus salicina* Lindl.) 'Horvin'. *Agronomía Colombiana*. Vol. 33, pg. 228-237.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M. C., Calle, A., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G., y Hernández, A. (2016). Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. Vol. 57, pg. 45–53.
- Salomão, B.C.M., Aragão, G.M.F., Churey, J.J., Padilla-Zakour, O.I., y Worobo, R.W. (2009). Influence of Storage Temperature and Apple Variety on Patulin Production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*. Vol. 72(5), pg. 1030–1036.
- Sánchez, P. (2015). Influencia de la temperatura en etapas postcosecha sobre la calidad de diferentes variedades de ciruela. Trabajo fin de grado. Universidad de Valencia.
- Sanzani, S.M., De Girolamo, A., y Schena, L.(2009). Control de la acumulación de *Penicillium expansum* y patulina en manzanas mediante quercetina y umbeliferona. *European Food Research and Technology*. Vol. 228, pg. 381–389.
- Schirra, M., D'Aquino, S., Cabras, P. y Angioni, A. (2011). Control de enfermedades poscosecha de frutas por calor y fungicidas: eficacia, niveles de residuos y persistencia de residuos. Una revisión. *Revista de química agrícola y alimentaria*. Vol. 59 (16), pg. 8531–8542.
- Schirra, M., Mulas, M., Fadda, A., Cauli, E., (2004). Cold quarantine responses of blood oranges to postharvest hot water and hot air treatments. *Postharvest Biology Technology*. Vol. 31, pg. 191–200.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N. y Geisen, R. (2009). Regulación compleja del grupo de genes de biosíntesis de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* en relación con varias combinaciones de actividad del agua y temperatura. *Revista Internacional de Microbiología de los Alimentos*. Vol. 135 (3),pg. 231-237.
- Schmidt-Heydt, M., Rufer, CE, Abdel-Hadi, A., Magan, N. y Geisen, R. (2010). La producción de aflatoxina B1 o G1 por *Aspergillus parasiticus* a diversas combinaciones de temperatura y actividad del agua está relacionada con la relación de expresión de aflS a aflR. *Micotoxina Research*. Vol. 26, pg. 241–246.
- Sever, Z., Ivić, D., Kos, T., y Miličević, T. (2012). Identification of *Fusarium* Species Isolated from Stored Apple Fruit in Croatia. *Industrial Hygiene and Toxicology*. Vol. 63(4), pg. 463–470.
- Shephard, G.S., y Leggott, N.L. (2000). Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A*. vol. 882(1-2), pg. 17–22.

- Sholberg, P.L., Bedford, K., y Stokes, S. (2005). Sensitivity of *Penicillium* spp. and *Botrytis cinerea* to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. *Crop Protection*. Vol. 24, pg. 127–134.
- Simmons, E.G. (2007). *Alternaria*. An identification manual". CBS Biodiversity Series. Vol. 6, pg. 1–775.
- Solfrizzo, M. (2017). Recent advances on *Alternaria* mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*. Vol. 17, pg. 57–61.
- Spadaro, D., Garibaldi, A., y Gullino, M.L. (2010). Efficacy of Biocontrol Yeasts Against *Penicillium Expansum* And Patulin On Different Cultivars of Apple in Postharvest. *Acta Horticulturae*. Vol. 873, pg. 191–196.
- Sternad, M., Rowland, A., Cesnik, U., y Butinar, L. (2017). Estudio del potencial de la biodiversidad de la levadura en el desarrollo de agentes de control biológico frente a hongos fitopatógenos en viticultura. VII Congreso Internacional de Microbiología Ambiental Industrial y Aplicada - BMW2017.
- Sugar, D., y Basile, S.R. (2008). Timing and sequence of postharvest fungicide and biocontrol agent applications for control of pear decay. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 49(1), pg. 107–112.
- Tannous, J., El Khoury, R., Snini, SP, Lippi, Y., El Khoury, A., Atoui, A., y Puel, O. (2014). Secuenciación, organización física y expresión cinética del grupo de genes biosintéticos de patulina de *Penicillium expansum*. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*. Vol.189, pg. 51–60.
- Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I., Abadias, M., y Usall, J., (2013). Biological and natural materials for postharvest disease management: success and failures. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Discovery and Development of Innovative Strategies for Postharvest Disease Management, 28 April-2 May 2013, Kusadasi, Turkey*. *Acta Horticulturae*, in press.
- Torre-Hernández, M.E., Sánchez-Rangel, D., y Galeana-Sánchez, E. (2014). Fumonisin – síntesis y Función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*. Vol. 17, pg. 77-91.
- Uribe- Gutierrez, L.A. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filosfera de Mora. Trabajo de Grado. Universidad Javeriana Facultad de ciencias Microbiología industrial. BOGOTÁ.
- Vannini, A., y Chilosi, G. (2013). *Botrytis* infection: grey mould and noble rot. In: Sweet, Reinforced and fortified wines: grape biochemistry, technology and vinification. Chichester, UK: John Wiley & Sons. Pg. 159–169.
- Vero, S., Garmendia, G., González, M.B., Bentancur, O., Wisniewski, M., (2012). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management

- of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). FEM Yeast Research. Vol. 13, pg. 189-199.
- Víctor Ortega, M.D. (2011). Evaluación De La Microextracción Líquido-líquido Dispersiva Para La Determinación De Patulina En Zumos De Manzana Mediante Electroforesis Capilar. Trabajo Fin De Master. Universidad De Granada.
- Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Jauset, A.M., y Teixidó, N. (2012). Infection capacities in the orange-pathogen relationship: Compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions. Food Microbiology. Vol. 29(1), pg. 56–66.
- Wang, Y., Yuan, Y., Liu, B., Zhang, Z., y Yue, T. (2016). Biocontrol activity and patulin-removal effects of *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides* and *Agrobacterium tumefaciens* against *Penicillium expansum*. Journal of Applied Microbiology. Vol. 121(5), pg. 1384–1393.
- Wisniewski, M.E., y Wilson, C.L. (1989). Biological Control of Postharvest Disease of Fruits and Vegetables: An Emerging Technology. Revisión anual de fitopatología N° 1989, vol. 27(1), pg. 425-441.
- Wisniewski, M.E., y Wilson, C.L. (1992). Biological Control of Postharvest Disease of Fruits and Vegetables: Recent Advances. HortScience. Vol 27(2).
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., y Crous, P.W. (2013). *Alternaria* redefined. Studies in Mycology. Vol. 75, pg. 171–212.
- Xiao, C.L., Kim, Y.K. (2010). Control of postharvest diseases in apples with reduced-risk fungicides. Stewart Postharvest Review. Vol. 6, pg. 1–6.
- Yin, Y.N., Xiao, C.L. (2013). Molecular characterization and a multiplex allele-specific PCR method for detection of thiabendazole resistance in *Penicillium expansum* from Apple". European Journal of. Plant Pathology. Vol. 136, pg.703–713.
- Zbyňovská, K., Petruška, P., Kalařová, A., y Capcarová, M. (2016). Patulina: un contaminante de alimentos y piensos: una revisión. Acta Fytotechnica et Zootechnica. N°2, Vol 19.
- Zheng, X., Yang, Q., y Zhao, L. (2017). Crosstalk between proteins expression and lysine acetylation in response to patulin stress in *Rhodotorula mucilaginosa*. Scientific Reports Vol. 7, 13490.
- Zinedine, A., y Akhdari, S. (2019). Seguridad Alimentaria y cambio climático. Manual de investigación sobre cambios ambientales globales y salud humana. Pg.74-97.
- Zwickel, T., Klaffke, H., Richards, K. y Rychlik, M. (2016). Desarrollo de un análisis basado en espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida de alto rendimiento para la cuantificación simultánea de diversas toxinas de *Alternaria* en vino, jugos de verduras y jugos de frutas. Journal of Chromatography A. vol. 1455, pg. 74-85.