

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

MICROENCAPSULACIÓN DE *MEYEROZYMA CARIBBICA* SOMETIDA A
ESTRÉS TÉRMICO E HÍDRICO, PARA LA INHIBICIÓN DE HONGOS
FITOPATÓGENOS EN AGUACATE (*Persea americana* Mill)

Por:

Katia Nayely González Gutiérrez

TESIS PROPUESTA A LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Director:

Dra. Montserrat Calderón Santoyo

Tepic, Nayarit

Diciembre, 2019

DEDICATORIA

A mis padres, quienes me dieron vida, educación, apoyo y consejos.

A Zimri, por su paciencia, comprensión, fuerza, amor, por ser tal y como es.

A Daniel, por llenar mis días de inmensa alegría y felicidad.

A Génesis, por su ayuda, preocupación, cariño y cuidados.

A mis abuelos, quienes siempre se preocupan por mi, me dan su apoyo y consejos.

GRACIAS

Katia Nayely González Guérrez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por nunca dejarme, por acompañarme a cada momento, por darme fuerzas para superar cada obstáculo y proveerme de todas las cosas. Gracias por su infinito amor y bondad.

Al Dr. Honoris Causa Naasón Joaquín García, el ser humano que más me ha inspirado, pensando en hacer lo que amo y siempre con la disposición de servir, él que me animó diciendo: si te duele mirar hacia atrás y te da miedo mirar hacia adelante, mira a la izquierda o a la derecha y ahí estaré a tu lado. Su exhortación siempre fue muy clara, firme y adelante, y con la fuerza de su voz me infundió las fuerzas para avanzar, por estas y tantas razones más, gracias.

A mi familia, mi mamá, papá y hermana. Por siempre estar para mí, por su amor, cariño, apoyo y comprensión.

A la Dra. Montserrat y Dr. Arturo, gracias por su conocimiento y enseñanza, por ser mi guía y soporte en este proceso, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia científica en un marco de confianza, seguridad y amistad.

Al Dr. Pedro Ulises y Dra. Alejandra Chacón, por sus valiosas aportaciones para la culminación de este proyecto.

A mi tía Briseida, gracias por llevarme al lugar adecuado en el momento correcto.

A mis compañeros de laboratorio, por su amabilidad, orientación, amistad y ayuda.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de la maestría.

RESUMEN

González-Gutiérrez, Katia Nayely. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Diciembre de 2019. Microencapsulación de *Meyerozyma caribbica* sometida a estrés térmico e hídrico, para la inhibición de hongos fitopatógenos en aguacate (*Persea americana* Mill). Director: Calderón-Santoyo, Montserrat.

En el cultivo de aguacate se reportan pérdidas poscosecha de hasta el 20%. La antracnosis inducida por *C. gloeosporioides* se considera la principal causa de las pérdidas pre y poscosecha. El uso indiscriminado de fungicidas y sus efectos a la salud humana y al ambiente, han llevado a explorar métodos alternativos para el manejo de enfermedades fúngicas, tal es el caso del control biológico, candidato para ser aplicado en pre y poscosecha. No obstante, la aplicación directa de una levadura en campo, puede presentar una disminución en su efectividad causada por factores ambientales, como HR y temperatura. Por lo tanto, se propone someter a *M. caribbica* a estrés hídrico y térmico con el fin de mejorar su tolerancia al estrés ambiental e inducir procesos que en condiciones adversas la conviertan en un organismo eficiente. Por otro lado, es importante contar con una bioformulación, por lo que surge como alternativa la microencapsulación de agentes de biocontrol mediante secado por aspersión. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antagonista de la levadura *Meyerozyma caribbica* microencapsulada mediante secado por aspersión y sujeta a estrés hídrico y térmico, frente a hongos fitopatógenos de frutos de aguacate. Se aislaron y purificaron a hongos fitopatógenos que afectan los frutos de aguacate. La identificación molecular se realizó por la técnica de PCR, amplificando una región específica del ADN (ITS-1 e ITS-4) que codifica para RNA ribosomal. Se realizaron pruebas de patogenicidad y la cepa más patógena se utilizó en los ensayos posteriores. Se evaluó la inhibición *in vitro* del hongo fitopatógeno aislado, empleando las levaduras *D. hansenii*, *M. caribbica* y *M. guilliermondii*. Se evaluaron 8 tratamientos de estrés hídrico (diseño 2x4) en medio YPD con: NaCl 0, 0.5, 1 y 1.5 M y se incubaron a 200 rpm por 48 h. Enseguida, las células se sometieron a estrés térmico a 28, 33 o 38 °C (28 o 33 °C para *D. hansenii* y 33 o 38 °C para *M. caribbica* y *M. guilliermondii*) por 30 min. Se determinó el % de viabilidad y se evaluó la inhibición *in vitro* de las levaduras estresadas. La microencapsulación se realizó en un secador por aspersión. Finalmente, se determinó el porcentaje de incidencia y severidad de antracnosis en frutos de aguacate.

Se obtuvieron ocho cepas de las cuales se identificaron como *C. gloeosporioides* (6), *Colletotrichum* sp. (1) y *Fusarium* sp. (1). Se consideró que *C. gloeosporioides* PA14 fue la cepa más patógena. En las pruebas de inhibición *in vitro*, *D. hansenii* presentó la menor inhibición con un 36.44%, seguido de *M. guilliermondii* y *M. caribbica* con inhibición, al día 8, de 42.94% y 49.27% respectivamente. Después de la exposición al estrés, la máxima viabilidad se logró al cultivar a *D. hansenii* en medio 1.0 M a 28 °C, *M. caribbica* en NaCl 1.5 M a 38 °C y la menor viabilidad con *M. guilliermondii* a 1.0 M y 38 °C. Se logró potenciar la actividad antagónica de *D. hansenii*, *M. caribbica* y *M. guilliermondii*, hasta valores de 64.64%, 75.12% y 56.12%, respectivamente. Después de la microencapsulación, la viabilidad de *M. caribbica* estresada fue de 89%. *M. caribbica* estresada y microencapsulada mostró 100% de incidencia y logró reducir la severidad de antracnosis en frutos de aguacate en un 45.45%.

El estrés hídrico y térmico permitió que las levaduras aumentaran su viabilidad en condiciones adversas de baja aw y alta temperatura, al mismo tiempo proporcionó un método para potenciar su actividad antagónica. La capacidad de *M. caribbica* para tolerar el estrés, representa un atributo importante con respecto a su uso como agente de biocontrol para aplicaciones en etapa de precosecha.

Palabras clave: Control biológico, *C. gloeosporioides*, estrés, levadura, microencapsulación.

ABSTRACT

González-Gutiérrez, Katia Nayely. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. December 2019. Microencapsulation of *Meyerozyma caribbica* subjected to thermal and water stress, for the inhibition of phytopathogenic fungi in avocado (*Persea americana* Mill). Director: Calderón-Santoyo, Montserrat.

In the avocado crop postharvest losses of up to 20% are reported. Anthracnose induced by *C. gloeosporioides* is considered the main cause of pre and postharvest losses. The indiscriminate use of fungicides and their effects on human health and the environment have led to the study of alternative methods for the control of fungal diseases, such is the case of biological control, a candidate to be applied in pre and postharvest. However, the direct application of a yeast in the field may present a decrease in its effectiveness caused by environmental factors, such as RH and temperature. Therefore, it is proposed to subject *M. caribbica* to water and thermal stress, in order to improve its tolerance to environmental stress and induce processes that make it an efficient organism in adverse conditions. Moreover, it is important to have a bioformulation, in this sense, microencapsulation of biocontrol agents by spray drying is a viable alternative for this purpose. The objective of this research was to evaluate the antagonistic capacity of microencapsulated *Meyerozyma caribbica* yeast by spray drying and subject to water and thermal stress, against phytopathogenic fungi of avocado fruits.

Phytopathogenic fungi that affect avocado fruits were isolated and purified. Molecular identification was performed by the PCR technique, amplifying a specific region of DNA (ITS-1 and ITS-4) that codes for ribosomal RNA. Pathogenicity tests were performed and the most pathogenic strain was used in subsequent tests. *In vitro* inhibition of the isolated phytopathogenic fungus was evaluated using the yeasts *D. hansenii*, *M. caribbica* and *M. guilliermondii*. Eight treatments of water stress (2x4 design) were evaluated in YPD medium with: NaCl 0, 0.5, 1 and 1.5 M and incubated at 200 rpm for 48 h. Next, the cells were subjected to thermal stress at 28, 33 or 38 °C (28 or 33 °C for *D. hansenii* and 33 or 38 °C for *M. caribbica* and *M. guilliermondii*) for 30 min. The viability percentage was determined and *in vitro* inhibition of stressed yeasts was evaluated. The microencapsulation was performed in a spray dryer. Finally, the percentage of incidence and severity of anthracnose in avocado fruits was determined.

Eight fungal strains were obtained and identified as *C. gloeosporioides* (6), *Colletotrichum* sp. (1) and *Fusarium* sp. (1). *C. gloeosporioides* PA14 was considered the most pathogenic strain. In the *in vitro* inhibition tests, *D. hansenii* showed the lowest inhibition with 36.44%, followed by *M. guilliermondii* and *M. caribbica* with inhibition, at day 8, of 42.94% and 49.27 respectively. After exposure to stress, maximum viability was achieved by culturing *D. hansenii* in 1.0 M medium at 28 °C, *M. caribbica* in 1.5 M NaCl at 38 °C and the lowest viability with *M. guilliermondii* at 1.0 M and 38 °C. The antagonistic activity of *D. hansenii*, *M. caribbica* and *M. guilliermondii* was improved, to values of 64.64%, 75.12% and 56.12%, respectively. After microencapsulation, the viability of stressed *M. caribbica* was 89%. Microencapsulated stressed *M. caribbica* showed 100% incidence and was able to reduce the severity of anthracnose in avocado fruits by 45.45%.

Water and thermal stress allowed yeasts to increase their viability in adverse conditions of low aw and high temperature, at the same time it provided a method to enhance their antagonistic activity. The ability of *M. caribbica* to tolerate stress represents an important attribute with respect to its use as a biocontrol agent for pre-harvest applications

Key words: Biological control, *C. gloeosporioides*, stress, yeast, microencapsulation.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRAC.....	v
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1. Producción y pérdidas del fruto de aguacate	3
2.2. Principales enfermedades del fruto de aguacate	4
2.2.1. Antracnosis	5
2.3. Métodos para el control de hongos fitopatógenos.....	5
2.4. Control biológico y características de los agentes de biocontrol	6
2.4.1. Levaduras como agentes de biocontrol.....	7
2.4.1.1. Características de la levadura <i>Debaryomyces hansenii</i>	8
2.4.1.2. Características de la levadura <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	8
2.4.1.3. Características de la levadura <i>Meyerozyma caribbica</i>	9
2.5. Respuesta al estrés hídrico y térmico en levaduras	10

2.6. Encapsulación de agentes de biocontrol	13
2.6.1. Microencapsulación de levaduras mediante secado por aspersión	14
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	16
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Material biológico.....	19
5.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos	19
5.3. Identificación de hongos fitopatógenos	20
5.4. Pruebas de patogenicidad de las cepas aisladas.....	21
5.5. Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> con las levaduras <i>D. hansenii</i> , <i>M. caribbica</i> y <i>M. guilliermondii</i> frente al hongo fitopatógeno aislado.....	23
5.6. Pruebas de estrés hídrico y térmico	24
5.6.1. Preparación del material biológico.....	24
5.6.2. Ensayo de estrés hídrico y térmico para las levaduras <i>D. hansenii</i> , <i>M. caribbica</i> y <i>M. guilliermondii</i>	24
5.6.3. Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> de la levadura no estresada y sometida a estrés hídrico y térmico.....	26
5.7. Microencapsulación de la levadura mediante secado por aspersión	26
5.7.1. Ensayo de viabilidad después del secado por aspersión	27
5.8. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i>	28
5.9. Prueba de antagonismo <i>in vivo</i>	29

5.10. Análisis estadístico de datos	30
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1. Aislamiento e identificación del hongo fitopatógeno.....	31
6.1.1. Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas.....	31
6.2. Prueba de patogenicidad de las cepas aisladas	37
6.3. Prueba de inhibición <i>in vitro</i>	41
6.4.1. Ensayo de viabilidad de la levadura sometida a estrés hídrico y térmico	45
6.4.2. Prueba de inhibición <i>in vitro</i> de las levaduras sometidas a estrés hídrico y térmico	54
6.5. Microencapsulación de <i>Meyerozyma caribbica</i>	60
6.6. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagonista de levadura estresada y microencapsulada.....	64
6.7. Eficacia de biocontrol de <i>M. caribbica</i> estresada y microencapsulada	66
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	74
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA	77

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1. Principales enfermedades del fruto de aguacate.	4
Cuadro 2.2. Principales antagonistas sobre patógenos de aguacate.	7
Cuadro 2.3. <i>M. caribbica</i> en el biocontrol de patógenos.	10
Cuadro 5.1. Diseño experimental prueba de estrés hídrico y térmico.	25
Cuadro 5.2. Condiciones de secado.....	27
Cuadro 5.3. Diseño experimental para la prueba de antagonismo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	29
Cuadro 6.1. Características macroscópicas de las cepas aisladas de frutos de aguacate.....	32
Cuadro 6.2. Identificación molecular de las cepas aisladas de aguacate cv. “Hass”.	35
Cuadro 6.3. Diámetro de crecimiento de las cepas inoculadas en frutos sanos de aguacate cv. “Hass”.	39
Cuadro 6.4. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de la cepa <i>C. gloeosporioides</i> Pa14.	41
Cuadro 6.5. Porcentaje de viabilidad de <i>M. caribbica</i> después del secado por aspersión.....	60
Cuadro 6.6. Evaluación <i>in vitro</i> de <i>M. caribbica</i> estresada y microencapsulada frente <i>C. gloeosporioides</i> Pa14.	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 6.1. Daño causado en el mesocarpio de frutos de aguacate inoculados con micelio.	37
Figura 6.2. Daño causado en el exocarpio de los frutos de aguacate.	38
Figura 6.3. Porcentaje de viabilidad de <i>Debaryomyces hansenii</i> sometida a estrés hídrico y térmico.	47
Figura 6.4. Porcentaje de viabilidad de <i>Meyerozyma caribbica</i> sometida a estrés hídrico y térmico.	50
Figura 6.5. Porcentaje de viabilidad de <i>Meyerozyma guilliermondii</i> sometida a estrés hídrico y térmico.	51
Figura 6.6. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> con <i>Debaryomyces hansenii</i> sometida a estrés hídrico y térmico.	56
Figura 6.7. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> con <i>Meyerozyma caribbica</i> sometida a estrés hídrico y térmico.	56
Figura 6.8. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> con <i>Meyerozyma guilliermondii</i> sometida a estrés hídrico y térmico.	57
Figura 6.9. Tratamientos contra la infección causada por <i>C. gloeosporioides</i> en aguacate cv. Hass.	66
Figura 6.10. Incidencia de <i>C. gloeosporioides</i> Pa14 en frutos de aguacate almacenados a 27 ± 1 °C.	67
Figura 6.11. Severidad de <i>C. gloeosporioides</i> Pa14 en frutos de aguacate almacenados a 27 ± 1 °C.	68

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el aguacate es uno de los frutos que se produce a gran escala, según datos de la SAGARPA, en el 2017, México ocupó el primer lugar de la producción a nivel mundial con 1,997,629 toneladas, siendo Nayarit el cuarto lugar a nivel nacional. Sin embargo, la vida pre y poscosecha de los aguacates se ve afectada por hongos fitopatógenos, representando una limitante importante para el almacenamiento, transporte y exportación.

En el fruto de aguacate, la enfermedad de mayor importancia económica es la antracnosis, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de costras o manchas oscuras en hojas, brotes, inflorescencias y frutos. Para el manejo de enfermedades generalmente se utilizan fungicidas convencionales como sulfato de cobre y tiabendazol, sin embargo, el uso de éstos conlleva efectos nocivos en la salud humana, en los alimentos, medio ambiente y, su aplicación indiscriminada contribuye al desarrollo de cepas resistentes a este tipo de compuestos. Por tal motivo, se han diseñado métodos alternativos para el control de enfermedades fúngicas, tal es el caso de microorganismos antagonistas conocidos como agentes de control biológico, cuya aplicación se realiza tanto en pre como en poscosecha.

En estudios previos se ha demostrado que la levadura *Meyerozyma caribbica* es efectiva para el control de enfermedades poscosecha en frutos de papaya y mango.

Con la aplicación de un antagonista microbiano en precosecha, se busca precolonizar la superficie del fruto antes de la colonización por un patógeno, sin embargo, la aplicación directa del agente de control biológico presenta una disminución en su efectividad y alteración de su crecimiento, lo cual es ocasionado por factores ambientales como la humedad relativa, temperatura, incidencia de la luz UV, etc., por lo que, mejorar la tolerancia a las condiciones ambientales frecuentemente adversas mediante la adaptación previa a una condición de estrés, representa una estrategia para mejorar la eficacia del organismo antagonista. Además, para prolongar la vida útil y preservar la viabilidad de la levadura, es necesario contar con una bioformulación en polvo. Por lo anterior, surge como una alternativa, la encapsulación de agentes de biocontrol. Entre las operaciones unitarias más utilizadas para la encapsulación se encuentra el secado por aspersión, el cual, es uno de los métodos más aceptados. Este método tiene como ventajas la uniformidad en la forma y el tamaño de las partículas, ayuda a prolongar la vida útil, preserva la viabilidad del antagonista, coadyuva a superar las dificultades involucradas en la manipulación y el mantenimiento de cultivos de materia líquida y facilita el transporte del agente antagónico.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad antagonista de la levadura *Meyerozyma caribbica* microencapsulada mediante secado por aspersión y sujeta a estrés hídrico y térmico, frente a hongos fitopatógenos de frutos de aguacate.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Producción y pérdidas del fruto de aguacate

El cultivo de aguacate es una fuente económica muy importante para México, su consumo es creciente debido a su incorporación en la dieta y genera fuentes de empleo directos e indirectos en su cadena productiva (Rodríguez y cols., 2009). Según datos de SAGARPA, en el 2017, México ocupó el primer lugar en la producción de aguacate a nivel mundial con 1,997,629 toneladas (SAGARPA, 2018). A nivel nacional, Michoacán aporta el 89.5% de aguacate, consolidándose como el líder productor en la República Mexicana; los estados que lo siguen en mayor producción son Estado de México, Jalisco, Nayarit y Morelos que, en conjunto, generan el 95% de la producción nacional (SIAP, 2019).

La vida pre y poscosecha de los aguacates se ve afectada por hongos patógenos que limitan de manera importante su almacenamiento, transporte y exportación. Las pérdidas poscosecha pueden causar pérdidas hasta del 20% en campo y en el empaque durante la clasificación y selección (Rodríguez y cols., 2009), sin embargo, no se tiene un dato preciso sobre las pérdidas a lo largo de la cadena hortícola, ya que las evaluaciones no siempre se realizan o se informan a detalle para toda la cadena (Kitinoja y Kader, 2015).

2.2. Principales enfermedades del fruto de aguacate

Los patógenos fúngicos se consideran la principal causa de pérdidas de frutas y hortalizas frescas a los niveles precosecha y poscosecha (Spadaro y Droby., 2016). La enfermedad de mayor importancia económica para el fruto de aguacate es la antracnosis provocada por *Colletotrichum gloeosporioides*. En el campo, los frutos presentan la enfermedad denominada antracnosis (Bill y cols., 2014). Estudios previos han identificado a diversos agentes causales de enfermedades del aguacate (Cuadro 2.1) y a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* y *Colletotrichum godetiae* como causantes de antracnosis (Campos y cols., 2016).

Cuadro 2.1. Principales enfermedades del fruto de aguacate.

Enfermedad	Agente causal
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Pudrición del pedúnculo	<i>Botryodiplodia theobromae</i>
Podredumbre de <i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Roña o sarna	<i>Sphaceloma perseae</i>
Pudrición de <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> sp.
Mancha negra o cercospora	<i>Pseudocercospora purpurea</i>
Pudrición blanda bacteriana	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>
Hongo azul	<i>Penicillium expansum</i>

(Bill y cols., 2014).

2.2.1. Antracnosis

La antracnosis afecta las hojas, brotes, inflorescencias y frutos. En el primer caso se manifiesta como manchas circulares color café rojizo que se ubican en los bordes o en la lámina foliar. Los síntomas de los frutos en el árbol aparecen como costras o puntos y después de la recolección, durante la maduración como manchas redondeadas oscuras, de color negro, hundidas y con márgenes elevados en el epicarpio. Estas lesiones se extienden rápidamente en el epicarpio y en la pulpa de la fruta, lo que lleva a la muerte y la putrefacción de los tejidos vegetales infectados. Las lesiones pueden desarrollar masas de esporas pegajosas de color salmón, típicas de enfermedades de antracnosis (Kimaru y cols., 2018). La antracnosis ocasionada principalmente por *C. gloeosporioides* se favorece durante temporadas lluviosas y humedad relativa mayor a 80% (Rodríguez y cols., 2009).

2.3. Métodos para el control de hongos fitopatógenos

El uso de pesticidas en precosecha es común en el control de hongos, sin embargo, tanto consumidores como autoridades han tomado conciencia de los efectos nocivos de los residuos en alimentos y en el ambiente. Asociado a esto, en las últimas décadas los pesticidas han perdido eficacia debido a la resistencia que algunos microorganismos han desarrollado hacia este tipo de compuestos. El manejo poscosecha ahora se inclina por tratamientos alternativos o complementarios (óxido nitroso, tratamientos térmicos, agua electrolizada oxidante, etc.) que permiten disminuir las dosis de fungicidas o incluso evitar el uso de productos químicos. Por estas razones, diversos métodos alternativos para el manejo de las enfermedades fúngicas han sido intensamente explorados en los

últimos años, como, por ejemplo, tratamientos hidrotérmicos, tratamiento por aire forzado, irradiación UV y gamma, tratamiento por microondas y agentes de biocontrol. Los microorganismos (generalmente microorganismos aislados de la superficie de los frutos) ejercen un efecto inhibitorio contra un patógeno determinado y, por lo tanto, disminuyen su agresividad contra la fruta. Estos son ampliamente conocidos como agentes de control biológico y son candidatos para su aplicación en pre y poscosecha (Morales y cols., 2008).

2.4. Control biológico y características de los agentes de biocontrol

El control biológico es el uso de organismos vivos (bacterias, levaduras y/u hongos) con la finalidad de controlar un organismo patógeno (Charlet, 2002); este método se ha utilizado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales. La superficie del fruto es el mejor lugar para el aislamiento de microorganismos antagonistas, los cuales pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad en el fruto. Para seleccionar microorganismos que puedan ser potenciales antagonistas, se deben considerar en principio varios criterios, como su capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos, persistir en ellas de manera efectiva, tener mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes y capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales. Por otra parte, se deben considerar otras características específicas del microorganismo antagonista, siendo las más importantes; su efectividad a bajas concentraciones, que tenga mínimos requerimientos nutricionales, que sea de fácil aplicación, sin producción de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistente a los fungicidas, compatible con los procedimientos comerciales y no patogénico sobre el hospedero (Hernández y cols., 2007).

2.4.1. Levaduras como agentes de biocontrol

El uso de levaduras antagónicas ha sido de especial interés por su habilidad de reducir el crecimiento microbiano (Liu y cols., 2013). Levaduras como *Candida oleophila*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus laurentii*, *Kloeckera apiculata* y *Pichia anomala* entre otras, que presentan diversos modos de acción en su actividad biocontroladora, han sido estudiadas (Palou y cols., 2008). Es importante que estas levaduras empleadas como agentes de biocontrol sean tolerantes al estrés abiótico como temperaturas extremas, falta de nutrientes, estrés oxidativo, pH adverso y baja humedad, etc. Existen reportes de levaduras antagonistas que tienen la capacidad de ejercer control biológico sobre diferentes patógenos del fruto de aguacate (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Principales antagonistas sobre patógenos de aguacate.

Microorganismo antagonista	Enfermedad (patógeno)	Referencia
<i>Pichia anomala</i> y <i>Candida intermedia</i>	Antracnosis (<i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. acutatum</i>)	Campos, 2014.
<i>Bacillus subtilis</i>	Pudrición del pedúnculo (<i>Botryodiplodia theobromae</i>)	Demoz y Korsten, 2006.
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> y <i>C. intermedia</i>	Antracnosis (<i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. acutatum</i>)	Campos y cols., 2016.

2.4.1.1. Características de la levadura *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii se ha definido como una levadura halófila o halotolerante que puede crecer en niveles de salinidad de hasta 24% (4 M) de NaCl. Se encuentra en ambientes con poca actividad de agua (aguas hipersalinas) como el agua de mar, de la que inicialmente se aisló. También se ha reportado que se encuentra en el queso, carne, vino, cerveza, fruta, suelo y productos con alto contenido de azúcar (Breuer y Harms, 2006). Su capacidad de control biológico se ha reportado en patógenos como *Penicillium citrinum* en limón persa (González-Estrada y cols., 2013), *Monilinia fructigena* y *Monilinia fruticola* en ciruela (Grzegorzczuk y cols., 2017) y *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (Hernández y cols., 2018), entre otros. Los mecanismos de acción reportados para *Debaryomyces hansenii* están relacionados con la competencia por espacio y nutrientes (Medina y cols., 2016; Hernández y cols., 2018), parasitismo y formación de biopelículas (González-Estrada y cols., 2017), producción de enzimas líticas de la pared celular y la producción y acumulación de compuestos volátiles (Hernández y cols., 2018).

2.4.1.2. Características de la levadura *Meyerozyma guilliermondii*

Meyerozyma guilliermondii es una especie de levadura cuya forma asexual o anamórfica se conoce como *Candida guilliermondii*. Es un ascomiceto distribuido ampliamente de manera natural, encontrándose en la superficie de muchos frutos. También su presencia se ha reportado en la piel normal, en el agua de mar, suero de leche, cuero, pescado y cerveza. Forma colonias blancas, cremosas y lisas (MycoBank, 2019). Su efectividad de biocontrol ha sido evaluada contra diversos hongos fitopatógenos, presentando diferentes mecanismos de acción, entre los

que destacan la competencia por espacio y nutrientes, parasitismo, inducción de producción de fitoalexinas y producción de enzimas hidrolíticas (Chanchaichaovivat y cols., 2008).

2.4.1.3. Características de la levadura *Meyerozyma caribbica*

Meyerozyma caribbica (anamorfo *Candida fermentati*), pertenece a la familia *Debaryomycetaceae* y su temperatura óptima de crecimiento es de 28 °C. Se ha aislado de una variedad de sustratos que incluyen suelo, almidón derivado del maíz, caña de azúcar, entre otros (MycoBank, 2019). *Meyerozyma caribbica* se ha reportado como un eficaz agente de control biológico. Ha demostrado su efectividad contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango (*Mangifera indica* L.) cv. 'Ataulfo', inhibiendo el 86.7% de la enfermedad de antracnosis en etapa de poscosecha (Bautista-Rosales y cols., 2013). Por otro lado, se evaluó la patogenicidad de la levadura mediante estudios de toxicidad oral aguda en ratas adultas, estudios de letalidad en embriones de pollo e irritación dérmica en conejos, la cual no mostró indicios de ser nociva por lo que su uso en el control de enfermedades poscosecha en frutas es posible (Ocampo-Suárez y cols., 2017).

En estudios previos se ha evaluado la capacidad antagónica de *M. caribbica* en el control de patógenos fúngicos de algunos frutos (Cuadro 2.3). Los mecanismos de acción reportados para esta levadura están relacionados con la competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas líticas de la pared celular, parasitismo y formación de biopelículas (Bautista-Rosales y cols., 2013).

Cuadro 2.3. *M. caribbica* en el biocontrol de patógenos.

Microorganismo antagonista	Patógeno	Fruto	Referencia
<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Mango cv. 'Ataulfo'	Aguirre-Güitrón y cols., 2018.
	<i>C. gloeosporioides</i>	Papaya var 'Maradol'	Barrón-Hernández, 2018.
	<i>C. gloeosporioides</i>	Mango cv. 'Ataulfo'	Bautista-Rosales y cols., 2013.

No obstante, aunque las levaduras antagonistas presenten diferentes mecanismos de acción, para tener una competencia exitosa contra patógenos deben adaptarse mejor y tener capacidad de sobrevivencia. Debido a que todos los microorganismos vivos crecen y se desarrollan de manera óptima bajo ciertas condiciones ambientales, alejándose muchas veces de las condiciones óptimas para su crecimiento y reproducción, es importante que las levaduras sean tolerantes al estrés abiótico causado por temperaturas extremas, falta de nutrientes, pH adverso y baja humedad (Folch y cols., 2004).

2.5. Respuesta al estrés hídrico y térmico en levaduras

Un antagonista aplicado en el campo presenta una serie de dificultades, ya que tienen que soportar la exposición a condiciones ambientales variables y con frecuencia hostiles durante largos períodos de tiempo (Gotor y cols., 2017).

El estrés hídrico sucede cuando la demanda de agua es más alta que la cantidad de agua que se encuentra disponible durante un periodo de tiempo determinado (Barkai, 2001). Se ha demostrado que la modificación del potencial hídrico en el medio de cultivo puede dar como resultado células con una mejor tolerancia a la desecación (Gotor y cols., 2017). Algunas de las estrategias de adaptación, que

permiten que ciertos microorganismos soporten estrés osmótico debido a la presencia de una alta concentración de sal son: (1) estrategia salt-in: las células mantienen altas concentraciones intracelulares de sal, o al menos equivalente a la concentración externa de sal, por lo que los sistemas intracelulares deben adaptarse a la presencia de altas concentraciones de ésta. Evita que el agua se mueva dentro y fuera de la célula, lo que regula la ósmosis y mantiene la estructura y la función de la célula a su vez, y (2) estrategia de soluto compatible: las células mantienen concentraciones más bajas de sales en su citoplasma. La presión osmótica del medio se equilibra con solutos compatibles y no se requiere una adaptación especial de los sistemas intracelulares (González y cols., 2005; Siglioccolo y cols., 2011).

Debido al continuo cambio de las condiciones externas, los microorganismos deben disponer de herramientas que les permitan adaptarse a ellas garantizando así su supervivencia. Este proceso viene mediado por cascadas de señalización las cuales engloban todos aquellos mecanismos por los que la célula es capaz de recibir un estímulo externo, transmitir y amplificar esta señal para poder elaborar una respuesta específica frente al estímulo recibido; dicha respuesta, conduce a modificaciones en su patrón de expresión génica o en su actividad celular.

Un tipo de estas cascadas de señales lo constituyen las mediadas por quinasas de tipo MAP (*Mitogen Activated Protein*) (Cowan y Storey, 2003). Estas señales están implicadas en procesos importantes como la modificación de la expresión génica, la proliferación celular, la mitosis, el metabolismo, la muerte celular programada (apoptosis) o la respuesta frente a distintos tipos de estrés (Cargnello y Roux, 2011).

Las rutas de MAP presentan un módulo central formado por MAP quinasas, las cuales, mediante fosforilaciones secuenciales transmiten la señal recibida. Intervienen tres tipos de MAP quinasas: una MAP quinasa (MAPK o ERK) que es activada mediante fosforilación por la proteína quinasa MAPKK o MEK, activada a su vez a través de fosforilación por otra proteína quinasa denominada MAPKKK o MEKK (Folch y cols., 2014). Tras la fosforilación, la MAPK puede ser translocada al núcleo, donde fosforila un factor de transcripción. Debido a ello, la expresión de gen/es diana se activa o reprime permitiendo una respuesta adaptativa (Musa y cols., 2018).

Por otra parte, la temperatura es uno de los factores más importantes que afectan la eficiencia del biocontrol. Las condiciones de alta temperatura bajo el campo pueden disminuir significativamente la viabilidad de los agentes de control biológico cuando se usan antes de la cosecha (Bang y cols., 2012). Por lo tanto, si las condiciones ambientales apropiadas no están consistentemente disponibles, las poblaciones de agentes de biocontrol pueden no reducir la incidencia y severidad de la enfermedad (Gotor y cols., 2017). Se ha observado que la inducción de la tolerancia a un determinado tipo de estrés, conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos sean letales en ausencia de una inducción previa. Así, por ejemplo, cuando un cultivo de levaduras se somete a un tratamiento moderado de calor (37°C por 30 min), estas células son capaces de resistir un choque superior a su temperatura óptima que de otro modo sería letal (Folch y cols., 2004).

La respuesta a estrés por calor en levaduras es de las mejor estudiadas. Un incremento de 10 a 15°C por arriba de su temperatura óptima de crecimiento induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (de las siglas en inglés Heat Shock Proteins) (Folch y cols., 2004). Estas constituyen una familia que se

encuentra en forma constitutiva en todas las células procariotas y eucariotas. Cumplen diversas funciones fisiológicas: colaboran en la adquisición de la estructura terciaria de las proteínas en formación, interviniendo en su ensamble y translocación, así como en la degradación o reparación de proteínas anormales, actuando como chaperonas moleculares. Las células poseen mecanismos de señales muy sensibles. A través de la vía de activación de proteínas kinasas, se activa el factor de transcripción (HSF1), que incrementa la transcripción de los genes que codifican estas proteínas con función protectora (Coronato y cols, 1999).

Sin embargo, aunque someter a las células a un estrés leve puede hacerlas resistentes a un desafío letal al mismo estrés, es importante protegerlas de las condiciones ambientales adversas, en este aspecto, la encapsulación de agentes de biocontrol surge como una alternativa debido a que las levaduras permanecen dentro de las cápsulas, mantienen su viabilidad y actividad hasta el momento de su liberación y se protegen de las condiciones ambientales adversas (Kim y cols., 2012).

2.6. Encapsulación de agentes de biocontrol

La microencapsulación implica recubrir o atrapar un material de interés con un material polimérico para generar microcápsulas en el intervalo de tamaño de 1-1000 μm (Rathore y cols., 2013). La protección de antagonistas en cápsulas selladas puede liberar su contenido a velocidades controladas en condiciones específicas (Desay y Park, 2005). Se han desarrollado una serie de tecnologías de encapsulación para aplicaciones en las industria farmacéutica, química, alimentaria, agrícola, biotecnológica y médica. Algunos factores que influyen en la

liberación de los agentes de biocontrol encapsulados son el tamaño y la porosidad de las cápsulas. (Klokk y Melvik, 2002; Kim y cols., 2012).

La supervivencia de los microorganismos en la etapa de secado depende de varios factores como la humedad residual, temperatura, características de la membrana celular y la morfología celular. La eliminación de agua intracelular durante el secado sin dañar la membrana celular del microorganismo es una tarea importante y delicada. Los agentes encapsulantes como el alginato, trehalosa, gelatina, los polímeros sintéticos y las proteínas ayudan a retener la integridad de la membrana celular durante el secado (Lakshmi y cols, 2015). Una vez secados en condiciones adecuadas, los microorganismos pueden permanecer viables durante un tiempo prolongado de hasta 6 meses siempre que se envasen y almacenen en las condiciones adecuadas (Aguirre-Güitrón y cols., 2018). Por lo tanto, la preparación de un cultivo microbiano viable que sea lo suficientemente estable y económico para ser utilizado en aplicaciones ambientales y alimentarias sigue siendo un desafío (Behboudi y cols., 2013).

2.6.1. Microencapsulación de levaduras mediante secado por aspersión

El secado por aspersión es una tecnología que permite la obtención de un producto en polvo a partir de un material líquido concentrado, lo que ayuda a obtener un producto más estable y manejable (Lakshmi y cols., 2015). Es uno de los métodos de encapsulación más aceptados con ventajas tales como: uniformidad en la forma y el tamaño de las partículas obtenidas, ayuda a prolongar la vida útil, preservar la viabilidad de la levadura, superar las dificultades involucradas en la manipulación y el mantenimiento de cultivos de materia líquida y facilidad de transporte (Chandrakha y cols., 2016).

En la microencapsulación mediante secado por aspersión, la biomasa se homogeneiza con el material de soporte (incluidos carbohidratos, proteínas, gomas, lípidos o mezclas de los mismos) en diferentes proporciones. La composición del material de recubrimiento es el principal determinante de las propiedades funcionales de la microcápsula. La mezcla se alimenta a un secador por aspersión y se atomiza con una boquilla, el agua se evapora al contacto con el aire caliente a contracorriente y las microcápsulas se depositan en el colector del secador (Desay y Park, 2005; Bustos y Bórquez, 2013).

Diversos factores afectan la viabilidad de las células encapsuladas mediante secado por aspersión, entre ellos se pueden destacar la fase de crecimiento, condiciones de cultivo, adaptación del microorganismo al calor o condiciones de estrés osmótico, daño por calor (temperatura de salida), tiempo y resistencia térmica de las células microbianas, así como tipo y concentración de materiales de pared (Rathore y cols., 2013; Behboudi y cols., 2013).

A menudo se elige como material de pared a aquellos que aseguran una buena capacidad de encapsulación e imparten características funcionales al polvo (porosidad, capacidad de flujo libre, antiaglomerante y buenas propiedades de humectación y dispersión), además de otros que exhiben características termo protectoras tales como disacáridos (lactosa, sacarosa o trehalosa), dextrosa o polioles (manitol, sorbitol), o aquellos que actúan como estimulantes de crecimiento probiótico (fructo y galacto-oligosacáridos) (Behboudi y cols, 2013).

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de aguacate es una fuente de ingresos muy importante que contribuye con la economía de productores nayaritas y del país. México se posicionó en el primer lugar en la producción mundial de aguacate y Nayarit está clasificado como el cuarto estado productor a nivel nacional. Sin embargo, la vida precosecha de estos frutos se ve afectada por hongos fitopatógenos que ocasionan una disminución en la producción. En la actualidad, para su control se emplean productos químicos tales como fungicidas, que tienen efectos nocivos en la salud humana, en los aguacates y el medio ambiente. Por estas razones, se han explorado diversos métodos alternativos para el manejo de enfermedades fúngicas, tal es el caso del control biológico, el cual se ha empleado principalmente en poscosecha. En relación con esto, estudios previos han demostrado que la levadura *Meyerozyma caribbica* es una antagonista exitosa en el control de enfermedades poscosecha en frutos de mango y papaya.

Actualmente no existen reportes sobre la aplicación de levaduras antagonistas en etapa de precosecha en frutos de aguacate, ya que, su aplicación directa puede presentar una disminución en su efectividad ocasionada por factores ambientales tales como baja humedad relativa, altas temperatura, incidencia de la luz UV, etc., alterando el crecimiento y el establecimiento de la cepa. Por lo tanto, se pretende optimizar las condiciones de estrés para una posible aplicación en etapa de precosecha. Por ello, para mejorar la tolerancia al estrés ambiental el agente de

control biológico debe someterse a condiciones de estrés, como una estrategia para mejorar su resistencia a condiciones ambientales adversas. De tal manera las levaduras no sólo pueden proteger y mantener sus funciones básicas, sino también inducir procesos que en condiciones adversas la conviertan en un organismo biológicamente eficiente y efectivo. Sin perder de vista que para prolongar la vida útil de *M. caribbica*, es necesario contar con una bioformulación en polvo que ofrezca como ventajas su liberación controlada, vida útil más larga y protección contra la contaminación. En este sentido, la encapsulación por secado por aspersión surge como una alternativa, ya que se ha reportado que permite mantener la viabilidad y obtener alto rendimiento a bajos costos de operación.

Por lo que se propone microencapsular a *Meyerozyma caribbica* previamente estresada hídrica y térmicamente, para mejorar su efectividad ante condiciones de baja humedad y alta temperatura, al ser aplicada en frutos de aguacate para controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos. Así como, contar con una bioformulación que ayude a preservar la viabilidad de la levadura, alargar su vida útil y facilitar su transporte.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antagonista de la levadura *Meyerozyma caribbica* microencapsulada mediante secado por aspersión y sujeta a estrés hídrico y térmico, frente a hongos fitopatógenos de frutos de aguacate.

4.2. Objetivos específicos

1. Aislar e identificar los hongos fitopatógenos que afectan los frutos de aguacate.
2. Evaluar la inhibición *in vitro* del hongo fitopatógeno aislado, empleando a la levadura *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica* y *Meyerozyma guilliermondii*.
3. Evaluar la inhibición *in vitro* de la levaduras no estresadas y sometidas a estrés hídrico y térmico, frente el hongo fitopatógeno aislado.
4. Obtener una bioformulación mediante la microencapsulación de *Meyerozyma caribbica* por secado por aspersión.
5. Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* e *in vivo* de *Meyerozyma caribbica* estresada y microencapsulada frente al hongo fitopatógeno aislado.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se utilizaron frutos de aguacate en estado de madurez fisiológica proporcionados por la empresa “Leb Trading Products S. de R.L. de C.V.” Las levaduras *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica* y *Meyerozyma guilliermondii* se encuentran resguardadas y conservadas en glicerol al 40% a -80 °C en el Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA) del Instituto Tecnológico de Tepic.

5.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos

Se emplearon frutos de aguacate con signos de enfermedad. Se lavaron con agua y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada estéril y se secaron en condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar. Éstos se incubaron en una cámara de aislamiento a una humedad relativa mayor a 90%. Una vez que los frutos presentaron enfermedad, se cortaron trozos de tejido de 2 a 3 mm (50% de tejido sano y 50% de tejido enfermo) tomando parte del epicarpio y mesocarpio. Las muestras obtenidas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 3 minutos y después se lavaron con agua destilada estéril. La

desinfección se realizó con el fin de eliminar la flora saprófita, insectos y bacterias, entre otros microorganismos presentes (Ragazzo-Sánchez y cols., 2011).

Posteriormente, se colocó 1 trozo de tejido en el centro de placas con agar papa dextrosa (Difco), las cuales se incubaron a 28 °C durante 3 a 8 días. Una vez que se observó el crecimiento de microorganismos se procedió a realizar una purificación de las cepas mediante resiembras sucesivas en el mismo medio, para la obtención de cultivos puros. Las cepas purificadas se almacenaron a -80 °C en glicerol al 40% (Ragazzo-Sánchez y cols., 2011; Rojas y Ávila, 2011; Trinidad-Ángel y cols., 2017).

5.3. Identificación de hongos fitopatógenos

La identificación de los hongos fitopatógenos aislados se realizó utilizando métodos morfológicos tradicionales: macroscópico (tipo de morfología, color y diámetro de las colonias presentes, tipo de crecimiento y tipo de micelio) y microscópico (tipo de micelio y morfología de la espora mediante un microscopio óptico) (Trinidad-Ángel y cols., 2017; González-Estrada y cols., 2017; Ragazzo-Sánchez y cols., 2011). La identificación microscópica, se realizó mediante la técnica de microcultivos. Para esto se colocó una varilla de vidrio en una caja de Petri y sobre esta un portaobjetos. Posteriormente se fragmentó con ayuda de un bisturí estéril el medio de cultivo en cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 cm, se colocó un cubo del medio en el centro del portaobjetos. Con ayuda de un asa bacteriológica se tomó el inóculo del hongo a cultivar y se colocó en los 4 bordes del cuadro de agar. Para finalizar se colocó un cubreobjetos sobre el medio de cultivo y se incubaron a 28 °C durante 8 días (Bonifaz, 2012).

5.4. Pruebas de patogenicidad de las cepas aisladas

Se preparó una suspensión de esporas a partir de cultivos puros de 8 días de crecimiento. Para ello, se añadieron 10 ml de agua destilada estéril en las placas que contenían a cada uno de los cultivos, se raspó con una varilla de vidrio y con la ayuda de un embudo y gasa estéril se filtró. El conteo de esporas/ml se realizó en una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico y se estimó el número total de células aplicando la ecuación 1 (González-Estrada y cols., 2017; Trinidad-Ángel y cols., 2017; Ragazzo-Sánchez y cols., 2011; Berecochea-López y cols., 2015).

$$\frac{\text{No.de esporas}}{\text{ml}} = \frac{\text{Total de esporas} \cdot 250,000}{\text{No. de cuadros}} \quad \text{Ec. (1)}$$

Posteriormente, la suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^5 esporas/ml, utilizando la ecuación 2.

$$V_2 = \frac{V_1 \cdot C_1}{C_2} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

V_1 = Volumen final de la solución a preparar (ml).

C_1 = Concentración de la solución requerida (esporas o células·ml⁻¹).

V_2 = Volumen de la solución concentrada (ml)

C_2 = Concentración de la solución madre (esporas o células·ml⁻¹)

Los frutos sanos de aguacate en estado de madurez fisiológica se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar en campana de flujo laminar.

Se emplearon 10 frutos por cepa de hongo aislado, a los primeros 5 frutos, se les realizaron 2 heridas con un punzón de 0.3 cm de profundidad. A cada herida se le inoculó 25 μ l de la suspensión de esporas de hongo (1×10^5 esporas/ml) con la ayuda de una micropipeta. El control se inoculó con 25 μ l de agua destilada estéril (Benbow y Sugar, 1999; Hernández y cols., 2010; Ragazzo-Sánchez y cols., 2011; Trinidad-Ángel y cols., 2017).

Además, para evaluar la severidad de los síntomas asociados con cada hongo patógeno, se tomaron 5 frutos y se realizaron 2 heridas circulares (6 mm) en la parte media e inferior del fruto. Los tapones miceliales de 6 mm fueron tomados del margen de colonias en crecimiento activo en PDA y se colocaron en cada herida y en la zona del pedúnculo. El pedúnculo se retiró al momento de colocar el tapón micelial. El control se inoculó con PDA estéril sin hongo (Guarnaccia y cols., 2016).

A fin de favorecer el crecimiento de los hongos, los frutos de aguacate inoculados se colocaron en una cámara de aislamiento a una humedad relativa mayor al 90% y temperatura ambiente (28 °C aprox.). Se realizaron revisiones durante 10 días para detectar la aparición de síntomas de la enfermedad, mismos que se compararon con los primeros síntomas en el aislamiento de hongos fitopatógenos (Ragazzo-Sánchez y cols., 2011; Guarnaccia y cols., 2016 Trinidad-Ángel y cols., 2017).

Una vez que los frutos presentaron síntomas de enfermedad, se procedió a realizar nuevamente la técnica de aislamiento de hongos fitopatógenos a partir de los frutos inoculados artificialmente y se realizó una comparación de la morfología macro y microscópica del hongo en el aislamiento original (Trinidad-Ángel y cols., 2017).

Después de 10 días de incubación, los frutos se cortaron longitudinalmente para su evaluación. Los frutos con tapón micelial se evaluaron de acuerdo a la gravedad de los síntomas utilizando una escala de categoría de 0 a 4, donde 0 = sin podredumbre visible; 1= 1 a 25%; 2= 25 a 50%; 3= 50 a 75%; y 4= >75% de la superficie del fruto con podredumbre (Guarnaccia y cols., 2016).

5.5. Pruebas de inhibición *in vitro* con las levaduras *D. hansenii*, *M. caribbica* y *M. guilliermondii* frente al hongo fitopatógeno aislado

Como estudio preliminar para seleccionar a la levadura con mayor actividad antagónica, se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* y se probaron 3 levaduras, *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica* y *Meyerozyma guilliermondii* frente al hongo fitopatógeno aislado. De cada una de ellas se realizó una suspensión a una concentración de 1×10^8 células/ml y se tomaron 0.5 ml. La suspensión de levaduras se extendió en la superficie de una placa con agar PDA con ayuda de un hisopo estéril y se dejó reposar por 1 hora. Posteriormente se realizó un orificio de 3 mm de diámetro en el centro de la placa y se colocó un tapón micelial del hongo aislado. Para el control se inoculó el patógeno fúngico y levadura en placas separadas para verificar el crecimiento. Las placas se incubaron a 25 °C por 8 días (Patiño y cols., 2005; Hernández y cols., 2010; Medina y cols., 2016).

La inhibición radial (RI) se calculó de acuerdo a la ecuación 3.

$$RI (\%) = [(C - T) / C] \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

C= control, es el diámetro promedio de las colonias fúngicas en ausencia de la levadura.

T= tratamiento, es el diámetro promedio de las colonias fúngicas en las placas cultivadas en presencia de las levaduras.

Cada tratamiento incluyó tres placas y el experimento se repitió tres veces.

5.6. Pruebas de estrés hídrico y térmico

5.6.1. Preparación del material biológico

La levadura contenida en un vial a -80°C , se colocó en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente hasta descongelación. La levadura fue inoculada en tubos con caldo peptona dextrosa extracto de levadura (YPD, extracto de levadura, 10 g/l; peptona, 20 g/l; y dextrosa, 20 g/l), y se incubaron a 28°C en agitación por 72 h a fin de obtener células viables (Hernández y cols., 2010). La concentración fue determinada con una cámara de Neubauer y el número de células/ml como en la Ec.1. Para ajustar la suspensión a una concentración de 1×10^8 células/ml, se aplicó la Ec.2.

5.6.2. Ensayo de estrés hídrico y térmico para las levaduras *D. hansenii*, *M. caribbica* y *M. guilliermondii*

Para cada tratamiento se inoculó 1 ml del cultivo de la levadura a una concentración de 1×10^8 células/ml en 50 ml del medio YPD que contenía: NaCl (Jalmek) 0 (control), 0.5, 1, 1.5 M, seguido de incubación a 200 rpm por 48 h. En

seguida las células se recuperaron mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 1 min y posteriormente se sometieron a estrés térmico a 28, 33 y 38 °C por 30 min según correspondió (Cuadro 4) (temperaturas 5 y 10 °C superior a la temperatura óptima de crecimiento de cada levadura). Para cada uno de los tratamientos, se realizaron diluciones seriadas sobre placas YPD no estresadas y estresadas ($a_w=0.98$ y 0.96) y se incubaron a 28 °C. La viabilidad de las células se examinó después de 48 h (en medio no estresado) y 96 h (en medio estresado). El porcentaje de viabilidad se determinó de acuerdo a la ecuación 4 (Wang y cols., 2010).

$$\frac{\text{Recuentos de células viables en medio estresado}}{\text{Recuento de células viables en medio original}} \times 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

Para el ensayo de estrés y la prueba de inhibición *in vitro* de las levaduras estresadas y no estresadas (apartado 5.6.3.) se evaluaron 8 tratamientos, el diseño constó de 2 factores (temperatura y concentración de NaCl) con 2 niveles de factor para temperatura (28 y 33 °C) y 4 niveles para concentración de NaCl (0, 0.5, 1, 1.5 M) (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1. Diseño experimental prueba de estrés hídrico y térmico.

a) *D. hansenii*

Tratamiento	Temperatura (°C)	Concentración NaCl
1	28	0 M
2	28	0.5 M
3	28	1 M
4	28	1.5 M
5	33	0 M
6	33	0.5 M
7	33	1 M
8	33	1.5 M

b) *M. caribbica* y *M. guilliermondii*

Tratamiento	Temperatura (°C)	Concentración NaCl
1	33	0 M
2	33	0.5 M
3	33	1 M
4	33	1.5 M
5	38	0 M
6	38	0.5 M
7	38	1 M
8	38	1.5 M

Cada tratamiento incluyó tres placas y el experimento se repitió dos veces.

5.6.3. Pruebas de inhibición *in vitro* de la levadura no estresada y sometida a estrés hídrico y térmico

Para cada uno de los tratamientos de estrés (Cuadro 4), se procedió a realizar una suspensión a una concentración de 1×10^8 células/ml, de la cual se tomaron 0.5 ml y se extendieron con ayuda de un hisopo estéril en la superficie de una placa con agar PDA. La suspensión se dejó reposar durante 1 hora y posteriormente, se realizó un orificio de 6 mm en el centro de la placa, donde se colocó un tapón micelial del hongo aislado. Para el control se inoculó el patógeno fúngico y levadura estresada en placas separadas para verificar el crecimiento. Las placas se incubaron a 28 °C por 8 días (Patiño y cols., 2005; Hernández y cols., 2010; Medina y cols., 2016).

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la ecuación 3. Cada tratamiento incluyó tres placas y el experimento se repitió tres veces.

5.7. Microencapsulación de la levadura mediante secado por aspersión

De acuerdo con los ensayos anteriores, se eligió para el ensayo de encapsulación el tratamiento de estrés que mostró el mayor porcentaje de inhibición. A partir del cultivo de la levadura, las células se recuperaron por centrifugación (10,000 rpm/1 min; Hermle modelo Z326K), posteriormente se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril para eliminar los compuestos nutricionales del medio inicial. (Teixidó y cols., 2006; Wang y cols., 2010).

La preparación de la suspensión a secar se realizó bajo condiciones estériles, la biomasa se homogeneizó con el material de pared y agua destilada previamente

esterilizados a 121 °C durante 15 min. La concentración celular inicial se obtuvo mediante diluciones en serie sobre placas con PDA incubadas a 28 °C durante 24-48 h. La suspensión se alimentó a un secador por aspersión (mini spray dryer Büchi B-290) y la mezcla se atomizó por medio de una boquilla bajo condiciones de secado mostradas en el cuadro 5.2. La solución de alimentación se mantuvo bajo agitación constante a 25 °C y 150 rpm mientras se alimentó al secador. Al finalizar el proceso, las microcápsulas se recogieron del vaso colector del equipo y el polvo se almacenó en bolsas tri-laminadas dentro de un desecador (Aguirre-Güitrón y cols., 2018). Para evaluar la viabilidad de la levadura se realizaron siembras de la biomasa recuperada y al polvo obtenido después del secado por aspersión.

Cuadro 5.2. Condiciones de secado.

Factor	Condición 1	Condición 2
Temperatura de entrada	113 °C	112 °C
Flujo de alimentación	3 ml/min	3 ml/min
Concentración material de pared	Aislado proteico de soya SPI (3.8%) Alginato de sodio (0.06%)	Trehalosa 10%

5.7.1. Ensayo de viabilidad después del secado por aspersión

Se prepararon muestras de 0.5 g de polvo, las cuales se rehidrataron con 5 ml de tampón fosfato y se agitaron hasta obtener una suspensión homogénea. El número de células viables se determinó mediante dilución en serie sobre cajas de Petri con PDA (incubadas a 28 °C durante 24-48 horas). El porcentaje de viabilidad se calculó de acuerdo a la ecuación 5 (Reddy y cols., 2009; Aguirre-Güitrón y cols., 2018).

$$\% Viabilidad = \frac{N_r * 100}{N_f} \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde:

Nr = log CFU ml⁻¹ en la muestra rehidratada

Nf = log CFU ml⁻¹ en la solución de alimentación antes del secado.

5.8. Prueba de antagonismo *in vitro*

Para cada uno de los tratamientos (Cuadro 6) se realizó una suspensión de levaduras 1x10⁸ células/ml, de la cual se tomaron 0.5 ml y se extendieron en la superficie del agar con un hisopo estéril. Se dejó reposar durante 1 hora y posteriormente, se realizó un orificio de 7 mm de diámetro en el centro de la placa con PDA. A continuación, se colocó en el centro de la caja un tapón micelial del hongo aislado. Para el control sólo se inoculó el patógeno fúngico. Las placas se incubaron a 25 °C por 8 días. Cada tratamiento incluyó cuatro placas y el experimento se repitió dos veces (Patiño y cols., 2005; Hernández y cols., 2010; Medina y cols., 2016).

Al final se observó y midió el diámetro de crecimiento para determinar el porcentaje de inhibición o antagonismo. La inhibición radial (RI) se calculó de acuerdo a la ecuación 3 (Medina y cols., 2016).

Se evaluaron 4 tratamientos (Cuadro 5.3), el diseño constó de 2 factores (estrés y levadura microencapsulada) y 2 niveles (1=con, 0=sin).

Cuadro 5.3. Diseño experimental para la prueba de antagonismo *in vitro* e *in vivo*.

Tratamiento	Estrés hídrico y térmico	Microencapsulación
1	1	1
2	0	1
3	1	0
4	0	0

5.9. Prueba de antagonismo *in vivo*

Para medir el efecto antagónico *in vivo* de la levadura estresada y microencapsulada sobre el hongo fitopatógeno aislado, se utilizaron frutos sanos de aguacate en estado de madurez fisiológica, los cuales se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar en campana de flujo laminar (Hernández y cols., 2010). Se realizó una suspensión de levadura antagónica (1×10^8 células/ml) de la cual se atomizaron 2 ml por fruto de aguacate y se mantuvieron en reposo durante 1 hora. Después, se realizaron 2 heridas artificiales para provocar la enfermedad en los frutos sanos con un punzón a una profundidad de 3 mm y se colocaron en cada herida 25 μ l de suspensión 1×10^5 esporas/ml del hongo fitopatógeno. Como blanco se emplearon 20 μ l de agua destilada estéril. Cada tratamiento incluyó 10 aguacates y el experimento se repitió 2 veces (González-Estrada y cols., 2017).

Los frutos se almacenaron en cámaras de aislamiento con humedad relativa mayor al 90% a 26 ± 1 °C durante 10 días, al final del experimento se observó y midió el diámetro de la lesión producida por el patógeno en cada fruto para determinar el porcentaje de incidencia de acuerdo a la ecuación 6 y severidad (reportada en cm)

(Wang y cols., 2010; González-Estrada y cols., 2017; Grzegorzczuk y cols., 2017; Aguirre-Güitrón y cols., 2018).

$$\% \text{ Incidencia de la enfermedad} = \frac{\text{Número de frutos infectados}}{\text{Número total de frutos}} (100) \quad \text{Ec. (6)}$$

Cada tratamiento incluyó 10 aguacates y el experimento se repitió dos veces.

5.10. Análisis estadístico de datos

Los resultados obtenidos de la prueba de patogenicidad y de la prueba de inhibición *in vitro* con las 3 levaduras frescas se evaluaron mediante un análisis unifactorial, para el ensayo viabilidad de las levaduras estresadas y de las pruebas de inhibición *in vitro* de la levadura no estresada y sometida a estrés se aplicó un diseño factorial 2x4, las pruebas de antagonismo *in vitro* y de biocontrol con la levadura microencapsulada se evaluaron mediante un análisis factorial 2², se realizó cada tratamiento por duplicado, siendo los factores el (estrés hídrico y térmico y levadura microencapsulada) y variable de respuesta el % de inhibición o antagonismo. En todos los casos, para las diferencias significativas entre tratamientos se aplicó una prueba LSD de Fisher con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el software estadístico STATISTICA versión 10.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Aislamiento e identificación del hongo fitopatógeno

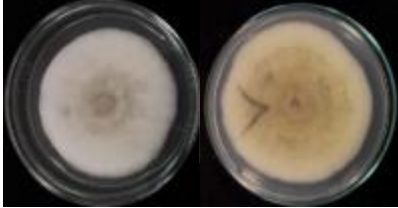
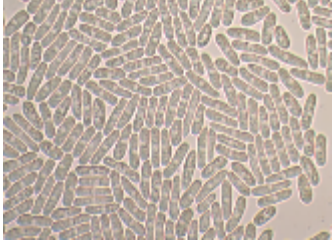

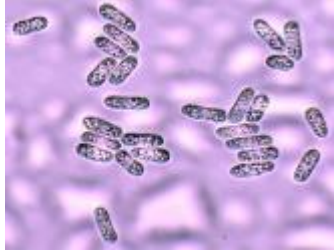
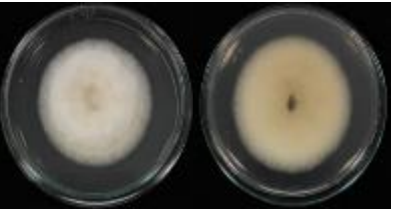
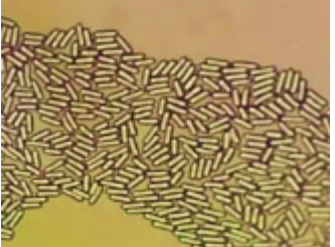
A partir de los frutos de aguacate proporcionados por la empresa “Leb Trading Products S. de R.L. de C.V.”, se obtuvieron 14 diferentes cepas de hongos, de las cuales se eliminaron aquellas que no esporularon y tenían características macroscópicas similares. Las ocho cepas seleccionadas fueron codificadas como Pa1, Pa2, Pa3, Pa5, Pa6, Pa8, Pa12 y Pa14 y utilizadas para los ensayos posteriores de identificación tanto macro como microscópica, identificación molecular y pruebas de fitopatogenicidad.

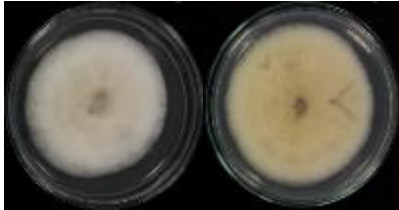
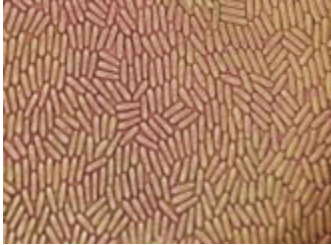
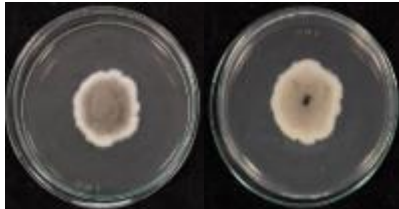
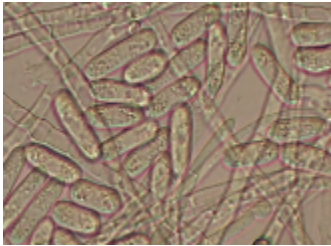
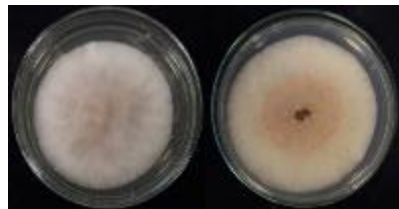

6.1.1. Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas

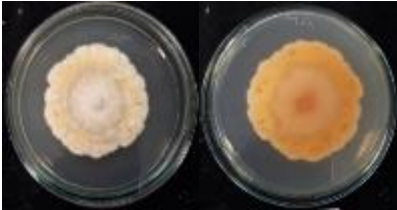
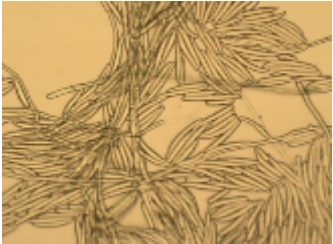


La identificación preliminar de los géneros se realizó en base a las características morfológicas macro y microscópicas, tales como diámetro de la colonia, color, micelio y morfología de la espora (Cuadro 6.1).

La identificación molecular de las cepas de los hongos aislados, se realizó por la técnica de PCR, amplificando una región específica del ADN (ITS-1 e ITS-4) que codifica para RNA ribosomal. Los productos de PCR se secuenciaron y las secuencias fueron comparadas mediante BLAST para su identificación, utilizando la base de datos abierta NCBI (Cuadro 6.2).

Cuadro 6.1. Características macroscópicas de las cepas aisladas de frutos de aguacate.

No. Aislado	Diámetro colonia (cm)*	Color del micelio	Morfología del micelio	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
Pa1 <i>C. gloeosporioides</i>	7	Centro color naranja, halo beige, micelio blanco.	Algodonoso, crecimiento en forma de anillos concéntricos.		
Pa2 <i>C. gloeosporioides</i>	7.2	Centro color beige, micelio blanco	Algodonoso, distribución concéntrica.		
Pa3 <i>C. gloeosporioides</i>	6.8	Centro beige, micelio blanco	Algodonoso, distribución concéntrica.		

<p>Pa5 <i>C. gloeosporioides</i></p>	<p>7.2</p>	<p>Centro beige-crema, micelio blanco.</p>	<p>Algodonoso, crecimiento en forma de anillos concéntricos</p>		
<p>Pa6 <i>Colletotrichum sp.</i></p>	<p>5.2</p>	<p>Centro color café-gris pálido, formación de halo blanco</p>	<p>Algodonoso, distribución concéntrica</p>		
<p>Pa8 <i>C. gloeosporioides</i></p>	<p>8</p>	<p>Centro color salmón, micelio blanco, halo naranja.</p>	<p>Algodonoso, distribución concéntrica.</p>		

<p>Pa12 <i>Fusarium sp.</i></p>	<p>5.5</p>	<p>Centro color blanco, halo beige, micelio amarillo-salmón</p>	<p>Aterciopelado, distribución concéntrica color naranja.</p>		
<p>Pa14 <i>C. gloeosporioides</i></p>	<p>8</p>	<p>Centro color salmón, halo gris, micelio blanco.</p>	<p>Algodonoso, crecimiento en forma de anillo concéntrico</p>		

* Diámetro de crecimiento fúngico en medio PDA a los 8 días.

Cuadro 6.2. Identificación molecular de las cepas aisladas de aguacate cv. "Hass".

Cepa	Identificación	GenBank (Número de acceso)	% Identidad
Pa1	<i>C. gloeosporioides</i>	MN477457	99
Pa2	<i>C. gloeosporioides</i>	MN477458	97
Pa3	<i>C. gloeosporioides</i>	MN477459	99
Pa5	<i>C. gloeosporioides</i>	MN477460	99
Pa6	<i>Colletotrichum</i> sp.	MN477461	98
Pa8	<i>C. gloeosporioides</i>	MN477462	98
Pa12	<i>Fusarium</i> sp.	MN477463	99
Pa14	<i>C. gloeosporioides</i>	MN477464	99

Las cepas identificadas molecularmente como *C. gloeosporioides*, después de ocho días de crecimiento, presentaron características macroscópicas similares, es decir, manifestación de colonias con el centro color beige-salmón, micelio blanco-gris-algodonoso, distribución concéntrica y presencia de uno o varios halos. Estos caracteres morfológicos coinciden con Kimaru y cols. (2018), quienes en un estudio sobre la identificación morfológica y molecular de *C. gloeosporioides* como agente causal de la enfermedad de antracnosis del aguacate, reportan colonias beige-crema, textura aterciopelada, color reverso naranja-grisáceo y forma concéntrica. Por otra parte, Silva y Ávila (2011) obtuvieron cepas con micelio aéreo, con colonias blanco a gris oscuro para *C. gloeosporioides* y colonias color crema a gris pálido para *C. boninense*, dichos aislados fueron obtenidos de frutos de aguacate del estado de Michoacán, México. y las características son similares a las cepas identificadas en el presente trabajo.

En cuanto a la morfología de las esporas, Morales y cols. (2009) definieron a las esporas de *C. gloeosporioides* como rectas y cilíndricas, redondeadas en su parte terminal. En este estudio, las cepas identificadas como *C. gloeosporioides* (6) y *Colletotrichum* sp. (1), presentaron esporas cilíndricas, y otras de forma elipsoide

(Cuadro 7), similares a las descritas por Silva y Ávila. (2011) quienes reportaron esporas cilíndricas-elipsoides para *C. gloeosporioides*.

La cepa *Fusarium* sp. Pa12, no ha sido reportada previamente en frutos de aguacate. Presentó diferencias morfológicas, tales como, micelio aterciopelado color amarillo-salmón, distribución concéntrica y reverso color naranja. Se observaron esporas curvas de corte largo, fusiformes, septadas y más anchos en la mitad de su longitud, mismas que son similares a las reportadas por Trabelsi y cols. (2017) y Chehri y cols. (2014). Aunque la morfología de las esporas también se considera importante para la delimitación de especies; no debe ser usada de forma aislada ya que existen similitudes en el tamaño y forma de las esporas dentro de diferentes especies (Sanders y Korsten, 2003).

Las características de las colonias varían ampliamente entre los aislados y los factores ambientales influyen sobre la estabilidad de los rasgos morfológicos (Domínguez y cols., 2012). Las diferencias observadas entre los caracteres morfológicos de los aislamientos podrían asociarse con sus variaciones genéticas y subcultivos repetidos, lo que hace que el patógeno sea capaz de evolucionar y adaptarse a diferentes condiciones (Kimaru y cols., 2018; Marroquín y cols., 2016). Por otra parte, Gutiérrez y cols. (2001) y Sharma y cols. (2017), mencionaron que el comportamiento diverso es debido a un grado de variabilidad elevado especialmente durante su cultivo *in vitro*, lo que indica una heterogeneidad y gran plasticidad genética de las poblaciones de *Colletotrichum* spp. es decir, que un genotipo puede formar diferentes fenotipos de acuerdo con la variabilidad ecológica.

6.2. Prueba de patogenicidad de las cepas aisladas

Con los dos métodos de patogenicidad empleados, los frutos inoculados con las ocho cepas de hongos, presentaron síntomas típicos de antracnosis. Tomando en cuenta los síntomas, el patógeno se aisló nuevamente y sus características morfológicas resultaron similares al patógeno originalmente inoculado, con lo que se cumplieron los postulados de Koch.

Los frutos inoculados con disco micelial activo se cortaron longitudinalmente para evaluar la gravedad de los síntomas internos. Los frutos presentaron pudrición del mesocarpio con manchas negras-café, así como crecimiento de micelio blanco que se desarrolló en las áreas inoculadas (Figura 6.1). Por otra parte, al inocular por separado suspensión de esporas del hongo y micelio, los síntomas de la enfermedad se manifestaron en el exocarpio con lesiones concéntricas de color marrón oscuro y micelio blanco. Las manchas pequeñas se observaron en los puntos de inoculación después de 4 días con ambos métodos (Figura 6.2). Los frutos control inoculados con agua estéril y agar PDA no presentaron síntomas de enfermedad.

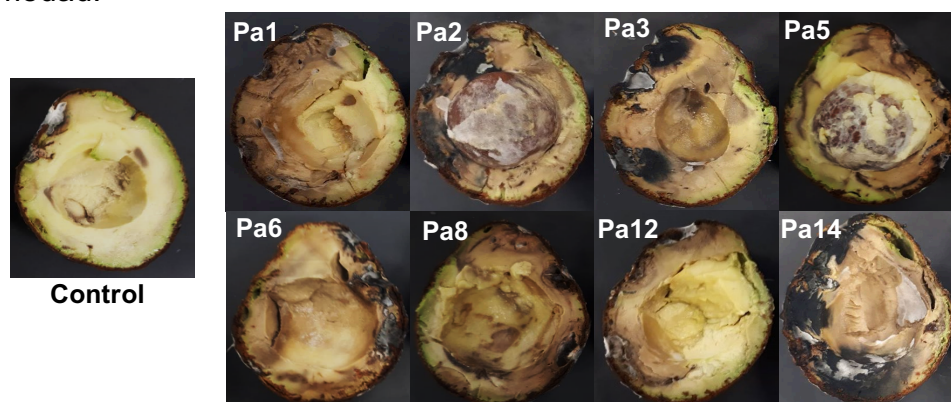


Figura 6.1. Daño causado en el mesocarpio de frutos de aguacate inoculados con micelio. Pa1, Pa2, Pa3, Pa5, Pa8, Pa14 (*C. gloeosporioides*), Pa6 (*Colletotrichum* sp.) y Pa12 (*Fusarium* sp.).






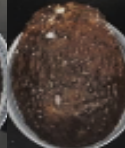

















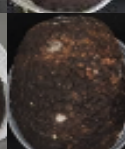








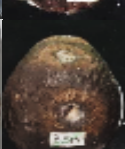








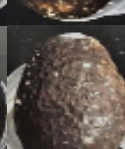




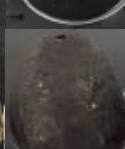

Cepa	a)			b)		
	Inoculación con micelio			Inoculación con esporas		
	Día 3	Día 5	Día 10	Día 3	Día 5	Día 10
Pa1 <i>C. gloeosporioides</i>						
Pa2 <i>C. gloeosporioides</i>						
Pa3 <i>C. gloeosporioides</i>						
Pa5 <i>C. gloeosporioides</i>						
Pa6 <i>Colletotrichum sp.</i>						
Pa8 <i>C. gloeosporioides</i>						
Pa12 <i>Fusarium sp.</i>						
Pa14 <i>C. gloeosporioides</i>						

Figura 6.2. Daño causado en el exocarpio de los frutos de aguacate.
a) Método de inoculación con micelio y b) Método de inoculación con esporas.

Se encontraron diferencias significativas en la severidad de los síntomas entre las cepas inoculadas por un mismo método, ya sea en el tamaño de las manchas necróticas del exocarpio o en la pudrición en el mesocarpio (Cuadro 6.3). Se consideró que la cepa *C. gloeosporioides* Pa14 fue la más patogénica, ya que causó daños más severos en el fruto ($p < 0.05$). Esta cepa presentó el mayor diámetro de crecimiento *in vivo* a los 10 días con 2.87 cm (inoculación con micelio) y 3 cm (inoculación con suspensión de esporas) ($p < 0.05$). Aun cuando las cepas *C. gloeosporioides* Pa2, *Colletotrichum* sp. Pa6 y *C. gloeosporioides* Pa14 son estadísticamente iguales al inocular con micelio (Cuadro 6.3), la pudrición del mesocarpio fue visiblemente mayor en la Pa14 (Figura 6.1).

Cuadro 6.3. Diámetro de crecimiento de las cepas inoculadas en frutos sanos de aguacate cv. "Hass".

Cepa	Diámetro de crecimiento (cm)	
	Inoculación con micelio	Inoculación con esporas
Pa1 <i>C. gloeosporioides</i>	2.23 ^{abc}	2.17 ^a
Pa2 <i>C. gloeosporioides</i>	2.58 ^{cd}	2.45 ^{ab}
Pa3 <i>C. gloeosporioides</i>	2.17 ^{abc}	2.12 ^a
Pa5 <i>C. gloeosporioides</i>	1.82 ^a	2.43 ^{ab}
Pa6 <i>Colletotrichum</i> sp.	2.90 ^d	2 ^a
Pa8 <i>C. gloeosporioides</i>	2.35 ^{bc}	2 ^a
Pa12 <i>Fusarium</i> sp.	2.15 ^{ab}	1.8 ^a
Pa14 <i>C. gloeosporioides</i>	2.87 ^d	3 ^b

Los valores con la misma letra en cada columna no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos coinciden con Rodríguez y cols. (2018), quienes reportan que la antracnosis se manifiesta con la presencia de manchas circulares café oscuro en el pericarpio, daños por ablandamiento y pudrición del mesocarpio. En estudios de la patogénesis realizados en aguacate, se ha manifestado que *C. gloeosporioides* germina sobre el exocarpio del fruto y forma apresorios. Posteriormente, las hifas de infección penetran en las células epidérmicas del exocarpio, pero permanecen inactivas hasta que la fruta madura (Guetsky y cols., 2005). En este trabajo, los primeros síntomas de enfermedad se manifestaron a los 4 días de incubación, lo que indica que los frutos son susceptibles al desarrollo del hongo a partir de la etapa fenológica de madurez fisiológica. Lo anterior ha sido explicado porque la resistencia del fruto de aguacate inmaduro al ataque de hongos durante la quiescencia depende de la presencia de compuestos antifúngicos preformados. El nivel del 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosano-12,15-dieno (dieno antifúngico, AFD) inhibe el desarrollo del hongo mientras su concentración sea de 1200 µg/g, misma que se mantiene mientras el fruto está en crecimiento, y disminuye durante la maduración, lo cual lo hace susceptible al ataque de hongos (Guetsky y cols., 2005; Morales y cols., 2009).

Las diferencias obtenidas son el resultado de la variación en la patogenicidad de las distintas cepas, ya que el huésped empleado era de un cultivar y las condiciones ambientales fueron iguales en el periodo de incubación. De acuerdo con Domínguez y cols. (2012), se ha encontrado que especies de *Colletotrichum* spp. corresponden a un complejo de especies polimórficas que contiene una serie de subgrupos con diferentes grados de patogenicidad, especificidad y diversidad genética, lo que hace que el grado de daño sea variable entre ellas. Por otro lado, Giraldo y cols. (2016) en el establecimiento de una escala de virulencia para la caracterización patogénica de *C. gloeosporioides*, reporta una alta variabilidad

genética de esta especie. Finalmente, según los estudios realizados por Campo y cols. (2015) las cepas aisladas de *C. gloeosporioides* presentaron diferentes grados de virulencia, sugiriendo una muy amplia variabilidad de *C. gloeosporioides*.

6.3. Prueba de inhibición *in vitro*

Se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* empleando a las levaduras *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica* y *Meyerozyma guilliermondii*, frente al fitopatógeno *C. gloeosporioides* Pa14. Diversos estudios han reportado que estas levaduras son un eficaz agente de control biológico, demostrando una alta efectividad contra diferentes hongos fitopatógenos (Magallón-Andalón., 2012; González-Estrada y cols., 2017; Aguirre-Güitrón y cols., 2018; Barrón-Hernández, 2018).

De acuerdo a los resultados obtenidos (Cuadro 6.4), *Debaryomyces hansenii* y *Meyerozyma guilliermondii* presentan un porcentaje de inhibición que no resultó estadísticamente diferente ($p>0.05$), 36.44 y 42.94% respectivamente. Así mismo, *Meyerozyma caribbica* y *Meyerozyma guilliermondii* son estadísticamente iguales ($p>0.05$) con inhibición, al día 8, de 49.27 y 42.94% respectivamente.

Cuadro 6.4. Porcentaje de inhibición *in vitro* de la cepa *C. gloeosporioides* Pa14.

Levadura	% de inhibición <i>in vitro</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	36.44 ^a
<i>Meyerozyma caribbica</i>	49.27 ^b
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	42.94 ^{ab}

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

El uso levaduras para la infección causada por *Colletotrichum* spp. ha sido reportada, sin embargo, hay pocos informes en frutos de aguacate (Campos y cols., 2016). En el presente estudio, las tres levaduras evaluadas inhibieron el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno en mayor o menor grado, de forma particular, *Debaryomyces hansenii* presentó el menor porcentaje de inhibición con un 36.44%. Resultados similares han sido reportados por Campos y cols. (2016) quienes evaluaron el efecto de levaduras antagónicas sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* para el control de la antracnosis en frutos de aguacate. Estos autores demostraron que con el uso de *Wickerhamomyces anomalus* se inhibe *in vitro* el 20.79% el crecimiento del hongo, mientras que con *Candida intermedia* el 27.38%. Por otro lado, la actividad antagónica *in vitro* de *D. hansenii* también ha sido reportada contra *Penicillium citrinum* con una inhibición del 97.4% (González-Estrada y cols., 2017), contra *Monilinia fructigena* con un 44.12% y contra *Monilinia fructicola* con un 23.53% de inhibición (Grzegorzczuk y cols., 2017).

Para *M. caribbica* y *M. guilliermondii* no existen reportes respecto al control de *Colletotrichum* spp. en frutos de aguacate. Sin embargo, estas levaduras han sido estudiadas para el control de enfermedades poscosecha de algunos frutos, tal es el caso de Aguirre-Güitrón y cols. (2018) quienes mostraron en una prueba de evaluación *in vitro* que *Meyerozyma caribbica* inhibe en un 83.92% a *C. gloeosporioides* aislado de la superficie del mango cv 'Ataulfo', mientras que en otro estudio, Barrón-Hernández, (2018), demostró que películas de pectina adicionadas de agentes de biocontrol *M. caribbica* y *M. guilliermondii*, son capaces inhibir en un 100% el micelio de *C. gloeosporioides* aislado del fruto de papaya var. "Maradol". Por otro lado, Aceves-Gómez y cols. (2008), evidenciaron que *M. guilliermondii* es

un antagonista eficaz en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en papaya var “Maradol”.

El hecho de que en el presente estudio se obtuvieron porcentajes de inhibición bajos comparados con los reportados con otros autores, se puede atribuir a que las tres levaduras presentan diferentes mecanismos de acción y por lo tanto no inhiben de la misma manera a todas las especies de *Colletotrichum spp.* El hongo fitopatógeno que se utilizó en las pruebas de inhibición probablemente fue resistente a las levaduras analizadas (Mahasuk y cols., 2013). En este sentido, es importante destacar que la diferencia en los porcentajes de inhibición puede deberse a que la composición de las paredes celulares de los hongos patógenos son diferentes (Moisan y cols., 2001) y que las enzimas que producen las levaduras (ya sea la β -1-3, glucanasa, proteasa, nagasa o quitinasa) pueden permitir o no la hidrólisis de la pared celular del hongo, la cual está compuesta principalmente por quitina (aprox. 20%), β -glucanos (aprox. 50–60%) y proteínas (aprox. 20 –30%). Así mismo, puede haber diferencias en la permeabilidad de la membrana celular del fitopatógeno, lo cual le puede favorecer o impedir la absorción de compuestos que inhiban su crecimiento.

No obstante, se han propuesto varios mecanismos para explicar la actividad antagonica de las levaduras contra los hongos, para las 3 levaduras se ha reportado la competencia por espacio y nutrientes. Estudios realizados por Medina y cols. (2016), Hernández y cols. (2018) y Bautista-Rosales y cols. (2013) han evidenciado que éstas generalmente tienen la capacidad de asimilar con éxito una amplia variedad de mono- y di-sacáridos, como la glucosa, fructosa y sacarosa presentes en el medio, lo que hace que estos nutrientes no estén disponibles para el patógeno y le evitan proliferar rápidamente e iniciar los procesos de germinación.

Asimismo, se ha informado que estas levaduras pueden producir enzimas hidrolíticas, β -1-3, glucanasa y proteasa por *D. hansenii* (Hernández y cols., 2018; Hernández y cols., 2010), glucanasa, nagasa, quitinasa y proteasa por *M. caribbica* (Bautista-Rosales y cols., 2013) y glucanasa, quitinasa y nagasa por *M. guilliermondii* (Magallón-Andalón., 2012). Tanto la β -1, 3 glucanasa como la proteasa actúan directamente sobre la pared celular del fitopatógeno, que está compuesta principalmente por quitina (aprox. 20%), β -glucanos (aprox. 50–60%) y proteínas (aprox. 20–30%). Específicamente, la β -1, 3 glucanasa hidroliza el β -1,3 glucano en sitios al azar a lo largo de la cadena de polisacárido, produciendo oligosacáridos de menor tamaño y glucosa, utilizados por la levadura como fuente de carbono. Las proteasas degradan directamente las proteínas contenidas en la membrana celular del fitopatógeno, lo que facilita que la levadura se alimente principalmente de una fuente de nitrógeno y aminoácidos (Hernández y cols., 2018).

Para *M. caribbica* y *M. guilliermondii* se ha demostrado que pueden parasitar a *C. gloeosporioides* a través de la producción de sus enzimas líticas que hidrolizan la pared celular del patógeno, causando una distorsión de las hifas de los hongos y eventualmente la lisis celular (Bautista-Rosales y cols., 2013; Magallón-Andalón., 2012).

Para *D. hansenii* y *M. caribbica*, se ha expuesto que pueden llevar a cabo la formación de biopelículas. Las biopelículas son comunidades de microorganismos protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) fijadas a una superficie, que por medio de la activación de sus genes forman microcolonias. Las células de la levadura se adhieren a la pared celular del patógeno formando biopelículas y

secretando enzimas que hidrolizan la pared celular (Bautista-Rosales y cols., 2013; González-Estrada y cols., 2017).

Por otra parte, de manera específica, para *D. hansenii*, se ha reportado la producción y acumulación de compuestos volátiles, como 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol, lo cual se atribuye a su absorción en la membrana celular del fitopatógeno, aumentando su permeabilidad y acelerando la propagación de iones esenciales y metabolitos a través de su membrana inhibiendo su crecimiento y germinación de esporas (Hernández y cols., 2018).

6.4. Efecto del estrés hídrico y térmico sobre la viabilidad y capacidad antagónica de las levaduras

Debido a que no se obtuvieron porcentajes de inhibición altos en las pruebas *in vitro* de las 3 levaduras estudiadas, fue necesario someterlas a los ensayos de estrés hídrico y térmico con el objetivo de inducir los mecanismos de protección específicos y mejorar la tolerancia al estrés, lo cual puede representar una estrategia para mejorar la eficacia del control biológico, de tal manera que cuando las levaduras se apliquen en el campo, tengan la capacidad de sobrevivir, replicarse y soportar las fluctuaciones naturales de humedad y temperatura (Abadias y cols., 2001; Liu y cols., 2011).

6.4.1. Ensayo de viabilidad de la levadura sometida a estrés hídrico y térmico

Las células viables son aquellas capaces de dividirse y formar una colonia en un medio de cultivo. La capacidad de formación de colonias podría aumentar o disminuir según la naturaleza del estrés o las condiciones de crecimiento (Abu y

cols., 2014). En este estudio, al exponer a las 3 levaduras a los diferentes tratamientos de estrés y actividad de agua de 0,98 y 0,96, se observaron distintos comportamientos, lo cual puede brindar información sobre cómo será el crecimiento y la actividad del control biológico cuando las levaduras sean expuestas a estrés hídrico y térmico en condiciones de campo. Debido a que en el estrés hídrico la demanda de agua es más alta que la cantidad que se encuentra disponible en el medio (Barkai, 2001), al disminuir la a_w del medio de crecimiento, se reduce la disponibilidad de agua y por lo tanto el crecimiento de las levaduras.

D. hansenii es una levadura halotolerante que se ha utilizado como organismo modelo para comprender los mecanismos de adaptación halófilos, al exponer a esta levadura únicamente a estrés térmico (concentración 0 M, sin contenido de sal), se observó que el porcentaje de viabilidad a a_w de 0.98 y 0.96 fue mayor a 28 °C en comparación al estrés de 33 °C (Figura 6.3). Dichos resultados coinciden con lo reportado por Almagro y cols. (2000), quienes determinaron la muerte térmica de *D. hansenii* y demostraron que su máxima temperatura de crecimiento sin la presencia de NaCl es de 33.6 °C, siendo menos termotolerante que *S. cerevisiae*. De manera análoga, Sui y cols. (2015) informaron que la pérdida de esta capacidad puede deberse a que la actividad metabólica de la levadura disminuye al exponerse a una temperatura por encima de su óptima de crecimiento. Sin embargo, con la sinergia de los factores estudiados, se observó que el porcentaje de viabilidad incrementó proporcionalmente al aumento de las concentraciones de NaCl y disminuyó por arriba de 1.0 M, no obstante, se obtuvieron viabilidades menores a $a_w=0.96$ (Figura 6.3). La máxima viabilidad se logró al cultivar a *D. hansenii* en medio modificado con 1.0 M, cuyos resultados a 28 °C fueron 150% ($a_w=0.98$) y 187.43% ($a_w=0.96$) y a 33 °C 140.66% ($a_w=0.98$) y 105.33% ($a_w=0.96$) (porcentajes respecto a un control sin estrés $a_w=1.0$) de esta

manera se evidenció que hubo una mejora de supervivencia a baja actividad de agua al exponer las células de levadura a estrés hídrico y térmico.

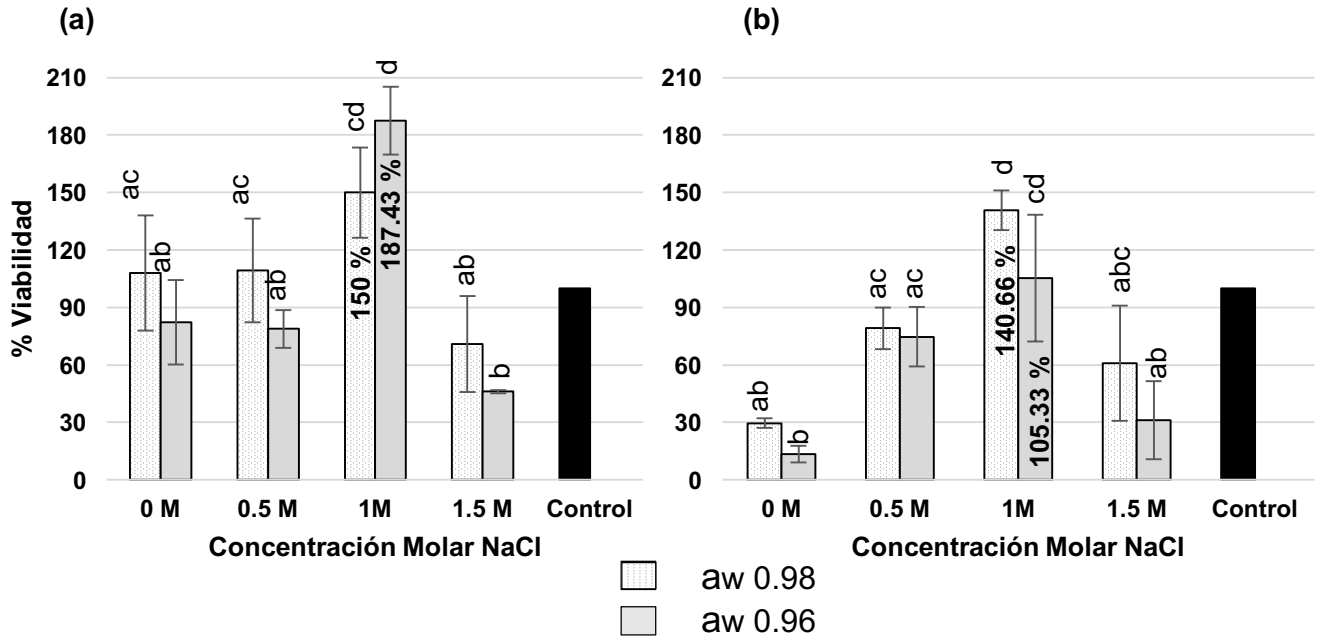


Figura 6.3. Porcentaje de viabilidad de *Debaryomyces hansenii* sometida a estrés hídrico y térmico; a) 28 °C, b) 33 °C.

Lo expuesto anteriormente coincide con Abu y cols. (2014), Chao y cols. (2009), Mortensen y cols. (2005) y Almagro y cols. (2000), quienes señalaron que la presencia de NaCl 1.0 M mejora el crecimiento de *D. hansenii* en diferentes condiciones de estrés y que puede tolerar niveles de salinidad de hasta 4 M de NaCl. Por otro parte González y cols. (2004) estudiaron la viabilidad de las células de *D. hansenii* cultivadas bajo diferentes concentraciones de sal, encontrando que el estrés moderado de 1.0 M mostró una viabilidad del 100% y que las concentraciones más altas de 2.0 y 3.0 M disminuyeron la viabilidad a 15 y 5% respectivamente. En el mismo contexto, Almagro y cols. (2000) aseveraron que el

crecimiento de *D. hansenii* fue estimulado por bajas concentraciones de cationes, mientras que concentraciones más altas tuvieron un efecto inhibitor reducido.

De forma particular, para *D. hansenii* se han propuesto mecanismos de tolerancia al estrés, uno de ellos es la estrategia salt-in y consiste en la capacidad de mantener concentraciones elevadas de Na intracelular o al menos equivalente a la concentración externa de sal, y expulsar rápidamente Na de la célula, evitando que el agua se mueva dentro y fuera de la célula, lo que regula la ósmosis, mantiene la estructura y función celular a su vez (González y cols., 2005; Mortensen y cols., 2005). Así mismo, se ha expresado que concentraciones superiores a 1.0 M causan adaptaciones celulares específicas, como cambios en la fluidez de la membrana y el perfil lipídico, las cuales desempeñan un papel principal en la adaptación a las condiciones salinas extremas (Abu y cols., 2014; Musa y cols., 2018), y además de la extrusión de Na en el cual se usa una proteína de membrana plasmática, ENA ATPasa, como uno de los mecanismos para la extrusión de sal (Musa y cols., 2018), la inclusión de sodio en la vacuola también se ha propuesto como un mecanismo de tolerancia al estrés (Prista y cols., 2005).

En contraste con *D. hansenii*, *Meyerozyma caribbica* mostró una mejor respuesta al estrés. Al exponer a esta levadura solamente a estrés térmico, no hubo diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad a 33 °C (113.92%) y 38 °C (112.30%) ($p > 0.05$), sin embargo, fue mayor en $a_w = 0.98$ que a 0.96 (Figura 4). Los resultados obtenidos son superiores a los reportados para otras levaduras de control biológico, tal es el caso de *Candida oleophila* cuya viabilidad descendió hasta el 22% al ser expuesta entre 39-41 °C, de igual manera la viabilidad de *D. hansenii* expuesta a 40 °C durante 20 min fue inferior al 10% (Sui y cols., 2015). Debido a esto se puede inferir que *M. caribbica* posee un grado de termotolerancia,

lo que la hace capaz de sobrevivir en diferentes condiciones de campo, ya que las altas temperaturas pueden reducir notablemente la viabilidad de los agentes de biocontrol especialmente cuando las aplicaciones son durante la precosecha. La termotolerancia podría explicarse por el aumento de diferentes conjuntos de proteínas de choque térmico (Hsp) en las células de levadura (Abu y cols., 2014), ya que cuando estas son sometidas a distintos estímulos como el estrés por alta temperatura, las Hsp se sobreexpresan. De esta manera confieren protección a las células, volviéndolas resistentes a la apoptosis y actuando como chaperonas cuya función es ayudar al plegamiento correcto de proteínas parcialmente desnaturalizadas (Coronato y cols., 1999). También se ha reportado que la trehalosa inducida por el gen trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS1) junto con la Hsp104p, actúan sinérgicamente para conferir termoprotección (Feldmann, 2010).

Con la acción conjunta de la temperatura y la concentración de NaCl, tampoco hubo diferencia significativa en los porcentajes de viabilidad a 33 y 38 °C ($p < 0.05$). Se alcanzaron viabilidades mejoradas con la menor a_w evaluada ($a_w = 0.96$), la máxima se logró al cultivar a la levadura en medio modificado con NaCl 1.5 M a 38 °C con 126.36% ($a_w = 0.98$) y 108.78% ($a_w = 0.96$) (Figura 6.4). Dichos resultados son similares a los obtenidos para *Rhodospiridium paludigenum*, la cual creció en medio con NaCl 1.5 M con viabilidades (92,1%) a baja actividad de agua ($a_w = 0.95$) que el control (81.1%) después de 48 h de incubación (Wong y cols., 2010). Esto se debe a que la adaptación a la sal puede tener el potencial de mejorar su supervivencia bajo estrés ambiental (Wang y cols., 2010). Por lo que la capacidad de *M. caribbica* para crecer a una baja a_w y alta temperatura, puede representar un atributo importante con respecto a su uso como agente de control biológico. A fin de apoyar lo anterior, estudios con *Candida sake* demostraron que cuando las células se cultivaron en un medio reducido en a_w , su capacidad para sobrevivir

mejoró en un rango de humedades relativas bajas. La levadura mantuvo la eficacia del control biológico contra *Penicillium expansum* en manzanas y mostró una mejor supervivencia en condiciones de campo que las células no modificadas (Teixidó y cols., 2006).

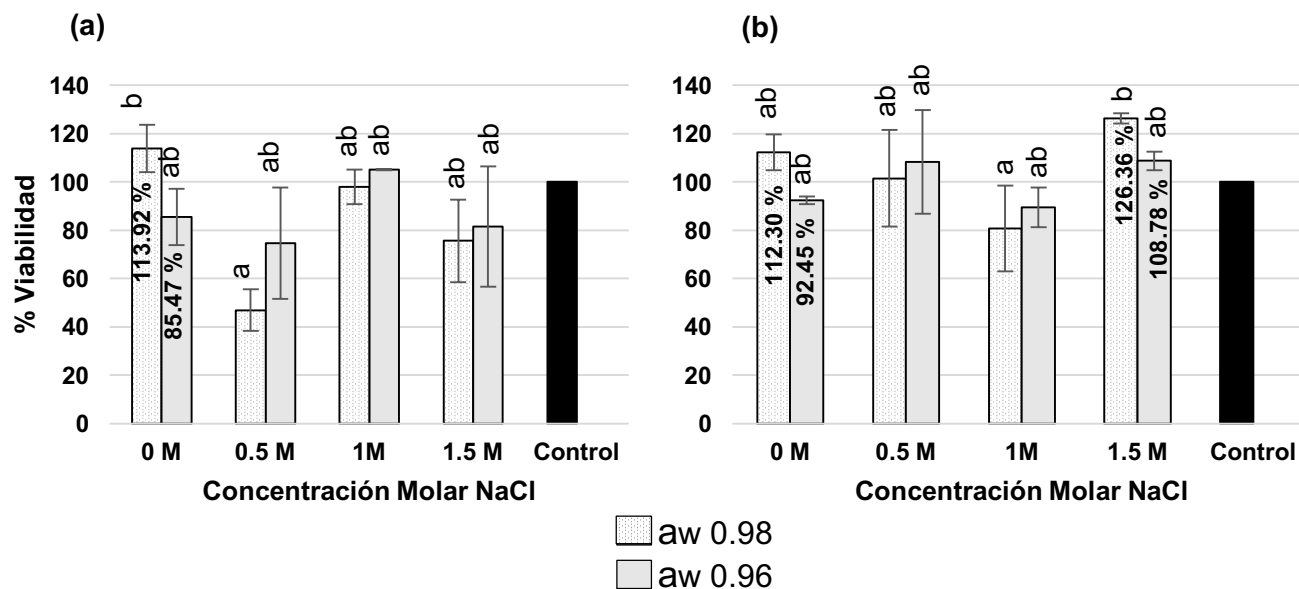


Figura 6.4. Porcentaje de viabilidad de *Meyerozyma caribbica* sometida a estrés hídrico y térmico; a) 33 °C, b) 38 °C.

Caso contrario ocurrió con *M. guilliermondii*, cuya respuesta al estrés no fue la más favorable, con esta levadura se obtuvieron los menores porcentajes de viabilidad, por lo tanto, su tolerancia al estrés y eficacia de control biológico podría ser significativamente menor comparada con *D. hansenii* y *M. caribbica*. Hubo diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad al exponerla únicamente a estrés térmico de 33 °C (85.59%) y 38 °C (81.46 %) a aw=0.98 ($p < 0.05$). Sin embargo, en ambos casos la viabilidad fue menor en aw=0.96 (Figura 6.5). Estos resultados son similares a los reportados para *Metschnikowia fructicola* quien obtuvo un 70 % de viabilidad al ser expuesta a 37 °C por 30 min (Liu y cols., 2011).

Sin embargo, en concentración de 1.0 M y 38 °C disminuyó la viabilidad a 68 y 63.60 % a una aw de 0.98 y 0.96 respectivamente, comparada con el cultivo modificado a la misma concentración y a 33 °C con un 94.52 % (aw= 0.98) y 95.43 % (aw= 96) (Figura 6.5). Lo anterior puede explicarse debido a que, al aumentar el estrés, la función protectora de las Hsp se ve sobrepasada deteniéndose su producción y activándose el programa de apoptosis (Coronato y cols., 1999). No obstante, su crecimiento se inhibió en concentración de 1.5 M NaCl, lo que puede deberse a una deshidratación y contracción celular, lo que llevó a la plasmólisis celular (Musa y cols., 2018).

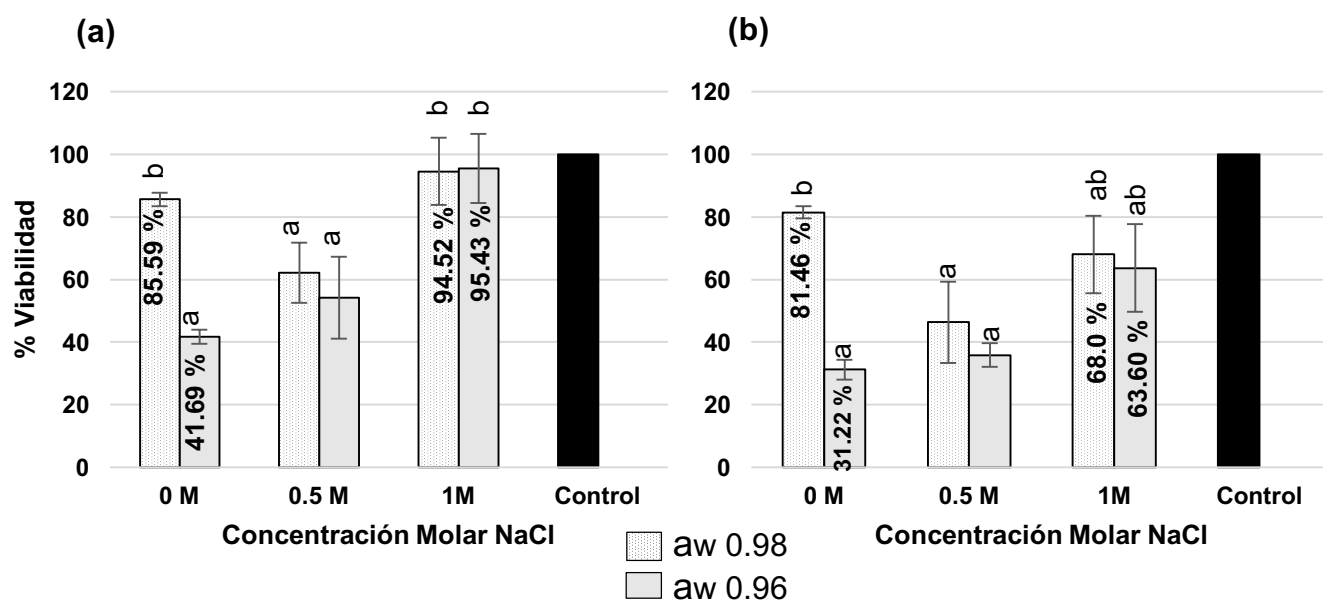


Figura 6.5. Porcentaje de viabilidad de *Meyerozyma guilliermondii* sometida a estrés hídrico y térmico; a) 33 °C, b) 38 °C.

Con la exposición de organismos no adaptados generalmente a condiciones ambientales adversas, especialmente condiciones con baja actividad de agua como lo es en el caso de *Meyerozyma caribbica* y *Meyerozyma guilliermondii*, se producen efectos perjudiciales tales como flujo inmediato de agua citoplásmica,

deshidratación posterior y contracción celular (Musa y cols., 2018). Tal deshidratación es un proceso rápido y se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola. Para sobrevivir y continuar con el crecimiento, las células deshidratadas pueden recuperar la turgencia siempre y cuando la severidad del estrés sea fisiológicamente aceptable. La proliferación celular se reanuda después de un período de aclimatación, el cual varía dependiendo de diversos factores, como el tipo y la severidad del estrés, la genética de la cepa y del estado fisiológico de crecimiento (Folch y cols., 2004). Durante esta fase, para hacer frente a una concentración tan elevada de NaCl, la célula microbiana debe adquirir algunos mecanismos adaptativos que le permitan contrarrestar el efecto desnaturalizante (Musa y cols., 2018). Para ello, se ha demostrado que las levaduras poseen una capacidad inherente para adaptarse a entornos desfavorables mediante la inducción de diversas respuestas de estrés. Estas respuestas se caracterizan por la inducción transitoria de proteínas generales y específicas y por cambios fisiológicos que generalmente mejoran la capacidad de los organismos para soportar condiciones ambientales más adversas (Teixidó y cols., 2006).

En levaduras, los cambios fisiológicos significativos informados incluyen a los solutos compatibles acumulados, los cuales son principalmente polioles (o alcoholes de azúcar) de bajo (glicerol y eritritol) y alto peso molecular (arabitol y manitol). Estos solutos permiten que el organismo crezca bajo estrés hídrico y a la vez, permiten el equilibrio de la a_w citoplásmica con el ambiente circundante, reteniendo agua en la célula y manteniendo así, la presión de turgencia y ayudando a preservar la función de las proteínas dentro de las células (Abadías y cols., 2001; González y cols., 2005; Teixidó y cols., 2006; Teixidó y cols., 2011).

Para *D. hansenii*, González y cols. (2005) reportaron que el glicerol se acumula de manera intracelular, proporcionalmente al aumento de las concentraciones de NaCl extracelular y que en *D. hansenii* los niveles intracelulares de polioles son notablemente mejorados por la alta salinidad, siendo los solutos dominantes el glicerol en las células en fase logarítmica y el arabitol en fase estacionaria. En otros estudios se informó que en levaduras tales como *Pichia sorbitophila*, *Candida cacoii*, *Candida magnoliae* y *Candida sake* el glicerol, arabitol, eritritol y manitol fueron los solutos cuyas concentraciones aumentaron significativamente durante el estrés (Abadias y cols., 2001).

Sin embargo, se ha mencionado que la capacidad de mantener una alta concentración intracelular de glicerol no depende exclusivamente de un transporte activo, también se reserva un papel principal para la impermeabilidad de la membrana plasmática, evitando la fuga de glicerol (Prista y cols., 2005). Cabe señalar que la capacidad de una célula microbiana para detectar los cambios de osmolaridad en el medio ambiente es de suma importancia para su supervivencia. La vía de señalización que reconoce el estrés osmótico es la vía de señalización de glicerol de alta osmolaridad (HOG). Esta permite que los microorganismos respondan a diversos estímulos extracelulares y también ajustar su maquinaria celular para alterar los ambientes (Folch y cols., 2004; Musa y cols., 2018).

Otros azúcares compatibles sintetizados en respuesta a baja aw son azúcares y derivados del azúcar como la trehalosa, sacarosa y glucosa. En este sentido, para las células osmoadaptadas de *Meyerozyma caribbica* ha sido reportado que la acumulación intracelular de trehalosa puede mejorar la resistencia de los componentes celulares contra el estrés ambiental como temperaturas extremas, bajas temperaturas y deshidratación (Abadias y cols., 2001; Lahlali y Jijakli, 2009).

Además, los resultados mostraron que la trehalosa puede desempeñar un papel de efecto protector para mantener la integridad de la membrana plasmática y proteínas (Wong y cols., 2010; Aguirre-Güitrón y cols., 2018).

En general, la acumulación intracelular de solutos compatibles puede mejorar la resistencia de los agentes de biocontrol a factores ambientales adversos, incluida la actividad del agua y la baja humedad relativa para su aplicación final en condiciones de precosecha (Lahlali y y Jijakli, 2009).

6.4.2. Prueba de inhibición *in vitro* de las levaduras sometidas a estrés hídrico y térmico

La respuesta al estrés, en el porcentaje de inhibición de las 3 levaduras, tuvo una efectividad variable. De acuerdo a los resultados obtenidos, *D. hansenii* cultivada en medio modificado con NaCl 1.0 M a 28 °C, aumentó su poder antagónico hasta un valor de 64.64%, comparada con el control que logró solo 36.44% de inhibición ($p < 0.05$) (Figura 6.6). Se observó que sometida a estrés a 28 y 33 °C, el porcentaje de inhibición aumentó con el incremento de la concentración de NaCl y disminuyó por arriba de 1.0 M. En todos los casos el porcentaje de inhibición aumentó respecto al control.

M. caribbica, sometida a estrés térmico, no afectó su efectividad respecto al porcentaje de inhibición a 33 y 38 °C ($p < 0.05$). De igual forma, a 33 °C y con el aumento de la concentración de NaCl, el porcentaje de inhibición fue estadísticamente igual en todos los casos. Por el contrario, al exponer a las células a 38 °C, el porcentaje de inhibición incrementó con el aumento de las concentraciones de NaCl ($p < 0.05$). *M. caribbica* cultivada a 38 °C en medio

modificado a 1.5 M, aumentó su actividad antagónica hasta llegar a un valor de 75.12%, comparada con el control (49.27 %) (Figura 6.7).

La respuesta al estrés de *M. guilliermondii*, no fue la más favorable, comparada con *D. hansenii* y *M. caribbica*, presentó los porcentajes de inhibición más bajos. Los tratamientos fueron estadísticamente iguales a 33 °C ($p>0.05$). *M. guilliermondii* cultivada a 33 °C en medio a 1.0 M, aumentó 13% la actividad antagónica (56.12%), respecto del control (42.94 %) (Figura 6.8).

Los porcentajes de inhibición *in vitro* para las tres levaduras estresadas, presentaron una correlación directa con los resultados obtenidos en el % viabilidad (apartado 6.4.1. Ensayo de viabilidad de la levadura sometida a estrés hídrico y térmico), lo que evidencia que a mayor porcentaje de viabilidad hay mayor porcentaje de inhibición (*D. hansenii* en 1.0 M a 28 °C, *M. caribbica* en 1.5 M a 38 °C y *Meyerozyma guilliermondii* en 1 M a 33 °C (Figura 6.6, 6.7 y 6.8).

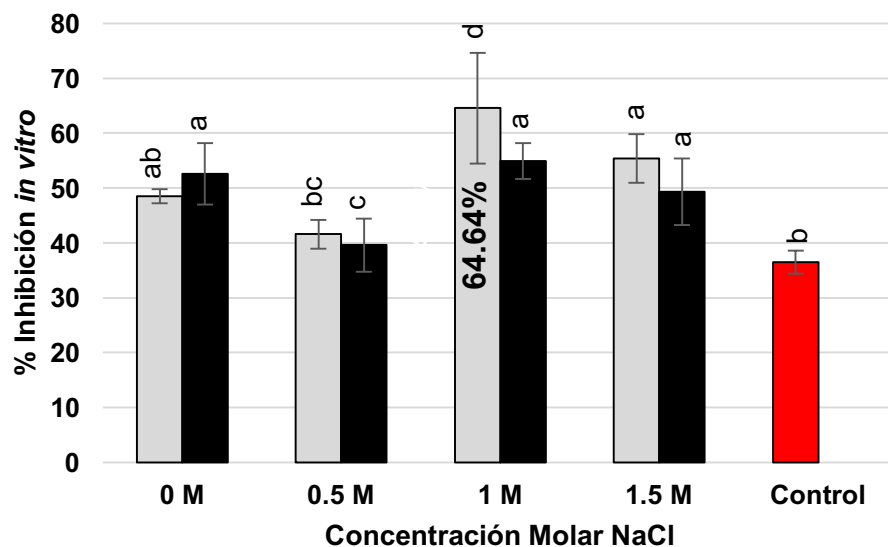


Figura 6.6. Porcentaje de inhibición *in vitro* con *Debaryomyces hansenii* sometida a estrés hídrico y térmico. Color gris: 28 °C, negro: 33 °C. El control no conlleva ni estrés térmico ni hídrico.

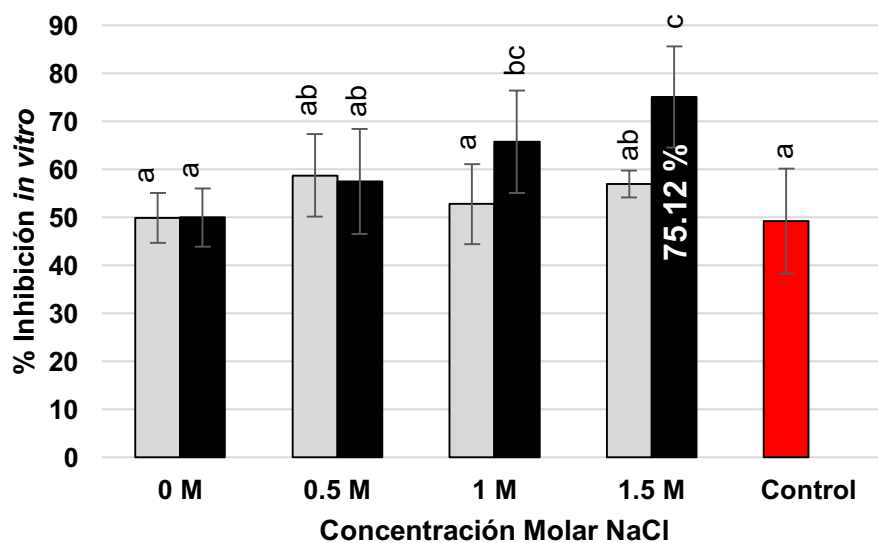


Figura 6.7. Porcentaje de inhibición *in vitro* con *Meyerozyma caribbica* sometida a estrés hídrico y térmico. Color gris: 33 °C, negro: 38 °C. El control no conlleva ni estrés térmico ni hídrico.

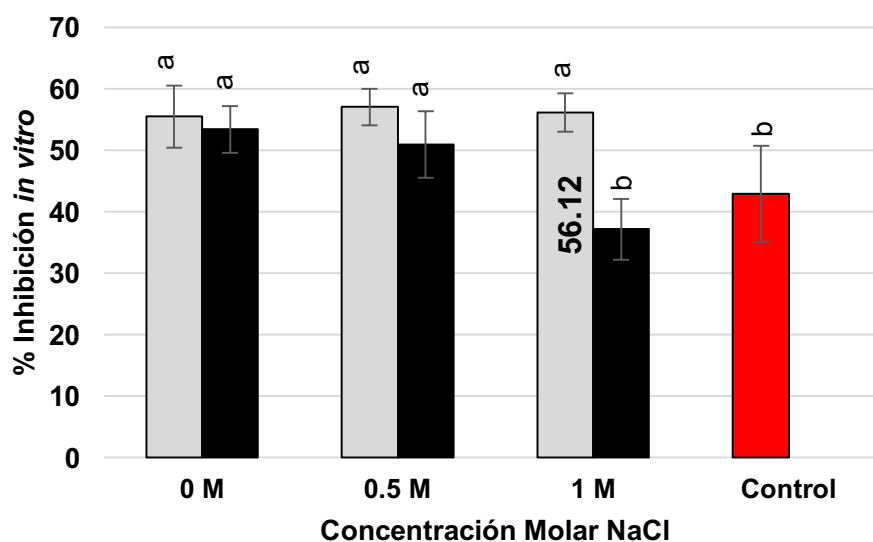


Figura 6.8. Porcentaje de inhibición *in vitro* con *Meyerozyma guilliermondii* sometida a estrés hídrico y térmico. Color gris: 33 °C, negro: 38 °C. El control no conlleva ni estrés térmico ni hídrico.

Específicamente, con respecto a las levaduras antagonistas, se han informado cambios en la expresión génica durante la adaptación al estrés (Sui y cols., 2015). Estudios anteriores han identificado una serie de genes relacionados con la sal que codifican para diferentes proteínas, tal es el caso del HOG1 (MAP quinasa implicada en la vía de síntesis de glicerol de alta osmolaridad), esta vía se activa principalmente bajo condiciones de estrés hiperosmótico (Folch y cols., 2004). ENA1 y ENA2 (proteína de membrana plasmática Na⁺-ATPasa) como un mecanismo para la extrusión de sal. La proteína GPD1 y GPP (proteína NAD-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y glicerol-3-fosfatasa), cataliza la producción y acumulación de glicerol durante condiciones de estrés hiperosmótico. NHX1 (proteína pre vacuolar Na⁺) también llamada antiportador Na⁺ vacuolar, media el secuestro intracelular de Na⁺ a la vacuola, regula el pH vacuolar, contribuye a la resistencia de la fase estacionaria al estrés osmótico y permite el crecimiento

continuo de las células hasta que se produzca la respuesta de osmotolerancia adquirida y el NHA1 (proteína antiportadora Na⁺/H⁺) actúa como un antiportador de iones y transporte de sodio (Chao y cols., 2009; Prista y cols., 2005; Folch y cols., 2014; Musa y cols., 2018). Por lo anterior, se adquiere una mejora posterior en la tolerancia al estrés y la eficacia del control biológico (Sui y cols., 2015).

Las tres levaduras sometidas a estrés incrementaron significativamente la eficacia de control biológico ($p < 0.05$). Dicho enfoque no ha sido estudiado a profundidad, sin embargo, algunos estudios mencionan que los aditivos salinos mejoran el biocontrol de algunas levaduras antagonistas para el control de enfermedades poscosecha en frutas y verduras (Sharma y cols., 2009). Para tal efecto, Lahlali y Jijakli. (2009), informaron la mejora de *Candida oleophila* en condiciones extremas de aw (0.98 y 0.93) contra el moho azul causado por *P. expansum*, en condiciones en que los tratamientos estándar de control biológico no eran efectivos.

En otros estudios, se ha reportado que la cepa de *D. hansenii* en presencia de NaCl al 6% produce toxinas killer (Marquina y cols., 2001), este puede ser un posible mecanismo de acción ejercido por la levadura, lo que favorece la actividad de control biológico.

A su vez, el aumento en el porcentaje de inhibición podría deberse a lo reportado por Liu y cols. (2011), quienes indicaron que las células de *Metschnikowia fructicola* tratadas bajo estrés, se multiplicaron más rápidamente que las células no tratadas durante los primeros 2 días después de la inoculación. Señalaron que este tiempo fue importante para la germinación e infección de *P. expansum*, con lo que explican por qué la capacidad de control biológico de las células tratadas fue significativamente mayor. En el mismo sentido, Gamagae y cols. (2003),

demonstraron que el crecimiento celular de *Candida oleophila* fue mayor que el de *C. gloeosporioides* al emplear bicarbonato de sodio. De tal manera, obtuvieron un menor diámetro en la lesión causada por el patógeno en frutos de papaya, maximizando así la actividad de la levadura.

Por lo anterior, resulta favorable el aumento en la tasa de crecimiento de levaduras sometidas a estrés, ya que, las células pueden crecer más rápido en la superficie del fruto, colonizar las heridas (Sharma y cols., 2009) y ejercer sus mecanismos de acción más rápido, lo que les permite competir de manera más eficiente contra el patógeno.

Expuesto lo anterior, comprender la respuesta al estrés de los agentes de biocontrol es esencial para desarrollar recomendaciones para su producción y aplicación. Los rangos de tolerancia al estrés mostrados por las tres levaduras, contribuyó a la elección de *Meyerozyma caribbica* para su microencapsulación, por su capacidad de sobrevivir en factores ambientales adversos y mostrar la mayor actividad de control biológico.

6.5. Microencapsulación de *Meyerozyma caribbica*

El porcentaje de viabilidad de *M. caribbica* después del secado por aspersion fue evaluado en células no estresadas y sometidas a estrés hídrico y térmico. Se utilizaron trehalosa, aislado proteico de soya (SPI) + alginato de sodio como materiales de pared (WM) (Cuadro 6.5).

Cuadro 6.5. Porcentaje de viabilidad de *M. caribbica* después del secado por aspersion.

WM + Tratamiento	% Viabilidad
Trehalosa + <i>M. caribbica</i> no estresada	90.57 ± 2.56 ^a
Trehalosa + <i>M. caribbica</i> estresada	89.77 ± 1.85 ^a
SPI:Alginato Na + <i>M. caribbica</i> no estresada	90.61 ± 1.65 ^a
SPI:Alginato Na + <i>M. caribbica</i> estresada	89.67 ± 7.13 ^a

Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Después del secado, la viabilidad de las células no adaptadas a estrés no fue estadísticamente diferente al utilizar trehalosa y SPI+ alginato de sodio ($p > 0.05$). Por otra parte, el estrés no tuvo efecto sobre la viabilidad de las células después del secado, en ambos casos se obtuvo 89%, siendo éste estadísticamente igual en comparación con las células no estresadas ($p > 0.05$).

Para mantener la viabilidad celular, el requisito fundamental es mantener las estructuras celulares esenciales intactas después del secado y completamente funcionales después de la rehidratación (Fu y Dong., 2011). En este sentido, el 90.57 ± 2.56% de viabilidad obtenido para las células control de *Meyerozyma*

caribbica es similar al reportado por Aguirre-Güitrón y cols. (2018), quien obtuvo el $95.41 \pm 0.93\%$ con el uso de trehalosa. Sin embargo, las diferencias observadas incluso al tratarse de la misma cepa, se pueden deber a que las células fueron cultivadas en diferentes medios de crecimiento, diferentes condiciones de cultivo y/o recolectadas en diferentes etapas de crecimiento. López-Cruz y cols. (2019), informaron una viabilidad del 98% al encapsular a *Meyerozyma guilliermondii* con SPI+ alginato de sodio, dicho resultado es mayor a la viabilidad obtenida para *M. caribbica* utilizando los mismos materiales de pared. Por el contrario, la viabilidad es mayor a la reportada por Chandralehka y cols. (2016) para *Saccharomyces cerevisiae*, quien obtuvo el 80.5% usando maltodextrina, el 59.5% con goma arábica y el 67.5% con almidón de maíz. Por tanto, a fin de explicar estas diferencias Fu y Chen. (2011) y Rathore y cols. (2013), informaron que la supervivencia celular durante el secado, puede atribuirse a las diferentes cepas, tipo y concentración de material encapsulante y diferentes condiciones de secado utilizadas.

De la misma manera que en el presente estudio, Bustos y cols. (2013) afirmaron que la pérdida de la viabilidad después del proceso de secado en *Lactobacillus plantarum*, siempre fue mayor en las muestras con estrés osmótico (0.8 M NaCl). Tal comportamiento fue más notable a medida que aumentó el nivel de estrés salino aplicado. Este efecto podría explicar por qué *M. caribbica* tuvo una viabilidad ligeramente menor comparada con el tratamiento control, y es debido a que durante el estrés hídrico el componente más afectado es la membrana celular, como se espera durante el proceso de secado por aspersion, ya que es la zona más expuesta a la deshidratación, por lo tanto, la viabilidad se vio más afectada ya que previamente las células fueron expuestas a un nivel de salinidad durante el cultivo.

En contraste con lo obtenido en el presente trabajo, diversos autores han observado el efecto protector de la adaptación al estrés en la viabilidad de las células después del proceso de secado por aspersión, tal es el caso de Desmond y cols. (2001), quien reportó que la viabilidad de *L. paracasei* NFBC338 adaptado al calor (52 °C x 15 min) mejoró 18 veces durante el secado a temperaturas de salida de 95-105 °C, mientras que los cultivos adaptados a la sal mostraron una viabilidad 16 veces mayor que los controles. Sin embargo, las temperaturas de salida de 85-90 °C no confirieron el efecto protector. Lo anterior puede explicar el por qué *M. caribbica* sometida a estrés no mejoró la viabilidad después del secado, las temperaturas de operación en este caso fueron temperatura de entrada= 112 y 113 °C con trehalosa y SPI+ alginato de sodio respectivamente, y una temperatura de salida de entre 72-74 °C. Esto puede deberse a que, a temperaturas de salida más bajas, se obtiene una buena supervivencia de la levadura no adaptada, lo que dificulta la demostración de cualquier efecto protector de los tratamientos de estrés para maximizar la supervivencia (Desmond y cols., 2001). De manera semejante, Fu y Chen. (2011), informaron que el tiempo de residencia de los microorganismos en el ambiente estresante durante el secado es muy limitado y podría ser insuficiente para que las células implementen una respuesta activa.

La temperatura de salida está determinada por la interacción de la temperatura de entrada y la velocidad del flujo de alimentación. La temperatura del aire de entrada es la variable que tiene el mayor efecto sobre la viabilidad celular (Shokri y cols., 2015; Aguirre-Güitrón y cols., 2018). La pérdida permanente de la viabilidad puede ser causada principalmente porque las células experimentan una inactivación térmica y una rápida deshidratación celular dañando a uno o más componentes celulares vitales que son sensibles al calor, tales como, la membrana celular, pared celular, ribosomas, proteínas, ADN y ARN, lo cual lleva a la muerte celular durante

el proceso de secado (Desmond y cols., 2001; Shokri y cols., 2015; Aguirre-Güitrón y cols., 2018; Fu y Chen., 2011).

También, cabe destacar que otro de los factores más importantes que tienen influencia sobre la viabilidad, es el material protector utilizado para transportar las células durante el secado y probablemente se deba a la estabilización de constituyentes de la membrana celular, lo que resulta en una mayor viabilidad (Ananta y cols., 2005). En este sentido, la trehalosa, es conocida por su efecto osmoprotector y tanto su alto nivel de acumulación endógena en las células de la levadura durante el estrés, como su función como material de pared, mejora la supervivencia celular (Fu y Dong., 2011). La trehalosa interactúa con las membranas durante la deshidratación, y de esta manera evita la fusión de los lípidos y ruptura de membranas (Rodríguez y cols., 2015). Además, tiene la capacidad de estabilizar y prevenir la desnaturalización de las proteínas durante el secado, para ello, forma puentes de hidrógeno entre los grupos polares de la proteína e hidroxilos de la trehalosa (Rodríguez y cols., 2015; Ananta y cols., 2005; Aguirre-Güitrón y cols., 2018).

Con respecto al SPI y alginato de sodio, estos dos polímeros interactúan para formar complejos electrostáticos carga-carga. Las interacciones que forman enlaces covalentes entre proteínas y polisacáridos son particularmente deseables porque el complejo unido es más estable al calor. Además, que como resultado se obtiene una hidratación y solubilidad mejorada (Shih, 1994). Por otro lado, Hadzieva y cols. (2017), confirmaron con datos espectrales que existen enlaces de hidrógeno, así como interacciones electrostáticas e hidrófobas entre los polímeros (SPI y alginato de sodio), de tal manera se pudieron estabilizar las partes de la membrana celular y condujo a una mayor viabilidad celular.

Finalmente, cabe destacar que el nivel de viabilidad alcanzado por *M. caribbica* a (1.5 M NaCl y 38 °C) es suficiente para considerar al secado por aspersion un buen método para prolongar la vida útil de la levadura, preservar su viabilidad y protegerla de condiciones adversas del medio ambiente (Kim y cols., 2012; Rajam y cols., 2012).

6.6. Evaluación *in vitro* de la actividad antagonista de levadura estresada y microencapsulada

La evaluación *in vitro* de la actividad antagonista de *M. caribbica* frente a *C. gloeosporioides* Pa14, se realizó con micelio y esporas del fitopatógeno. Al utilizar suspensión de esporas, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del tratamiento con levadura estresada y microencapsulada fue de 91.10%, mismo que fue estadísticamente igual a los tratamientos control con levadura fresca y estresada (100%) ($p>0.05$). Por el contrario, con micelio, la actividad antagonista de *M. caribbica* estresada y microencapsulada disminuyó a 72.88%, en comparación con la levadura fresca estresada que inhibió el 76.98% ($p>0.05$) (Cuadro 6.6).

Los porcentajes de inhibición fueron mayores con esporas, ya que la levadura impide el desarrollo del tubo germinativo de la espóra, fijándose sobre ella y degradando su pared celular mediante enzimas hidrolíticas, como se describió anteriormente.

Con estos resultados se evidenció que hay una ligera disminución en el poder antagónico de la levadura durante el proceso de secado, similar a lo reportado por Abadias y cols. (2005), quienes aseveraron que las células de *Candida sake*

secadas por aspersión fueron menos efectivas que las células frescas para el control de la pudrición de *Penicillium expansum* en manzanas. Sin embargo, en este estudio, al no resultar estadísticamente diferentes, les puede permitir inhibir el crecimiento micelial del hongo con una actividad similar a la de las células frescas estresadas.

Cuadro 6.6. Evaluación *in vitro* de *M. caribbica* estresada y microencapsulada frente *C. gloeosporioides Pa14*.

Tratamiento	% Inhibición del crecimiento micelial	
	Micelio	Esporas
<i>M. caribbica</i> estresada y microencapsulada	72.88 ± 7.40 ^a	91.10 ± 13.80 ^{ab}
<i>M. caribbica</i> microencapsulada	61.69 ± 3.99 ^c	89.94 ± 17.35 ^a
<i>M. caribbica</i> estresada control	76.98 ± 9.79 ^a	100 ^b
<i>M. caribbica</i> control	47.61 ± 10.94 ^b	100 ^{ab}

Los valores con la misma letra en cada columna no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Cada tratamiento incluyó cuatro placas y el experimento se repitió dos veces

6.7. Eficacia de biocontrol de *M. caribbica* estresada y microencapsulada

Se evaluó la eficacia de biocontrol de diferentes tratamientos con *Meyerozyma caribbica* fresca y microencapsulada sobre la incidencia y severidad de la enfermedad de antracnosis en frutos de aguacate (Figura 6.9). Los frutos presentaron los síntomas de la enfermedad después de 3 días de almacenamiento. Todos los tratamientos mostraron 100% de incidencia a los 10 días de almacenamiento (Figura 6.9) ($p>0.05$).

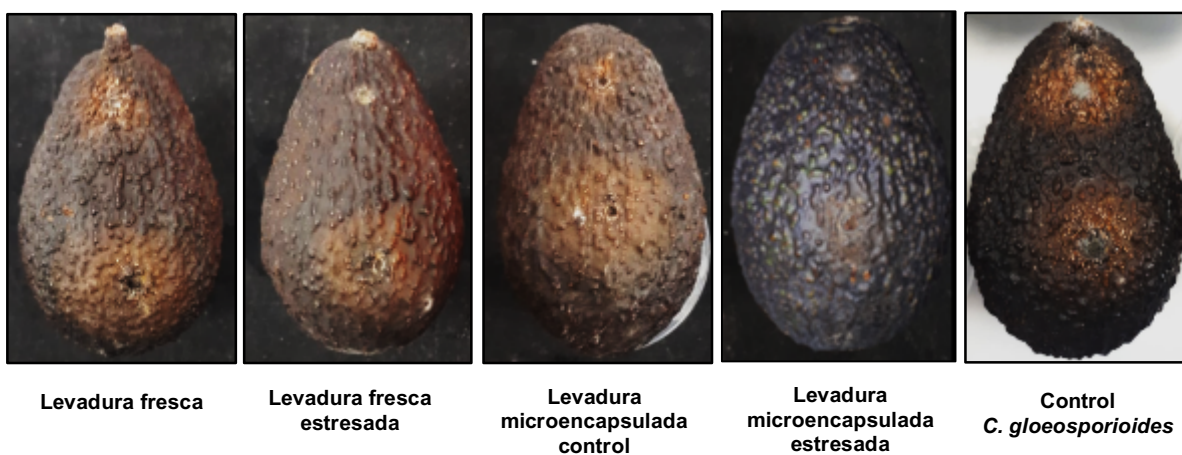


Figura 6.9. Tratamientos contra la infección causada por *C. gloeosporioides* en aguacate cv. Hass.

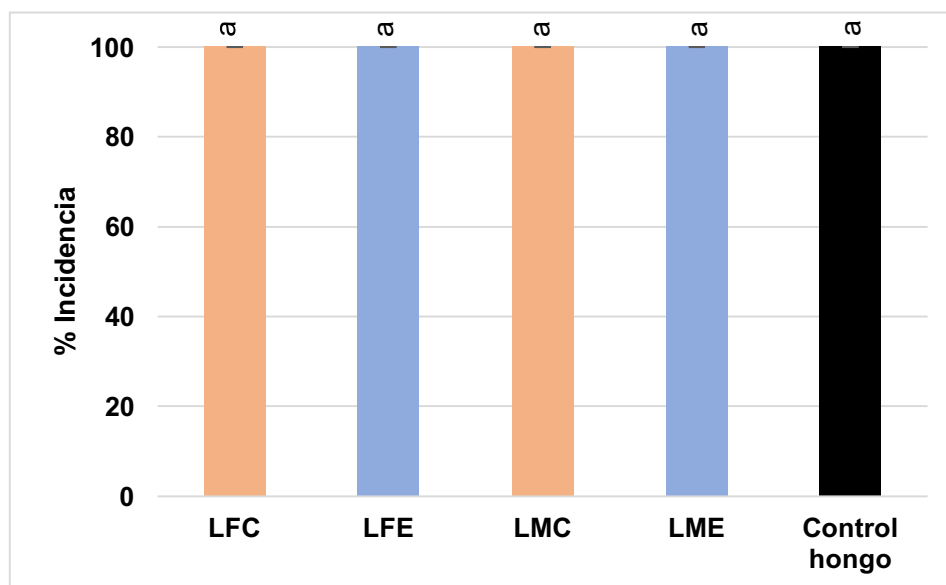


Figura 6.10. Incidencia de *C. gloeosporioides* Pa14 en frutos de aguacate almacenados a 27 ± 1 °C. LFC: levadura fresca control, LFE: levadura fresca estresada, LMC: levadura microencapsulada control, LME: levadura microencapsulada estresada.

No obstante, todos los tratamientos lograron reducir la severidad de la enfermedad en comparación con el tratamiento control (Figura 6.10). El diámetro de la lesión de los frutos control inoculados con el patógeno y frutos con levadura fresca fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$) con un diámetro de 1.76 cm y 1.58 cm respectivamente, la levadura fresca obtuvo una reducción de la severidad del 10.22% comparada con el control. Por otra parte, no hubo un efecto significativo entre los tratamientos con levadura fresca control, levadura fresca estresada y levadura microencapsulada control ($p > 0.05$). El tratamiento de estrés (1.5 M y 38 °C) logró reducir la severidad en un 14.55% comparado con la levadura fresca y 23.29% comparado con el control. En particular, el mejor tratamiento se obtuvo con

la levadura microencapsulada estresada, la cual redujo el diámetro de la lesión en un 45.45% (0.96 cm) comparado con el control (1.76 cm) (Figura 6.11).

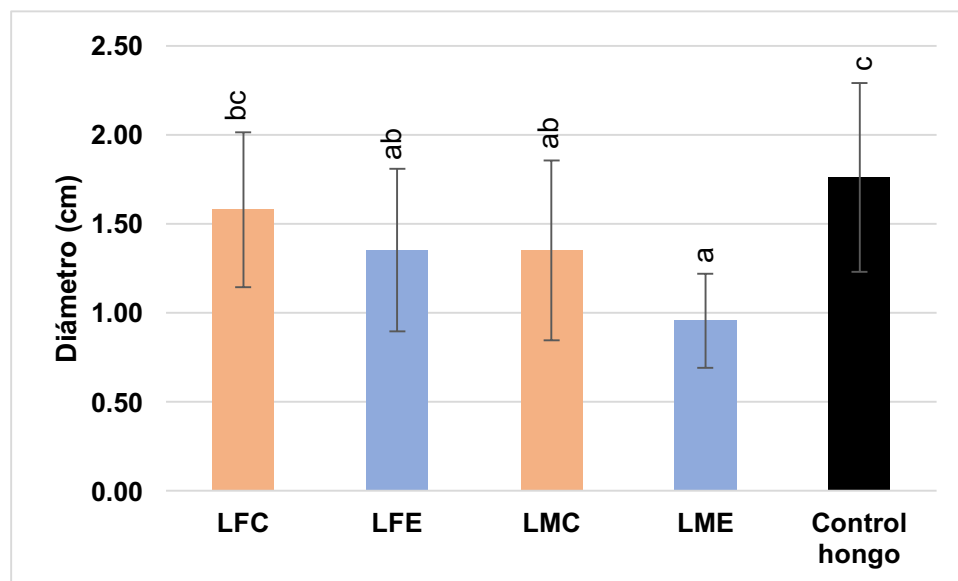


Figura 6.11. Severidad de *C. gloeosporioides* Pa14 en frutos de aguacate almacenados a 27 ± 1 °C. LFC: levadura fresca control, LFE: levadura fresca estresada, LMC: levadura microencapsulada control, LME: levadura microencapsulada estresada.

Actualmente, no existen estudios con respecto a la actividad de biocontrol de levaduras adaptadas a estrés y microencapsuladas para aplicaciones a nivel precosecha. La mayoría de los estudios relacionados se han llevado a cabo para aplicaciones poscosecha con levaduras frescas estresadas y formulaciones a base de levaduras microencapsuladas sin estrés. En el caso de levaduras frescas, Campos y cols. (2016) reportaron que frutos de aguacate tratados con *Wickerhamomyces anomalus* tuvieron un diámetro de lesión causado por *Colletotrichum gloeosporioides* de 1.79 cm, comparado con el control (2.7 cm),

logrando una reducción de la severidad del 33.70%. Sin embargo, comparado con los datos de esta investigación, la reducción de la severidad fue menor al emplear a *M. caribbica* fresca (10.22 %). En relación con lo anterior, Luo y cols. (2015) informaron que la eficacia de biocontrol depende de factores como la concentración (a mayor concentración del antagonista, mejor actividad de biocontrol) y algunos factores que probablemente contribuyeron a obtener altos porcentajes de incidencia y severidad son: el tiempo de inmersión (menor tiempo de inmersión, menor incidencia de la enfermedad), los autores encontraron que 1 h fue el tiempo más adecuado ya que un tiempo menor o más prolongado puede dañar la calidad del fruto y causar enfermedades, sin embargo, en este estudio los tratamientos con levadura fueron aplicados por aspersión. Otro aspecto importante es la fuente de aislamiento de la levadura, se reportó una mayor eficacia de biocontrol al aplicar al antagonista en el mismo fruto de donde fue aislado. Lo que difiere del presente estudio, ya que *M. caribbica* fue aislada de la superficie de mango cv Ataulfo y no de frutos de aguacate.

En cuanto a los tratamientos con levaduras frescas estresadas, un resultado similar al presente estudio fue reportado por Wang y cols. (2010), quienes no obtuvieron diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad entre las frutas tratadas con *Rhodosporidium paludigenum* no modificada y modificada con NaCl. Sin embargo, demostraron que el efecto de biocontrol de la podredumbre negra causada por *A. alternata* en frutos de peras fue mayor con el tratamiento de *R. paludigenum* modificada con NaCl al 6.6%, cuyo diámetro de la lesión fue de 0.39 mm y 15% de incidencia. En este caso la baja eficacia de biocontrol de las células de *M. caribbica* sometidas a estrés puede deberse a que tuvieron una dificultad en la colonización y baja supervivencia en la superficie del exocarpio, ya que comparado con los resultados *in vitro* la levadura no se encontró en un medio rico

en glucosa, nitrógeno, aminoácidos y vitamina B, lo que contribuyó a mejorar eficazmente su viabilidad en presencia de estos sustratos (Lahlali y Jijakli, 2009). Otra posible causa se le puede atribuir a que la susceptibilidad del aguacate al ataque de *C. gloeosporioides*, está regulada por más de un mecanismo: una disminución en el nivel de compuestos antifúngicos y un aumento en el pH del pericarpio que modula la secreción de la pectato liasa (PL) (Rodríguez y cols., 2009; Berecochea-López y cols., 2015). En este sentido, Yakoby y cols. (2000) reportaron que la secreción de (PL) se detectó cuando el pH del pericarpio inmaduro de frutos de aguacate recién cosechados alcanzó 5.8, mientras que en los frutos maduros el nivel de secreción aumentó hasta pH 6.5 y fue cuando se expresaron los síntomas de descomposición. La secreción de PL nunca se detectó cuando el pH del medio era inferior a 5.8. En el presente estudio, se emplearon frutos en etapa de madurez fisiológica, cuyo pH aumentó con los días de almacenamiento, los síntomas de la enfermedad se mostraron a partir del tercer día, favoreciendo la patogenicidad de *C. gloeosporioides* al permitir que la punta de infección del apresorio penetrara al fruto mediante enzimas degradadoras de la pared celular como la pectato liasa y posteriormente colonizara las células del tejido del hospedero.

Respecto a las bioformulaciones a base de levaduras microencapsuladas probadas para el control de enfermedades poscosecha, Aguirre-Güitrón y cols. (2018, 2019) no encontraron diferencias significativas al aplicar a *M. caribbica* como levadura fresca y en formulación en polvo en una prueba *in vivo*. La formulación fue capaz de reducir la incidencia y severidad de antracnosis en frutos de mango hasta un 53.4% y un 23.9%, respectivamente. Comparando ambas formulaciones, *M. caribbica* microencapsulada con SPI+alginate Na, resultó ser más efectiva en reducir hasta el 45.45% la severidad de antracnosis en frutos de

aguacate. Por otra parte, Carbó y cols. (2019) reportaron que la formulación de *C. sake* secada por aspersión en lecho fluidizado redujo el 56% la severidad de *B. cinerea* en uvas. Sus observaciones se relacionaron con lo obtenido en la presente investigación, ya que la formulación en polvo tuvo un porcentaje de severidad menor que las células frescas y esto puede deberse a que las células, encapsuladas junto con aditivos nutricionales pueden protegerse de condiciones adversas del medio ambiente y mejorar su actividad fisiológica, lo que lleva a una mayor viabilidad celular (Kim y cols., 2012). Tomando en cuenta dicho supuesto, *M. caribbica* microencapsulada presentó un menor diámetro de la lesión comparada con las células frescas y *M. caribbica* estresada y microencapsulada un porcentaje de severidad menor que el tratamiento con levadura microencapsulada control, sin embargo, éstos no resultaron ser estadísticamente diferentes. La mayor actividad de biocontrol se le atribuyó a que previamente potenció su actividad antagónica durante el estrés hídrico y térmico.

Aunque el tratamiento con levadura estresada y microencapsulada aplicado en poscosecha no fue efectivo en reducir la incidencia y severidad de la enfermedad, se espera que tenga mayor efecto de biocontrol al aplicarla en el campo, de tal forma *M. caribbica* podría colonizar la superficie del fruto de manera temprana anticipándose a la llegada del patógeno y protegerlo contra infecciones quiescentes. Similar a lo reportado por Lopez-Cruz y cols. (2019), donde *M. guilliermondii* microencapsulada aplicada en poscosecha, controló el 56.6% la incidencia de antracnosis en frutos de mango, mientras que al aplicarla en campo + poscosecha controló el 72.9% la incidencia de la enfermedad.

Se ha informado que las levaduras antagonistas pueden actuar como un bio-inductor de la resistencia del fruto contra los patógenos. Las respuestas del fruto

generan cambios en la expresión génica asociadas con una mayor resistencia a la infección por patógenos (Liu y cols., 2013). Sharma y cols. (2009) reportaron que la producción de compuestos antifúngicos en las células huésped del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill) ayudó a inducir el mecanismo de defensa. Otro tipo de respuestas producidas por los antagonistas microbianos son la inducción de proteínas antioxidantes y PR (proteínas relacionadas a la patogénesis), aumento en la producción de fitoalexinas (scoparona, escopoletina y umbeliferona) e inducción de ROS (Liu y cols., 2013; Spadaro y Droby., 2016). Las levaduras antagonistas influyen en la producción de ROS y en la señalización de defensa en los tejidos de la fruta. Una explosión oxidativa, durante la cual se generan grandes cantidades de ROS, es una de las primeras respuestas del huésped al ataque de patógenos (Liu y cols., 2013). Por otra parte, se ha reportado que las levaduras inducen la activación de defensas estructurales específicas, como la formación de protuberancias a lo largo de las paredes celulares del tejido; cuya actividad coincide con la producción de quitinasa y β -1-3-glucanasa (Nantawanit y cols., 2010).

Aunque las condiciones poscosecha proporcionan un entorno especial para el desarrollo de sistemas de control biológico, la aplicación de estos agentes antes de la cosecha puede tener ventajas en comparación con los tratamientos posteriores a la cosecha. En este aspecto, Teixidó y cols. (1998) concluyeron que con la aplicación de *C. sake* dos días antes de la cosecha, la población del tratamiento con células modificadas a baja aw (0.96) aumentó hasta 30 días durante el almacenamiento y controlaron el moho azul causado por *P. expansum* en manzanas "Golden Delicious". Además, la aplicación de una levadura antagonista en etapa de precosecha podría permitir una colonización preventiva de la superficie del fruto o de una herida inmediatamente después de que se haya

infligido, durante la cosecha o posterior manejo. En este caso, el antagonista tendría más tiempo para colonizar y saturar la herida fresca antes de la llegada del patógeno. En particular, al mejorar la tolerancia al estrés les puede permitir sobrevivir y establecerse en la superficie de las frutas en condiciones ambientales que son naturalmente fluctuantes, y al mismo tiempo proporciona un método para mejorar su eficacia en el campo sin afectar su potencial de biocontrol (Teixidó y cols., 2006).

Finalmente, cabe señalar que otra posible alternativa para aumentar la actividad de biocontrol de *M. caribbica* se ha llevado a cabo aumentando la actividad enzimática de las levaduras (Iñiguez-Moreno y cols., 2019). Bautista-Rosales y cols. (2013) encontraron que la actividad de la β -1, 3-glucanasa y quitinasa de *M. caribbica* incrementó en cultivo *in vitro* con micelio estéril, esto debido a que las interacciones levadura-patógeno se deben a un sistema de reconocimiento de señales entre las células de levadura, y las hifas fúngicas.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Se aisló e identificó a *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la enfermedad de antracnosis y principal responsable de las pérdidas de aguacate a los niveles pre y poscosecha.

El estrés hídrico y térmico permitió que las levaduras aumentaran su viabilidad en condiciones adversas de baja aw y alta temperatura. Al mismo tiempo proporcionó un método para potenciar su actividad antagónica. *In vitro* *Meyerozyma caribbica* mostró la mejor tolerancia al estrés y eficacia de control biológico.

El estrés hídrico y térmico no fue útil como método para aumentar o disminuir la supervivencia de la levadura durante el secado por aspersión. Sin embargo, los mecanismos de protección adquiridos durante el estrés, le pueden permitir en condiciones de campo la capacidad de sobrevivir y resistir condiciones ambientales adversas.

Todos los tratamientos aplicados contra la infección causada por *C. gloeosporioides* mostraron 100% de incidencia. El mejor tratamiento con levadura estresada y microencapsulada logró reducir la severidad de antracnosis en un 45.45%. Al obtener un alto porcentaje de incidencia y severidad, no se considera un tratamiento efectivo para aplicaciones en poscosecha. Sin embargo, su capacidad para mantener e incluso aumentar su viabilidad bajo condiciones de estrés, representa un atributo importante con respecto a su uso como agente de

biocontrol para aplicaciones en etapa de precosecha, tomando en cuenta que la presencia de la levadura antes de las fases iniciales del ciclo de la enfermedad del patógeno es de vital importancia para controlar las infecciones previamente establecidas.

PERSPECTIVAS

Se espera que *Meyerozyma caribbica* estresada y microencapsulada tenga mayor efecto de biocontrol al aplicarla en etapa de precosecha, de tal forma podría colonizar la superficie del fruto de manera temprana anticipándose a la llegada del patógeno y protegerlo contra infecciones quiescentes.

CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I. and Magan, N. 2001. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Canadian Journal of Microbiology* 47:123-129.

Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Solsona, C. and Viñas, I. 2005. Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. *Biocontrol Science and Technology* 15(8):835–846.

Abu, S., Droby, S. and Korine, C. 2014. Seasonal and plant-dependent variations in diversity, abundance and stress tolerance of epiphytic yeasts in desert habitats. *Environmental Microbiology Reports* 6(4):373–382.

Aceves-Gómez, M., Ragazzo-Sánchez, J., Calderón-Santoyo, M. 2008. Use of antagonistic cultures and low temperatures in the control of postharvest diseases of papaya (*Carica papaya* L.) var Maradol. In: *Advances in Food Sciences and Food Biotechnology in Developing Countries*. Soto-Cruz, O., Angel, P.M., Gallegos-Infante, A., Rodríguez-Herrera, R. (eds.). Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos pp: 217–222.

Aguirre-Güitrón, L., Calderón-Santoyo, M., Ortiz-Basurto, R., Bautista-Rosales, P., y Ragazzo-Sánchez, J. 2018. Optimisation of the spray drying process of formulating the post-harvest biocontrol agent *Meyerozyma caribbica*. *Biocontrol Science and Technology* 28(6):574-590.

Aguirre-Güitrón, L., Calderón-Santoyo, M., Bautista-Rosales, P. U., and Ragazzo-Sánchez, J. A. 2019. Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). *LWT-Food Science and Technology* 113:1-6.

Almagro, A., Prista, C., Catro, S., Quintas, C., Madeira, A., Ramos, J. and Loureiro, M. 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology* 56:191–197.

Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal* 15(4):399–409.

Bang, A., Boqiang, L., Guozheng, Q. and Shiping, T. 2012. Exogenous Calcium Improves Viability of Biocontrol Yeasts Under Heat Stress by Reducing ROS Accumulation and Oxidative Damage of Cellular Protein. *Current Microbiology* 65:122–127.

Barkai, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control. Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands. pp.:33.

Barrón, R. 2018. Aplicación de recubrimientos a base de pectinas adicionados de agentes de biocontrol para el control de enfermedades postcosecha en frutos de papaya variedad Maradol (*Carica papaya* L). Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic. Tepic, Nay., México.

Bautista-Rosales P., Calderón-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N. and Ragazzo-Sánchez, J. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control* 65:293-301.

Behboudi, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I. 2013. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology* 31(11):1274-1283.

Benbow, J. and Sugar, D. 1999. Fruit Surface Colonization and Biological Control of Postharvest Diseases of Pear by Preharvest Yeast Applications. *Plant Disease* 83:839-844.

Berecochea-López, A., Ragazzo-Sánchez, J., Allende-Molar, R., Ávila-Quezada, G. and Calderón-Santoyo M. 2015. *Colletotrichum gloeosporioides* from Mango Ataulfo: morphological, physiological, genetic and pathogenic aspects. *Journal of Research in Biology* 5(2):1641-1647.

Bill, M., Sivakumar, D., Thompson, A.K. and Korsten L. 2014. Avocado Fruit Quality Management during the Postharvest Supply Chain. *Food Reviews International* 30(3):169–202.

Bonifaz, J. 2012. *Micología Médica Básica*. Cuarta edición, Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México, D.F. pp.: 563.

Breuer, U. and Harms, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Interscience* 23:415-437.

Bustos, P. and Bórquez, R. 2013. Influence of Osmotic Stress and Encapsulating Materials on the Stability of *Autochthonous Lactobacillus plantarum* after Spray Drying. *Drying Technology: An International Journal* 31(1):57-66.

Campos, A. 2014. Identificación de levaduras y evaluación de su capacidad para inhibir a *Colletotrichum spp.* causante de la antracnosis en aguacate (*Persea americana Mill*). Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos., México.

Campos, A., Velázquez, M.G., Flores. H.E., Suárez, R., Ramírez, J.A. and Hernández, A.N. 2016. Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. *Crop protection* 89:101-104.

Carbó, A., Teixidó, N., Usall, J., Solsona, C. and Torres, R. 2019. Shelf life improvement of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 by suitable package and storage conditions. *BioControl* 64:435-466.

Cargnello, M. and Roux, P. 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(1):50–83.

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

Chandralekha, A., Tavanandi, A., Amrutha, N., Hebbar, H., Raghavarao, KSMS. and Gadre, R. 2016. Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life. *Drying Technology* 34(11):1307–1318.

Chao, H., Yen, Y. and Ku, M. 2009. Characterization of a salt-induced *DhAHP*, a gene coding for alkyl hydroperoxide reductase, from the extremely halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *BioMed Central Microbiology* 9(1):1-14.

Charlet, L.D., Olson, D. and Glogoza, P.A. 2002. Biological Control of Insect and Weed Pests in North Dakota Agriculture: North Dakota State University.

Chehri, K., Salleh, B. and Zakaria, L. 2014. Morphological and Phylogenetic Analysis of *Fusarium solani* Species Complex in Malaysia. *Microbial Ecology* 69(3):457–471.

Coronato, S., Di Girolamo, W., Salas, M., Spinelli, O. y Laguens, G. (1999). Biología de las Proteínas del Shock Térmico. *Medicina - Volumen* 59(5): 477-484.

Cowan, K. and Storet, J. 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology* 206(7):1107–1115.

Demoz, B.T. and Korsten, L. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control* 37(1):68-74.

Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G., Collins, K. and Paul, R. 2001. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 11(10):801–808.

Desai, K. and Park, H.J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology: An international Journal* 23(7):1361–1394.

Domínguez, I., Mohali, S., Marín, M. and Pino, H. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology* 37(2):108-122.

Feldmann, H., Branduardi, P., Dujon, B., Gaillardin, C. and Danilo Porro. 2010. *Yeast Molecular and Cell Biology*. Edited by Horst Feldmann. Wiley- Blackwell, Weinheim, Germany. pp.: 294.

Folch, J., Garay, A., Lledías, F. and Covarrubias, A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 46(1-2): 24-46.

Fu, N., and Chen, X. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International* 44(5):1127–1149.

Gamagae, S., Sivakumar, D., Wijeratnam, R. and Wijesundera, R. 2003. Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. *Crop Protection* 22(5):775–779.

Giraldo, N., Bustamante, S., Pinzón, Y., and Buitrago, G. 2016. Molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from yam plants of Colombia Atlantic Coast using DNA Amplification Fingerprinting technique (DAF).” *Revista Colombiana de Biotecnología* 18(1):95-103.

González, J., Jiménez, M. and Peña, A. 2005. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles* 9(1):7–16.

González-Estrada, R., Ascencio-Valle, F., Ragazzo-Sánchez, J. and Calderón-Santoyo, M. 2017. Use of a marine yeast as a biocontrol agent of the novel pathogen *Penicillium citrinum* on Persian lime. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29(2): 114-122.

Gotor, A., Usall, R., Torres, R., Ramos, M.C. and Teixidó, N. 2017. Environmental stress responses of the *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 formulated products on nectarines and peaches. *Scientia Horticulturae* 225:359-365.

Grzegorzczak, M., Zarowska, B., Restuccia, C. and Cirvilleri, G. 2017. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology* 61:93–101.

Guarnaccia, V., Vitale, A., Cirvilleri, G., Aiello, D., Susca, A., Epifani, F. and Polizzi, G. 2016. Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 146(4):963–976.

Guetsky, R., Kobilier, I., Wang, X., Perlman, N., Gollop, N., Ávila, G. and Prusky, D. 2005. Metabolism of the Flavonoid Epicatechin by Laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and Its Effect on Pathogenicity on Avocado Fruits. *Phytopathology* 95(11):1341–1348.

Gutiérrez, J., Nieto, D., Téliz, D. y Zavaleta, E. 2001. Características de Crecimiento, Germinación, Esporulación y Patogenicidad de Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de Frutos de Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1).

Hadzieva, J., Mladenovska, K., Simonoska, M. and Glavas, M. 2017. *Lactobacillus casei* Encapsulated in Soy Protein Isolate and Alginate Microparticles Prepared by Spray Drying. *Food Technol. Biotechnol* 55(2):173–186.

Hernández, A. N., Bautista, S., Velázquez, M.G y Hernández, A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1):66-74.

Hernández, L., Ochoa, J., Troyo, J. and Larralde, C. 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology* 56:181-187.

Hernández, L., Gutiérrez, E., Murillo, B., Vero, S., Chiquito, R. and Rincón, G. 2018. Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 139:31-37.

Iñiguez-Moreno, M., González-Gutiérrez, K.N., Ragazzo-Sánchez, J. A., Sandoval-Contreras, T., Narváez-Zapata, J.A. y Calderón-Santoyo, M. Inhibición *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) por *Meyerozyma caribbica* en películas de alginato de sodio. IV Congreso en Tendencias en Ciencias de Alimentos y Desarrollo Tecnológico. Guadalajara, Jalisco, México, Octubre, 2019.

Ippolito, A. and Nigro, F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop protection* 715-723.

Kimaru, K., Monda, E., Cheruiyot, R., Mbaka, J. and Alakonya, A. 2018. Morphological and Molecular Identification of the Causal Agent of Anthracnose Disease of Avocado in Kenya. *International Journal of Microbiology* 2018:1–10.

Klokk, T.I. and Melvik, E. 2002. Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potential. *Taylor&Francis health sciences* 19(4):415-424.

Kim, I., Lawrence, P., Zhao, Y., Korban, S., Choi, H. and Kim, K. 2012. Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of Apple. *Journal of Controlled Release* 161:109-115.

Kitinoja, L. and Kader, A. 2015. Measuring postharvest losses of fresh fruits and vegetables in developing countries. *Postharvest Education Foundation*. 25 pages.

Lahlali, R. and Jijakli, M. 2009. Enhancement of the biocontrol agent *Candida oleophila* (strain O) survival and control efficiency under extreme conditions of water activity and relative humidity. *Biological Control* 51(3):403–408.

Lakshmi, M., Amrutha, N., Hrishikesh, A. and Raghavarao, K. 2015. Stabilization of Lipoxygenase-1 from Glycine max by microencapsulation. *Drying Technology: An International Journal* 0:1–9.

Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Tian, S., Hershkovitz, V. and Tworkoski, T. 2011. Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. *FEMS Microbiology Ecology* 76(1):145–155.

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., and Liu, Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology* 167:153–160.

López, R. 2019. Evaluación de la aplicación precosecha del agente de biocontrol microencapsulado *Meyerozyma guilliermondii* para el control de antracnosis en mango (*Mangifera indica* L). Avance de Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic. Tepic, Nay., México.

López-Cruz, R., González-Gutiérrez, K. N., Ragazzo-Sánchez, J. A., Narváez-Zapata, J. A., y Calderón-Santoyo, M. Aplicación precosecha de *Meyerozyma guilliermondii* para el control de antracnosis en mango cv Kent. XXI Congreso

Internacional de Inocuidad de Alimentos. Puerto Vallarta, Jalisco., México, noviembre, 2019.

Luo, S., Wan, B., Feng, S. and Shao, Y. 2015. Biocontrol of Postharvest Anthracnose of Mango Fruit with *Debaryomyces nepalensis* and Effects on Storage Quality and Postharvest Physiology. *Journal of Food Science* 80(11).

Magallón-Andalón, C., Luna-Solano, G., Ragazzo-Sánchez, J. and Calderón-Santoyo, M. 2012. Parasitism and Substrate Competitions Effect of Antagonistic Yeasts for Biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya (*Carica papaya* L.) var Maradol. *Mexican Journal of Scientific Research* 1(1):2-9.

Mahasuk, P., Chinthaisong, J. and Mongkolporn, O. 2013. Differential resistances to anthracnose in *Capsicum baccatum* as responding to two *Colletotrichum* pathotypes and inoculation methods. *Breeding Science* 63(3):333–338.

Marquina, D., Barroso, J., Santos, A. and Peinado, J. M. (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiological Research*, 156:387–391.

Medina, N., López, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa, A. and Angulo, C. 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control* 97:70-79.

MIKOBANK, Fungal Databases, Nomenclature and Species Banks. 2019. MIKOBANK DATABASE <http://www.mycobank.org/>

Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., and Yahia, L. 2001. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International journal of Pharmaceutics* 226(1):1-21.

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

Morales, J., Azpíroz, H. y Pedraza, M. 2009. Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México. *Revista UDO Agrícola* 9(4):848-856.

Mortensen, H., Gori, K., Siegumfeldt, H., Nissen, P., Jespersen, L. and Arneborg, N. 2005. Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hansenii* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(5):713–719.

Musa, H., Kasim, F., Nagoor, A. and Gopinath, S. 2018. Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental biotechnology. *Process Biochemistry* 69:33–44.

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

Ocampo-Suárez, I. B., Sánchez-Salas, J. L., Ragazzo-Sánchez, J. A., & Calderon-Santoyo, M. (2017). Evaluation of the toxicity and pathogenicity of biocontrol agents in murine models, chicken embryos and dermal irritation in rabbits. *Toxicological Research* 6(2): 188–198.

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

Patiño, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., and Galindo, E. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potencial biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology* 99:540-550.

Prista, C., Loureiro, M., Montiel, V. and Ramos, J. 2005. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* 5(8):693–701.

Ragazzo-Sánchez, J., Gutiérrez-Escatel, A., Luna-Solano, G., Gómez-Leyva, J. and Calderón-Santoyo, M. 2011. Molecular identification of the fungus causing postharvest rot in jackfruit. *Revista Mexicana de Micología* 34:9-15.

Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. and Anandharamakrishnan, C. 2012. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods* 4(4):891–898.

Rathore, S., Desai, P., Liew, C., Chan, L., and Heng, P. 2013. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering* 116(2):369–381.

Reddy, K., Madhu, N., and Prapulla, S. 2009. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Technology* 62(2):240-248.

Rodríguez, S., Pérez, R. e Iturriaga, G. 2015. La trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México* 3(1):1-13.

Rodríguez, E.S., González, J.M. y Pérez, N.M. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(1).

Rojas, S. and Ávila, G.D. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*. 60:899-908.

Román, E.A. y Yahia, E. 2002. Manejo postcosecha del aguacate. *Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica* 9(2):5-16.

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2018. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. SAGARPA www.sagarpa.gob.mx.

Sanders, G. and Korsten, L. 2003. A comparative morphological study of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Canadian Journal of Botany* 81(8):877–885.

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

Sharma, G., Maymon, M., and Freeman, S. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports* 7(1):1-16.

Shih, F. F. 1994. Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71(11):1281–1285.

Shokri, Z., Fazeli, M., Ardjmand, M., Mousavi, S., and Gilani, K. 2015. Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(1).

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. www.gob.mx/siap

Siglioccolo, A., Paiardini, A., Piscitelli, M. and Pascarella, S. 2011. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology* 11(1):1-12.

Silva, H. and Ávila, G. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology* 60(5):899–908.

Spadaro, D. and Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast Antagonists. *Trends in Food Science & Technology* 47:39-49.

Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S. and Liu, J. 2015. Responses of Yeast Biocontrol Agents to Environmental Stress. *Applied and Environmental Microbiology* 81(9):2968–2975.

Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J. and Magan, N. 1998. Control of Blue Mold of Apples by Preharvest Application of *Candida sake* Grown in Media with Different Water Activity. *Phytopathology* 88(9):960–964.

Teixidó, N., Cañamás, T., Abadías, M., Usall, J., Solsona, C., Casals, C. and Viñas, I. 2006. Improving low water activity and desiccation tolerance of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 by osmotic treatments. *Journal of Applied Microbiology* 101(4):927–937.

Teixidó, N., Usall, J., Torres, R., Abadías, M. and Viñas, I. 2011. Improving the efficacy of postharvest biocontrol agents - production of environmental stress tolerant formulations. *Acta Horticulturae* (905):221–226.

Trabelsi, R., Sellami, H., Gharbi, Y., Krid, S., Cheffi, M., Kammoun, S. and Triki, M. 2017. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *3 Biotech* 7(1):1-9.

Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F., Ulloa, J., Ramírez-Ramírez, J., Ragazzo-Sánchez, J., Calderón-Santoyo, M. and Bautista-Rosales, P. 2017. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose in avocado Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 19:3953-3964.

Wang, Y., Wang, P., Xia, J., Yu, T., Lou, B., Wang, J. and Dong, X. 2010. Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *International Journal of Food Microbiology* 143:103–108.

Yakoby, N., Kobilier, I., Dinoor, A. and Prusky, D. 2000. pH Regulation of Pectate Lyase Secretion Modulates the Attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on Avocado Fruits. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3):1026–1030.