



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Rocío Cruz Muñoz
Ingeniero en Alimentos

**PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE *Pycnoporus sanguineus* CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA EN HONGOS Y BACTERIAS FITOPATÓGENAS**

Dirigida por

Dr. Ramón Villanueva Arce y Dr. Jorge Yáñez Fernández

México, D.F. 06 de Enero de 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 06 del mes de enero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la UPIBI para examinar la tesis titulada:
Producción de extractos de *Pycnoporus sanguineus* con actividad antimicrobiana en hongos y bacterias fitopatógenas

Presentada por el alumno:

CRUZ MUÑOZ ROCÍO
Apellido paterno Apellido materno
Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	0	6	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Jorge Yañez Fernández

Dr. Ramón Villanueva Arce

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Dra. Silvia Bautista Baños

Dr. Fabián Robles Martínez



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES POLITÉCNICO NACIONAL

**UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de México D.F. el día 6 del mes de enero del año 2012, el que suscribe Rocío Cruz Muñoz alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A100062, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Jorge Yáñez Fernández y codirección Dr. Ramón Villanueva Arce y cede los derechos del trabajo intitulado “Producción de extractos de *Pycnoporus sanguineus* con actividad antimicrobiana en hongos y bacterias fitopatógenas”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección rarce74@hotmail.com y/o rocum@hotmail.com.

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Rocío Cruz Muñoz

Declaración de originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."



Rocío Cruz Muñoz.

Vo. Bo.



Dr. Ramón Villanueva Arce



Dr. Jorge Yáñez Fernández

Resumen

El objetivo de este trabajo fue producir extractos crudos de dos aislamientos (H1 y H2) de *P. sanguineus* y evaluar su efecto en el control *in vitro* de hongos y bacterias fitopatógenas de frutas y hortalizas en postcosecha así como de interés clínico. Se determinaron las mejores condiciones de producción del pigmento naranja del hongo. Para esto se realizó un diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial en donde los factores y niveles fueron: pH (8.0, 8.5 y 9.0), medio de cultivo líquido (caldo de papa y dextrosa, y extracto de malta) y tipo de luz (normal y blanca continua). El pigmento naranja se extrajo con acetato de etilo. El pigmento se concentró y se utilizó en el control de los hongos (*Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* y *Botrytis cinérea*) y las bacterias (*Erwinia amylovar* y *Pectobacterium carotovorum*) en postcosecha; así como de bacterias de interés clínico (*Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella rhinoescleromatis*, *Yersinia enterocolitica* y *K. pneumoniae*). Las mejores condiciones de producción del pigmento fueron pH 8, medio caldo papa y dextrosa, y luz blanca continua. Se observó un efecto fungicida contra los hongos fitopatógenos, obteniéndose una reducción del 70 y 60 % del crecimiento de *B. cinerea* con la adición de 10, y 20 mg/mL del extracto crudo del pigmento de *P. sanguineus*, respectivamente. Para *C. fragarie*, la inhibición fue mayor al 50% y sólo del 40% para *C. gloeosporioides*. En el caso de las bacterias fitopatógenas, se determinó la concentración mínima inhibitoria para: *E. amylovora* (H1>12mg/mL; H2, 7mg/mL) y *P. carotovorum* (H1, 10mg/mL; H2, >12mg/mL); así como para las bacterias de interés clínico: *Salmonella typhi* (8mg/mL), *Bacillus cereus* (H1, 8mg/mL; H2,10mg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (>12mg/mL) y *Shigella dysenteriae* (8mg/mL).

Abstract

The main objective of this study was the crude extracts production of two *P. sanguineus* isolated (H1 & H2) and the test of their effect postharvest in controlling *in vitro* of fruit and vegetables fungus and fitopathogens bacteria, and also bacteria of clinical interest. The best conditions were determined through factorial treatment arrangements and Randomized Block Design. Where the factors and levels were: pH (8.0, 8.5 y 9.0), culture medium (potato dextrose broth & malt extract) and kind of light (daylight & full time white light). The orange pigment was extracted with ethyl acetate. The pigment was concentrated and test in postharvest fungus control (*Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* and *Botrytis cinérea*) and bacteria (*Erwinia amylovora* and *Pectobacterium carotovorum*). Moreover, clinical interest bacteria (*Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Yersinia enterocolitica* and *K. pneumoniae*). The best conditions for orange pigment production were pH 8, potato dextrose broth and full time white light. The fungicidal effect was observed against fitopathogens fungus with a reduction of 70 and 60 % in *B. cinerea* growth in 10 and 20 mg/mL crude extract *P. sanguineus* pigment conditions, respectively. An inhibition major of 50% was presented by *C. fragariae* and only of 40% in *C. gloeosporioides*. In fitopathogen bacteria, the minimal inhibition concentration was determined in *E. amylovora* (H1>12mg/mL; H2, 7mg/mL) and *P. carotovorum* (H1, 10mg/mL; H2, >12mg/mL). As much as in clinical bacteria for *Salmonella typhi* (8mg/mL), *Bacillus cereus* (H1, 8mg/mL; H2,10mg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (>12mg/mL) and *Shigella dysenteriae* (8mg/mL).

Agradecimientos

A mi alma mater el Instituto Politécnico Nacional. A la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología donde se realizó este trabajo en el Laboratorio de Posgrado de Biotecnología Alimentaria.

Al CONACyT por el apoyo brindado.

A la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del IPN Proyecto 20113692.

A los directores de proyecto: Dr. Ramón Villanueva Arce y Dr. Jorge Yáñez Fernández a quienes agradezco su confianza y apoyo incondicional para lograr este proyecto.

A los doctores: Silvia Bautista Baños, Fabián Robles Martínez y Gustavo Valencia del Toro quienes me brindaron su apoyo, colaboración y dedicación para el desarrollo de este trabajo.

A la paciencia y apoyo brindado por la Dra. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez.

Dedicatorias:

Este trabajo va dirigido a toda mi familia en especial a: mi madre (Josefina Muñoz Flores) quien es un ejemplo en mi vida a seguir a mi padre (Marcos Cruz Manuel) y a mi hermano (Guillermo Cruz Muñoz) que sin su apoyo, amor, comprensión y guía sería más complicado el camino recorrido.

A mi abuela (Esperanza) a quien admiro profundamente.

A mi novio: Antonio González Preciado quien me ha demostrado su cariño y comprensión a lo largo de este proyecto.

A todos mis amigos que me acompañaron a lo largo de este camino agradeciendo sus consejos, apoyo moral y por lo que les he dedicado este trabajo muy especialmente a: Angélica, Alfonso, Arturo, Delia, Elier, Flor, Gabriela, Gelacio, Gustavo, Laura, Laura J. Marisol, Maury, Miguel, Nubia, Ricardo, Sandra y Teresita.

Contenido

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL	i
Acta de Revisión de Tesis	i
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Agradecimientos.....	vi
Dedicatorias:	vii
Contenido.....	viii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Cuadros	xi
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Importancia de las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas.....	12
1.2. Enfermedades postcosecha de frutas y hortalizas	13
1.2.1. Enfermedades postcosecha causadas por hongos y bacterias	13
1.2.2. Enfermedades postcosecha causadas por bacterias	15
1.3. Principales patógenos relacionados con la inocuidad de productos frescos	16
1.4. Control de enfermedades postcosecha.....	18
1.4.1. Control químico.....	18
1.4.2. Biocontrol	20
1.4.3. Uso de extractos fúngicos de hongos basidiomicetos	22
1.4.4. Pigmentos	23
1.5. <i>Pycnoporus sanguineus</i>	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo General.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. Material biológico.....	28
4.1.1. Aislamientos de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	28
4.1.2. Bacterias y hongos fitopatógenos en postcosecha.....	29
4.1.3. Bacterias patógenas de importancia en la inocuidad de productos frescos	29
4.1.4. Producción de pigmentos de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	29
4.2. Producción de los extractos.....	30
4.3. Pruebas de control de hongos fitopatógenos <i>in vitro</i>	31

4.4.	Pruebas preliminares de actividad antibacteriana.....	32
4.4.1.	Pruebas de sensibilidad antibacterianas	32
4.4.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	33
5.	Resultados y discusión.....	34
5.1.	Aislamiento e identificación molecular de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	34
5.2.	Producción de pigmentos de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	35
5.3.	Pruebas de control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos.....	38
5.4.	Pruebas preliminares de actividad antibacteriana.....	41
5.4.1.	Pruebas de control <i>in vitro</i> de bacterias fitopatógenas y de interés clínico	41
6.	Conclusiones.....	44
7.	VII. Referencias.....	45

Índice de Figuras

FIGURA 1. ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE FRESA, AGUACATE Y PAPAYA(SOMMER ET AL., 2002).	14
FIGURA 2. PRESENCIA DE MOHO GRIS EN FRESA(SOMMER ET AL., 2002).	15
FIGURA 3. MARMOLEADO EN LECHUGA, ZANAHORIA Y PAPA (SOMMER ET AL., 2002).	15
FIGURA 4. FUEGO BACTERIANO CAUSADO POR ERWINIA AMYLOVORA EN PERA	16
FIGURA 5. BASIDIOCARPO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS COLECTADO EN EL ESTADO DE MICHOACÁN.	24
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA CINNABARINA (TOMADO DE WWW.CHEMDRUG.COM)	25
FIGURA 7. BASIDIOCARPOS DE PYCNOPORUS SANGUINEUS COLECTADOS EN MICHOACÁN (H2).	28
FIGURA 8. ARREGLO EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN DEL PIGMENTO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS.	30
FIGURA 9. PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL PIGMENTO PRODUCIDO POR PYCNOPORUS SANGUINEUS.	30
FIGURA 10. TRATAMIENTOS REALIZADOS PARA EL CONTROL IN VITRO DE LOS HONGOS FITOPÁTOGENOS	32
FIGURA 11. AISLAMIENTOS DE LOS ESTADOS DE MÉXICO A (H1) Y MICHOACÁN B (H2).	34
FIGURA 12. DISEÑO EXPERIMENTAL EN CONDICIONES DE LUZ DE DÍA (A) Y CONTINUA (B).	36
FIGURA 13. CRECIMIENTO A LOS 2 DIAS DE B. CINEREA(A) , C. FRAGARIE(B) Y C. GLOESPOROIDES (C)	39
FIGURA 14. TESTIGO POSITIVO, PRODUCTO COMERCIAL CAPTAN [®] B. CINEREA(A) , C. FRAGARIE(B) Y C. GLOESPOROIDES (C).	39
FIGURA 15. HALO DE INHICION EN SHIGELLA DYSENTERIAE DE LOS EXTRACTOS (8 MG/ML) DE AISLAMIENTOS DE P. SANGUINEUS, H1 Y H2 .	41
FIGURA 16. ESPECTROGRAMA DE UV DEL PIGMENTO DE COLOR NARANJA EXTRAÍDO DE H1.	43
FIGURA 17. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS H1 Y H2	43

Índice de Cuadros

CUADRO 1. PRINCIPALES HONGOS Y BACTERIAS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSTCOSECHA.	13
CUADRO 2. BROTES DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS) DE PRODUCTOS.....	17
CUADRO 3. FUNGICIDAS COMERCIALES USADOS ACTUALMENTE EN LA AGRICULTURA MEXICANA.	¡ERROR!
MARCADOR NO DEFINIDO.	
CUADRO 4. COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA PRODUCIDOS POR BASIDIOMICETOS	23
CUADRO 5. SECUENCIA DE PARES DE BASES OBTENIDOS DE LOS AISLAMIENTOS H1 Y H2	35
CUADRO 6. EFECTO DEL PH, MEDIO DE CULTIVO Y TIPO DE LUZ EN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTO,	¡ERROR!
MARCADOR NO DEFINIDO.	
CUADRO 7. COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL RADIO DE CRECIMIENTO DE HONGOS	37
CUADRO 8. COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL CRECIMIENTO DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN PDA CON EXTRACTOS FÚNGICOS DE P. SANGUINEUS (H1 Y H2) Y FUNGICIDAS COMERCIALES.	40
CUADRO 9. HALOS DE INHIBICIÓN DE EXTRACTOS (8 MG/ML) DE AISLAMIENTOS (H1 Y H2) DE	41
CUADRO 10. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE AISLAMIENTOS DE P.SANGUINEUS (H1 Y H2) EN BACTERIAS PATÓGENAS Y FITÓPATOGENAS.	42

....

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas

La importancia de las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas radica en que se requirió una inversión de dinero y tiempo para su producción, distribución y venta a los consumidores finales implicando pérdidas económicas en regiones productoras. Se mencionan a continuación las estadísticas de estas pérdidas.

La FAO (1993), calcula en 25% las pérdidas postcosecha por consecuencias de manipulación inadecuada, deterioro, plagas y enfermedades, implicando que una cuarta parte de la producción no llegue al consumidor. Además, menciona que las frutas, hortalizas, raíces y tubérculos son mucho menos resistentes y se deterioran rápidamente por lo que implica un mayor cuidado en su manipulación y transporte. Por esta razón, en algunos países en vías de desarrollo es difícil calcular las pérdidas pero en algunos productos como plátanos, tomates y cítricos es de no menos del 50%, la mitad de lo producido (Wilson y Lawrence, 1985).

Wilson y Lawrence (1985), mencionan que en el caso de las pérdidas postcosecha ocasionadas por microorganismos, no han recibido la atención de la magnitud del problema. Es difícil tener una estimación completa de las pérdidas debidas a las enfermedades, sin embargo, las aproximaciones conservadoras revelan pérdidas en EEUU para frutas y hortalizas de un 24% del total de la cosecha. Estos mismos autores también refieren que en países menos desarrollados las pérdidas son aún mayores debido a la falta de refrigeración adecuada e higiene. De esta manera, concluyen que en el mundo, las pérdidas aproximadas son del 50% de la cosecha y mucha de ella se debe a la pudrición causada por microorganismos.

Por su parte Bajpai *et al.*, (2007) mencionan que las pérdidas precosecha en el mundo causadas por hongos pueden ser del 12% o incluso superior en los países en desarrollo. Muchos patógenos, tales como *Botrytis cinerea* (moho gris), *Fusarium oxysporum* (marchitamiento vascular), *Sclerotinia sclerotiorum* (mancha acuosa), *Fusarium solani* (pudrición de la fruta), están causando graves daños a la agricultura en pre y postcosecha. De esta manera, la amenaza de las enfermedades postcosecha está en

función de la manera en cómo se manejen la mayoría de los productos hortofrutícolas y de la ahí la importancia de entender la naturaleza de los patógenos y la fisiología del producto.

1.2. Enfermedades postcosecha de frutas y hortalizas

Las enfermedades postcosecha de frutas y hortalizas son causadas básicamente por hongos (60%) y en menor proporción por bacterias, virus y nematodos. Los hongos patógenos en postcosecha son comúnmente ascomicetos e imperfectos o anamórficos así como algunos géneros antes considerados como hongos, tales como *Phytophthora* y *Phythium* (Kirk *et al.*, 2001; Sommer *et al.*, 2002).

1.2.1. Enfermedades postcosecha causadas por hongos y bacterias

Algunos de los hongos y bacterias que causan serios problemas por las pérdidas económicas de la producción en postcosecha se presentan en el Cuadro 1. Dentro de todas estas enfermedades mencionadas, las causadas por *Colletotrichum* spp. y *Botrytis cinerea* son las de mayor importancia por lo que nos ocuparemos en mayor detalle.

Cuadro 1. Principales hongos y bacterias causantes de enfermedades postcosecha.

Patógeno	Enfermedad	Frutos atacados
<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul	Pera, manzana, ciruela, kiwi, uva
<i>Monilinia fructicola</i>	Pudrición café	Durazno, cereza, ciruela
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pudrición rosada	Apio
<i>Fusarium</i> spp.	Pudrición basal	Cebolla, jitomate
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Manzana, pera, kiwi, fresa, uva, naranja
<i>Colletotrichum</i> spp.	Antracnosis	Fresa, plátano, limón, papaya, mango, aguacate
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Marmoleado	Zanahoria, papa, lechuga, apio, cebolla
<i>Erwinia amylovora</i>	Fuego bacteriano	Manzana, pera

Fuente: Sommer *et al.* (2002).

Antracnosis

La antracnosis es causada por especies de *Colletotrichum*, tales como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*, y *C. demantium*. Estas especies atacan el fruto, primordialmente en el campo, pero la enfermedad puede desarrollarse después de la cosecha. Las lesiones de antracnosis se desarrollan como lesiones hundidas, circulares, de color canela o café claro, en fruta madura o casi madura (Figura 1). Un ejemplo es *C. gloeosporioides* causante de antracnosis de muchos frutos, como manzana, aguacate, mango y papaya (Sommer *et al.*, 2002).

La infección de frutos puede causar su caída prematura, sin embargo las pérdidas más importantes se presentan en la fase de maduración (Arauz, 2000). Aún cuando no existan datos estadísticos precisos, se estiman que las pérdidas postcosecha por antracnosis en mango fluctúan entre 30 y 60% del total de la producción (Allende *et al.*, 2000).



Figura 1. Antracnosis en frutos de fresa, aguacate y papaya (Sommer *et al.*, 2002).

Moho gris

Las pudriciones por el moho gris (*Botrytis cinerea*) son de una tonalidad café claro o café y algunas veces de color café oscuro. Es la enfermedad postcosecha más seria encontrada comúnmente en fresa en almacenes y transportes refrigerados modernos (Chaves y Wang, 2004). La enfermedad es común en fresa en proceso de maduración y en fruta madura (Figura 2). La infección ocurre en fruta inmadura o verde, particularmente bajo condiciones húmedas. El hongo puede atacar el material de propagación almacenado de la fresa. Este patógeno es capaz de afectar el 95% de los frutos después de 48 h de cosechados (Matamoros, 1986).



Figura 2. Presencia de moho gris en fresa(Sommer *et al.*, 2002).

1.2.2. Enfermedades postcosecha causadas por bacterias

Dentro de las bacterias, las principales especies causantes de enfermedades o pudriciones son las causadas por las especies *Pectobacterium carotovorum* y *Erwinia amylovora* las enfermedades que causan son (Sommer *et al.*, 2002).

Marmoleado

En el caso de las enfermedades bacterianas, el marmoleado es una enfermedad causada por *Pectobacterium carotovorum* y afecta principalmente a los cultivos de las regiones subtropicales y templadas (Alippiet *al.*, 1997). Es una pudrición blanda que pudre el tejido rápidamente a temperatura ambiente. Los más afectados son zanahoria, lechuga, apio, cebolla y papa (Figura 3). Esta pudrición, en el caso de la papa, provoca pérdidas significativas de hasta 100% durante el almacenamiento de los tubérculos (Francoet *al.* 2007).



Figura 3. Marmoleado en lechuga, zanahoria y papa (Sommer *et al.*, 2002).

El fuego bacteriano

Esta enfermedad es básicamente de precosecha. Ataca a casi toda la planta (flores, brotes, hojas, frutos, ramas y tronco), siendo los frutos uno de sus preferidos. La enfermedad, causada por *Erwinia amylovora*, es considerada como la más devastadora de frutales de pepita en algunos países de Europa y Norteamérica. Es extremadamente peligrosa para el cultivo de peral y manzano. Los frutos pueden ser atacados desde el inicio de su formación hasta la madurez. La bacteria penetra a través de las lenticelas o heridas, especialmente lesiones producidas por granizo. Un síntoma característico y peculiar de esta enfermedad es la producción de exudados bacterianos en los órganos afectados (Palacio *et al.*, 2008). Es importante conocer la naturaleza del patógeno, la fisiología del hospedante y la manera de cómo afecta a ambos. Cabe citar que tras una explosión de fuego bacteriano en Egipto, en el período 1982-1984, en peral de la variedad Le Conte, en 1985 se registraron pérdidas en las cosechas cercanas al 95% (Van der Zwet y Beer, 1995).



Figura 4. Fuego bacteriano causado por *Erwinia amylovora* en pera
(Tomado de Palacio *et al.*, 2008).

1.3. Principales patógenos relacionados con la inocuidad de productos frescos

Las frutas y hortalizas que provienen del campo a la mesa tienen operaciones después de la cosecha, el envasado, transporte y el almacenamiento por lo que es muy importante implementar las buenas prácticas agrícolas (GAPs, por sus siglas en inglés) y buenas prácticas de manufactura (GMPs). Un riesgo latente son los riesgos biológicos, específicamente bacterianos, siendo estos parte del medio ambiente. A continuación se mencionan los patógenos que han sido aislados de productos crudos agrícolas: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (patogénica), especies de *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Clostridium*, *Bacillus cereus* y *Vibrio* (FDA, 2001).

En 1983, el Comité de Expertos sobre Seguridad Alimenticia convocado conjuntamente por la Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas (1984) concluyó que las enfermedades debidas a alimentos contaminados constituyen “el problema de salud más extendido en el mundo contemporáneo”. Aunque el número de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) asociadas a productos agrícolas frescos (Cuadro 2) es bajo pero al aumento de su consumo existe una mayor incidencia de brotes de ETAs (Guzewich y Salsbury, 2000). Algunos de estos brotes han sido relacionados con los productos importados en Estados Unidos.

Cuadro 2. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) de productos frescos en algunos estados de EE UU.

Año	No. de Estados	No. de casos	Patógeno	Alimento asociado
2001	6	>40	<i>Salmonella</i>	Melón
2000	8	86	<i>Salmonella</i>	Tomates
1998	3	>400	<i>Shigella</i>	Perejil
1997	14	864	<i>Cyclospora</i>	moras azules
1997	3	305	<i>Cyclospora</i>	Albahaca
1996	2	49	<i>E.coli</i> 0157:H7	lechuga de hoja
1996	2	72	<i>Shigella</i>	Chayotes
1996	20	1500	<i>Cyclospora</i>	Frambuesas
1993	3	84	<i>Salmonella</i>	Tomates
1991	23	400	<i>Salmonella</i>	Melón

Fuente:Brady (2002).

Los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los EE UU. Han sido asociados a productos agrícolas de origen nacional e importado. La proporción de enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas a productos importados no es mayor que la de los productos producidos en los EE UU (Brady, 2002). De 1999 a 2001 en este país se presentaron 148 brotes atribuidos a productos frescos y sólo tres han sido vinculados a importaciones provenientes de México. En septiembre de 1992 se registró en vegetales un brote de *E. Coli* 0157:H7 que afectó a cuatro personas, y en septiembre de 1995 se presentó otro brote ahora en lechuga iceberg de origen mexicano el cual ocasionó 30 casos (Avendaño *et al.*, 2002). En frutas, en enero de 1997 se presentó un brote epidemiológico de hepatitis A, asociado al consumo de fresas congeladas producidas en México y que provocó 256 casos en cinco estados de los EE UU. En esta

ocasión nunca se comprobó que el producto mexicano fuera el contaminante. Otro caso se presentó en el 2001 en melón Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) precortado proveniente del estado de Guerrero, México el cual se asoció con brotes de salmonelosis en EE UU y Canadá. Debido a que estos brotes fueron responsables de numerosas enfermedades y muertes de personas, las exportaciones del melón a EE. UU se vieron comprometidas hasta el punto del cierre de fronteras, por sugerencia de la FDA (Hernández *et.al.*, 2009).

El caso más reciente fue detectado en mayo de 2011 en el cual en donde pepinos españoles provocaron un brote letal de *E. coli* en Alemania. De acuerdo con el diario español El País, la comisión Europea confirmó la implicación de pepinos españoles consumidos en Alemania. Al menos hasta el 27 de mayo habían muerto tres personas por esta causa. Para el 30 de mayo el diario electrónico "ibtimex" reportó que ya eran 14 personas muertas en Alemania y más de 300 enfermos con seriedad a causa de la *E. coli*.

1.4. Control de enfermedades postcosecha

1.4.1. Control químico

Durante muchos años, una gran variedad de productos químicos y compuestos sintéticos han sido utilizados como agentes antimicrobianos para inhibir la acción de los fitopatógenos. La investigación sobre fungicidas vegetales derivada de sus aplicaciones en la agricultura, está siendo intensificada a medida que se está teniendo un enorme potencial para inspirar e influir en la investigación agroquímica moderna.

Productos químicos antimicrobianos, como los benzimidazoles, hidrocarburos aromáticos y los inhibidores de la biosíntesis de los esteroides, se utilizan a menudo en el control de enfermedades de las plantas en la agricultura. Sin embargo, hay una serie de problemas en contra del uso eficaz de estos productos químicos en áreas donde los hongos han desarrollado resistencia. Para superar este problema, mayores concentraciones de estos químicos aumentan el riesgo de residuos tóxicos de alto nivel en los productos (Tripathi y Dubey, 2004). Por lo tanto, ha habido un creciente interés en la investigación de la posible utilización de los aceites esenciales y extractos de plantas que son menos perjudiciales para el control de plagas y enfermedades en la agricultura (Bajpai *et al.*, 2007). Algunos fungicidas comerciales que se usan actualmente se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Fungicidas comerciales usados actualmente en la agricultura Mexicana.

Nombre comercial	Ingrediente Activo	Observaciones
Acrobat	Dimetomorf: (E,Z)-4-[3-(4-clorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acriloil] morfolina.	Fungicida de acción preventiva y antiesporulante para el control de la enfermedad causada por <i>Phytophthora infestans</i> en los cultivos de papa y tomate.
Benomil	Benomilo: Metil 1 (butilcarbamoil)bencimidazol-2-il carbamato.	Fungicida contra Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>), Fumagina (<i>Capnodium</i> spp.), Mancha de la hoja (<i>Cercospora purpurea</i>) y Roña o sarna (<i>Sphaceloma perseae</i>).
Captan 50 PH	Captan: N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida	Fungicida contra: Mancha púrpura (<i>Alternaria porri</i>), Mancha foliar (<i>Cercospora capsici</i>) y Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>).
Cercobin	Tiofanato metílico: Dimetil-4,4-0-Fenilenbis (3-tioalofanato)	Contra los hongos: <i>Monilinia</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Gloeosporium</i> spp.
Forum	Dimetomorf: (E, Z) 4-[3-(4-clorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acriloil] morfolina	Hongo al que ataca: Moho azul (<i>Peronospora tabacina</i>) en tabaco.
Kumulus DF	Azufre elemental, S no menos del 80%	Pudrición del fruto (<i>Glomerella cingulata</i>), Cenicilla (<i>Sphaerotheca</i> spp) y Pudrición del fruto (<i>Monilinia</i> spp.).
Meltatox	Dodemorph: acetato de 4-ciclododecil-2,6-dimetil morfolina.	Fungicida para el control de oidio, <i>Sphaeroteca pannosa</i> de las plantas del rosal.
Polyram DF	Metiram: Tris [amino-[etileno bis (ditiocarbamato)] de zinc (II)][tetrahydro-1,2,4,7 -ditiadiazocina-3, 8-dition] polímero	Fungicida contra: Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>), Tizón temprano (<i>Alternaria solani</i>) Cenicilla (<i>Podosphaera leucotricha</i>) Roña o sarna (<i>Venturia inaequalis</i>).
Regnum	Pyraclostrobin: Metil N-{2-[1-(4-Clorofenil)-1H-Pirazol-3-il]oximetil]fenil] N-metoxicarbamato.	Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> var. <i>Difformis</i>).
ZIR Micro WDG	Ziram: (Bis-dimetil ditiocarbamato de zinc)	Contra los hongos: Antracnosis (<i>Colletotrichum capsici</i>) y Mildiu de la vid (<i>Plasmopara viticola</i>)

Fuente: Thompson, 2007

Los inconvenientes que presenta el control químico se han potenciado en los últimos años debido al cambio en los sistemas de cultivo (monocultivos, explotaciones intensivas, etc.). Esto, unido a una mayor concienciación social, ante el enorme deterioro medioambiental que supone la utilización masiva de compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos (Serrano y Galindo, 2007).

Así, en los últimos años, debido a las preocupaciones sobre la seguridad de los agentes antimicrobianos sintéticos, ha habido un aumento en el uso de las sustancias naturalmente desarrollados, que ha dado lugar a un enorme incremento en el uso de compuestos de origen natural como aceites esenciales y extractos vegetales de diversas partes de las plantas medicinales importantes como agentes antifúngicos (Hernández *et al.*, 2007). Los extractos de las plantas que han sido reconocidas como agentes antimicrobianos constituyen una fuente potencial de compuestos químicos o más comúnmente productos, conocidos como fitoquímicos, que también incluyen aceites esenciales y extractos de plantas (Bajpai *et al.*, 2007).

1.4.2. Biocontrol

Baker y Cook (1974) definen control biológico desde una perspectiva patológica en las plantas como "la reducción de la densidad de inóculo o actividades que produzcan la enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o inactivo, por uno o más organismos, logrando de manera natural o mediante la manipulación del medio ambiente, huésped, o antagonista, por masa o introducción de uno o más antagonistas". De esta manera, el término "control biológico" o "biocontrol" se refiere al uso de una fuente natural de microorganismos los cuales son antagonistas a los patógenos en postcosecha que deseamos eliminar.

El antagonismo entre microorganismos es un fenómeno que siempre ha estado presente en la naturaleza e involucra a hongos (incluyendo levaduras) y bacterias que habitan de manera natural en el suelo y en las superficies de las diferentes partes de las plantas (Wilson y Wisniewski, 1994). Uno de los enfoques del aislamiento de los microorganismos antagonistas para controlar las pérdidas postcosecha es a través de la promoción del manejo de los antagonistas naturales presentes en superficies de frutas y vegetales (Barkai, 2001).

La mayoría de las aplicaciones de los antagonistas para controlar las enfermedades postcosecha se realizan antes de la cosecha. Las aplicaciones postcosecha no han sido plenamente explotadas (Bautista, 2006). Muchos químicos son usados en el procesamiento de alimentos primeramente como pesticidas y antioxidantes: Es importante conocer como algún agente potencial de biocontrol interactuará con la existencia de tratamientos químicos (Wilson y Lawrence, 1985).

A la fecha, la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) ha liberado dos productos comerciales: BioSave 110 (anteriormente BioSave 11) (EcoScience, Worcester, MA, EUA) y Aspire (Ecogen, Langhorne PA, EUA). El primero formulado a base de la bacteria *Pseudomonas syringae* y la segunda a partir de la levadura *Candida oleophila*, cepa I-182 (Hofstein *et al.*, 1991; Janisciewicz y Marchi, 1992). En otros países como Sudáfrica, el Departamento Nacional de Agricultura, también ha liberado dos productos para su comercialización: Avorgreen que contiene la bacteria *B. subtilis* (Stimuplant, White River, Sudáfrica) y YieldPlus (Anchor Yeast, Cape Town, Sudáfrica) formulados ambos productos con la levadura *Cryptococcus albidus* (Bautista, 2006).

Se describen varios mecanismos involucrados en el biocontrol de antagonistas como la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, inducción de resistencia y competencia por nutrientes y espacio Janisciewicz y Korsten (2002).

Antibiosis

En el caso de la producción de antibióticos se ha demostrado que las bacteria *Bacillus subtilis* B-3 produce el compuesto llamado iturina que inhibe el crecimiento radial y germinación del hongo *Monilinia fructicola* (Guledner *et al.* 1988, Pusey y Wilson 1984), otra bacteria importante es *Pseudomonas cepacia* LT-4-12 que sintetiza la pirrolnitrina y controla a *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* causantes de la pudrición agria en limones y en frutas de 'hueso' (manzana, pera, etc.), respectivamente (Smilanick y Denis-Arrue, 1992; Janisciewicz y Roitman, 2000). Igualmente *Pseudomonas syringae* produce el compuesto nombrado siringomicina que inhibe la germinación de *Penicillium digitatum* y controla las pudriciones ocasionadas por este hongo en varios cítricos (Bull *et al.*, 1998).

Competencia por nutrientes.

La competencia por nutrientes y espacio, son los principales componentes en el modo de acción de las levaduras antagonistas. Por ejemplo, en cítricos el control potencial de la levadura *Pichia guilliermondii* en el sitio de infección se revirtió mediante la adición de nutrientes exógenos (Arras *et al.*, 1998). En ese estudio, la aplicación de bajas dosis de glucosa en las heridas del fruto previamente tratadas con *Pichia guilliermondii* e inoculadas con *Penicillium italicum* aumentaron la incidencia de la pudrición.

Competencia por espacio.

En la mayoría de los reportes sobre control biológico se ha demostrado la relación entre la efectividad del antagonista aplicado y la concentración de éste. En general, se ha observado que la mayor efectividad del antagonista microbiano se manifiesta a una concentración de 10^8 ufc/ml reportándose que concentraciones menores de 10^5 ufc/ml no controlaron los patógenos en postcosecha (Droby *et al.*, 1989; McLaughlin *et al.*, 1990).

Producción de enzimas líticas e inducción de resistencia

Además de los aspectos antes mencionados en el control biológico, se ha demostrado que la producción de enzimas hidrolíticas es una parte importante dentro de los mecanismos de acción de los agentes antagonistas. La actividad enzimática por ejemplo la producción de quitinasa por *Aureobasidium pullulans* es antagonista de *Enicillium expansum* y *B. cinerea* que son causantes en pudriciones en manzanas y uvas (Castoria *et al.*, 2001).

1.4.3. Uso de extractos fúngicos de hongos basidiomicetos

Los hongos nos proveen de una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica que pueden ser explotados. Estos metabolitos no se forman en la fase vegetativa, este metabolismo comienza cuando declina la tasa de crecimiento y se hace presente en la ideofase en contraste con el metabolismo primario que se aparece en la trofofase (Carlile *et al.*, 2001).

Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Cuadro 4) (Brizuela *et al.*, 1998). El metabolismo secundario de los

basidiomicetos es rico en terpenoides, especialmente sesquiterpenoides. *Mycena leaiana* es un basidiomiceto de color naranja brillante, perteneciente a los *Agaricales*, el pigmento amarillo-naranja tiene una actividad antibiótica y citotóxica esta sustancia llamada leianafulveno (Hartting *et al.*, 1990).

Cuadro 4. Compuestos con actividad antibiótica producidos por hongos basidiomicetos

Naturaleza química	Hongos	Actividad biológica	Producto
Sesquiterpenos y compuestos relacionados	<i>Merulius, Marasmius, Naematoloma, Pleurotellus, Lentinelus, Panaelus</i>	antimicrobiana, antifúngica, antiviral, citotóxica, mutagénica	Merulidial, Naematolin, Naematolon, Hynophilin, Leianafuleveno, Pleurotellool, Ácido pleurotético, Omphalone, Fluvoferuginin
Diterpenoides	<i>Cyathus, Crinipellis</i>	citotóxica, antifúngica, antibacteriana	Estriatin, Pleuromutilin, Cavipetin
Acetilenos	<i>Marasmius, Clitocybe Coprinus, Pleurotus, Merulius</i>	antibacterial, antifúngica, citotóxica	Escorodonin
Glicolípidos	<i>Ustilago, Schizonella</i>	antimicrobiana, citotóxica	Schizonellina
Policetonas	<i>Merulius, Phlebia</i>	antimicrobiana, hemolítica	Ácido merulínico
Nucleósidos	<i>Citocybe, Lentinus</i>	antibacteriana, antiviral	Nebularin
Sales de diazonio	<i>Agaricus xanthodermus</i>	antibacteriana, citotóxica	Agaridin

Fuente: Brizuela, 1998

1.4.4. Pigmentos

Los pigmentos son sustancias químicas que imparten color a otros materiales por el efecto óptico de la refracción de la luz del sol. Igualmente, puede ser definido como una sustancia en polvo que cuando se mezcla con un vehículo líquido imparte color a una superficie (Wani *et al.*, 2004). La importancia de los pigmentos radica en que éstos pueden ser de utilidad en industrias como la alimentaria, como aditivo e intensificador de color; y la farmacéutica (cosméticos).

Se ha investigado una forma alternativa de producir pigmentos de origen natural, las fuentes pueden ser de plantas y microorganismos (Durán *et al.*,2002).El empleo de los hongos filamentosos puede ser una alternativa al uso de colorantes químicos ó sintéticos.

Los hongos pertenecientes al género *Monascus* han sido estudiados por muchos años y diversos autores, refieren a éstos como un potencial productor de pigmentos naturales (Carvalho *et al.*, 2003). Además de su capacidad de producción extracelular, facilitar procesos fermentativos y por los altos rendimientos obtenidos. Los hongos de este género producen pigmentos hidrosolubles y que difunden por todo el medio de cultivo con tonalidades rojas a amarillas los cuales se han aplicado a la industria de los alimentos (Blanc *et al.*,1994). Otros géneros como *Paecilomyces* también producen pigmentos en tonalidades rojas, amarillas y violetas en cantidades de hasta 4.73 gL⁻¹(Cho *et al.*, 2002). Así como los hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, también han sido estudiados, como potenciales productores de pigmentos naturales (Engstrom *et al.*,1982; Larsen y Breinholt, 1999; Suhr *et al.*, 2002).

1.5. *Pycnoporus sanguineus*

Pycnoporus sanguineus (Figura 5) es un hongo perteneciente a los Basidiomicetes, utilizado en medicina popular desde tiempos antiguos, tienen una gran importancia en la búsqueda de sustancias antivirales, antibacterianas y antifúngicas de sus metabolitos secundarios (Hwang *et al.*, 2004). *P. sanguineus*, es un conocido popularmente como un hongo de podredumbre blanca de gran incidencia en países tropicales y subtropicales. Este hongo, de acuerdo con Kirk *et al.* (2001) tiene la siguiente clasificación taxonómica.



Figura 5. Basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus* colectado en el estado de Michoacán.

Reino: Fungi
Phylum: Basidiomycota
Clase: Basidiomycetes
Orden: Polyporales
Familia: Polyporaceae
Género: *Pycnoporus*
Especie: *P. sanguineus*

Las fructificaciones (cuerpo fructífero o basidiocarpo) de este hongo son correosas, de 2-6 cm de ancho, en forma de abanico o repisa, de color rojo-anaranjado en su totalidad, incluyendo el interior. Superficie exterior lisa o algo marcada de zonas concéntricas. Superficie inferior con finos poros. Olor fúngico. Sabor fúngico amargo ligero. Crecen en conjuntos sobre troncos tirados o tocones en lugares soleados, en tierras calientes o templadas con influencia tropical. Tiene amplia distribución en el país, siempre en vegetación alterada por el hombre. Prospera desde el nivel del mar hasta los 1800 m de altitud (UNAM, 2011). Los principales compuesto producidos por *P. sanguineus* que tienen actividad antimicrobiana son:

Poliporin. La actividad antimicrobiana de *P. sanguineus* se conoce desde 1946 en donde se aisló un compuesto activo (poliporin) contra bacterias gram-positivas y gram-negativas el cual no tuvo toxicidad contra animales de experimentación (Rosa *et al.*, 2003).

Cinnabarina. Es una sustancia antibiótica producida por *P. sanguineus* (Smânia *et al.*, 1998) y es un pigmento naranja que tiene una estructura básica 3-fenoxazina, con un grupo carbonilo en C-1, un grupo amino en C-2 y un grupo hidroxilo en C-9 (Achenbach *et al.*, 1991 y Gripenberg 1951). Smânia *et al.* (1995a, 1997) muestran que la cinnabarina tiene una actividad en *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. typhi*, *S. aureus* y diversos *Streptococcus spp.* y su actividad es mayor en bacterias Gram (+) que Gram(-).

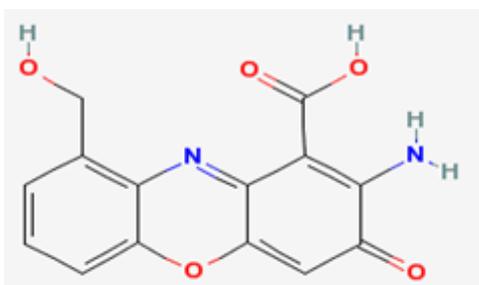


Figura 6. Estructura química de la cinnabarina (Tomado de www.chemdrug.com)

2. JUSTIFICACIÓN

Las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas debidas a enfermedades causadas por microorganismos (hongos y bacterias principalmente) pueden ser del 50%,o incluso mayores en países en vías de desarrollo. Para controlar a los microorganismos causantes de estas pérdidas se han utilizado productos químicos que por sus efectos nocivos a la salud humana y ambiental, se ha restringido su uso en productos frescos, además debido a su abuso, al crear resistencia en los microorganismos, se ha optado por productos de origen natural. De esta manera, una de las alternativas de control de los patógenos postcosecha, es el uso de microorganismos antagónicos (control biológico) o de algún subproducto de ellos (metabolitos secundarios). En el primer caso, existen riesgos en el manejo de organismos vivos mientras que en el segundo estos se reducen. De esta manera, se propone la obtención, evaluación de extractos crudos de *P. sanguineus* como un método de control de tipo biológico o natural de los microorganismos patógenos (hongos y bacterias) que causan deterioro de los productos hortofrutícolas en postcosecha.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Producir extractos de *P. sanguineus* y evaluar su efecto en el control *in vitro* de hongos y bacterias fitopatógenas de frutas y hortalizas en postcosecha.

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Aislar e Identificar molecularmente a *P. sanguineus*.
- ❖ Producir extractos crudos de aislamientos de *P. sanguineus*.
- ❖ Realizar pruebas de control con extractos de *P. sanguineus* sobre los hongos fitopatógenos en postcosecha *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fragariae*, y *Botrytis cinerea*.
- ❖ Realizar pruebas de control con extractos de *P. sanguineus* de bacterias fitopatógenas en postcosecha y las relacionadas con la inocuidad en productos frescos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Aislamientos de *Pycnopus sanguineus*

Se realizaron muestreos y colectas de material de *P. sanguineus* en Villa Guerrero, Estado de México (H1) y Parácuaro, Michoacán (H2) (Figura 7). El material colectado se trasladó al laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para el aislamiento y purificación del hongo se tomó una parte del tejido del basidiocarpo (cuerpo fructífero) y se hicieron crecer en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA)BD Bioxon® hasta su purificación.

Para confirmar la identificación morfológica de la especie, se realizó una caracterización molecular de las regiones intergénicas ITS1 e ITS2. Las secuencias se analizaron y alinearon con la base de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) de los EE UU. De los valores cuantitativos generados, sólo se consideraron los de mayor valor y se generó un índice de similitud para confirmar la especie *P. sanguineus*.



Figura 7. Basidiocarpos de *Pycnopus sanguineus* colectados en Michoacán (H2).

4.1.2. Bacterias y hongos fitopatógenos en postcosecha

Se utilizaron las bacterias *Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum*, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas del Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Las bacterias se cultivaron en agar nutritivo (AN) e incubaron a 28-30°C. Los hongos postcosecha utilizados fueron *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporoides* y *Botrytis cinerea*, el primero aislado de frutos de chirimoya y los otros dos de frutos de fresa, se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA, Bioxon®) e incubaron a 20-25°C.

4.1.3. Bacterias patógenas de importancia en la inocuidad de productos frescos

Para las pruebas de inhibición con los extractos de *P. sanguineus* se utilizaron las bacterias patógenas de interés clínico: *Salmonella thyphi*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* proporcionadas por el Laboratorio de Farmacología de la UPIBI. Además, también se utilizaron las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, denominada S. aureus1 y un aislamiento clínico, denominado S. aureus2, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Shigella dysenteriae* INDRE B2188, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Yersinia enterocolitica* y *K. pneumoniae* ATCC 13884, estas bacterias fueron proporcionadas por el Laboratorio de Cultivos Celulares y Bioconversiones de la UPIBI.

4.1.4. Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus*

Para conocer las mejores condiciones de producción del pigmento naranja de los aislamientos de *P. sanguineus*, se realizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) en arreglo factorial. Los factores y niveles evaluados fueron: pH (8.0, 8.5 y 9.0), medio de cultivo líquido (caldo de papa, extracto de malta) y condiciones de luz (luz de día, luz blanca continua) (Figura 8). Las unidades bajo luz blanca continua se pusieron dentro de una caja de madera. Los tratamientos se mantuvieron a temperatura ambiental (25±3 °C) y cada tratamiento se hizo con tres repeticiones.

pH 8.0				pH 8.5				pH 9.0			
Caldo papa		Extracto de malta		Caldo papa		Extracto de malta		Caldo papa		Extracto de malta	
Luz de día	Luz cont.	Luz día	Luz cont.	Luz de día	Luz cont.	Luz de día	Luz cont.	Luz de día	Luz cont.	Luz de día	Luz cont.

Figura 8. Arreglo experimental para la producción del pigmento de *Pycnoporus sanguineus*.

4.2. Producción de los extractos

Con base en el diseño experimental, para la obtención de los extractos crudos del pigmento de *P. sanguineus*, se realizó la siguiente metodología de la Figura 9.

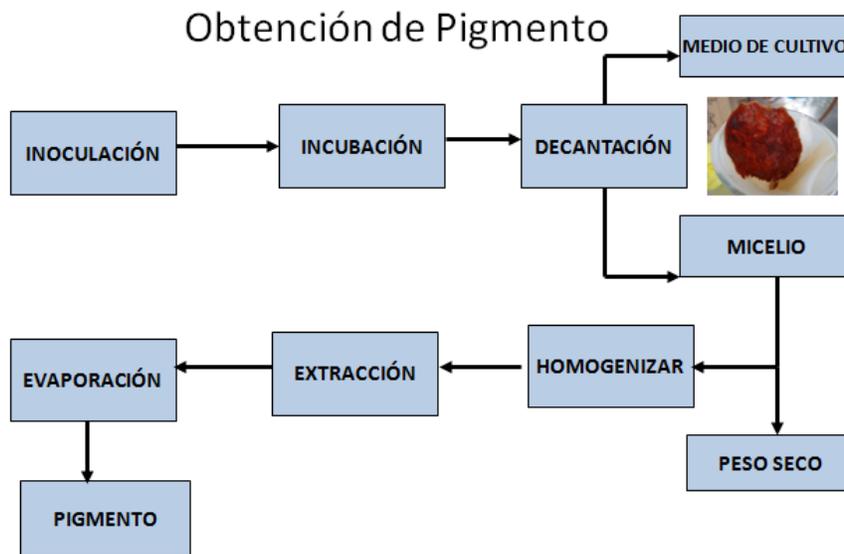


Figura 9. Proceso de extracción del pigmento producido por *Pycnoporus sanguineus*.

Se depositaron discos (5 mm de diámetro) de PDA con micelio de *P. sanguineus* (H1 y H2) de 20 días en frascos de vidrio de (350 mL) que contenían 150 mL de caldo de papa de pH ajustados de acuerdo con el arreglo experimental propuesto (Figura. 9). Los frascos inoculados se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 30 días en luz blanca de día (12 h) y continua (24 h). Después del periodo de incubación, se decantó el caldo de papa con micelio de color naranja y se filtró con papel Whatman No.1, previamente pesado. Se pesaron las masas de micelio. Se tomó aproximadamente 1 g de cada muestra y se secaron a 105°C durante 20 h. El micelio restante, se maceró con 10 mL acetato de etilo para liberar el pigmento. Se ajustó a un volumen de 50 mL con el mismo solvente. Se dejó reposar el extracto por 2 días. Posteriormente, los extractos se concentraron en un rotavapor (Büchi mod. 461) a 75°C . Los extractos se pesaron y guardaron en frascos.

Las variables de respuesta fueron: peso seco del micelio, concentración y cantidad de pigmento (rendimiento) extraído. Para determinar la concentración y cantidad del pigmento, se hizo una curva patrón con concentraciones conocidas del colorante rojo de metilo (0.0024, 0.0048, 0.0097, 0.019, 0.039, 0.078125, 0.15625 mg/mL de acetato de etilo), seleccionado previamente por comparación con otros pigmentos utilizando una cromatografía de placa fina. Se determinó la absorbancia de cada una de las concentraciones. Por medio de una regresión lineal se determinó la ecuación de la recta ($y=18.813x-0.0153$, $r^2=0.9972$) con la cual se calculó la concentración del pigmento.

4.3. Pruebas de control de hongos fitopatógenos *in vitro*.

Las pruebas se hicieron con los hongos *Colletotrichum fragariae*, *C. gloesporoides* y *Botrytis cinerea*, previamente cultivados en PDA. Para esto, se utilizaron tres concentraciones de los extractos de H1 y H2 (2.0, 10.0 y 20 mg/mL) las cuales se adicionaron al medio de cultivo (PDA) antes de solidificar. El pigmento se disolvió en acetato de etilo. El control positivo fue un fungicida comercial (Captan®) en una concentración de 200 mg/mL, agregado también al medio PDA antes de solidificar. El control negativo fueron cajas de PDA con 1 mL de acetato de etilo. Se sembraron trozos de PDA (5 mm de diámetro) con micelio de cada uno de los hongos en todos los tratamientos. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos se muestran a continuación (Figura 10).



Figura 10. Tratamientos realizados para el control *in vitro* de los hongos fitopatógenos

De esta manera, los tratamientos fueron: To (testigo absoluto) sólo PDA; T1 (testigo negativo) acetato de etilo, T2 (testigo positivo) captan a 200 mg/mL, T3 (pigmento de H1, 2 mg/mL), T4 (pigmento de H1, 10mg/mL) y T5 (pigmento H1, 20mg/mL). Esto mismo se repitió para el caso de H2. Se midieron los halos de inhibición del crecimiento.

4.4. Pruebas preliminares de actividad antibacteriana

Se realizaron pruebas de control con los extractos de *P. sanguineus* de las bacterias *Salmonella thyphi*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* proporcionadas por el laboratorio de Farmacología de la UPIBI. Se usó el método de vaciado en placa por permitir un crecimiento homogéneo. Se reactivaron las cinco cepas bacterianas en caldo nutritivo (24 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$). Para esta prueba se realizaron dos vaciados, el primero fue una capa de 10 mL de medio para antibióticos número dos, posteriormente se preparó medio para antibióticos número uno (30 mL) y antes de que solidificó, se colocaron 30 μL de cada una de las bacterias reactivadas (0.1 mL de inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo), y se vertieron 10 mL sobre el medio antibióticos número 2 sólido. Se prepararon discos de papel filtro (sensidiscos) de 5 mm de diámetro impregnados con los extractos a una concentración de 8 mg/mL y de 4 mg/mL. Se colocaron estas dos concentraciones y un testigo (impregnado con acetato de etilio) por caja.

4.4.1. Pruebas de sensibilidad antibacterianas

Para determinar el efecto antibacteriano de los extractos de *P. sanguineus*, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer (Bailey y Finnegold, 1991; Koneman *et al.*, 1999). Las dos bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum*) y las doce bacterias patógenas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, denominada

*S. aureus*¹ y un aislamiento clínico, denominado *S. aureus*², *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Shigella dysenteriae* INDRE B2188, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Yersinia enterocolitica* y *K. pneumoniae* ATCC 13884, proporcionadas por los laboratorios de Cultivos Celulares y Bioconversiones de la UPIBI) se reactivaron en agar Müller Hinton (AMH) y después en solución salina (0.9%) a una concentración de 1.5×10^8 UFC por comparación óptica con un tubo a 0.5 de la escala nefelométrica de Mc Farland (Bailey *et al.* 1991 y Koneman *et al.* 1999). Se tomó una muestra de cada bacteria con un hisopo estéril y se sembró en cajas Petri con AMH de manera uniforme. Se colocaron sensidiscos, previamente impregnados con los extractos H1 y H2 a una concentración de 8 mg/mL. Se colocaron los controles positivos (sensidiscos con un antibiótico de amplio espectro (Cloramfenicol a 30 µg) y negativo (agua-alcohol 75% y acetato de etilo 25%). Después de 24 h de incubación a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bacterias patógenas y a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ las bacterias fitopatógenas: Se midieron los halos de inhibición.

4.4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se tomó una asada de las bacterias, previo cultivadas (24 h) en AMH y se inocularon en tubos con caldo Müller Hinton (CMH). Los tubos se incubaron ($37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 h con bacterias patógenas y fitopatógenas a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h). Una vez crecidas las bacterias, se agregaron a otro tubo de CMH estéril a una concentración de 1.5×10^8 UFC (tubo 0.5 de la escala de McFarland). Se hicieron ocho concentraciones diferentes (0.75, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0, 8.0, 10.0 y 12 mg/mL) de los pigmentos de H1 y H2 estas concentraciones se hicieron con los extractos disueltos en agua-alcohol (75%) y acetato de etilo (25%). Se agregó en cada microtubo 50 µL del pigmento en sus diversas concentraciones y 50 µL del medio de cultivo con bacteria en placas de ELISA. Las placas se incubaron (18 a 24 h, a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bacterias patógenas y fitopatógenas a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y después se adicionó en cada microtubo 50 µL del reactivo violeta de tetrazolio. Se mantuvieron por 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ bacterias patógenas y fitopatógenas a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente, se verificó el crecimiento bacteriano por la presencia en el microtubo de una coloración morada. La concentración mínima inhibitoria se identificó en los microtubos que no presentaron dicha coloración.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento e identificación molecular de *Pycnoporus sanguineus*

Se aislaron, purificaron e identificaron dos cepas de *P. sanguineus*, provenientes de Villa Guerrero (18°53'07" LN, 99°37' 36" LO y altitud 1839 msnm), en el Estado de México (H1) y Parácuaro (19° 08' 44" LN, 102° 13' 09" LO, altitud: 600 msnm) en Michoacán (H2) (Figura 11). En el primer caso, el hongo se aisló de madera en descomposición de casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.) y el segundo de madera de mango (*Mangifera indica* L.). El crecimiento de los hongos varió de acuerdo a su procedencia, en el caso de H1, el hongo cubrió con micelio blanco el total de la caja petri a los 10-15 días (5.3-8.0 mm/día), mientras que H2 lo hizo a los 10-12 días (6.7-8.0 mm/día). El color naranja del micelio se presentó a los 25 días aproximadamente, en ambos aislamientos. Lo anterior fue similar con lo reportado por Baumer *et al.* (2008) para las cepas de *P. sanguineus* aisladas de Santa Catarina, Brasil, los cuales presentaron unas velocidades de crecimiento micelial de 5.6-7.14 mm/día (MIP20001 y MIP95002, respectivamente), además de que la coloración naranja más intensa se presentó los 20 días en el aislamiento de menor crecimiento (MIP20001).

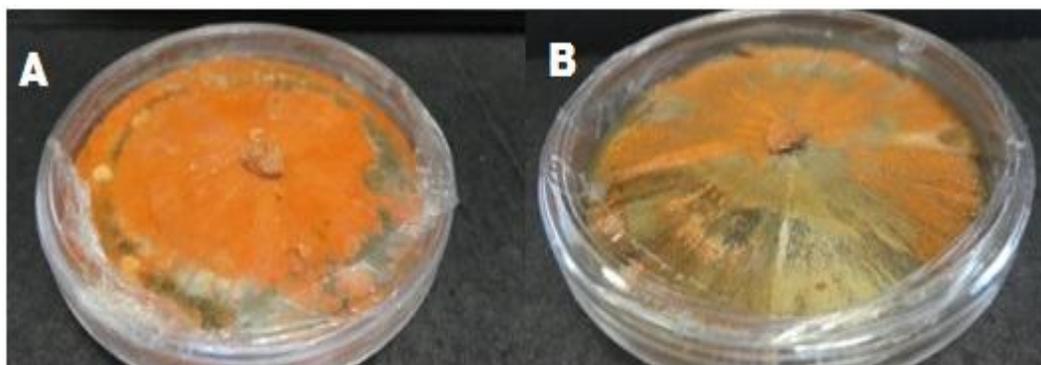


Figura 11. Aislamientos de los Estados de México A (H1) y Michoacán B (H2).

5.1.1 Identificación molecular

De acuerdo con las secuencias obtenidas (Cuadro 5) de la región ITS1 del ADN ribosomal y su posterior alineamiento con las bases de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), se corroboró que los aislamientos H1 y H2, correspondieron con la especie *Pycnoporus sanguineus*.

Cuadro 5. Secuencia de pares de bases obtenidos de los aislamientos H1 y H2

Secuencia de H1

GGTCTTACGAGTTCTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTC
TACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCTCTCCGGGTCTTGAGGCATTCTG
CCGGCCTATGTATCACTACAAACACTTAAAGTAAAAGAATGTATTTCGCGTCTAACGCATCTAAATACAA
CTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCTCCTTGGTATTCCGAGNAGCATGC
CTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACCCACACATCCTTGTGATGCTGCGGNCTTGGATTTGGAGGCTTG
CTGNCCCTCTGCGGTGCGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGATTTCGGTGCGGATCGNCTCTCAGTA

Pycnoporus sanguineus strain 7IV2...

Secuencia de H2

CCTGCGGAAGGATCTTAACGAGTTCTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTGCACACCCT
GCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCTCTCCGGGTCT
TGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTATCACTACAAACACTTAAAGTAAAAGAATGTATTTCGCGTCTAACGC
ATCTAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCTCCTTGGTATTCC
GAGNAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACCCACACATCCTTGTGATGCTGCGGGCTTGG
TTTGGAGGCTTGCTGGCCCTCTGCGGTGCGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGGATCGG
CT

Pycnoporus sanguineus strain 7IV2...

De acuerdo con las secuencias obtenidas, en el caso de H1 mostró un 98% de identidad y un índice de similaridad de 787; mientras que para H2 mostró un 97% de identidad y un índice de similaridad de 822 con el aislamiento 7IV2/2 (número de acceso GQ982886 en el NCBI) de *P. sanguineus*, en ambos aislamientos. De esta manera, se confirmó la especie *Pycnoporus sanguineus* con la cual se trabajó en este estudio.

5.2. Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus*

La forma en que las unidades experimentales se dispusieron se presenta en la Figura 12. Los resultados del análisis estadístico de las variables que se evaluaron (peso seco de la biomasa, concentración y rendimiento (cantidad) del pigmento para ambas cepas (H1 y H2) se presentan en los Cuadros 6 y 7. El crecimiento del hongo se notó 7 días después de la inoculación ya que se formó micelio blanco en la superficie y hasta los 20 días se cubrió por completo la superficie del medio líquido del frasco que lo contenía. La pigmentación naranja inició a partir de los 25-30 días y el experimento se detuvo a los 40 días. De acuerdo con Smânia *et. al.* (1998), las colonias de las cepas de *P. sanguineus* MIP 89007, MIP 95001 y MIP 95002 presentaron la pigmentación naranja completa a los 20 días, la mitad del tiempo que duró el experimento propuesto en este trabajo. Cabe mencionar que se hicieron unas pruebas preliminares de crecimiento del hongo en agitación pero el hongo no creció de forma adecuada, tal como lo reporta Smânia *et. al.* (1998).



Figura 12. Diseño experimental en condiciones de luz de día (A) y continua (B).

Después del periodo de evaluación (40 días), se encontró que los tres factores evaluados (pH, medio de cultivo y tipo de luz) fueron determinantes (5%) en cuanto a la concentración del pigmento se refiere, en ambos aislamientos, mientras que en el caso del peso seco y rendimiento, sólo el medio de cultivo y pH, respectivamente, fueron significativos (Cuadro 6) para ambos aislamientos. En cuanto a las interacciones entre factores, sólo el pH y el medio de cultivo fueron significativos para la concentración del pigmento.

Cuadro 6. Efecto del pH, medio de cultivo y tipo de luz en el peso seco, concentración y rendimiento del pigmento naranja producido por los aislamientos H1 y H2 de *Pycnoporus sanguineus*.

Factor de variación	Concentración del pigmento		Peso seco		Rendimiento	
	H1	H2	H1	H2	H1	H2
pH (A)	*	*	*	NS	*	*
Medio de cultivo (B)	*	*	*	*	NS	*
Condiciones de luz (C)	*	*	NS	NS	NS	NS
A*B	*	*	NS	NS	NS	NS
A*C	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B*C	*	NS	NS	NS	NS	NS
A*B*C	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*Significativo al (5%); NS no significativo

En el cuadro 7 muestra la comparación de medias por Tukey a una significancia del 5 % por lo que muestra que los resultados no tuvieron una tendencia definida, las mejores condiciones de producción del pigmento naranja para ambos aislamientos fueron a pH 8 (H1) y pH 8.5 (H2), caldo de papa y luz blanca continua. De acuerdo con Smânia *et al.*

(1998), la cepa de *Pycnoporus sanguineus* MIP 89007 donde tuvo una mayor concentración de pigmento fue en caldo papa a pH 7 y 9 a 25°C en luz continua, mantuvo un crecimiento y producción del pigmento a los 20 días, el doble de los aislamientos H1 y H2.

En el caso donde se produce más cantidad de biomasa para H1 (pH 8.0, medio de cultivo, caldo de papa) y H2 (el pH no fue significativo, medio de cultivo, caldo papa) y la luz para ambos aislamientos no fue significativo el tipo de luz. Las condiciones que influyen en un mayor rendimiento en H1 fueron: pH 8.5 y 9.0 y las otras condiciones no tienen un efecto significativo de acuerdo al cuadro 7. En el caso de H2 para un mayor rendimiento el pH fue de 8.0 y 8.5 y el medio es extracto de malta para que haya un mayor rendimiento las condiciones de luz no son significativas para ambos aislamientos.

Cuadro 6. Comparación de medias del radio de crecimiento de hongos Fitopatógenos con respecto los extractos de H1 y H2

Factor de variación	Nivel	N	Concentración del pigmento		Peso seco		Rendimiento	
			H1	H2	H1	H2	H1	H2
pH (A)	8.0	12	0.0537 ^a	0.0383 ^b	0.8501 ^a	0.5801 ^a	17.491 ^b	34.098 ^a
	8.5	12	0.0355 ^b	0.0487 ^a	0.5605 ^b	0.5941 ^a	27.533 ^a	30.045 ^a
	9.0	12	0.0528 ^a	0.0341 ^b	0.6287 ^b	0.6262 ^a	24.915 ^a	24.180 ^b
Medio de cultivo (B)	CP	18	0.0619 ^a	0.0651 ^a	0.7531 ^a	0.7726 ^a	21.2339 ^a	23.282 ^b
	EM	18	0.0384 ^b	0.0156 ^b	0.6064 ^b	0.4275 ^b	25.3939 ^a	35.604 ^a
Condición de luz (C)	LD	18	0.0403 ^b	0.0365 ^b	0.6609 ^a	0.6596 ^a	24.307 ^a	29.532 ^a
	LC	18	0.0544 ^a	0.0442 ^a	0.6986 ^a	0.5406 ^a	22.319 ^a	29.354 ^a

La determinación del contenido de pigmento naranja en la muestras de H1 y H2 se realizó después de la extracción del micelio, considerando que este pigmento es un metabolito secundario y que la literatura sugiere que su producción se realiza en la idiofase, cuando el crecimiento activo ha cesado (Calvo *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2005). De esta manera, nuestros resultados son coincidentes con la teoría ya que la pigmentación del micelio comenzó a los 20 días, cuando el hongo alcanzó el máximo crecimiento dentro del medio de cultivo, y culminó a los 40 días y suelen sintetizarse como una mezcla de compuestos químicamente relacionados (Parés y Juárez, 2002). De esta manera, la producción *in vitro* del pigmento se produjo en respuesta a factores abióticos (pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes, espacio, luz y agua) (Frisvad *et al.*, 1998; Strohl, 2000; Adrio y Demian, 2003) donde la variación de los nutrientes y las condiciones de incubación son utilizados como una estrategia para inducir o estimular una mayor producción de metabolitos secundarios bioactivos (Casas-López *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2005).

De acuerdo con Smânia *et al.* (1998), la cepa de *Pycnoporus sanguineus* MIP 89007 tuvo una mejor producción del pigmento naranja (cinnabarina) a un pH de 9 en caldo papa, lo cual es parecido a este trabajo, como es el caso de la producción de antibióticos por *Fusidium coccineum* a pH básicos (Shipanova *et al.*, 1995) .

De acuerdo con Parés y Juárez (2002) la luz blanca, en el caso de los hongos que contienen pigmentos, al absorber la energía luminosa, protegen al material genético de las reacciones químicas inducidas por la luz. La presencia de pigmentos también es frecuente en células vegetativas, donde pueden funcionar protegiéndolas bien de la radiación o de radicales tóxicos producidos en reacciones aeróbicas. Por lo que de acuerdo al cuadro 7 en la concentración de pigmento afecta directamente la incidencia de luz blanca continua para ambas cepas (H1 y H2).

El rendimiento, entendido como la relación entre el peso seco del extracto y el peso seco de biomasa. Esta característica no fue igual para ambos aislamientos ya que las condiciones de pH afectaron su expresión. En el caso del aislamiento H2, el medio de cultivo extracto de malta tuvo un mayor rendimiento, lo reportado por Smânia *et al.*, 1995 menciona que a mayor formación de cinnabarina el crecimiento del hongo es menor. Ramos (2006) coincide con Smânia *et al.*, (1995) y menciona que las mejores condiciones de crecimiento no se relacionan directamente con la producción de cinnabarina.

5.3. Pruebas de control *in vitro* de hongos fitopatógenos

Se realizaron 6 tratamientos para determinar si existió inhibición de crecimiento en los hongos fitopatógenos con respecto a los extractos obtenidos de H1 y H2 esto se realizó mediante la comparación de medias de radio de crecimiento (mm) de los hongos fitopatógenos en presencia de los extractos de H1 y H2 (Figura 13) por Tukey a un nivel de significancia del 5 %, los cuales están representado en el Cuadro 8.

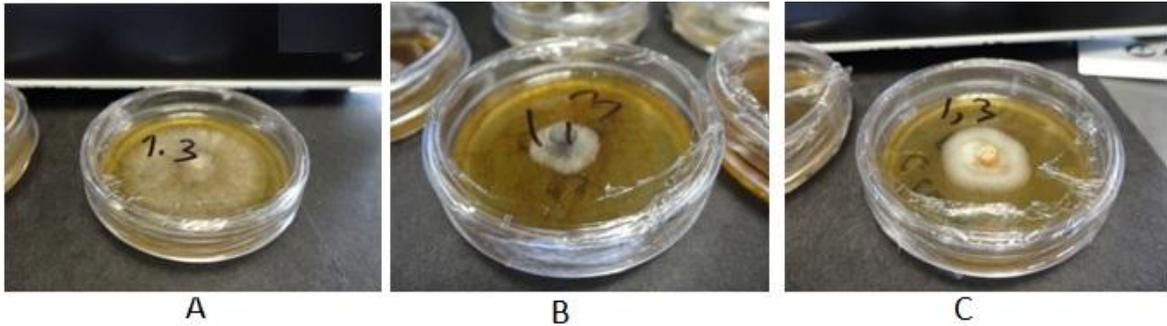


Figura 13. Crecimiento a los 2 días de *B. cinerea*(A) , *C. fragariae*(B) y *C.gloeosporoides* (C) con el extracto de H1 a una concentración de 20mg/mL.

En la Figura 14 se muestra el tratamiento T2 el cuál se denominó testigo positivo ya que se incorporó al PDA a una concentración de 200 mg de un fungicida comercial Captan® de acuerdo a las especificaciones de este producto, por lo que se verificó que no hubo crecimiento micelial de los tres hongos fitopatógenos descartando este dato en el análisis estadístico por lo que no aparece datos en la comparación de medias (Cuadro 8.)

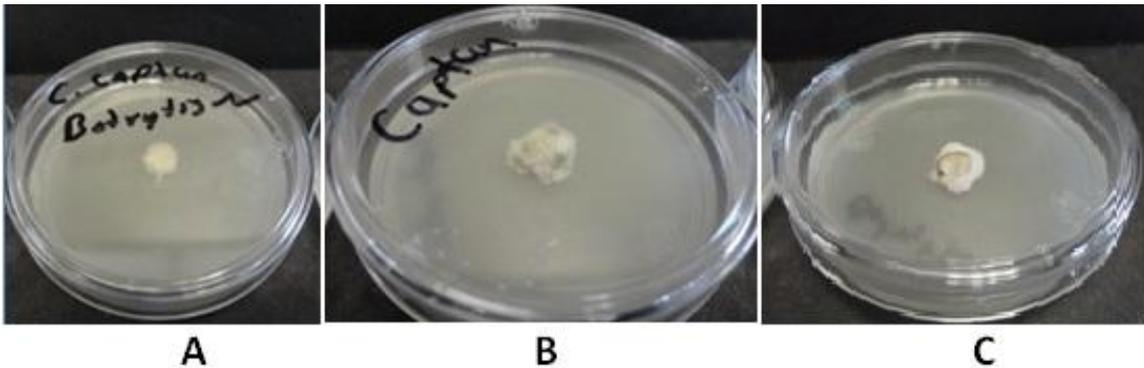


Figura 14. Testigo positivo, producto comercial Captan® *B. cinerea*(A) , *C. fragariae*(B) y *C.gloeosporoides* (C).

En el caso del hongo *Botrytis cinérea*, este creció y alcanzó el total del espacio de la caja de Petri en 3 días (testigo absoluto, To) mientras que *Colletotrichum fragariae* y *C. gloeosporioides* lo hicieron en 7 y 9 días, respectivamente (Figura 13). En general, se observó una mayor inhibición del crecimiento con los extractos de *P. sanguineus* a medida que la concentración del extracto fue mayor (Cuadro 8), notándose un mayor efecto con el extracto del aislamiento de H2 en los tres hongos evaluados. En caso de *B. cinerea*, la reducción en el crecimiento fue casi del 70 y 60% para los tratamientos con 10, y 20 mg/mL, respectivamente. En otro trabajo de biocontrol, se han utilizado extractos

fúngicos extracelulares (EFE) de *Penicillium* sp., *Beauveria* sp., *Aspergillus* sp. y *Phyalophora* sp. en la germinación *B. cinerea* y se encontró una inhibición entre el 85% y 90% (Poveda, 2006). En otro estudio (López *et al.*, 2005) se trabajó con cuatro especies: llantén (*Plantago major* L), ruda (*Ruta graveolens* L), pronto alivio [*Lippia alba* (Mill) NEBROS], helecho marranero [*Pteridium aquilinum* (Kaulf) Maxon] de los cuales se realizaron extractos etanólicos al 25% y disminuyeron el desarrollo de los hongos: *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum musae* hasta un 68% del crecimiento.

En este presente trabajo para *C. fragarie*, la inhibición fue mayor al 50% y sólo del 40% para *C. gloeosporioides*. En el trabajo de control biológico de Carrillo *et al.*, (2004) se trabajó con la efectividad de *Bacillus subtilis* y *Rhodotorulla minuta* contra *Colletotrichum gloeosporoides* en mango, lo que las aplicaciones de estos dos microorganismos permitieron reducir la antracnosis hasta un 86.7% en los frutos.

Cuadro 7. Comparación de medias del radio de crecimiento (mm) de hongos fitopatógenos en PDA con extractos fúngicos de *P. sanguineus* (H1 y H2) y fungicida comercial

Tratamiento	<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Colletotrichum fragarie</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	H1	H2	H1	H2	H1	H2
T0	33.183 ^a	33.183 ^a	25.000 ^a	25.000 ^a	25.000 ^a	25.000 ^a
T1	25.000 ^b	25.000 ^b	22.833 ^b	23.333 ^b	22.833 ^a	23.333 ^a
T3	25.000 ^b	25.000 ^b	17.500 ^c	22.000 ^b	21.833 ^b	25.000 ^a
T4	18.000 ^c	10.500 ^c	14.333 ^e	12.166 ^c	18.000 ^c	18.666 ^b
T5	16.500 ^c	13.166 ^c	15.000 ^d	12.000 ^c	20.833 ^b	14.500 ^c

Nota: T0, testigo absoluto; T1, testigo negativo acetato de etilo; T3, extracto de *P. sanguineus* de 2 mg/mL; T4, extracto de 10 mg/mL; T5, extracto de 20 mg/mL.

De acuerdo con el cuadro 8 el tratamiento T4 tuvo un menor radio de crecimiento para los hongos fitopatógenos: *B. cinérea* en el caso del extracto H2, *C. fragarie* para el extracto de H2 y *C. gloeosporoides* con el extracto H1 esto pudo haber pasado por una mala homogenización en el momento de agregar los extractos al PDA, afectando los datos estadísticamente.

5.4. Pruebas preliminares de actividad antibacteriana

5.4.1. Pruebas de control *in vitro* de bacterias fitopatógenas y de interés clínico

Las pruebas de sensibilidad realizadas con sensidiscos impregnados con los extractos de H1 y H2 a una concentración de 8 mg/mL contra bacterias fitopatógenas y de interés clínico (patógenas) arrojaron los siguientes resultados (Cuadro 9 y Figura 15).

Cuadro 8. Halos de inhibición de extractos (8 mg/mL) de aislamientos (H1 y H2) de *P. sanguineus* contra bacterias fitopatógenas y patógenas.

Bacteria	Tinción	Halos de inhibición (mm)		
	Gram	H1	H2	Cloranfenicol
<i>Salmonella thypi</i>	Negativo (-)	10.3 ± 0.57	10.6 ± 1.15	25 ± 0.0
<i>Bacillus cereus</i>	Positivo (+)	8.0 ± 1.73	7.0 ± 0.0	25 ± 0.0
<i>Klebsella pneumoniae</i>	Negativo (-)	10.0 ± 1.0	12.6 ± 0.57	20 ± 0.0
<i>Shigella dysenteriae</i>	Negativo (-)	9.6 ± 0.57	13.3 ± 1.52	36.6 ± 0.15
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Negativo (-)	7.3 ± 0.57	8.6 ± 1.52	32.6 ± 0.05
<i>Erwinia amylovora</i>	Negativo (-)	8.0 ± 1.73	7.0 ± 0.0	35 ± 0.0

Nota: los halos de inhibición son el promedio de tres repeticiones ± el error de la media (ESM).

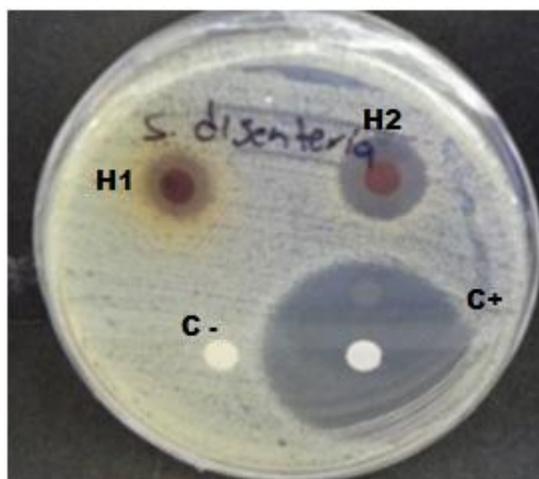


Figura 15. Halo de inhiación en *Shigella dysenteriae* de los extractos (8 mg/mL) de aislamientos de *P. sanguineus*, H1 y H2 .

Los resultados del cuadro anterior fueron un paso previo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). De este cuadro se observa que el pigmento del extracto de H2 provocó los mayores halos de inhibición, excepto en los casos de *B. cereus* y *E. amylovora*. De esta manera, se detectó que los extractos del pigmento de *P. sanguineus* fueron efectivos en el control de bacterias gram positivas y gram negativas lo que concuerda con lo reportado por Smânia *et al.* (1998) aunque estos autores refieren de que hubo una mayor efectividad en bacterias Gram positivas.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos del pigmento de *P. sanguineus* que se encontraron en este trabajo se presentan en el cuadro 10. Al comparar las concentraciones encontradas con las reportadas por Smânia *et al.* (1998), se encontró que estas fueron mayores para las bacterias *Klebsella pneumoniae*, *Salmonella thyphi* y *Bacillus cereus*, ya que estos autores reportan unas MIC menores de 4 mg/mL en contraste con los 8-12 mg/mL el caso de los extractos de H1 y H2. El aporte de este trabajo es que se encontraron las CMI para *Shigella dysenteriae* y las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora* y *Pectobacterium carotovorum* (Cuadro 10).

Cuadro 9. Concentración mínima inhibitoria de extractos obtenidos de aislamientos de *P. sanguineus* (H1 y H2) en bacterias patógenas y fitopatógenas.

Bacteria	Concentración mínima inhibitoria (mg/mL)	
	H1	H2
<i>Salmonella thyphi</i>	8	8
<i>Bacillus cereus</i>	8	10
<i>Klebsella pneumoniae</i>	>12	>12
<i>Shigella dysenteriae</i>	8	8
<i>Erwinia amylovora</i> *	>12	7
<i>Pectobacterium carotovorum</i> *	10	>12

Smânia *et al.* (1998) reportan que la cinnabarina es la que realiza la actividad antibacteriana de acuerdo con trabajos previos (Smânia *et al.*, 1996) y de haber utilizado estos autores el compuesto puro, podría ser la causa de las bajas dosis utilizadas para el control de las bacterias en contraste con las dosis mayores presentadas en este trabajo. En este trabajo, como se ha mencionado anteriormente, se utilizaron los extractos crudos (no purificados) del pigmento de color naranja. Para saber si el extracto estaba puro, se realizó una cromatografía de capa fina con los pigmentos de los aislamientos de *P. sanguineus* (H1 y H2), los pigmentos se corrieron con un sistema hexano-acetato de etilo (2:1) el cual reveló la presencia de 4 compuestos, dos de estos compuestos se lograron

ver con luz UV y los otros se pudieron observar a simple vista por lo que se realizó un barrido al pigmento dando lugar a dos picos en el espectro UV (Figura 16).

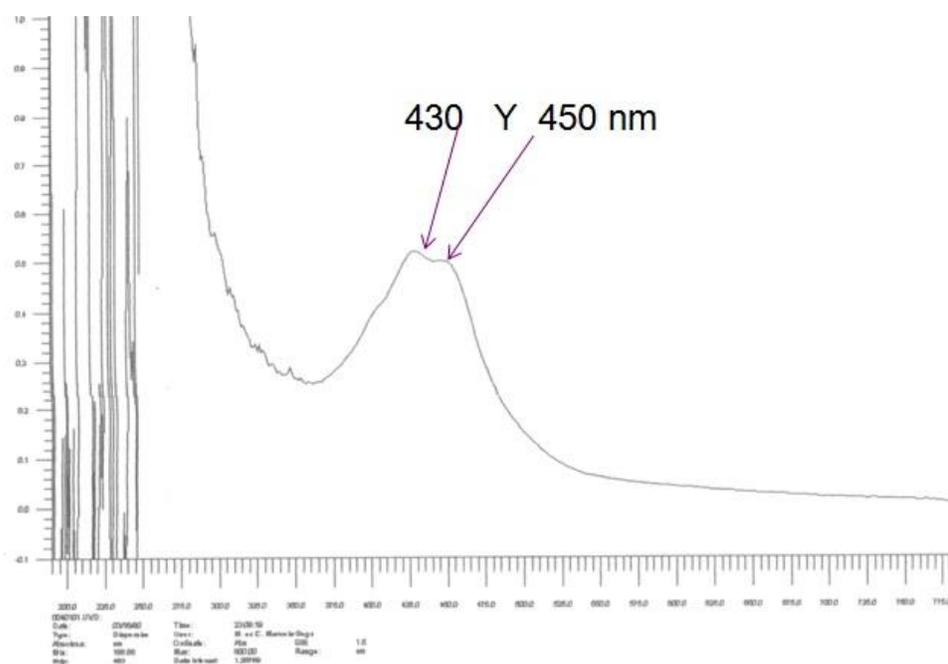


Figura 16. Espectrograma de UV del pigmento de color naranja extraído de H1.

En el espectrograma se pudo verificar la existencia de dos picos, el primero a 430 nm y el segundo a 450 nm (Figura 16). Al exponer la placa cromatográfica a la luz UV, se observaron dos compuestos, uno rosa y otro amarillo (Figura 17) por lo que habría que definir cuáles de estos compuestos es la cinnabarina que, de acuerdo con la literatura, es de color naranja. De esta manera, se despejaría la duda de que es la cinnabarina la que ejerce el control de actividad antibacteriana y de retraso en el crecimiento de los hongos fitopatógenos o si es otro el agente inhibidor (por ejemplo, el poliporin). Pudiera ser la interacción de ambos compuestos.

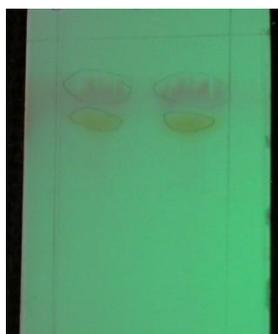


Figura 17. Cromatografía de capa fina de los extractos crudos H1 y H2

6. CONCLUSIONES

Aunque los resultados no mostraron una tendencia definida, las mejores condiciones de producción del pigmento naranja para ambos aislamientos fueron a pH 8, caldo de papa y luz blanca continua, aunque en el caso del rendimiento, hayan sido a mayor pH en el caso de H1 y en extracto de malta, en caso de H2.

Se logró reducir el crecimiento de hongos fitopatógenos *in vitro* en postcosecha con el uso de extractos crudos del pigmento de color naranja de *P. sanguineus*. En caso de *B. cinerea*, la reducción en el crecimiento fue casi del 70 y 60% para los tratamientos con 10, y 20 mg/mL, respectivamente. Para *C. fragarie*, la inhibición fue mayor al 50% y sólo del 40% para *C. gloeosporioides*.

Se encontró la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de los extractos crudos del pigmento de color naranja de *P. sanguineus* contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora* (H1>12mg/mL; H2, 7mg/mL) y *Pectobacterium carotovorum*(H1, 10mg/mL; H2, >12mg/mL); así como de las bacterias patógenas (*in vitro*) de interés clínico *Salmonella thyphi* (8mg/mL), *Bacillus cereus* (H1, 8mg/mL; H2,10mg/mL), *Klebsella pneumoniae* (>12mg/mL), *Shigella dysenteriae* (8mg/mL).

7. VII. REFERENCIAS

- Achenbach, H. and Blümm, E. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* -picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Arch. Pharm., 324: 3-6.
- Adrio, J.L., A.L. Demian, 2003. Fungal biotechnology. International Microbiology 6:191-199.
- Alippi, A. M., Dal Bó, E., Ronco, L. B., and Casanova, P. E. 1997. Tomato as a new host of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* in Argentina. Plant Disease 81: 230.
- Allende, M.R., Juárez, R.C., García, E.R.S. y Carrillo, F.A. 2000. Control biológico de antracnosis en frutos de mango Keirr en Culiacán, Sinaloa. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Control biológico. Guanajuato, Guanajuato México. pp.219-222.
- Arauz, L.F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact current for integrated management. Plant Disease 84:600-611.
- Arras G., De Cicco V., Arru, S. y Lima G. 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 73: 413-418.
- Avendaño, R. B., Schwemtesius, R.R., y Lugo, M.S. 2002. Inocuidad en hortalizas ¿Beneficio para el consumidor o nueva barrera al comercio?. Reporte de Investigación. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM) Universidad Autónoma de Chapingo <http://www.fao.org/ag/agn/fv/files/inocuidad.pdf>. 2011/11/10.
- Bailey, S., Finegold, S., Baron, E. 1991. Diagnostico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, 7ª edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 190-209.
- Bajpai, V., Rahman, A., y Chul, K. S. 2007. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. Industrial Crops and Products 26: 712-714.
- Baker, K. F. and Cook, R. J. Biological Control of Plant Pathogens. San Francisco: W. H. Freeman; 1974. 433p
- Barkai, R. G. 2001. Biological control. En: Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables Development and Control. Barkai, R. G (Ed). Elsevier Science B.V. pp.221-225.
- Baumer, J.D., Mas Diegp, S. M., Pacheco, S.M.V., Morgado, A.F.M., Furigo, A. F.Jr. 2008. Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarina by different strains of *Pycnoporus sanguineus*. Biofar., 2:12-17.

- Bautista, B. S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8(01): 1-6.
- Blanc, P.J.; Loret, M.O., Santerre, A.L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Laussac, J.P. and Goma, G.A. 1994. Pigments of *Monascus*. *Journal of Food Science* 59(4), 862-865.
- Brady P. 2002. *Mejorando la Seguridad y Calidad de Frutas y Hortalizas Frescas: Manual de Formación para Instructores* Copyright © 2002 University of Maryland.
- Brizuela, M., García, L. Pérez, L. y Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:68-74.
- Brote de Salmonella en Alemania por pepinos españoles:
- Bull C. T., Wadsworth K. N., Sorenson K. N., Takemoto J., Austin R. y Sminalick J. L. 1998. Syringomycin E produced by biological agents controls green mold on lemons. *Biological Control* 12: 89- 95.
- Calvo, M.A., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C. and Gooday, G.W. 2001. *Fungi and biotechnology in The fungi*. Academic Press (Ed). London UK. pp.513-524.
- Carrillo, F.J.A., García, E.R.S., Muy, R. M.D., Sañudo, B.A., Márquez, Z.I., Allende, M.R., De la Garza, R.Z., Patiño, V.M., Galindo, F.E. 2005. Control Biológico de Antracnosis y su efecto en la calidad poscosecha del mango en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 1 (23):24-32.
- Carvalho, J.C. Pandey, A., Babitha, S. and Soccol, C. R. 2003. Production of *Monascus biopigments*: An overview. *AgroFOOD industry hi-tech*. 6,37-42
- Casas-López, J.L., J.A. Sánchez-Pérez, F.G. Fernández-Sevilla, E. Molina Grima, Y. Chisti, 2004. Fermentation, optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and*
- Castoria r., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S. y De Cicco V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology Technology* 22:7-17
- Delp, C.J. 1980. Coping with resistance to plant disease control agents. *Plant Dis.* 64:652-657.
- Chaves, N. y Wang, A. 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gluicladium roseum*. *Agronomía Costarricense* 28(2):73-85.

- Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. N., Song, C. H. and Yun, J. W. 2002 b. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. Letters of Applied Microbiology 35,195-202.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C. L. y Wisniewski M. E. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaromyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. Canadian Journal of Microbiology 35: 794-800
- Duran, N.,Teixeira, M. F.S., De Conti, R.and Espósito, E. 2002. Ecological-Friendly Pigments From Fungi. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 42(1).53-66.
- Engstrom, G.W.,Stenkamp,R.E.,McDorman,D.J. and Jensen,L.H.1982.Spectral Identification X-ray Structure Determination, and Iron-Chelating Capability of Erythroglaucin a Red Pigment form *Aspergillus ruber*.Journal of Agriculture and Food Chemistry 30:304-307.
- FAO 1993. Manual de capacitación. Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos [en línea] <http://www.fao.org/docrep/T0073S/T0073S00.htm>.2011/10/01.
- FAO/WHO Expert Committee on Food Safety. WHO Tech. Rep:705.
- FAO/WHO.1984.The role of food safety in health and development. Report of Joint
- FDA. 2001. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – The “Bad Bug Book.” U.S. Food and Drug Administration-Center for Food Safety and Applied Nutrition. Available via the Internet at <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.cfm>
- Franco, C.Y., Stefanova, N.M., Coronado, I.M.F. 2007.Patofenicidad y virulencia de cepas de *Pectobacterium carotovotum* y *Dickeya Chrysanthemi* en papa (*solanum tuberosum l.*). Fitosanidad 11:15-18.
- Frisvad, C.J.; U. Traen, O. Filtenborg, 1998.Role and use of secondary metabolites in fungal taxonomy. In: Frisvad; J.C., P.D. Bridge, D.K. Arora, (eds), Chemical fungal Taxonomy. Marcel-Decker, Nueva York pp. 289-319.
- Gripenberg, J. 1951. Fungus pigment. I. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. Acta Chem. Scand., 12:590-59.
- Guzewich, J.J. and Salsbury, P.A. 2000. FDA’s role in traceback investigations for produce.Food Safety Magazine.December, 2000/January, 2001.
- Hartting, U., Anke, T., Scherer, A. and Steglich, w.1990.Leianafulvene, a sesquiterpenoid fulvene derivative from cultures of *Mycena leiana*.Phytochemistry. 29:3942-3944.

- Hernández, L.A., Bautista, B.S., y Velázquez, D.M.G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas [versión electrónica]. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(02): 119-123.
- Hernández, M.L., Hernández, A. A.M., Cháidez, Q.C., Rendón, S. G. y Suslow, T.V. 2009. Detección de *Salmonella* spp. En melón *Cantaloupe* en unidades de producción y unidad de empaque. *Agricultura Técnica en México*, 35 (2): 135-145.
- Hofstein R. S., Droby S., Chalutz E., Wilson C. L. y Friendlendes T. 1991. Scaling-up the production of an antagonist—From basic research to R and D. pp: 188-201. En: US Department of Agriculture Research Service Publication. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Workshop proceedings. Shepherdstown, WV.
- Hwang, H. J., S. W. Kim, C. P. Xu, J. W. Choi, and J. W. Yun. 2004. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 96: 1296-1305.
- Janisciewicz W. J. y Marchi A. 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease* 76:55-560.
- Janisciewicz, W. J. y Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40:411-441.
- Janisciewicz, W.J. and Roitman, J. 2000. Biological control of blue mould and gray mould with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78:1697-1700.
- Keller, N.P., G. Turner, J.W. Bennett, 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3:937-947.
- Komeman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G. y Screckenberger, P. 2004. Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica-PANamericana. 5a. Edición. Argentina. pp. 565-620.
- Larsen, T.O. and Breinholt, J. 1999. Dichlorodiaportin, Diaportinol, and Diaportinic Acid: Three Novel Isocoumarins from *Penicillium nalgiovense*. *Journal of Natural Products* 62,1182-1184.
- López, A., Vélez, M., Sánchez, A.S., Bonilla C.C.R., Gallo, P.I. 2005. Evaluación de extractos vegetales para manejo de hongos patógenos en banano y fresa almacenados. *Acta Agron (Colombia)*. 4 (55): 39-44.
- Matamoros G. 1986. La fresa, prácticas de cultivo. Estación Experimental Fabio Baudrit, Escuela de Fitotecnia, Vicerrectoría de Acción Social, Universidad de Costa Rica – Instituto del Café de Costa Rica. San José, Costa Rica. p.29.

- McLaughlin R. J., Wisniewski M. E., Wilson C. L. y Chalutz E. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida sp.* *Phytopathology* 80:456-461
- Palacio, A., Cambra M., López M., Ordax M., Peñalver J., Gorrís M., Cambra M., Marco-Noales E., Llop P., Biosca E., Roselló M., Montesinos E., Llorente I., Badosa E., Cabrefiga J., Bonaterra A., Ruz L., Moragrega C., Francés J. y Díaz C., 2008. El fuego bacteriano: la enfermedad. En: El fuego Bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Palacio, A. Y Cambra M. (Ed). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino., Zaragoza-España. pp.13-48.
- Parés, I.F.R., Juárez, G.A. 2002. Capítulo 24 Metabolitos secundarios. En: Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté, S.A. de C.V. 2da. Reimpresión. Barcelona España. pp.324-338.
- Poveda, P.D.C. 2006. Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C. pp. 48-59
- Practical guide to integrated disease management. United States Department of Agriculture (U.S.D.A.). *Agriculture Information Bulletin*, 631, 83 pp.
- Ramos, R. C.; et al. (2006). Cinética de Crescimento de *Pycnoporus sanguineus* em Sistema Submerso Para Produção de Compostos Antibacterianos. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química.
- Rosa L.E., Gomes, M. K.M., Cristina, J.C., Capelari, M., Augusto, R.C. and Leomar, Z.C. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(7): 967-974.
- Serrano, C.L. y Galindo, F.E. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. Enero-marzo 2007:77-88.
- Shipanova, I.; Bartoshevich, Y.; Sibeldina, L.; Zaslavskaya, P.; Michtchenko, A. 1995. Relationship between intracellular pH and antibiotic biosynthesis in *Fusidium coccineum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43:514-517.
- Smânia, A. Jr., Delle Monache, F., Smânia, E.F.A., Gil, M.L., Benchetrit, L.C. 1995a. Cruz, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J. Ethnopharmacol.*, 45:177-181.
- Smânia, E.F.A., Smânia, A. Jr., Loguercio-Leite, C., Gil, M.L. 1997. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *J. Chem. Biotechnol.*, 70:57-59.

- Smânia, E.F.A., Smânia, A.Jr., and Loguercio, L.C. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Rev. Microbiol* 29: 129-136.
- Smilanick J. L. y Denis-Arrue R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease* 76:481-485.
- Sommer, N.F., Fortalage, J., Edwards, D.C. 2002. Postharvest Diseases of selected commodities. En Kader, A.A. (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops* (pp.223-227). University of California.
- Strohl, W.R., 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today* 5: 39-41.
- Suhr, K. I., Haasum, I., Streenstrup, L.D. and Larsen, T.O. 2002. Factors Affecting Growth and Pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *Journal of Dairy Science* 85(11), 2786-2794.
- Thomson. 2007. *Diccionario de especialidades agroquímicas patrocinado por BASF The chemical company* (versión electrónica).
- Tripathi P., y Dubey N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32:325-245.
- UNAM2011. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=8039> 2011/10/10
- Van Der Zwet, T., Beer, S.V. 1995. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A
- Wani, K.S., Naphade, B.S., Chaudhari, B.L. and Chincholkar, S. B. 2004. Pigment Production in Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. Ashok Pandey, PhD. The Haworth Reference Press, Inc. 645-652.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1994. *Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Wilson, C.L., & Lawrence P.P. 1985. Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Disease*, 69(05):375-378.
- http://www.elpais.com/articulo/sociedad/Pepinos/espanoles/provocan/brote/letal/coli/Alemania/elpepusoc/20110526/elpepusoc_15/Tes
- <http://mx.ibtimes.com/articles/13750/20110530/e-coli-en-pepinos.htm>

