

Ciencia y Tecnología Alimentaria  
Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos  
somenta@gmail.com  
ISSN (Versión impresa): 1135-8122  
ISSN (Versión en línea): 1696-2443  
MÉXICO

2007

J.L. Ochoa / L. G. Hernández Montiel / H. Latisnere Barragán / J. L. León de la Luz /  
C. P. Larralde Corona

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS DE NARANJA CITRUS  
SINENSIS L. OSBECK CULTIVADA EN BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO

*Ciencia y Tecnología Alimentaria*, año/vol. 5, número 005  
Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos  
Reynosa, México  
pp. 352-359

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS DE NARANJA *Citrus sinensis* L. OSBECK CULTIVADA EN BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO

### ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI FROM ORANGE *Citrus sinensis* L. OSBECK CULTURED IN BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO

Ochoa, J. L.<sup>1\*</sup>; Hernández-Montiel, L. G.<sup>1</sup>; Latisnere-Barragán, H.<sup>1</sup>; León de La Luz, J. L.<sup>1</sup>; Larralde-Corona, C. P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo 195, La Paz, CP 23090, Baja California Sur, México. <sup>2</sup>Centro de Biotecnología Genómica-IPN, Boulevard del Maestro esq. Elías Piña, Reynosa, C.P. 88710, Tamaulipas, México.

Recibido/Received 16-07-2007; aceptado/accepted 03-10-2007

\*Autor para la correspondencia/Corresponding author. E-mail: jlochoa@cibnor.mx

#### Abstract

Citric fruits constitute an important commodity in Mexico. However, because of significant post-harvest losses (up to 40%), the citrus industry in Mexico requires optimization. The presence of pathogenic fungi affecting root system, stem, leaves and fruits, represent a risk for ulterior development of post-harvest rotting. In this work, several varieties of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), Valencia Temprana, Valencia Tardía y Washington Navel, grown in Comondú, Baja California Sur, México were analyzed, aiming to identify the corresponding pathogenic fungi present on the fruit surface. Several fungi belonging to *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* genera were isolated. Sequence analysis of their ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region showed that the fungi correspond to *A. flavus*, *F. oxysporum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, and *P. variabile* species, which are known to cause diseases affecting fruit quality. This work identify suitable treatments for citrus production in Baja California Sur in order to extend their shelf-life and quality to compete in national and international markets successfully.

#### Resumen

Los cítricos son uno de los principales productos agrícolas de México. Sin embargo, debido a las pérdidas significativas en poscosecha (hasta un 40%) es importante optimizar su producción. La presencia de hongos fitopatógenos que atacan la raíz, tronco, hojas y frutos constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de este cultivo. En este trabajo se analizaron las variedades de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Valencia Temprana, Valencia Tardía y Washington Navel cultivada en la zona de Comondú, Baja California Sur, México, para identificar los hongos fitopatógenos que pudieran afectar la calidad de los frutos durante su almacenamiento. Se aislaron e identificaron morfológicamente varios hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. El análisis de la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA demostró que las especies aisladas fueron *A. flavus*, *F. oxysporum*, *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. variabile*, los cuales son agentes causales de pudriciones y enfermedades en los frutos, afectando su calidad. Este trabajo posibilita la adopción de medidas de tratamiento y biocontrol de las enfermedades de la naranja cultivada en Baja California Sur con el objeto de extender su vida de anaquel y competir exitosamente en los mercados nacional e internacional.

Keywords: Citric fruits, orange, *Citrus sinensis*, phyto-pathogenic fungi, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium variabile*

Palabras clave: Cítricos, naranja, hongos fitopatógenos, *Citrus sinensis*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium variabile*

#### INTRODUCCIÓN

La producción de naranja en México se basa exclusivamente en las variedades Valencia y Washington navel en casi todas las regiones productoras. Algunas de estas ofrecen ventajas debido a su posibilidad de exportación, a la época de cosecha y/o porque existe una demanda en el mercado. Es conveniente tomar en cuenta las características de las variedades, las condiciones de clima, suelo, preferencia de mercados, etc. para lograr los

mejores beneficios en la selección de variedades. México ha firmado tratados comerciales con Chile (1992), el TLC con Norteamérica (1994), Costa Rica (1995), Bolivia (1995), Nicaragua (1998), Israel (2000) y la Unión Europea (2000), los cuales han fijado la pauta para incrementar las exportaciones de productos agrícolas mexicanos.

La naranja es una fruta subtropical (<http://www.infoagro.com/citricos/naranja.htm>) por lo que las condiciones climáticas prevalecientes en Baja California

Sur (BCS) pueden representar cierta ventaja en su cultivo. Por ejemplo, el factor limitante más importante para el cultivo de la naranja es la temperatura mínima, ya que no tolera las inferiores a -3 °C, condición que puede cumplirse con el clima árido y semi-árido que impera en BCS (<http://www.mexconnect.com/MEX/austin/baja.html>). La naranja necesita temperaturas cálidas durante el verano para la correcta maduración de los frutos y aunque requiere de precipitaciones de alrededor de 1,200 mm anuales, cuando no son cubiertas se recurre al riego. Siendo la naranja una especie que necesita luz para los procesos de floración y fructificación, BCS puede ser el lugar idóneo para su cultivo, ya que recibe una de las más altas tasas de irradiación solar en el mundo. Finalmente, la naranja necesita de suelos permeables y poco calizos para una buena producción, lo cual es una característica común en los suelos de BCS, que siendo fundamentalmente arenosos presentan una proporción equilibrada de elementos gruesos y finos (textura) para garantizar una buena aireación y facilitar el paso de agua. La mayor desventaja para el cultivo de naranja en BCS lo constituye la salinidad del suelo o agua de riego que afecta al crecimiento de las plantas, por lo que en este caso deben seleccionarse variedades halotolerantes.

Las enfermedades de los cítricos ocasionadas por hongos provocan pérdidas económicas en todo el mundo, y en algunos casos alcanzan hasta el 50 % de la producción total de los frutos. La aplicación de fungicidas reducen las pérdidas significativamente, pero éstas aún se ubican entre un 5-10% de la producción total (Ismail y Zhang, 2004; Margosan *et al.*, 1997). Dentro de los principales hongos causantes de pudriciones en el caso de naranja destacan: *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Geotrichum candidum*, *Colletotrichum acutatum* y *Rhizopus stolonifer*; entre otros (Altieri *et al.*, 2005; Benyahia *et al.*, 2003; Qing y Shiping, 2000; Pavoncello *et al.*, 2001; Wuryatmo *et al.*, 2003). La infección por hongos puede ocurrir durante el cultivo, en el momento de la colecta, durante el procesamiento o empaqueo, almacenamiento, transporte y mercado, e incluso después de ser adquirido por el consumidor (Amiri y Bompeix, 2005; Dennis, 1983; Sanderson y Spotts, 1995). Los síntomas de deterioro se manifiestan cuando el hongo fitopatógeno comienza a desarrollarse activamente en el fruto. En muchos casos de infección se aprecia un cambio de coloración y la destrucción del tejido con la aparición de lesiones (Droby *et al.*, 2002). De manera tradicional, su control se basa principalmente en el uso de fungicidas sintéticos (Capdeville *et al.*, 2002), sin embargo la demanda por parte de los consumidores de productos libres de residuos químicos (Castoria *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2000) y la aparición de hongos resistentes a estos compuestos (Zheng *et al.*, 2004) ha dificultado el control de estos patógenos.

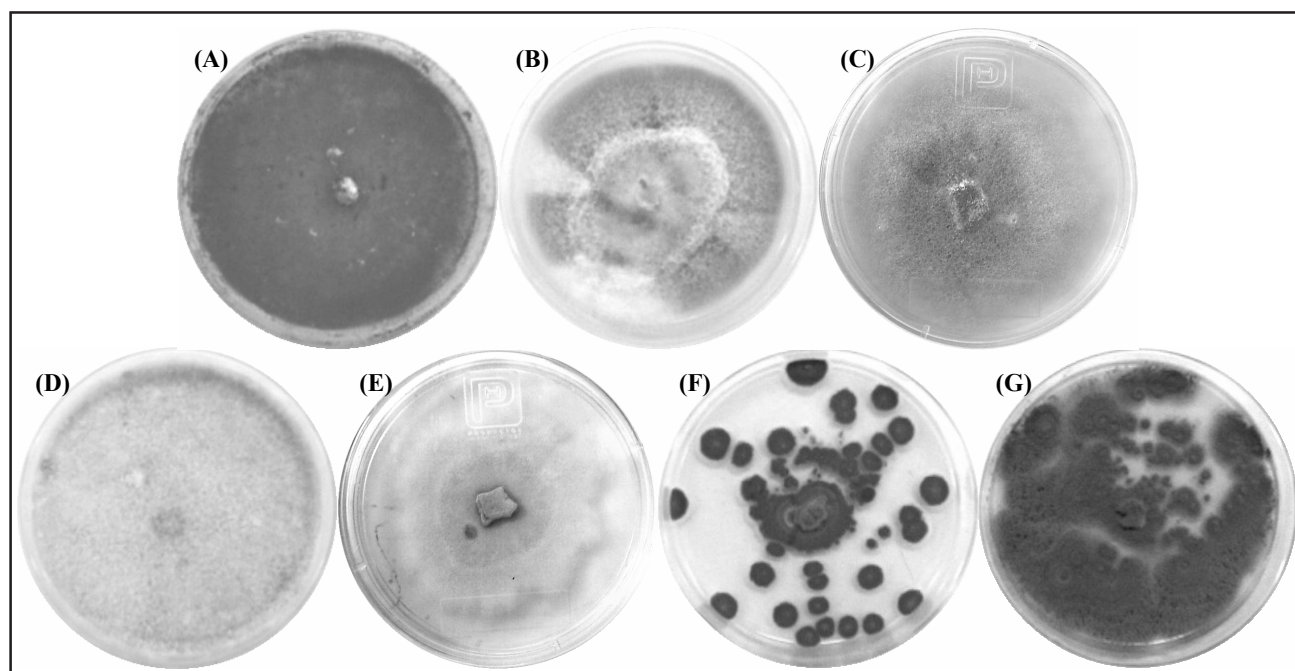
En México, la experiencia sobre el control de infecciones, conservación y almacenamiento de cítricos,

lamentablemente, no está bien documentada (Orozco-Santos, 1991). Se estiman pérdidas en la citricultura nacional del 40% de la producción en poscosecha solamente, por lo que el impacto de las enfermedades fúngicas en los cítricos es relevante. No obstante, no existe información disponible sobre la naturaleza e impacto de las poblaciones de microorganismos patógenos poscosecha de los cítricos cultivados en BCS. La experiencia en el estudio sobre las enfermedades de frutos poscosecha a nivel mundial sugiere que la problemática de cada región es distinta, tanto por cuestiones de manejo, como condiciones de suelo, clima y variedad de fruto. No es posible por lo tanto generalizar sobre la incidencia de las enfermedades ni sobre su control o tratamiento, por lo cual es necesario caracterizar cada caso. Para ello, la identificación precisa de los hongos fitopatógenos que se presentan en un huerto o bodega determinado posibilita tanto la generación de información del rol ecológico de una especie determinada como las posibles consecuencias que potencialmente se pueden presentar y la manera de combatirlos. Una forma rápida y eficaz para identificar los hongos es analizar la secuencia de regiones del DNA específicas (Seifert *et al.*, 2007), tales como la que codifica para la citocromo oxidasa 1 (*COI*), la de la  $\beta$ -tubulina (*BenA*), la del factor de elongación 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) o la subunidad ribosomal 5.8S flanqueada por sus espaciadores (*ITS1-5.8S-ITS2*). Esta información, junto con las características morfológicas y bioquímicas específicas, constituye la base de la identificación y clasificación taxonómica de los microorganismos. En este trabajo se dan a conocer los principales hongos fitopatógenos aislados de naranja cultivada en BCS. Los resultados aquí presentados constituyen una advertencia que pudiera ser tomada en cuenta por los citricultores locales si planean alcanzar los mercados internacionales y realizar el control racional y específico de las enfermedades fúngicas de cítricos cultivados en México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitios de colecta

En Diciembre del 2003 se realizó la colecta del material vegetal en las inmediaciones de las huertas localizadas en el Lote 4 (Col. Mexicali), Lote 51 (Col. Cuitláhuac) y Lote 318 (Col. Emiliano Zapata), todas pertenecientes al municipio de Comondú, BCS. En las tres huertas, las variedades de naranja cultivada correspondieron a 'Valencia Temprana', 'Valencia Tardía' y 'Washington Navel'. Las tres variedades se plantaron juntas, sin barreras físicas o separación entre los árboles que eviten la transmisión de enfermedades de una variedad a otra. Se colectaron de cada variedad 6 frutos sin lesión aparente del flavedo de 5 árboles seleccionados al azar de cada lote, depositándolos en bolsas de plástico estériles para ser transportados inmediatamente al laboratorio en cajas de espuma de poliuretano.



**Figura 1.** Identificación de hongos aislados de distintas variedades de naranja cultivada en Baja California Sur, México. (A) *Penicillium* spp. Ceba PvWN002, (B) *Fusarium* spp. Ceba FoWN001, (C) *Fusarium* spp. Ceba FoWN003, (D) *Aspergillus* spp. cepa AfVT001, (E) *Fusarium* spp. cepa FoVTa001, (F) *Penicillium* spp. cepa PiWN004 y (G) *Penicillium* spp. cepa PdVTa002.

**Figure 1.** Identification of fungi isolated from different varieties of orange cultivated in Baja California Sur, Mexico. (A) *Penicillium* spp. strain PvWN002, (B) *Fusarium* spp. strain FoWN001, (C) *Fusarium* spp. strain FoWN003, (D) *Aspergillus* spp. strain AfVT001, (E) *Fusarium* spp. strain FoVTa001, (F) *Penicillium* spp. strain PiWN004 y (G) *Penicillium* spp. strain PdVTa002.

### Aislamiento de hongos

Los hongos de los frutos se aislaron mediante un raspado superficial y sembrando la muestra en placas con medio agar Papa-Dextrosa (PDA, Difco®) adicionado con 100 mg/L de cloranfenicol (SIGMA®) y 50 mg/L de ampicilina (SIGMA®) para inhibir el crecimiento de bacterias (Benbow y Sugar, 1999). Las placas fueron depositadas en una incubadora (VWR®) durante 7 días a 30 °C en completa oscuridad. Las colonias diferenciales se transfirieron a nuevas placas con medio PDA hasta lograr su purificación. Posteriormente, se realizó la caracterización morfológica macro y microscópica de cada uno de los hongos aislados, tomando como base las claves propuestas por Barnett y Hunter (1998), Carrillo (2003), Nelson *et al.* (1983), Pitt (1988) y Romero (1988).

### Crecimiento del hongo y extracción de ADN

Los hongos fueron cultivados en caldo de papa dextrosa a 30 °C durante 7 días. La masa micelial fue cosechada por filtración y el DNA fue extraído usando el método de Raeder y Broda (1985).

### Identificación molecular

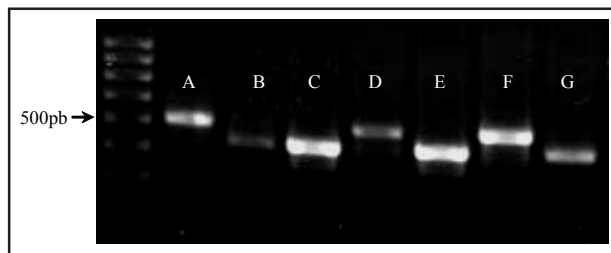
La región ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA, fue obtenida mediante los iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990),

sintetizados por Sigma-Genosys (EUA). Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en un termociclador (System 9700 GeneAmp®) con un periodo de desnaturalización de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (los cuales comprendían una desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineación por 30 s a 50 °C y una extensión de 2 min a 72 °C), con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (SIGMA®), se tiñeron con bromuro de etidio (0,2 µg/ml), se visualizaron en un transiluminador (BioDoc-IT imagen system, UVP®) y fueron secuenciados por la compañía MACROGEN (Seúl, Korea). La identificación molecular se realizó comparando la secuencia obtenida contra todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fenotipo macroscópico de los hongos aislados de las naranjas cultivadas en BCS se muestra en la Figura 1, en donde se aprecian las características coloniales principales que constituyen el primer paso de identificación a nivel de género. Respecto a la amplificación de la región ITS del rDNA, se observa una diversidad en tamaños de





**Figura 2.** Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA de los hongos aislados de naranja cultivada en Baja California Sur, México. A) *Penicillium* spp., B) *Fusarium* spp., C) *Fusarium* spp., D) *Aspergillus* spp., E) *F. oxysporum*, F) *Penicillium* spp. y G) *Penicillium* spp.

**Figure 2.** Amplification of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region from fungi isolated from orange cultured in Baja California Sur, Mexico. A) *Penicillium* spp., B) *Fusarium* spp., C) *Fusarium* spp., D) *Aspergillus* spp., E) *F. oxysporum*, F) *Penicillium* spp. y G) *Penicillium* spp.

fragmentos de los hongos aislados (Figura, 2). Estas diferencias en tamaño existen debido a un alto grado de polimorfismo entre especies y entre cepas de la misma especie (Duggal *et al.*, 1997). Esta variación en composición nucleotídica y longitud pudiera deberse a la característica de alta repetición y baja tasa de evolución de esta unidad del rDNA, a la presencia de más de un núcleo con diferentes secuencias de rDNA dentro del mismo organismo aislado, al intercambio de núcleos por la fusión de hifas con otros individuos, o bien a cambios genéticos y de presión selectiva (Tavares-Ramos *et al.*, 2004). El análisis comparativo de las secuencias (Tabla 1 y 2) con la base de datos del NCBI, permitió la identificación de las especies *Aspergillus flavus*, *Penicillium variabile*, *P. italicum*, *P. digitatum* y tres cepas de *Fusarium oxysporum*. La presencia de estos microorganismos en los frutos puede estar regulada por el manejo agronómico de cada una de las huertas; por ejemplo, *Penicillium* spp., fue aislado en las huertas Lote 4 y 51 y estuvo ausente en la huerta del Lote 318 en las tres variedades de naranja analizadas. Ello puede deberse a la aplicación de tratamientos precosecha, los cuales juegan un papel preponderante en la reducción de este patógeno (Droby *et al.*, 1997). Estos resultados

sugieren que los hongos prevalentes en las huertas de naranja constituyen una amenaza a la calidad de los frutos por lo que se deben implementar tratamientos de control adecuados, ya que algunas especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* producen toxinas en frutos y vegetales almacenados que pueden representar un riesgo para los consumidores (Lugauskas y Stakénienė, 2002).

Entre los aislamientos obtenidos, *P. italicum* y *P. digitatum*, comúnmente conocidos como moho azul y moho verde, respectivamente (Yildiz *et al.*, 2005), ya han sido reportados como patógenos poscosecha de los cítricos (McGuire, 2000; Wild, 1994) y son responsables de pérdidas económicas en todo el mundo (Skouboe *et al.*, 1999). La infección comienza con la penetración de las esporas en las heridas de los frutos en el árbol, durante la cosecha o el transporte (Spotts *et al.*, 1998). Los síntomas aparecen como cambios en la coloración del fruto (Snowdon, 1990), debido al desarrollo del micelio sobre la superficie, seguida por la aparición de una masa de esporas de color azul (*P. italicum*) o verde-olivo (*P. digitatum*), según sea el caso, como manifestación clara de una infección. La pudrición de los frutos por esta causa puede llegar al 40 % de la producción total, por lo que la detección oportuna reviste de importancia (OEPP/EPO, 2004). Las condiciones climáticas y de cultivo (variedad en cultivares, aplicación de fertilizantes, tipo de suelo, entre otros) pueden determinar la susceptibilidad de los frutos a las enfermedades, maduración, manejo y almacenamiento (Plaza *et al.*, 2003; Smilanick *et al.*, 2003).

Por otro lado, *Penicillium variabile* es un hongo de lento crecimiento que produce una colonia amarillenta y naranja, verdosa y color oscuro en el reverso cuando se crece a 25 °C. Ha sido aislado principalmente de suelos desérticos, dunas, agua de mar, manglares y jugo de frutas (<http://www.pureaircontrols.com/glossary.html>). En el caso particular de *Aspergillus flavus*, aunque no es un patógeno frecuente en frutos cítricos, ha sido aislado de limón en diferentes plantaciones de Argentina (Maldonado *et al.*, 2005) y de naranjas en descomposición (Varma y Verma, 1987). En las estaciones cálidas y húmedas, *A. flavus* puede causar pudriciones importantes en limón agrio (*Citrus*

**Tabla 1.** Identificación de los diferentes hongos aislados de naranja cultivada en Baja California Sur, México.

**Table 1.** Identification of fungi isolated from oranges cultivated in Baja California Sur, México.

Cepa	Origen	Variedad de naranja	Identificación Molecular (NCBI)	Identidad
FoWN001	Lote 318 E. Zapata	Washington Navel	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i> (DQ452453.1)	99 %
PvWN002	Lote 51 Cuitláhuac	Washington Navel	<i>Penicillium variabile</i> (AY373936.1)	99 %
FoWN003		Washington Navel	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i> (DQ452453.1)	99 %
AfVT001		Valencia Temprana	<i>Aspergillus flavus</i> (DQ467982.)	100 %
FoVTa001	Lote 4 Mexicali	Valencia Tardía	<i>Fusarium oxysporum</i> (DQ123598.1)	97 %
PiWN004		Washington Navel	<i>Penicillium italicum</i> (AY373920.1)	99 %
PdVTa002		Valencia Tardía	<i>Penicillium digitatum</i> (DQ426516)	100 %

**Tabla 2.** Homología de la secuencia de los hongos aislados de naranja cultivada en Baja California Sur de acuerdo al N.C.B.I. (National Center of Biotechnology Information).

**Table 2.** Sequence homology of fungi isolated from oranges cultivated in Baja California Sur, Mexico, according to N.C.B.I. (National Center of Biotechnology Information).

**Cepas FoWN001 y FoWN003 (*Fusarium* spp.).** DQ452453.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* cepa ATCC 15642. Gen del RNA ribosomal 18S, secuencia parcial; espaciador transcripcional interno 1, gen del RNA ribosomal 5.8S, y espaciador transcripcional interno 2, secuencias completas; y gen del RNA ribosomal 28S, secuencia parcial. Identidad = 451/452 (99%), Gaps = 1/452 (0%).

```

Query 1  ACTCCCAAAACCCCTGTGAACATACCACCTGTGTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCAGTA 60
Sbjct 42  ACTCCCAAAACCCCTGTGAACATACCACCTGTGTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCAGTA 101

Query 61  AAACGGGACGCGCCGCCAGAGGACCCCT-AACTCTGTTCTATATGTAACTTCTGAGTAA 119
Sbjct 102  AAACGGGACGCGCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTCTATATGTAACTTCTGAGTAA 161

Query 120  AACCCATAAATAAATAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTCTCGGCATCGATGAAGAA 179
Sbjct 162  AACCCATAAATAAATAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTCTCGGCATCGATGAAGAA 221

Query 180  CGCAGCAAAATGCGATAAGTAAGTGAATTCAGAAATCACTGAAATCACTGAAATCTTTGA 239
Sbjct 222  CGCAGCAAAATGCGATAAGTAAGTGAATTCAGAAATCACTGAAATCACTGAAATCTTTGA 281

Query 240  ACGCACATTTGGCTGCGCATTTCTGGCGGCGATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCACCC 299
Sbjct 282  ACGCACATTTGGCTGCGCATTTCTGGCGGCGATGCGCTGTTTCGAGCGTCATTTCACCC 341

Query 300  TCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTAAATTCGCGTTCGCCAAATGATGGCGGT 359
Sbjct 342  TCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTAAATTCGCGTTCGCCAAATGATGGCGGT 401

Query 360  CACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAACCCCTGCTACTGTTAACTCGCGGCCAC 419
Sbjct 402  CACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAACCCCTGCTACTGTTAACTCGCGGCCAC 461

Query 420  GCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC 451
Sbjct 462  GCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC 493
    
```

**Cepa FoVTa001 (*Fusarium* spp.).** DQ123598.1. *Fusarium oxysporum* cepa CBMAI 53. Espaciador transcripcional interno 1, secuencia parcial; gen del RNA ribosomal 5.8S, secuencia completa; y espaciador transcripcional interno 2, secuencia parcial. Identidad = 275/282 (97%), Gaps = 4/282 (1%).

```

Query 1  GTTGCTTCGGCGATCAGCCCGCTCCCAGTAAACGGGACGCGCCCGCAGAGACCCCT 60
Sbjct 4  GTTGCTTCGGCGATCAGCCCGCTCCCAGTAAACGGGACGCGCCCGCAGAGACCCCT 63

Query 61  AAACCTCTGTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAACCCATAAATAAATAAACTTCAACA 120
Sbjct 64  AAACCTCTGTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAACCCATAAATAAATAAATAAACTTCAACA 123

Query 121  ACGGATCTCTGGTCTCGCATCGATGAAGAAGCGCAAAAATGCGATAAGTAAGTAAAGTAA 180
Sbjct 124  ACGGATCTCTGGTCTCGCATCGATGAAGAAGCGCAAAAATGCGATAAGTAAGTAAAGTAA 183

Query 181  TTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCATTTGCGCCGTCAGTATTCT 240
Sbjct 184  TTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCATTTGCGCCGTCAGTATTCT 241

Query 241  GGCGGTATGCTTGTTCGATGCGTCAATTTAAACCTCAAGC 282
Sbjct 242  GGCGGTATGCTTGTTCGATGCGTCAATTTAAACCTCAAGC 281
    
```

**Cepa AfVT001 (*Aspergillus* spp.).** DQ467982. *Aspergillus flavus* cepa UR24. Gen del RNA ribosomal 18S, secuencia parcial; espaciador transcripcional interno 1, gen del RNA ribosomal 5.8S, y espaciador transcripcional interno 2, secuencias completas; y gen del RNA ribosomal 28S, secuencia parcial. Identidad = 550/550 (100%), Gaps = 0/550 (0%).

```

Query 3  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAATACCAGTGTAGGGTTCTTAGCGAGCCCAACC 63
Sbjct 5  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAATACCAGTGTAGGGTTCTTAGCGAGCCCAACC 65

Query 64  TCCACCCCGGTCTTACTGTACCTTAGTGTGCTTGGCGGGCCCGCATTCATGCGCCCGG 123
Sbjct 66  TCCACCCCGGTCTTACTGTACCTTAGTGTGCTTGGCGGGCCCGCATTCATGCGCCCGG 125

Query 124  GGGCTCTCAGCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCAAGAACTCTGTCTGATCTAGT 183
Sbjct 126  GGGCTCTCAGCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCAAGAACTCTGTCTGATCTAGT 185

Query 184  AAGTCTGAGTGTGATGATCGCAATCAGTAAACCTTCAACAATGGATCTCTGTGTTCC 243
Sbjct 186  AAGTCTGAGTGTGATGATCGCAATCAGTAAACCTTCAACAATGGATCTCTGTGTTCC 245

Query 244  GGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCGAATTCCTGTA 303
Sbjct 246  GGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATGCGAATTCCTGTA 305

Query 304  TCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCGTGTCGA 363
Sbjct 306  TCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCGTGTCGA 365

Query 364  GCGTCAATGCTGCCATCAAGCAGCGCTGTGTGTGGTCTGCTGCCCTCTCCGGGG 423
Sbjct 366  GCGTCAATGCTGCCATCAAGCAGCGCTGTGTGTGGTCTGCTGCCCTCTCCGGGG 425

Query 424  GGACGGGCCCCAAGGACGCGGGCGCACCGCTCCGATCTCTGAGCGTATGGGGCTTTGT 483
Sbjct 426  GGACGGGCCCCAAGGACGCGGGCGCACCGCTCCGATCTCTGAGCGTATGGGGCTTTGT 485

Query 484  CACCCGCTCTGTAGGCGCGGGCGGCTGTGCGAAGCAAAATCAATCTTTTCTCAGGTTG 543
Sbjct 486  CACCCGCTCTGTAGGCGCGGGCGGCTGTGCGAAGCAAAATCAATCTTTTCTCAGGTTG 545

Query 544  ACCTTGGATC 553
Sbjct 546  ACCTTGGATC 555
    
```

**Cepa PwVN002 (*Penicillium* spp.).** AY373936.1. *Penicillium variable* cepa FRR 1290. Gen del RNA ribosomal 18S, secuencia parcial; espaciador transcripcional interno 1, gen del RNA ribosomal 5.8S, y espaciador transcripcional interno 2, secuencias completas; y gen del RNA ribosomal 28S, secuencia parcial. Identidad = 341/343 (99%), Gaps = 1/343 (0%).

```

Query 6  TTTAAATCATTAATACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGC 65
Sbjct 200  TTTAAATCATTAATAA-CTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGC 258

Query 66  AGCGAAATGCGATAAGTAATGTAAATGCGAATAATCCGTAATCATCGAATCTTTGAACG 125
Sbjct 259  AGCGAAATGCGATAAGTAATGTAAATGCGAATAATCCGTAATCATCGAATCTTTGAACG 318

Query 126  CACATTTGCGCCCTTGGCATTCGGGGGGCATGCGTGTCCGAGCGCTCAATTTCTGCCCTCC 185
Sbjct 319  CACATTTGCGCCCTTGGCATTCGGGGGGCATGCGTGTCCGAGCGCTCAATTTCTGCCCTCC 378

Query 186  AGCAGCGCTGGGTGTGGGCGCTGTCCCCCGGGGACACGCCCAAAAGCAGTGGCGGG 245
Sbjct 379  AGCAGCGCTGGGTGTGGGCGCTGTCCCCCGGGGACACGCCCAAAAGCAGTGGCGGG 438

Query 246  CCGCGTGGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCCCGCTCGGGAGGACTCGGTGCGC 305
Sbjct 439  CCGCGTGGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCCCGCTCGGGAGGACTCGGTGCGC 498

Query 306  GCTGTCTTCCCTTTAGGCGCCCTTCGGGGTGGCGCTTCC 348
Sbjct 499  GCTGTCTTCCCTTTAGGCGCCCTTCGGGGTGGCGCTTCC 541
    
```

**Cepa PiWN004 (*Penicillium* spp.).** AY373920.1. *Penicillium italicum* cepa ATCC 48114. Gen del RNA ribosomal 18S, secuencia parcial; espaciador transcripcional interno 1, gen del RNA ribosomal 5.8S, y espaciador transcripcional interno 2, secuencias completas; y gen del RNA ribosomal 28S, secuencia parcial. Identidad = 436/438 (99%), Gaps = 0/438 (0%).

```

Query 25  ACCTCCCAACCCGTGTTTATTTACACGTTGCTTCGGCGGGCCCGCTTAACTGGCCCGCG 84
Sbjct 55  ACCTCCCAACCCGTGTTTATTTACACGTTGCTTCGGCGGGCCCGCTTAACTGGCCCGCG 114

Query 85  GGGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCCGAATCTGCTGAAGAT 144
Sbjct 115  GGGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCCGAATCTGCTGAAGAT 174

Query 145  TGTGCTGAGTGAATAATAAATTAATAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGG 204
Sbjct 175  TGTGCTGAGTGAATAATAAATTAATAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGG 234

Query 205  GCATCGATGAAGAAGCAGCAAAAATGCGATAAGTGAATTCGAAATCACTGAAATC 264
Sbjct 235  GCATCGATGAAGAAGCAGCAAAAATGCGATAAGTGAATTCGAAATCACTGAAATC 294

Query 265  ATGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCGTGTCCGAG 324
Sbjct 295  ATGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCGCGGGGGCATGCGTGTCCGAG 354

Query 325  ATCATGCTGCGCTCAAGCCCGCTTGTGTGTTGGGCCCGCTCTCCGATTCGGGGGAC 384
Sbjct 355  ATCATGCTGCGCTCAAGCCCGCTTGTGTGTTGGGCCCGCTCTCCGATTCGGGGGAC 414

Query 385  GGGCCGAAAGGACGCGCGGCGCACCGCTCCGTCCTGAGCGTATGGGGCTTTCTCACC 444
Sbjct 415  GGGCCGAAAGGACGCGCGGCGCACCGCTCCGTCCTGAGCGTATGGGGCTTTGTACC 474

Query 445  CGCTCTGATAGGCCCGGCC 462
Sbjct 475  CGCTCTGATAGGCCCGGCC 492
    
```

**Cepa PdvTa002 (*Penicillium* spp.).** DQ426516. *Penicillium digitatum* isolate YNLF-23. Gen del RNA ribosomal 18S, secuencia parcial; espaciador transcripcional interno 1, gen del RNA ribosomal 5.8S y espaciador transcripcional interno 2, secuencias completas; y gen del RNA ribosomal 28S, secuencia parcial. Identidad = 520/520 (100%), Gaps = 0/541 (0%).

```

Query 1  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAATACCAGTGTAGGGCCCTTGGGTCCAACTCC 60
Sbjct 5  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAATACCAGTGTAGGGCCCTTGGGTCCAACTCC 65

Query 61  CACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCTTACTGCGCCCGGGGG 120
Sbjct 66  CACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCTTACTGCGCCCGGGGG 125

Query 121  CTCACGCTCCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCCGAATCTGTCTGAAGATTGAG 180
Sbjct 126  CTCACGCTCCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCCGAATCTGTCTGAAGATTGAG 185

Query 181  TCTGAGTGAAGAACGAAATTTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCG 240
Sbjct 186  TCTGAGTGAAGAACGAAATTTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCG 245

Query 241  ATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTGAATGCAAAATCAGTGAATCATCGAG 300
Sbjct 246  ATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTGAATGCAAAATCAGTGAATCATCGAG 305

Query 301  TCTTTGAAGCAGCATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCGTGCGAGCGTCATT 360
Sbjct 306  TCTTTGAAGCAGCATTCGCGCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCGTGCGAGCGTCATT 365

Query 361  GCTGCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGTTGGGCCCGCTCCCGATCCCGGGGACGGGGCC 420
Sbjct 366  GCTGCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGTTGGGCCCGCTCCCGATCCCGGGGACGGGGCC 425

Query 421  GAAAGGACGCGCGCACCGCTCCGTCGCTCCTGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCC 480
Sbjct 426  GAAAGGACGCGCGCACCGCTCCGTCGCTCCTGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCC 485

Query 481  GTAGGCCCGCGCGCCCTGCGGATCAACCCCAAAATTTT 520
Sbjct 486  GTAGGCCCGCGCGCCCTGCGGATCAACCCCAAAATTTT 525
    
```

*aurantifolia* Swingle) produciendo la aflatoxina B(1) (Bamba y Sumball, 2005; Huang *et al.*, 1997). La aflatoxina B(1) presenta efectos tóxicos inmediatos, inmunosupresores, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, constituyendo un riesgo para la salud humana (Chao-Zong *et al.*, 2004). Algunas cepas de esta especie producen ácido ciclopiazónico (Bamba y Sumball, 2005), el cual es el causante de degeneración y necrosis del hígado. Este hongo contamina diversos cultivos (maíz, cacahuete, algodón, nueces, etc.), pastas, harinas, salvados, germinados, frutos secos, entre otros. El aire es su principal fuente de dispersión pero sus conidios pueden ser transportados en el cuerpo de los insectos y depositados sobre la superficie de los frutos (Mazzani *et al.*, 2004), por lo que su control mediante un manejo agronómico adecuado a nivel de precosecha, puede reducir la contaminación de los frutos (Abarca *et al.*, 2000).

Finalmente, *Fusarium oxysporum* es un hongo que aunque ataca fundamentalmente las raíces y sistema vascular de la plantas, ocasionalmente se asocia con la pudrición de frutos debido a una alta actividad de endopoligalacturonasa (Di Pietro y Roncero, 1998), y ha sido reportado como el agente causal de pudrición del pedúnculo (Eng: Stem End Rot) y pudrición interna (Eng: Internal Core Rot) en naranja Valencia, asociado con *Alternaria citri* probablemente porque el fungicida utilizado (tiabendazol) para controlar a éste último, no es efectivo contra el género *Fusarium* (Schiffmann-Nadel *et al.*, 1987). No obstante, es conveniente reconocer que algunas cepas de *F. oxysporum* no poseen acción patogénica (Namiki *et al.*, 2001) por lo que la patogenicidad específica del aislamiento obtenido en este estudio requiere de una caracterización detallada.

## CONCLUSIONES

Este es el primer reporte de hongos aislados de naranja cultivada en Baja California Sur. Las variedades de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) 'Valencia Temprana', 'Valencia Tardía' y 'Washington Navel' cultivadas en 3 huertas de Comondú, BCS, indicaron la presencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Penicillium variabile* como patógenos potenciales en poscosecha. Se observaron diferencias entre los sitios de colecta y las variedades de fruto respecto al tipo de microorganismo presente, lo que sugiere que el manejo agronómico en los sitios de muestreo puede determinar la naturaleza de la microflora presente en los frutos. Estos resultados conllevan a la necesidad de introducir diferentes alternativas de tratamiento para la desinfección y protección de los frutos en cada huerta.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Fundación PRODUCE-Baja California Sur y al Fondo SAGARPA-CONACYT 003-C01-8, 2002-C01-0798 y al proyecto SIP-IPN 20060913, el apoyo financiero para la realización de este trabajo. A la Ing. Ma. Guadalupe López Aburto y el M. en C. Rogelio Ramírez, por su asistencia técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L.; Bragulat, M. R.; Castellá, G.; Accensi, F.; Cabañes, F.J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología* **17**, 63-68.
- Altieri, G.; Renzo, G. C.; Lanza, G. 2005. Imazalil on-line control in post-harvest treatments of citrus fruit. *Acta Horticulturae* **682**, 1773-1780.
- Amiri, A.; Bompeix, G. 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: Consequences for decay development. *Plant Pathology* **54**, 74-81.
- Bamba, R.; Sumball, G. 2005. Co-occurrence of aflatoxin B(1) and cyclopiazonic acid in sour lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during post-harvest pathogenesis by *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia* **159**, 407-411.
- Barnett, H. L.; Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Benbow, J. M.; Sugar D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease* **83**, 839-844.
- Benyahia, H.; Jriji, A.; Smaili, C.; Afellah, M.; Lamsetef, Y.; Timmer, L. W. 2003. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing wither tip on twigs and tear stain on fruit of citrus in Morocco. *Plant Pathology* **52**, 798.
- Capdeville, G.; Wilson, C. W.; Beer, S. Y.; Aist, J.R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested red delicious apple fruit. *Phytopathology* **92**, 900-908.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina. 128 p.
- Castoria, R.; Caputo, L.; Curtis, F.; Cicco, V. 2003. Resistance to oxidative stress of postharvest biocontrol yeasts: a possible new mechanism of action. *Phytopathology* **93**, 564-572.
- Chao-Zong, L.; Guey-Yuh, L.; Gwo-Fang, Y. 2004. Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**, 61-68.

- Dennis, C. 1983. Postharvest pathology of fruits and vegetables. Academic Press, London. UK. 264 p.
- Di Pietro, A.; Roncero, M. I. 1998. Cloning, expresión, and role in pathogenicity of *pgl* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 91-98.
- Droby, S.; Wisniewski, M. E.; Cohen, L.; Weiss, B.; Touitou, D.; Eilam, Y.; Chalutz, E. 1997. Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* **87**, 310-315.
- Droby, S.; Vinokur, V.; Weiss, B.; Cohen, L.; Daus, A.; Goldschmidt, E.; Porat, R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology* **92**, 393-399.
- Duggal, A.; Dumas, M.T.; Jeng, R. S.; Hubbes, M. 1997. Ribosomal variation in six species of shape *Fusarium*. *Mycopathologia*. **140**, 34-49.
- Fan, Q.; Tian, S. P.; Li, Y.; Xu, Y.; Wang, Y. 2000. Biological control of postharvest brown rot in peach and nectarine fruits by *Bacillus subtilis* (B-912). *Acta Botanica Sinica* **42**, 1137-11473.
- Huang, Z.; White, D. G.; Payne, G. A. 1997. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology* **87**, 622-627.
- Ismail, M.; Zhang, J. Z. 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Management* **15**, 29-35.
- Lugauskas, A.; Stakénienė, J. 2002. Toxin producing micromycetes on fruit, berries and vegetables. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **9**, 183-197.
- Maldonado, M. C.; Santa-Runco, R.; Navarro, A. R. 2005. Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non-pathogenic fungi. *Revista Iberoamericana de Micología* **22**, 57-59.
- Margosan, D. A.; Smilanick, J.L.; Simmons, G. F.; Henson, D. J. 1997. Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. *Plant Disease* **81**, 1405-1409.
- Mazzani, C.; Luzón, O.; Chavarri, M. 2004. *Aspergillus flavus* asociado a *Epitragus* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado Portuguesa, Venezuela. *Entomotropica* **19**, 157-159.
- McGuire, R. G. 2000. Population dynamics of postharvest decay antagonists growing epiphytically and within wounds on grapefruit. *Phytopathology* **90**, 1217-1223.
- Namiki, F.; Matsunaga, M.; Okunda, M.; Inoue, I.; Nihi, K.; Fujita, Y.; Tsuge, T. 2001. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 580-584.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University. University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- OEPP/EPPO (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes/ European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Citrus. *Bulletin OEPP/EPPO* **34**, 43-56.
- Orozco-Santos, M. 1991. Control of citrus leaf spot (*Alternaria limicola*) and other diseases of Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*) with mancozeb and detergent sprays. *Revista Mexicana de Fitopatología* **9**, 129-133.
- Pavoncello, D.; Lurie, S.; Droby, S.; Porat, R. 2001. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiologia Plantarum* **111**, 17-22.
- Pitt, J. I. 1988. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species, 2nd ed. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia. 187 p.
- Plaza, P.; Usall, J.; Torres, R.; Lamarca, N.; Vinas, I. 2003. Control of green and blue mold by curing on orange during ambient and cold storage. *Postharvest Biology and Technology* **28**, 195-198.
- Qing, F.; Shiping, T. 2000. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Disease* **84**, 1212-1216.
- Raeder, U.; Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters Applied Microbiology* **1**, 17-20.
- Romero, C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. 347 p.
- Sanderson, P. G.; Spotts, R. A. 1995. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology* **85**, 103-110.
- Seifert K. A.; Samson, R. A.; deWaard, R. A.; Houbraken, J.; Lévesque, C. A.; Moncalvo, J.M.; Louis-Seize, G.; Hebert, P. D. N. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3901-3906.
- Schiffmann-Nadel, M.; Chalutz, E.; Waks, J.; Lomaniec, E.; Yofee, A.Z. 1987. Increase of *Fusarium* rot in stored citrus fruit. *Journal of Phytopathology* **120**, 154-157.
- Skouboe, P.; Frisvad, J.C.; Taylor, J. W.; Lauritsen, D.; Boysen, M.; Rossen, L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of



- terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research* **103**, 873-881.
- Smilanick, J.; Sorenson, D.; Mansour, M.; Aieyabei, J.; Plaza, P. 2003. Impact of a brief post-harvest hot water drench treatment on decay, fruit appearance, and microbial populations of California lemons and oranges. *HortTechnology* **13**, 333-338.
- Snowdon, A. L. 1990. Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, Vol. 1, General Introduction and Fruits. CRC Press, Boca Raton FL. 718 p.
- Spotts, R.; Sanderson, P.G.; Lennox, C. L.; Sugar, D.; Cervantes, L.A. 1998. Wounding, wound healing, and staining of mature pear fruit. *Postharvest Biology and Technology* **13**, 27-36.
- Tavares-Ramos, B.; Brasileiro, V.; Moura, M. R. C.; Morais, M.A.; de Oliveira, N.T. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology* **35**, 205-202.
- Varma, S. K.; Verma, R. A. 1987. Aflatoxin B1 production in orange (*Citrus reticulata*) juice by isolates of *Aspergillus flavus* Link. *Mycopathologia* **97**, 101-104.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (eds). Academic Press, San Diego, CA. pp. 315-322.
- Wild, B. L. 1994. Differential sensitivity of citrus green mould isolates (*Penicillium digitatum* Sacc.) to the fungicide imazalil. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **22**: 167-171.
- Wuryatmo, E.; Klieber, A.; Scott, E.S. 2003. Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2637-2640.
- Yildiz, F.; Kinay, P.; Yildiz, M.; Sen, F.; Karacali, L. 2005. Effects of preharvest applications of CaCl<sub>2</sub>, 2,4-D and benomyl and postharvest hot water, yeast and fungicide treatments on development of decay on satsuma mandarins. *Journal of Phytopathology* **153**, 94-98.
- Zheng, X.; Zhang, H.; Xi, Y. 2004. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbutus berries. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**, 55-60.