

MODOS DE ACCIÓN DE CUATRO CEPAS DE LEVADURAS ANTAGÓNICAS CONTRA *Penicillium expansum* EN MANZANA

Sergio Rivera Ávalos; Ramón Álvar Martínez-Peniche*;
Lourdes Soto-Muñoz; María del Socorro Chávaro-Ortiz

División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario s/n, Colonia Las Campanas, C. P. 76000, Querétaro, Querétaro. Correo-e: alvar@uaq.mx (* Autor para correspondencia).

RESUMEN

El uso de levaduras antagonicas para el control de enfermedades de manzanas en poscosecha reduce los daños al ambiente, por lo que resulta fundamental conocer su modo de acción para su posterior uso comercial. Se estudiaron dos modos de acción de cuatro cepas de levaduras contra *Penicillium expansum* Link. La antibiosis se evaluó mediante cultivos duales y antibiogramas, y la competencia por nutrientes a través de microplacas de cultivo, con filtros semipermeables de politetrafluoroetileno (PTFE). La ausencia de halos de inhibición por los antagonistas en los cultivos duales y antibiogramas muestra su incapacidad para producir antibióticos. La germinación de los conidios de *P. expansum* en las microplacas fue de alrededor de 95 % en los distintos medios en ausencia de las levaduras, pero se redujo significativamente (entre 10 y 20 %) en presencia de cualquiera de éstas. Cuando las levaduras fueron separadas del hongo por el filtro, el porcentaje de germinación de *P. expansum* se incrementó significativamente sólo con la cepa 22-111 (*Pichia guilliermondii*). Se obtuvo un bajo coeficiente de correlación de los índices de germinación del hongo entre los dos tratamientos ($r = -0.303$), lo que supone una interacción directa del antagonista con el hongo. Por el contrario, con las cepas 38-432, 24⁻²_{3a} y 22⁻²_{4a} el índice de germinación de *P. expansum* resultó muy similar al obtenido cuando éstas se encontraban en contacto directo con los conidios ($r = 0.989$, $r = 0.999$ y $r = 0.995$, respectivamente), lo que sugiere que la competencia por nutrientes es su principal modo de acción.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Malus domestica* Borkh, antagonismo, control biológico, pudrición azul, antibiosis, competencia por nutrientes

MODES OF ACTION OF FOUR ANTAGONIST YEASTS TO *Penicillium expansum*

Link IN APPLE

ABSTRACT

The use of antagonistic yeasts to control diseases in postharvest of apples reduces environmental risks. Knowing the modes of action of the antagonists is essential in order to use them at a commercial level. Two modes of action of four yeast strains against *Penicillium expansum* Link were studied. Antibiosis was evaluated by means of dual cultures and antibiograms, and nutrient competition using culture microplates containing semipermeable polytetrafluorethylene (PTFE) filters. The absence of inhibition haloes in the dual cultures and in antibiograms showed the antagonists' inability to produce antibiotics. Germination of *P. expansum* conidia was about 95 % in all of the different growing media in the microplates when antagonist yeasts were absent; however, it significantly declined (anywhere from 10 to 20 %) in the presence of any of the yeasts. When the yeasts were separated from the fungus by means of the filter, germination of *P. expansum* only increased significantly with the strain 22-111 (*Pichia guilliermondii*) in all the media, obtaining a low correlation coefficient for the germination index of both treatments ($r = -0.303$), which supposes a direct interaction between the antagonist and the fungus. In contrast, with strains 38-432, 24⁻²_{3a} and 22⁻²_{4a} conidia germination were very similar to those obtained when the yeasts were directly in contact with conidia ($r = 0.989$, $r = 0.999$ and $r = 0.995$, respectively), which suggests that nutrient competition is their main mode of action.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Malus domestica* Borkh, antagonism, biological control, blue mold, antibiosis, nutrient competition

INTRODUCCIÓN

Penicillium expansum Link es el causante de más de 80 % de las pudriciones que se presentan en la manzana en poscosecha, y es capaz de desarrollarse por debajo de 0 °C (Spotts *et al.*, 1999). El método más utilizado para el control de este hongo consiste en el empleo de productos químicos que pueden ser tóxicos para la salud del consumidor, o provocar la aparición de cepas del hongo resistentes al producto químico utilizado (Campbell, 1989). Por ello, se han desarrollado métodos alternativos como la utilización de microorganismos antagonistas, fundamentalmente levaduras, que tienen la capacidad de desarrollarse a temperaturas de almacenamiento por tiempos prolongados (Viñas *et al.*, 2002).

En México se han aislado, seleccionado e identificado levaduras antagonistas en manzanas y se ha evaluado su efectividad biológica actuando solas (Sánchez *et al.*, 2008) o en combinación con bicarbonato de sodio (Soto y Martínez, 2009), pero no se han estudiado sus posibles modos de acción.

El conocimiento del modo de acción de los microorganismos antagonistas sobre los patógenos es fundamental para la optimización de los métodos y el momento de su aplicación, el desarrollo de formulaciones adecuadas que propicien su utilización, la selección de nuevos antagonistas efectivos y el registro de los agentes de biocontrol para su posterior uso comercial (Droby y Chalutz, 1994).

Los posibles modos por los cuales los antagonistas son capaces de inhibir al patógeno son difíciles de precisar, ya que resulta muy complicado realizar experimentos que puedan excluir a todos los posibles modos distintos del que se quiere analizar. Para la mayoría de organismos se han sugerido varios modos de acción, y no se ha demostrado que un solo modo sea responsable de todo el efecto de biocontrol de un determinado antagonista (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Algunos modos de acción señalados para distintos agentes de biocontrol de enfermedades de poscosecha incluyen antibiosis (Gueldner *et al.*, 1988; Janisiewicz *et al.*, 1991; Edwards y Seddon, 2001; Wichitra *et al.*, 2008), competencia por nutrientes (Wilson y Wisniewski, 1989; Mari *et al.*, 1996; Filonow, 1998) o espacio (Andrews *et al.*, 1994; Pasichnyk *et al.*, 2005), interacción directa con el patógeno (Castoria *et al.*, 2001; Bonaterra *et al.*, 2003), inducción de resistencia en el hospedante (El-Ghaouth *et al.*, 2001; Janisiewicz *et al.*, 2003), o la combinación de algunos de éstos (Zhang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar posibles modos de acción de levaduras antagonistas sobre *Penicillium expansum* en manzana en poscosecha.

INTRODUCTION

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus.

Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus.

Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, quis gravida magna mi a libero. Fusce vulputate eleifend sapien. Vestibulum purus quam, scelerisque ut, mollis sed, nonummy id, metus.

Nullam accumsan lorem in dui. Cras ultricies mi eu turpis hendrerit fringilla. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; In ac dui quis mi consectetur lacinia. Nam pretium turpis et arcu. Duis arcu tortor, suscipit eget, imperdiet nec, imperdiet iaculis, ipsum. Sed aliquam ultrices mauris. Integer ante arcu, accumsan a, consectetur eget, posuere ut, mauris. Praesent adipiscing. Phasellus ullamcorper ipsum rutrum nunc. Nunc nonummy metus. Vestibulum volutpat pretium libero. Cras id dui. Aenean ut eros et nisl sagittis vestibulum. Nullam nulla eros, ultricies sit amet, nonummy id, imperdiet feugiat, pede. Sed lectus. Donec mollis hendrerit risus. Phasellus nec sem in justo pellentesque facilisis.

Etiam imperdiet imperdiet orci. Nunc nec neque. Phasellus leo dolor, tempus non, auctor et, hendrerit quis, nisi. Curabitur ligula sapien, tincidunt non, euismod vitae, posuere imperdiet, leo. Maecenas malesuada. Praesent congue erat at massa. Sed cursus turpis vitae tortor. Donec posuere vulputate arcu. Phasellus accumsan cursus

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cuatro cepas de levaduras aisladas de manzanas de la región productora de Querétaro, México, que en estudios previos exhibieron los mejores comportamientos como antagonistas. Dos de ellas fueron identificadas a nivel de especie por el método Biolog: 38-432 y 22-111 (Soto y Martínez, 2009) y 24⁻²_{3a} 22⁻²_{4a} (resultados no publicados) (Cuadro 1). Asimismo, como patógeno a inhibir se utilizó la cepa del hongo *P. expansum* Link CFNL2016, aislada de manzana 'Golden Delicious' y seleccionada por su elevada virulencia (Sánchez *et al.*, 2008).

Preparación de inóculos

La cepa de *P. expansum* se mantuvo en **Papa Dextrosa Agar** (PDA) a 4 °C, y cada dos meses se multiplicó en jugo de manzana para mantener su virulencia (Usall *et al.*, 2001). Se preparó una suspensión conidial a partir de cultivos con dos semanas de incubación a 25 °C, agregando 10 ml de diluyente peptona sobre la superficie del medio de cultivo. El conteo de esporas se efectuó con una cámara de Neubauer, ajustando la concentración a 1 × 10⁴ esporas ml⁻¹ (Viñas *et al.*, 2002).

Los cultivos de levaduras almacenadas a 4 °C en Agar Nutritivo-Dextrosa para Levaduras (NYDA) fueron sembrados en Caldo Nutritivo-Dextrosa para Levaduras (NYDB), e incubados durante 72 h a 26 ± 1 °C y 200 rpm de agitación (Viñas *et al.*, 2002). Después, el medio se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de diluyente de peptona. La concentración del inóculo (antagonista) se ajustó a 1 × 10⁷ UFC ml⁻¹ (Sánchez *et al.*, 2008).

Producción de sustancias antimicóticas

Prueba *in vitro*

Los ensayos realizados correspondieron a cultivos duales *in vitro* basados en la metodología propuesta por Khamna *et al.* (2009). A partir de colonias de 48 horas de

velit. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Sed aliquam, nisi quis porttitor congue, elit erat euismod orci, ac placerat dolor lectus quis orci. Phasellus consetetuer vestibulum elit. Aenean tellus metus, bibendum sed, posuere ac, mattis non, nunc. Vestibulum fringilla pede sit amet augue. In turpis. Pellentesque posuere. Praesent turpis. Aenean posuere, tortor sed cursus feugiat, nunc augue blandit nunc, eu sollicitudin urna dolor sagittis lacus. Donec elit libero, sodales nec, volutpat a, suscipit non, turpis.

MATERIALS AND METHODS

Nullam sagittis. Suspendisse pulvinar, augue ac venenatis condimentum, sem libero volutpat nibh, nec pellentesque velit pede quis nunc. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Fusce id purus. Ut varius tincidunt libero. Phasellus dolor. Maecenas vestibulum mollis diam. Pellentesque ut neque. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. In dui magna, posuere eget, vestibulum et, tempor auctor, justo. In ac felis quis tortor malesuada pretium. Pellentesque auctor neque nec urna.

Proin sapien ipsum, porta a, auctor quis, euismod ut, mi. Aenean viverra rhoncus pede. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Ut non enim eleifend felis pretium feugiat. Vivamus quis mi. Phasellus a est. Phasellus magna. In hac habitasse platea dictumst. Curabitur at lacus ac velit ornare lobortis. Curabitur a felis in nunc fringilla tristique. Morbi mattis ullamcorper velit. Phasellus gravida semper nisi. Nullam vel sem. Pellentesque libero tortor, tincidunt et, tincidunt eget, semper nec, quam. Sed hendrerit. Morbi ac felis. Nunc egestas, augue at pellentesque laoreet, felis eros vehicula leo, at malesuada velit leo quis pede. Donec interdum, metus et hendrerit aliquet, dolor diam sagittis ligula, eget egestas libero turpis vel mi. Nunc nulla. Fusce risus nisl, viverra et, tempor et, pretium in, sapien. Donec venenatis vulputate lorem. Morbi nec metus. Phasellus blandit leo ut odio. Maecenas ullamcorper, dui et placerat feugiat, eros pede varius nisi, condimentum viverra felis nunc et lorem. Sed magna purus, fermentum eu, tincidunt eu, varius ut, felis.

In auctor lobortis lacus. Quisque libero metus, condimentum nec, tempor a, commodo mollis, magna. Vestibulum ullamcorper mauris at ligula. Fusce fermentum. Nullam cursus lacinia erat.

Praesent blandit laoreet nibh. Fusce convallis metus id felis luctus adipiscing. Pellentesque egestas, neque sit amet convallis pulvinar, justo nulla eleifend augue, ac auctor orci leo non est. Quisque id mi. Ut tincidunt tincidunt erat. Etiam feugiat lorem non metus. Vestibulum dapibus nunc ac augue. Curabitur vestibulum aliquam leo.

CUADRO 1. Cepas de levadura utilizadas en el estudio.

Cepa	Especie
38-432	<i>Debaromyces hansenii</i>
22-111	<i>Pichia guilliermondii</i>
24 ⁻² _{3a}	No identificada
22 ⁻² _{4a}	No identificada

crecimiento de las levaduras a evaluar, se realizaron re- siembras en placas de PDA y de NYDA por medio de dos estrías paralelas realizadas a 2.5 cm de distancia del centro de la placa. Posteriormente el hongo se inoculó en el centro de la placa colocando un segmento de 0.25 cm² de superficie del crecimiento de un cultivo de ocho días. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante ocho días con el fin de verificar la presencia o ausencia de halo de inhibición (Poppe *et al.*, 2003). Este ensayo se realizó por triplicado.

Prueba *in vivo*

La metodología empleada para este ensayo se basó en lo reportado por Basha y Ulaganathan (2002). La primera parte consistió de cinco tratamientos utilizando cinco manzanas por tratamiento. El primero (control negativo) consistió en la inoculación de 20 µl de la suspensión de esporas del patógeno ($1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1} = 200$ esporas) en cada una de cuatro heridas cúbicas (3 mm por lado) equidistantes realizadas con ayuda de un punzón en la zona ecuatorial del fruto, mientras que los otros cuatro consistieron en la inoculación en las heridas de 25 µl de una suspensión de cada levadura (25,000 células), seguida de la inoculación del patógeno. Las manzanas inoculadas se incubaron durante seis días a 25 °C, después de lo cual se tomaron muestras de aproximadamente 1 cm³ de las heridas con un escalpelo y se trituraron en un tubo Eppendorf que contenía 100 µl de agua estéril. El tubo Eppendorf se centrifugó a 13,000 rpm y 20 °C durante 20 min. Se obtuvo el sobrenadante, el cual se esterilizó mediante filtración (Millipore, 0.45µ).

Para la segunda parte del ensayo se realizaron antibiogramas *in vitro*, vertiendo por separado 5 µl de cada uno de los extractos obtenidos en cada uno de tres discos de papel filtro Whatman estériles de 1 cm de diámetro colocados sobre placas de PDA. En el centro de cada placa se inoculó *P. expansum* (200 esporas), y las placas se incubaron a 25 °C durante 10 días. Además, se utilizó el fungicida Captán® (ingrediente activo: N-(triclorometil) ciclohex-4-ene-1,2-dicarboximida) a 1 % como control positivo. Así, se evaluaron seis tratamientos (Cuadro 2). La variable evaluada fue la longitud del halo de inhibición. Se realizó un análisis de varianza cuando éste se presentó.

Praesent egestas neque eu enim. In hac habitasse platea dictumst. Fusce a quam. Etiam ut purus mattis mauris sodales aliquam. Curabitur nisi. Quisque malesuada placerat nisl. Nam ipsum risus, rutrum vitae, vestibulum eu, molestie vel, lacus. Sed augue ipsum, egestas nec, vestibulum et, malesuada adipiscing, dui. Vestibulum facilisis, purus nec pulvinar iaculis, ligula mi congue nunc, vitae euismod ligula urna in dolor. Mauris sollicitudin fermentum libero. Praesent nonummy mi in odio. Nunc interdum lacus sit amet orci. Vestibulum rutrum, mi nec elementum vehicula, eros quam gravida nisl, id fringilla neque ante vel mi.

RESULTS AND DISCUSSION

Morbi mollis tellus ac sapien. Phasellus volutpat, metus eget egestas mollis, lacus lacus blandit dui, id egestas quam mauris ut lacus. Fusce vel dui. Sed in libero ut nibh placerat accumsan. Proin faucibus arcu quis ante. In consectetuer turpis ut velit. Nulla sit amet est. Praesent metus tellus, elementum eu, semper a, adipiscing nec, purus. Cras risus ipsum, faucibus ut, ullamcorper id, varius ac, leo. Suspendisse feugiat. Suspendisse enim turpis, dictum sed, iaculis a, condimentum nec, nisi. Praesent nec nisl a purus blandit viverra. Praesent ac massa at ligula laoreet iaculis. Nulla neque dolor, sagittis eget, iaculis quis, molestie non, velit. Mauris turpis nunc, blandit et, volutpat molestie, porta ut, ligula. Fusce pharetra convallis urna. Quisque ut nisi. Donec mi odio, faucibus at, scelerisque quis,

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus.

Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, elei-

CUADRO 2. Antibiogramas *in vitro* para la determinación de sustancias antimicóticas.

Tratamiento	Inoculación en la placa
Control (-). Extracto de manzana inoculada con <i>P. expansum</i>	
Control (+). Captán® a 1 %	
Extracto de manzana inoculada con <i>P. expansum</i> + antagonista (38-432)	Penicillium
Extracto de manzana inoculada con <i>P. expansum</i> + antagonista (22-111)	expansum
Extracto de manzana inoculada con <i>P. expansum</i> + antagonista (24 ⁻² _{3a})	
Extracto de manzana inoculada con <i>P. expansum</i> + antagonista (22 ⁻² _{4a})	

Competencia por nutrientes

Se realizaron tres tratamientos para cada antagonista (Janisiewicz *et al.*, 2000): 1) Testigo *P. expansum* (patógeno) sin levadura; 2) El patógeno y el antagonista separados por un filtro semipermeable hidrofílico de politetrafluoroetileno (PTFE), y 3) El patógeno y el antagonista sin filtro. Para cada tratamiento se utilizaron pozos de 1 ml incluidos en microplacas de poliestireno, que contenían distintos medios: agua, NYDA 20 y 40 % y jugo de manzana 1, 5 y 10 % (Figura 1). Las concentraciones del inóculo en el medio se ajustaron a $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ para el patógeno (200 esporas) y de $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ para el antagonista (25,000 células).

Las microplacas se incubaron a 25 °C durante 24 horas. Se evaluó el índice de germinación desde 0 (espora no germinada) hasta 4 (tubo germinativo \geq cuatro veces el diámetro de la espora) (Figura 2). Se consideraron 100 esporas por tratamiento en tres diferentes campos del microscopio. Se llevaron a cabo análisis de correlación simple por pares entre las frecuencias de clase de los índices de germinación del hongo, obtenidos cuando éste se encontraba en contacto directo con la levadura y cuando se encontraba separado por la membrana, así como de éstos con el testigo. Además, se llevó a cabo un análisis de varianza para cada antagonista, tomando como variable la suma ponderada de los índices de germinación de las esporas en un diseño experimental de bloques al azar y considerando como bloques los cinco medios empleados. Se utilizó el Programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I (Statpoint Technologies, Inc. 2010) (Castaño y Domínguez, 2010).

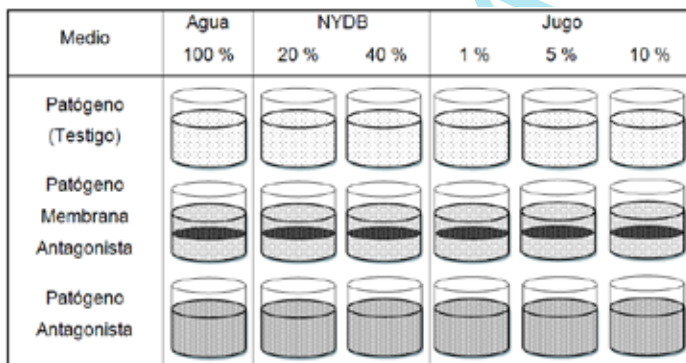


FIGURA 1. Pozos de estudio de competición de nutrientes



FIGURA 2. Escala de germinación de conidios de *P. expansum*. 0 = no germinado, 1. Longitud del tubo germinativo (LTG) \leq un conidio; 2. LTG de uno a dos conidios; 3. LTG de dos a cuatro; 4. LTG o \geq cuatro veces el tamaño de conidio.

fend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus.

Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, quis gravida magna mi a libero. Fusce vulputate eleifend sapien. Vestibulum purus quam, scelerisque ut, mollis sed, nonummy id, metus.

Nullam accumsan lorem in dui. Cras ultricies mi eu turpis hendrerit fringilla. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; In ac dui quis mi consectetuer lacinia. Nam pretium turpis et arcu. Duis arcu tortor, suscipit eget, imperdiet nec, imperdiet iaculis, ipsum. Sed aliquam ultrices mauris. Integer ante arcu, accumsan a, consectetuer eget, posuere ut, mauris. Praesent adipiscing. Phasellus ullamcorper ipsum rutrum nunc. Nunc nonummy metus. Vestibulum volutpat pretium libero. Cras id dui. Aenean ut eros et nisl sagittis vestibulum. Nullam nulla eros, ultricies sit amet, nonummy id, imperdiet feugiat, pede. Sed lectus. Donec mollis hendrerit risus. Phasellus nec sem in justo pellentesque facilisis.

Etiam imperdiet imperdiet orci. Nunc nec neque. Phasellus leo dolor, tempus non, auctor et, hendrerit quis, nisi. Curabitur ligula sapien, tincidunt non, euismod vitae, posuere imperdiet, leo. Maecenas malesuada. Praesent congue erat at massa. Sed cursus turpis vitae tortor. Donec posuere vulputate arcu. Phasellus accumsan cursus velit. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Sed aliquam, nisi quis porttitor congue, elit erat euismod orci, ac placerat dolor lectus quis orci. Phasellus consectetuer vestibulum elit. Aenean tellus metus, bibendum sed, posuere ac, mattis non, nunc. Vestibulum fringilla pede sit amet augue. In turpis. Pellentesque posuere. Praesent turpis. Aenean posuere, tortor sed cursus feugiat, nunc augue blandit nunc, eu sollicitudin urna dolor sagittis lacus. Donec elit libero, sodales nec, volutpat a, suscipit non, turpis.

Nullam sagittis. Suspendisse pulvinar, augue ac venenatis condimentum, sem libero volutpat nibh, nec pellentesque velit pede quis nunc. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Fusce id purus. Ut varius tincidunt libero. Phasellus dolor. Maecenas vestibulum mollis diam. Pellentesque ut neque.

RESULTADOS

Producción de sustancias antimicóticas (antibiosis)

Ensayos *in vitro*

En ninguna de las placas se formaron halos de inhibición, lo que indica, bajo las condiciones de este estudio, una ausencia de producción de sustancias antimicóticas, o bien una producción insuficiente capaz de inhibir el crecimiento del patógeno (Figura 3). La ausencia de producción de sustancias antimicóticas contra *P. expansum* y otros hongos ha sido determinada para diversas cepas de levaduras a través de ensayos con cultivos duales en diferentes medios de crecimiento. Janisiewicz *et al.* (2000) reportan que *Aureobasidium pullulans* no es capaz de generar antibiosis contra *P. expansum* en distintos medios estudiados. Resultados similares fueron obtenidos por Janisiewicz *et al.* (1991) y Edwards y Seddon (2001). Por el contrario, Campbell (1989) reporta que *Agrobacterium radiobacter* produce sustancias antimicóticas capaces de inhibir el desarrollo de *P. expansum* y *B. cinerea* en peras. Asimismo, Adebayo y Aderiye (2011) reportan la producción de la bacteriocina Brevecin SG1 por *Lactobacillus brevis* CG1, la cual presenta efecto antimicótico sobre *Candida albicans* y *Penicillium citrinum*.

Ensayos *in vivo*

En el caso del control negativo, el patógeno se desarrolló en prácticamente toda la placa de cultivo, mientras que el patógeno en contacto con el Captán® (control positivo) manifiesta en todos los puntos un halo de inhibición evidente (Figura 4). Finalmente, en los antibiogramas correspondientes a los extractos obtenidos de manzanas que habían sido inoculadas con las levaduras 38-432, 22-111, 24⁻²_{3a} y 22⁻²_{4a} que estuvieron en contacto con el patógeno en heridas realizadas en manzanas, no se observa inhibición alguna del hongo, lo que hace inútil el análisis esta-

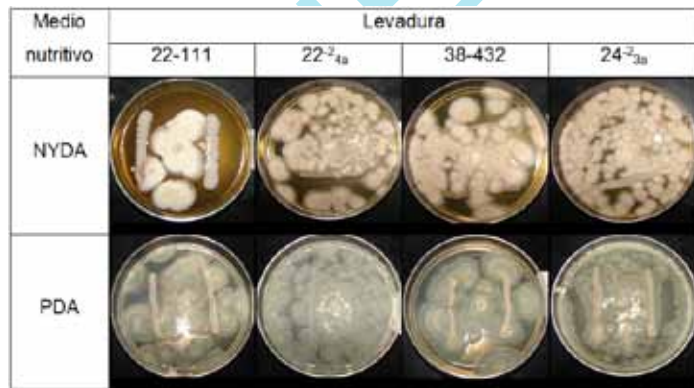


FIGURA 3. Desarrollo de *Penicillium expansum* en cultivos duales en presencia de cuatro levaduras antagonistas en dos medios de cultivo.

Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. In dui magna, posuere eget, vestibulum et, tempor auctor, justo. In ac felis quis tortor malesuada pretium. Pellentesque auctor neque nec urna.

Proin sapien ipsum, porta a, auctor quis, euismod ut, mi. Aenean viverra rhoncus pede. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Ut non enim eleifend felis pretium feugiat. Vivamus quis mi. Phasellus a est. Phasellus magna. In hac habitasse platea dictumst. Curabitur at lacus ac velit ornare lobortis. Curabitur a felis in nunc fringilla tristique. Morbi mattis ullamcorper velit. Phasellus gravida semper nisi. Nullam vel sem. Pellentesque libero tortor, tincidunt et, tincidunt eget, semper nec, quam. Sed hendrerit. Morbi ac felis. Nunc egestas, augue at pellentesque laoreet, felis eros vehicula leo, at malesuada velit leo quis pede. Donec interdum, metus et hendrerit aliquet, dolor diam sagittis ligula, eget egestas libero turpis vel mi. Nunc nulla. Fusce risus nisl, viverra et, tempor et, pretium in, sapien. Donec venenatis vulputate lorem. Morbi nec metus. Phasellus blandit leo ut odio. Maecenas ullamcorper, dui et placerat feugiat, eros pede varius nisi, condimentum viverra felis nunc et lorem. Sed magna purus, fermentum eu, tincidunt eu, varius ut, felis.

In auctor lobortis lacus. Quisque libero metus, condimentum nec, tempor a, commodo mollis, magna. Vestibulum ullamcorper mauris at ligula. Fusce fermentum. Nullam cursus lacinia erat.

Praesent blandit laoreet nibh. Fusce convallis metus id felis luctus adipiscing. Pellentesque egestas, neque

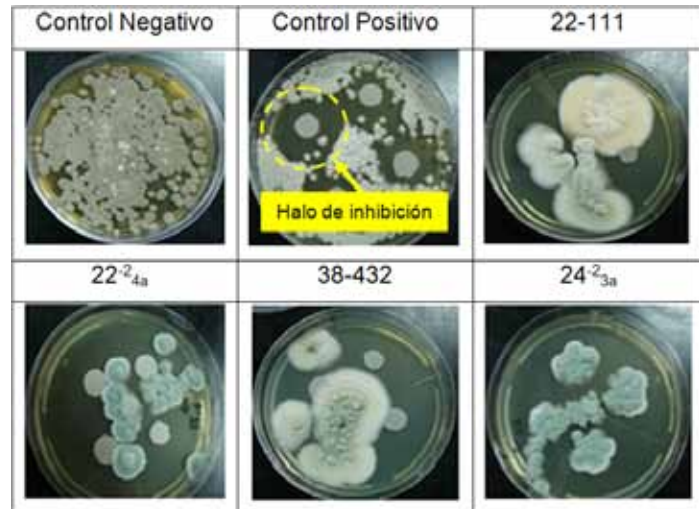


FIGURA 4. Antibiogramas de *P. expansum* y extractos del jugo de manzanas inoculadas con el patógeno con cuatro distintos antagonistas. Control negativo = El patógeno en presencia de extracto de manzana inoculada con el patógeno; Control positivo = El patógeno en presencia del fungicida Captán® a 1 %.

dístico de los datos e indica la ausencia de producción de sustancias antimicóticas de estas cuatro cepas contra *P. expansum*, al menos en concentraciones suficientes para inhibir al hongo. Los resultados obtenidos con un sistema que trata de emular las condiciones *in vivo* coinciden sensiblemente con las pruebas realizadas con cultivos duales.

Competencia por nutrientes

Para el caso del testigo, las esporas de *P. expansum* no germinaron cuando se incubaron en agua destilada, pero su tasa de germinación resultó muy elevada en todos los medios de cultivo. Para jugo a 5 % y NYDB a 40 %, los porcentajes de germinación observados bajo el microscopio biológico a 40x fueron de 98 y 100 %, respectivamente, y los tubos germinativos fueron notablemente superiores (todos con un índice de germinación = 4) al de NYDB 20 % (14, 24 y 57 % en los índices 2, 3 y 4, respectivamente), lo que puede deberse a la menor disponibilidad de nutrientes en este último (Cuadro 3).

Al incubar las esporas del patógeno en contacto directo con la cepa de levadura 38 - 432 (*Debaromyces hansenii*), su germinación se redujo considerablemente (a 6, 8 y 10 % en jugo a 10, 5 y 1 %, respectivamente, y a 13 y 14 % en medio NYDB a 20 y 40 %, respectivamente), por lo que se obtuvo un bajo y negativo coeficiente de correlación con el testigo ($r = -0.280$). Un comportamiento similar al anterior se observó cuando el antagonista fue separado del patógeno por un filtro semipermeable, donde la germinación de los conidios contenidos en NYDB 20 % se inhibió en más de 71 %; en NYDB 40 %, en más del 74 %, y en jugo de manzana, en más de 80 % (Cuadro 4). El coeficiente de correlación obtenido entre las frecuencias de clase de los índices de germinación para ambos tratamientos (con filtro y sin filtro) fue muy elevado ($r = 0.989$). La presencia del filtro no impide la inhibición de la germinación de las esporas, lo que implica un modo de acción de la levadura por competencia por nutrientes.

En el caso de la levadura 22⁻²_{4a}, debido a que estuvo en contacto célula-célula con el patógeno, la germinación

sit amet convallis pulvinar, justo nulla eleifend augue, ac auctor orci leo non est. Quisque id mi. Ut tincidunt tincidunt erat. Etiam feugiat lorem non metus. Vestibulum dapibus nunc ac augue. Curabitur vestibulum aliquam leo. Praesent egestas neque eu enim. In hac habitasse platea dictumst. Fusce a quam. Etiam ut purus mattis mauris sodales aliquam. Curabitur nisi. Quisque malesuada placerat nisl. Nam ipsum risus, rutrum vitae, vestibulum eu, molestie vel, lacus. Sed augue ipsum, egestas nec, vestibulum et, malesuada adipiscing, dui. Vestibulum facilisis, purus nec pulvinar iaculis, ligula mi congue nunc, vitae euismod ligula urna in dolor. Mauris sollicitudin fermentum libero. Praesent nonummy mi in odio. Nunc interdum lacus sit amet orci. Vestibulum rutrum, mi nec elementum vehicula, eros quam gravida nisl, id fringilla neque ante vel mi. Morbi mollis tellus ac sapien. Phasellus volutpat, metus eget egestas mollis, lacus lacus blandit dui, id egestas quam mauris ut lacus. Fusce vel dui. Sed in libero ut nibh placerat accumsan. Proin faucibus arcu quis ante. In consetetur turpis ut velit. Nulla sit amet est. Praesent metus tellus, elementum eu, semper a, adipiscing nec, purus. Cras risus ipsum, faucibus ut, ullamcorper id, varius ac, leo. Suspendisse feugiat. Suspendisse enim turpis, dictum sed, iaculis a, condimentum nec, nisi. Praesent nec nisl a purus blandit viverra. Praesent ac massa at ligula laoreet iaculis. Nulla neque dolor, sagittis eget, iaculis quis, molestie non, velit. Mauris turpis nunc, blandit et, volutpat molestie, porta ut, ligula. Fusce pharetra convallis urna. Quisque ut nisi. Donec mi odio, faucibus at, scelerisque quis,.

Lorem ipsum dolor sit amet, consetetur adipiscing elit. Aenean commodo ligula eget dolor. Aenean massa. Cum sociis natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Donec quam felis, ultricies nec, pellentesque eu, pretium quis, sem. Nulla consequat massa quis enim. Donec pede justo, fringilla vel, aliquet nec, vulputate eget, arcu. In enim justo, rhoncus ut, imperdiet a, venenatis vitae, justo. Nullam dictum felis eu pede mollis pretium. Integer tincidunt. Cras dapibus. Vivamus elementum semper nisi. Aenean vulputate eleifend tellus.

CUADRO 3. Frecuencia de desarrollo de tubos germinativos de conidios de *P. expansum* por 24 h a 25 °C en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	0*	Escala de germinación			
		1	2	3	4
Agua	100	0	0	0	0
NYDB (20 %)	5	0	14	24	57
NYDB (40 %)	0	0	0	0	100
Jugo (1 %)	3	1	1	0	95
Jugo (5 %)	2	0	0	0	98
Jugo (10 %)	6	2	2	0	90
Totales (sin agua)	16	3	17	24	440

*Escala de germinación: 0 = no germinado, 1. Longitud del tubo germinativo (LTG) ≤ un conidio; 2. LTG entre uno y dos conidios; 3. LTG dos a cuatro conidios; 4. LTG > cuatro veces el tamaño de conidio. Se colectaron 100 conidios por tratamiento.

de este último se inhibió en 95 % y en 71 % en NYDB 20 % y NYDB 40 %, respectivamente, y en 91, 82 y 89 % en jugo de manzana a 1, 5 y 10 %, respectivamente ($r = -0.298$, con relación al testigo). Al ser separada del hongo por el filtro, la germinación del hongo continuó inhibiéndose significativamente. Así, los conidios en NYDB 20 y 40 % se inhibieron en 91 y 90 %, respectivamente, y en jugo de manzana a 1, 5 y 10 %, en 75, 79 y 80 %, respectivamente (Cuadro 5). El coeficiente de correlación ($r = 0.995$) entre ambos tratamientos (con y sin filtro) es muy similar al obtenido con la cepa 38-432, y también resultan compatibles con el modo de acción por competencia por nutrientes con esta levadura.

En la cepa 24²_{3a} se obtuvieron resultados análogos a los de las dos levaduras precedentes, ya que cuando ésta se encuentra en contacto directo con el patógeno, más de 88 % de las esporas no germinan en jugo de manzana, y más de 82 % no germinan en NYDB ($r = -0.284$, con relación al testigo). Cuando la levadura fue separada del

Aenean leo ligula, porttitor eu, consequat vitae, eleifend ac, enim. Aliquam lorem ante, dapibus in, viverra quis, feugiat a, tellus. Phasellus viverra nulla ut metus varius laoreet. Quisque rutrum. Aenean imperdiet. Etiam ultricies nisi vel augue. Curabitur ullamcorper ultricies nisi. Nam eget dui. Etiam rhoncus. Maecenas tempus, tellus eget condimentum rhoncus, sem quam semper libero, sit amet adipiscing sem neque sed ipsum. Nam quam nunc, blandit vel, luctus pulvinar, hendrerit id, lorem. Maecenas nec odio et ante tincidunt tempus.

Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, quis gravida magna mi a libero. Fusce vulputate eleifend sapien. Vestibulum purus quam, scelerisque ut, mollis sed, nonummy id, metus.

CUADRO 4. Frecuencia de desarrollo del tubo germinativo de conidios de *P. expansum* expuestos por 24 h a 25°C en presencia de la cepa de levadura 38-432 en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Escala de germinación									
	Contacto directo					Separados por filtro PTFE				
	0*	1	2	3	4	0	1	2	3	4
NYDB (20 %)	87	9	4	0	0	71	0	4	9	16
NYDB (40 %)	86	12	0	2	0	74	0	7	8	11
Jugo (1 %)	90	10	0	0	0	80	3	0	8	9
Jugo (5 %)	92	6	0	1	1	82	0	3	11	4
Jugo (10 %)	94	5	0	0	1	85	9	6	0	0
Suma	449	42	4	3	2	392	12	20	36	40

*Escala de germinación: 0 = no germinado, 1. Longitud del tubo germinativo (LTG) \leq un conidio; 2. LTG entre uno y dos conidios; 3. LTG dos a cuatro conidios; 4. LTG > cuatro veces el tamaño de conidio. Se colectaron 100 conidios por tratamiento.

CUADRO 5. Frecuencia de desarrollo del tubo germinativo de conidios de *P. expansum* expuestos por 24 h a 25°C en presencia de la cepa de levadura 22²_{4a} en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Escala de germinación									
	Contacto directo					Separados por filtro PTFE				
	0*	1	2	3	4	0	1	2	3	4
NYDB (20 %)	95	5	0	0	0	91	9	0	0	0
NYDB (40 %)	71	16	5	6	2	90	10	0	0	0
Jugo (1 %)	91	9	0	0	0	75	4	10	3	8
Jugo (5 %)	82	18	0	0	0	79	6	0	4	11
Jugo (10 %)	89	8	3	0	0	80	0	9	5	6
Suma	428	56	8	6	2	415	29	19	12	25

*Escala de germinación: 0 = no germinado, 1. Longitud del tubo germinativo (LTG) \leq un conidio; 2. LTG entre uno y dos conidios; 3. LTG dos a cuatro conidios; 4. LTG > cuatro veces el tamaño de conidio. Se colectaron 100 conidios por tratamiento.

patógeno por el filtro, la germinación de los conidios contenidos en jugo de manzana se inhibe en 79 % o más, y en el caso NYDB a 20 y 40 %, la germinación se inhibe en 75 y 77 %, respectivamente (Cuadro 6). La similitud entre las frecuencias de clase obtenidas para los dos tratamientos (con y sin filtro) es aún mayor que en las dos levaduras anteriores ($r = 0.999$).

Resultados similares a los observados en este trabajo para estas tres levaduras, donde la competencia por nutrientes parece desempeñar un papel importante en el efecto antagonico, se reportan en *P. digitatum* por *Debaromyces hansenii* (Droby *et al.*, 1998) y en *B. cinerea* por *Cryptococcus spp.* (Filonow *et al.*, 1996). La exclusión preventiva de los sitios de infección fúngicos por el antagonista fue observada en *Candida oleophila* y *Cryptococcus laurentii* empleadas para el control de *B. cinerea* (Roberts, 1990; Mercier y Wilson, 1994).

Además, Zhou *et al.* (2011) obtuvieron una reducción de 100 a 20 % en la tasa de germinación y una reducción del tubo germinativo de 50.0 μ a 10.25 μ de esporas de *Rhizopus stolonifer* incubadas en PDB (caldo papa dextrosa) en presencia de *Bacillus subtilis* fmbj a 10^8 ml⁻¹. Por su parte, Zhang *et al.* (2011) observaron una reducción en la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* de 91.7 a 12.3 % cocultivadas con *Pichia guilliermoundii* M8 a 1×10^7 ml⁻¹, y concluyeron que uno de los modos de acción de este antagonismo es la competencia por nutrientes, particularmente azúcares y nitrógeno. Por otro lado, Li *et al.* (2011) reportan una reducción en la germinación de esporas de *P. expansum* y *B. cinerea* incubadas en PDB en presencia de *Rhodotorula mucilaginosa* de 81.9 y 82.8 %, respectivamente.

La cepa de levadura 22-111 también redujo significativamente la germinación de los conidios en NYDB (más de 89 %) y en jugo (más de 82 %) ($r = -0.280$, con relación al testigo), pero, a diferencia de las otras tres levaduras, cuando estuvo separada por el filtro los conidios del patógeno en NYDB 40 % germinaron en 100 %, y el máximo

Nullam accumsan lorem in dui. Cras ultricies mi eu turpis hendrerit fringilla. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; In ac dui quis mi consectetuer lacinia. Nam pretium turpis et arcu. Duis arcu tortor, suscipit eget, imperdiet nec, imperdiet iaculis, ipsum. Sed aliquam ultrices mauris. Integer ante arcu, accumsan a, consectetuer eget, posuere ut, mauris. Praesent adipiscing. Phasellus ullamcorper ipsum rutrum nunc. Nunc nonummy metus. Vestibulum volutpat pretium libero. Cras id dui. Aenean ut eros et nisl sagittis vestibulum. Nullam nulla eros, ultricies sit amet, nonummy id, imperdiet feugiat, pede. Sed lectus. Donec mollis hendrerit risus. Phasellus nec sem in justo pellentesque facilisis.

Donec vitae sapien ut libero venenatis faucibus. Nullam quis ante. Etiam sit amet orci eget eros faucibus tincidunt. Duis leo. Sed fringilla mauris sit amet nibh. Donec sodales sagittis magna. Sed consequat, leo eget bibendum sodales, augue velit cursus nunc, quis gravida magna mi a libero. Fusce vulputate eleifend sapien. Vestibulum purus quam, scelerisque ut, mollis sed, nonummy id, metus.

Nullam accumsan lorem in dui. Cras ultricies mi eu turpis hendrerit fringilla. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; In ac dui quis mi consectetuer lacinia. Nam pretium turpis et arcu. Duis arcu tortor, suscipit eget, imperdiet nec, imperdiet iaculis, ipsum. Sed aliquam ultrices mauris. Integer ante arcu, accumsan a, consectetuer eget, posuere ut, mauris. Praesent adipiscing. Phasellus ullamcorper ipsum rutrum nunc. Nunc nonummy metus. Vestibulum volutpat pretium libero. Cras id dui. Aenean ut eros et nisl sagittis vestibulum. Nullam nulla eros, ultricies sit amet, nonummy id, imperdiet feugiat, pede. Sed lectus. Donec mollis hendrerit risus. Phasellus nec sem in justo pellentesque facilisis.

Duis arcu tortor, suscipit eget, imperdiet nec, imper-

CUADRO 6. Frecuencia de desarrollo del tubo germinativo de conidios de *P. expansum* expuestos por 24 h a 25°C en presencia de la cepa de levadura 24^{2-3a} en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Escala de germinación									
	Contacto directo					Separados por filtro PTFE				
	0*	1	2	3	4	0	1	2	3	4
NYDB (20 %)	83	4	13	0	0	77	12	11	0	0
NYDB (40 %)	82	14	2	1	1	75	11	12	2	0
Jugo (1 %)	90	10	0	0	0	85	12	3	0	0
Jugo (5 %)	88	8	1	0	3	79	9	8	0	4
Jugo (10 %)	94	6	0	0	0	90	10	0	0	0
Suma	437	42	16	1	4	406	54	34	2	4

*Escala de germinación: 0 = no germinado, 1. Longitud del tubo germinativo (LTG) \leq un conidio; 2. LTG entre uno y dos conidios; 3. LTG dos a cuatro conidios; 4. LTG > cuatro veces el tamaño de conidio. Se colectaron 100 conidios por tratamiento.

porcentaje de inhibición fue de 23 y 27 % en jugo a 5 % y 10 %, respectivamente (Cuadro 7). La distribución de los índices de germinación es totalmente distinta cuando el hongo se encuentra en contacto con el antagonista que cuando se separa por la membrana, con un coeficiente de correlación negativo y muy pequeño $r = -0.303$, totalmente diferente al de las otras tres levaduras. Puesto que no se apreció la producción de sustancias antimicóticas para esta levadura, los resultados obtenidos son compatibles con la interacción directa entre el antagonista y el patógeno. Esto coincide con lo reportado por Bonaterra *et al.* (2003), quienes observaron una reducción de 95.7 a 2.0 % y de 98.0 a 1.3 % de la germinación conidial de *Rhizopus stolonifer* y *Monilinia laxa*, respectivamente, cuando fueron cocultivadas con células de *P. agglomerans* ($1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$) en jugo de nectarina a 5 %, efecto que no fue detectado cuando el antagonista y los patógenos fueron separados por un filtro de membranas que admitía físicamente el cruce de nutrientes y de metabolitos, ya que la germinación fue de 92.0 y 96.0 %, respectivamente.

diet iaculis, ipsum. Sed aliquam ultrices mauris. Integer ante arcu, accumsan a, consectetuer eget, posuere ut, mauris. Praesent adipiscing. Phasellus ullamcorper ipsum rutrum nunc. Nunc nonummy metus. Vestibulum volutpat pretium libero. Cras id dui. Aenean ut eros et nisl sagittis vestibulum. Nullam nulla eros, ultricies sit amet, nonummy id, imperdiet feugiat, pede. Sed lectus. Donec mollis hendrerit risus.

CONCLUSIONS

Etiam imperdiet imperdiet orci. Nunc nec neque. Phasellus leo dolor, tempus non, auctor et, hendrerit quis, nisi. Curabitur ligula sapien, tincidunt non, euismod vitae, posuere imperdiet, leo. Maecenas malesuada. Praesent congue erat at massa. Sed cursus turpis vitae tortor. Donec posuere vulputate arcu. Phasellus accumsan cursus velit. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Sed aliquam, nisi quis porttitor congue, elit erat euismod orci, ac placerat dolor

CUADRO 7. Frecuencia de desarrollo del tubo germinativo de conidios de *P. expansum* expuestos por 24 h a 25°C en presencia de la cepa de levadura 22-111 en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Escala de germinación									
	Contacto directo					Separados por filtro PTFE				
	0*	1	2	3	4	0	1	2	3	4
NYDB (20 %)	94	3	2	0	1	8	9	0	1	82
NYDB (40 %)	89	10	0	1	0	0	10	0	0	90
Jugo (1 %)	93	4	1	1	1	1	15	22	20	42
Jugo (5 %)	82	18	0	0	0	23	6	19	20	32
Jugo (10 %)	91	7	2	0	0	27	29	28	14	2
Suma	449	42	5	2	2	59	69	69	55	248

*Escala de germinación: 0 = no germinado, 1. Longitud del tubo germinativo (LTG) \leq un conidio; 2. LTG entre uno y dos conidios; 3. LTG dos a cuatro conidios; 4. LTG > cuatro veces el tamaño de conidio. Se colectaron 100 conidios por tratamiento.

CUADRO 8. Índice de germinación* de esporas de *P. expansum* en función de la separación de la levadura antagonista por el filtro de PTFE en el medio de cultivo.

Tratamiento	Levadura			
	38 – 432	22 ⁻² _{4a}	24 ⁻² _{3a}	22 – 111
<i>P. expansum</i>	373.80 a ^z	373.80 a	373.80 a	373.80 a
Filtro	64.00 b	40.60 b	28.80 b	272.80 a
Contacto directo	13.40 c	19.60 b	18.60 b	13.20 b
"F" (tratamientos)	307.91***	377.52***	631.43***	54.57***
F (bloques)	0.75 ^{NS}	1.79 ^{NS}	1.45 ^{NS}	1.01 ^{NS}
DMS	45.00	41.39	32.57	101.92

* Suma ponderada de los índices de germinación de 100 esporas de *P. expansum* incubadas en distintos medios nutritivos a 25 °C durante 24 horas

^z Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: Diferencia mínima significativa

^{NS}, ***; no significativo y significativo a una $P \leq 0.001$, respectivamente

Finalmente, el análisis de las sumas de los índices de germinación (Cuadro 8) confirma los resultados arriba expuestos. Para las levaduras 38-432, 22⁻²_{4a} y 24⁻²_{3a} el índice de germinación de *P. expansum* obtenido en presencia de la levadura (con y sin filtro) es significativamente inferior ($P \leq 0.05$) al que se obtiene incubando solas las esporas del patógeno, lo que es compatible con un modo de acción por competencia por nutrientes y/o espacio. En el caso de la levadura 22-111, cuando se separa del patógeno por medio del filtro, se obtiene un índice de germinación estadísticamente igual al observado en el patógeno sin el antagonista, lo cual es compatible con una interacción directa entre éstos. En el mismo cuadro, la no significancia entre bloques en todas las levaduras muestra que el medio de cultivo no afectó la germinación de las esporas.

CONCLUSIONES

Las levaduras antagonicas 38-432, 24⁻²_{3a} y 22⁻²_{4a} mostraron, en el bioensayo realizado, un comportamiento compatible con un modo de acción por competencia por nutrientes con el patógeno. Por el contrario, la cepa 22-111 manifestó un modo de acción basado en la interacción directa con el patógeno. Bajo las condiciones de este estudio, ninguna de las cuatro levaduras evaluadas mostró un modo de acción por antibiosis.

LITERATURA CITADA

- ADEBAYO, C.; ADERIYE B. 2011. Suspected mode of antimycotic action of brevicin SG1 against *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*. *Food Control* 22: 1814-1820.
- ANDREWS, J. H., HARRIS, R. F., SPEAR, R. N., LAU, G. W., NORDHEIM, E. V. 1994. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology* 40: 6-17.
- BASHA, S.; ULAGANATHAN, K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science* 82(12): 1457-1463.
- BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. 2003. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruits by *Pantotea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology* 84: 93-104.
- CAMPBELL, R. 1989. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*. Cambridge University Press. Cambridge, England. 218 p.
- CASTAÑO, T. E.; DOMÍNGUEZ, D. J. 2010. *Diseño de Experimentos: Estrategias y Análisis en Ciencia y Tecnología*. Universidad Autónoma de Querétaro. Qro. México. 418 p.
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICCO, S.; DE CICCIO, V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology* 22(1): 7-17.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E. 1994. Mode of Action of Biocontrol Agents of Postharvest Diseases, pp: 63-75. *In: Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*. WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. (eds.). CRC Press Inc., Boca Raton, EE.UU.
- DROBY, S.; COHEN, A.; WEISS, B.; HOREV, B.; CHALUTZ, E.; KATZ, H.; KEREN, M.; SHACHNAI, A. 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control* 12: 97-100.
- EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology* 91(4): 652-659.
- EL-GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; BROWN, G. E.; IPPOLITO, A.; WILSON, C. L. 2001. Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-Deoxy-glucose. *Biological Control* 20(2): 96-101
- FILONOW, A. 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science and Technology* 8: 243-256.
- FILONOW, A. B.; VISHNIAC, H. S.; ANDERSON, J. A.; JANISIEWICZ, W. J. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control* 7: 212-220.

lectus quis orci. Phasellus consetetuer vestibulum elit. Aenean tellus metus, bibendum sed, posuere ac, mattis non, nunc.

End of English Version

- GUELDNER, R. C.; REILLY, C.; PUSEY, P. L.; COSTELLO, C. E.; ARRENDALE, R. F.; COX, R. H.; HIMMELSBACH, D. S.; CRUMLEY, F. G.; CUTLER, H. G. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36(2): 366-370.
- JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40: 411-441.
- JANISIEWICZ, W. J.; LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; SAFTNER, R. A.; REED, A. N.; CAMP, M. J. 2003. Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruits stored under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* 29: 129-143.
- JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J.; SHARER, C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90: 1196-1200.
- JANISIEWICZ, W. J.; YOURMAN, L.; ROITMANN, H. J.; MAHONEY, N. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease* 75: 490-494.
- KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; PEBERTY, J. F.; LUMYONG, S. 2009. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. Isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology* 6: 143-147.
- LI, R.; ZHANG, H.; LIU, W.; ZHENG, X. 2011. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology* 146(2): 151-156.
- MARI, N.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G. C. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biological Control* 7: 30-37.
- MERCIER, J.; WILSON, C. L. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control* 4: 138-144.
- PASICHNYK, L. A.; HVOZDIAK, R. I.; KHODOS, S. F. 2005. Physical linkage of Tn3 and part of Tn1721 in tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella thyphimurium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 562-565.
- POPPE L.; VANHOUTTE, S.; HÖFTE, M. 2003. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology* 109: 963-973.
- ROBERTS, R. G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80: 526-530.
- SÁNCHEZ V., S. E.; MARTÍNEZ P., R. Á.; CASTILLO T., J.; FERNÁNDEZ E., E. 2008. Antagonismo de levaduras nativas contra la pudrición azul (*Penicillium expansum* LINK) en manzanas en poscosecha. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31(4): 359-366.
- SOTO, M. L.; MARTÍNEZ P., R. Á. 2009. Efecto de levaduras antagonicas y bicarbonato de sodio sobre *Penicillium expansum* Link en dos variedades de manzana. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 211-215.
- SPOTTS R. A.; CERVANTES, L. A.; MIELKE, E. A. 1999. Variability in postharvest decay among apple cultivars. *Plant Disease* 83: 1051-1054.
- USALL, J.; NÚÑEZ, C.; TEIXIDÓ, N.; MIRÓ, M.; VIÑAS, I. 2001. Nutritional enhancement of biocontrol activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears. *European Journal of Plant Pathology* 107: 543-551.
- VIÑAS, I.; TEIXIDÓ, N.; ABADIAS, M.; COSTA, J.; USALL, J. 2002. Producción, formulación y mejora de bacterias y levaduras para su aplicación en el control biológico de enfermedades. *Phytoma* 144: 107-113.
- WICHITRA, L.; PUNPEN, H.; SAMERCHAI, C. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48: 113-21.
- WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeast and bacteria. *Science Horticulturae* 40: 105-112.
- ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biological Control* 57: 193-201.
- ZHOU, X.; LU, Z.; LV, F.; ZHAO, H.; WANG, Y.; BIE, X. 2011. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Food Science* 76(5): M254-M259.