

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

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

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 STRAINS OF ANTAGONISTIC YEASTS AGAINST

Penicillium expansum LINK IN APPLE

ABSTRACT

The use of antagonistic yeasts to control diseases in postharvest 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 antagonistic 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 assumes a direct interaction between the antagonist and the fungus. In contrast, with strains 38-432, 24⁻²_{3a} and 22⁻²_{4a} conidia germination was very similar to that obtained when the yeasts were directly in contact with conidia ($r = 0.999$ and $r = 0.995$, respectively), which suggests that nutrient competition is their main code of action.

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

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 (Guedner *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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cuatro cepas de levaduras aisladas de manzanas de la región productora de Querétaro, México,

INTRODUCTION

Penicillium expansum Link is the cause of 85 % of the rots that appear in postharvest apple and is capable of developing below 0 °C (Spotts *et al.*, 1999). The method most often used for the control of this fungus consists of the use of chemical products that can be toxic for the consumer's health or provoke the appearance of strains of the fungus resistant to the chemical product used (Campbell, 1989). Therefore, alternative methods have been developed such as the use of antagonistic microorganisms, fundamentally yeasts, which have the capacity of developing at storage temperatures for prolonged periods of time (Viñas *et al.*, 2002).

In Mexico antagonistic yeasts have been isolated, selected and identified in apples and their biological effect has been evaluated acting alone (Sánchez *et al.*, 2008) or in combination with sodium bicarbonate (Soto and Martínez, 2009), but their possible modes of action have not been studied.

The knowledge of the mode of action of the antagonistic microorganisms against the pathogens is fundamental for the optimization of the methods and the moment of their application, the development of the adequate formulations that propitiate their use, the selection of new effective antagonists and the register of the biocontrol agents for their later commercial use (Droby and Chalutz, 1994).

The possible modes by which the antagonists are capable of inhibiting the pathogen are difficult to pinpoint, because it is very complicated to carry out experiments that can exclude all of the possible modes that are different from the one to be analyzed. For most of the organisms various modes of action have been suggested, and it has not been demonstrated that a single mode is responsible of all of the effect of biocontrol of a determined antagonist (Janisiewicz and Korsten, 2002).

Some modes of action indicated for certain biocontrol agents of postharvest diseases include antibiosis (Guedner *et al.*, 1988; Janisiewicz *et al.*, 1991; Edwards and Seddon, 2001; Wichitra *et al.*, 2008), competition for nutrients (Wilson and Wisniewski, 1989; Mari *et al.*, 1996; Filonow, 1998) or space (Andrews *et al.*, 1994; Pasichnyk *et al.*, 2005), direct interaction with the pathogen (Castoria *et al.*, 2001; Bonaterra *et al.*, 2003), induction of resistance in the host (El-Ghaouth *et al.*, 2001; Janisiewicz *et al.*, 2003) or the combination of some of the above (Zhang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011).

The objective of the present study was to study possible modes of action of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* in postharvest apple.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Four strains of yeasts were used, isolated from apples of the productive region of Querétaro, México, which in pre-

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 inhibirse 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 1×10^4 esporas·ml⁻¹ (Viñas *et al.*, 2002).

Los cultivos de levaduras almacenadas a 4 °C en Agar Nutritivo-Dextrosa para Levaduras (NYDA) fueron resembrados 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 1×10^7 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 crecimiento de las levaduras a evaluar, se realizaron resiembras 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.

CUADRO 1. Cepas de levadura utilizadas en el estudio.

TABLE 1. Yeast strains used in the study.

Cepa / Strain	Especie / Species
38-432	<i>Debaromyces hansenii</i>
22-111	<i>Pichia guilliermondii</i>
24 ⁻² _{3a}	No identificada / Not identified
22 ⁻² _{4a}	No identificada / Not identified

vious studies exhibited the best performance as antagonists. Two of them were identified at the species level by means of the Biolog method: 38-432 and 22-111 (Soto and Martínez, 2009) and 24⁻²_{3a} (results not published) (Table 1). In addition, as pathogen to inhibit the strain of the fungus *P. expansum* Link CFNL2016 was used, isolated from "Golden Delicious apple and selected for its high virulence (Sánchez *et al.*, 2008).

Preparation of the inocula

The strain of *P. expansum* was maintained in Potato Dextrose Agar (PDA) at 4 °C, and every two months was multiplied in apple juice to maintain its virulence (Usall *et al.*, 2001). A conidial suspension was prepared from cultures with two weeks of incubation at 25 °C, adding 10 ml of peptone diluent over the surface of the culture medium. The spore count was made with a Neubauer camera, adjusting the concentration to 1×10^4 spores·ml⁻¹ (Viñas *et al.*, 2002).

The yeast cultures stored at 4 °C in Nutritive Yeast Dextrose Agar (NYDA) were re-sown in Nutritive Yeast Dextrose Broth (NYDB), and incubated during 72 h at 26 ± 1 °C and 200 rpm of agitation (Viñas *et al.*, 2002). Then, the medium was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The supernatant was eliminated and the cells were re-suspended in 1 ml of peptone diluent. The concentration of the inoculum (antagonist) was adjusted to 1×10^7 UFC·ml⁻¹ (Sánchez *et al.*, 2008).

Production of antimycotic substances

In vitro test

The assays carried out corresponded to dual *in vitro* cultures based on the methodology proposed by Khamna *et al.* (2009). From colonies of 78 hours of growth of the yeasts to evaluate, re-sowings were made in plates of PDA and NYDA by means of two parallel striations de 2.5 cm from the center of the plate, placing a segment of 0.25 cm² during eight days with the purpose of verifying the presence or absence of inhibition halo (Poppe *et al.*, 2003). This assay was made in triplicate.

In vivo test

The methodology employed for this assay was based on what was reported by Basha and Ulaganathan (2002). The first part consisted of five treatments using five apples per treatment. The first (negative control) consisted of the inoculation of 20 µl of the suspension of spores of the pathogen (1×10^4 ml⁻¹= 200 spores) in each one of four cubic equidistant lesions (3mm per side) made with the aid of an awl in the equatorial zone of the fruit, while the other four consisted of the inoculation in the wounds of 25 µl of a suspension of each yeast (25,000 cells), followed by the inoculation of the pathogen. The inoculated apples were incubated during six days at 25 °C, after which samples were taken of approximately 1 cm³ from the lesions with a

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-(trichlorometiltio) 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.

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

scalpel and were ground in an Eppendorf tube containing 100 µl of sterile water. The Eppendorf tube was centrifuged at 13,000 rpm and 20 °C during 20 min. The supernatant was obtained, which was sterilized by filtration (Millipore, 0.45µ).

For the second part of the assay *in vitro* antibiograms were carried out separately pouring 5 µl of each one of the extracts obtained in each one of the three discs of sterile Whatman filter papers of 1 cm diameter placed over plates of PDA. In the center of each plate *P. expansum* (200 spores) was inoculated, and the plates were incubated at 25 °C during 10 days. In addition, the fungicide Captan® was used (active ingredient: N-(trichloromethylthio) cyclohex-4-ene-1, 2-dicarboximide) at 1 % as positive control. Thus, six treatments were evaluated (Table 2). The variable evaluated was the length of the inhibition halo. An analysis of variance was used when it appeared.

Competition for nutrients

Three treatments were made for each antagonist (Janisiewicz *et al.*, 2000): 1) Control *P. expansum* (pathogen) without yeast; 2) The pathogen and the antagonist separated by a hydrophilic semipermeable filter of polytetrafluoroethylene (PTFE), and 3) The pathogen and the antagonist without filter. For each treatment wells of 1 ml were used included in microplates of polystyrene, which contained different media: water, NYDA 20 and 40 % and apple juice 1, 5 and 10 % (Figure 1). The concentrations of the inoculum in the media were adjusted to $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ for the pathogen (200 spores) and of $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ for the antagonist (25,000 cells).

The microplates were incubated at 25 °C during 24 hours. The germination index was evaluated from 0 (non-germinated spore) to 4 (germination tube \geq four times the diameter of the spore) (Figure 2). 100 spores per treatment were considered in three different fields of the microscop-

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

TABLE 2. Antibiograms *in vitro* for the determination of antimycotic substances.

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

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).

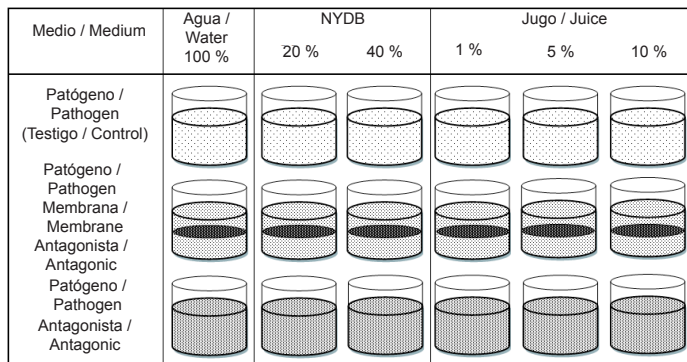


FIGURA 1. Pozos de estudio de competición de nutrientes.

FIGURE 1. Study wells of nutrient competition.

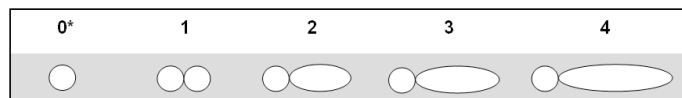


FIGURA 2. Escala de germinación de conidios de *P. expansum*. 0 = no germinado, 1. Longitud del tubo germinativo (LTG) \leq un conidio; 2. LTG de uno a dos conidios; 3. LTG de dos a cuatro; 4. LTG \geq cuatro veces el tamaño de conidio.

FIGURE 2. Germination scale of conidia of *P. expansum*. 0 = not germinated, 1. Length of the germination tube (LTG) \leq one conidium; 2. LTG of one to two conidia; 3. LTG of two to four; 4. LTG \geq four times the size of conidia.

pe. Analyses of simple correlation were carried out by pairs among the class frequencies of the germination indices of the fungus, obtained when the fungus was in direct contact with the yeast and when it was separated by the membrane, as well as with the control. In addition, an analysis of variance was made for each antagonist, taking as variable the weighted sum of the germination indices of the spores in an experimental design of randomized blocks and considering as blocks the five media employed. The statistical program STATGRAPHICS Centurion XV.I (Statpoint Technologies Inc., 2010) was used (Castaño and Domínguez, 2010).

RESULTS

Production of antimycotic substances (antibiosis)

In vitro assays

No inhibition halos were formed in any of the plates, which indicates, under the conditions of this study, an absence of production of antimycotic substances, or an insufficient production capable of inhibiting the growth of the pathogen (Figure 3). The absence of production of antimycotic substances against *P. expansum* and other fungi has been determined for different strains of yeasts through assays with dual cultures in different growth media. Janisiewicz *et al.* (2000) report that *Aureobasidium pullulans* is not capable of generating antibiosis against *P. expansum* in different media studied. Similar results were obtained by Janisiewicz *et al.* (1991) and Edwards and Seddon (2001). In contrast, Campbell (1989) reports that *Agrobacterium radiobacter* produces antimycotic substances capable of inhibiting the development of *P. expansum* and *B. cinerea* in pears. In addition, Adebayo and Aderiye (2011) report the production of the bacteriocin Brevecin SG1 by *Lactobacillus brevis* CG1, which presented an antimycotic effect on *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*.

In vivo assays

In the case of the negative control, the pathogen developed in practically all of the culture plate, while the pathogen in contact with the Captan® (positive control) manifests in all points an evident inhibition halo (Figure 4). Finally, in the antibiograms corresponding to the extracts obtained from apples that had been inoculated with the yeasts 38-432, 22-111, 24⁻²_{3a} and 22⁻²_{4a} which were in contact with the pathogen in wounds made in apples, no inhibition of the fungus was observed, which renders useless the antimycotic substances of these four strains against *P. expansum*, at least in concentrations sufficient to inhibit the fungus. The results obtained with a system that tries to emulate the *in vivo* conditions coincide noticeably with the tests made with dual cultures.

Competition for nutrients

For the case of the control, the spores of *P. expansum* did not germinate when they were incubated in distri-

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 inhibi-

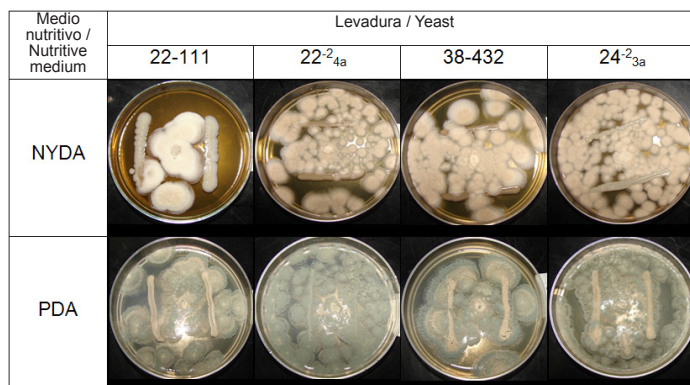


FIGURA 3. Desarrollo de *Penicillium expansum* en cultivos duales en presencia de cuatro levaduras antagonicas en dos medios de cultivo.

FIGURE 3. Development of *Penicillium expansum* in dual cultures in the presence of four antagonistic yeasts in two culture media.

lled water, but their germination rate was very high in all of the culture media. For juice at 5 % and NYDB at 40 %, the percentages of germination observed under the biological microscope at 40× were of 98 and 100 %, respectively, and the germination tubes were notably higher (all with a germination index = 4) than that of NYDB 20 % (14, 24 and 57 % in indices 2, 3 and 4, respectively), which may be due to the lower availability of nutrients in the latter (Table 3).

When the spores of the pathogen in direct contact with the yeast strain 38 – 432 (*Debaromyces hansenii*) were incubated, their germination was reduced considerably (to 6, 8 and 10 % in juice at 10, 5 and 1 %, respectively, and to 13 and 14 % in NYDB at 20 and 40 %, respectively), thus a low and negative coefficient of correlation was obtained with the control ($r = -0.280$). A behavior similar to the above was observed when the antagonist was separated from the pathogen by a semipermeable filter, where the germination of the conidia contained in NYDB 20 % was inhibited by more than 71 %; in NYDB 40 %, by more than 74 %, and in apple juice, by more than 80 % (Table 4). The coefficient of correlation obtained among the class frequencies of the germination indices for both treatments (with and without filter) was very high ($r = 0.989$). The presence of the filter does not impede the inhibition of the germination of the spores, which implies a mode of action of the yeast for completion for nutrients.

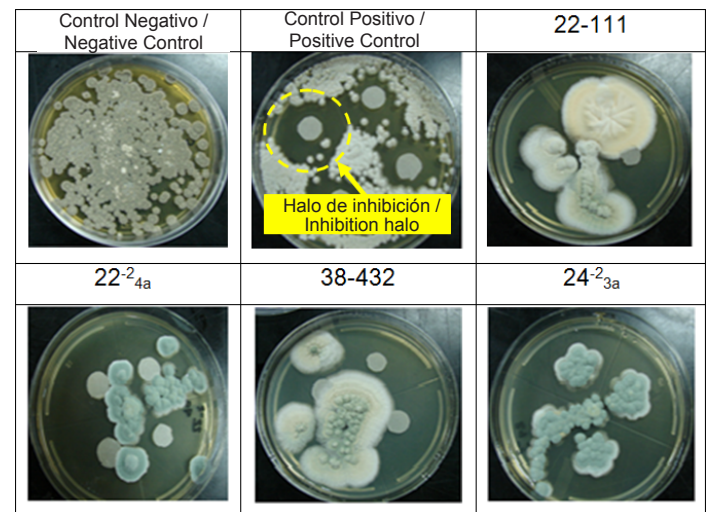


FIGURA 4. Antibiogramas de *P. expansum* y extractos del jugo de manzanas inoculadas con el patógeno con cuatro distintos antagonistas. Control negativo = El patógeno en presencia de extracto de manzana inoculada con el patógeno; Control positivo = El patógeno en presencia del fungicida Captán® a 1 %.

FIGURE 4. Antibiograms of *P. expansum* and extracts of juice of apples inoculated with four different antagonists. Negative control = The pathogen in the presence of extract of apple inoculated with the pathogen; Positive control = The pathogen in the presence of the fungicide Captan® at 1 %.

ción alguna del hongo, lo que hace inútil el análisis estadístico 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.

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

TABLE 3. Development frequency of germination tubes of conidia of *P. expansum* for 24 h at 25 °C in different culture media.

Tratamiento Treatment	Escala de germinación / Germination scale				
	0*	1	2	3	4
Agua / Water	100	0	0	0	0
NYDB (20 %)	5	0	14	24	57
NYDB (40 %)	0	0	0	0	100
Jugo / Juice (1 %)	3	1	1	0	95
Jugo / Juice (5 %)	2	0	0	0	98
Jugo / Juice (10 %)	6	2	2	0	90
Totales (sin agua) Totals (without water)	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.

*Germination scale: 0 = not germinated, 1. Length of germination tube (LGT) ≤ one conidium; 2) LGT between one and two conidia; 3) LGT two to four conidia; 4) LGT > four times the size of conidium. 100 conidia per treatment were collected.

In the case of yeast 22⁻²_{4a}, because it was in contact cell-to-cell with the pathogen, its germination was inhibited by 95 % and by 71 % in NYDB 20 % and NYDB 40 %, respectively, and by 91, 82 and 89 % in apple juice at 1, 5 and 10 %). When separated from the fungus by the filter, the germination of the fungus continued to be inhibited significantly. Thus, the conidia in NYDB 20 and 40 % were inhibited by 91 and 90 %, respectively, and in apple juice at 1, 5 and 10 %, by 75, 79 and 80 %, respectively (Table 5). The coefficient of correlation ($r = 0.995$) between both treatments (with and without filter) is very similar to that obtained with the strain 38-432, and also are compatible with the mode of action by competition for nutrients with this yeast.

In strain 24⁻²_{3a} results analogous to those of the two preceding yeasts were obtained, given that when it is found in direct contact with the pathogen, more than 88 % of the spores do not germinate in apple juice, and more than 82 % do not germinate in NYDB ($r = -0.284$, with respect to the control). When the yeast was separated from the pathogen by the filter, the germination of the conidia contained in apple juice was inhibited by 79 % or more, and in the case of NYDB at 20 and 40 %, germination was inhibited by 75 and 77 %, respectively (Table 6). The similarity among the class frequencies obtained for the two treatments (with and without filter) is even higher than in the two previous yeasts ($r = 0.999$).

Results similar to those observed in this work for these three yeasts, where the competition for nutrients seems to have an important role in the antagonistic effect, are reported in *P. digitatum* by *Debryomyces hansenii* (Droby *et al.*, 1998) and in *B. cinerea* by *Cryptococcus* spp. (Filonow *et al.*, 1996). The preventive exclusion of the sites of fungal infection by the antagonist was observed in *Candida oleophila* and *Cryptococcus laurentii* used for the control of *B. cinerea* (Roberts, 1990; Mercier and Wilson, 1994).

Furthermore, Zhou *et al.* (2011) obtained a reduction of 100 to 20 % in the germination rate and a reduction of

En el caso de la levadura 22-²_{4a}, debido a que estuvo en contacto célula-célula con el patógeno, la germinación 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 24-²_{3a} se obtuvieron resultados análogos a los de las dos levaduras precedentes, ya que cuando ésta

the germination tube of 50.0 μ to 10.25 μ of spores of *Rhizopus stolonifer* incubated in PDB (potato dextrose broth) in the presence of *Bacillus subtilis* fmbj at 10⁸ ml⁻¹. Zhang *et al.* (2011) observed a reduction in germination of spores of *Botrytis cinerea* of 91.7 to 12.3 % cocultivated with *Pichia guilliermoundii* M8 at 1 \times 10⁷ ml⁻¹, and concluded that one of the modes of action of this antagonism is the competition for nutrients, particularly sugars and nitrogen. On the other hand, Li *et al.* (2011) report a reduction in the germination of spores of *P. expansum* and *P. cinerea* incubated in PDB in the presence of *Rhodotorula mucilaginosa* of 81.9 and 82.8 %, respectively.

The yeast strain 22-111 also significantly reduced the germination of the conidia in NYDB (more than 89 %) and in juice (more than 82 %) ($r = -0.280$, with respect to the control), but, contrary to the other three yeasts, when it was separated by the filter the conidia of the pathogen in NYDB

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.

TABLE 4. Development frequency of the germination tube of conidia of *P. expansum* exposed for 24 h at 25 °C in the presence of the yeast strain 38-432 in different culture media.

Tratamiento Treatment	Escala de germinación / Germination scale									
	Contacto directo / Direct contact					Separados por filtro PTFE / Separated by PTFE filter				
	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 / Juice (1 %)	90	10	0	0	0	80	3	0	8	9
Jugo / Juice (5 %)	92	6	0	1	1	82	0	3	11	4
Jugo / Juice (10 %)	94	5	0	0	1	85	9	6	0	0
Suma / Sum	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.

*Germination scale: 0 = Not germinated, 1. Length of germination tube (LGT) \leq one conidium; 2. LGT between one and two conidia; 3. LGT two to four conidia; 4. LGT > four times the size of conidium. 100 conidia per treatment were collected.

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 22-²_{4a} en diferentes medios de cultivo.

TABLE 5. Development frequency of the germination tube of conidia of *P. expansum* exposed for 24 h at 25 °C in the presence of the yeast strain 22-²_{4a} in different culture media.

Tratamiento Treatment	Escala de germinación / Germination scale									
	Contacto directo / direct contact					Separados por filtro PTFE / Separated by PTFE filter				
	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 / Juice (1 %)	91	9	0	0	0	75	4	10	3	8
Jugo / Juice (5 %)	82	18	0	0	0	79	6	0	4	11
Jugo / Juice (10 %)	89	8	3	0	0	80	0	9	5	6
Suma / Sum	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.

*Germination scale: 0 = not germinated; 1. Length of germination tube (LGT) \leq one conidium; 2. LGT between one and two conidia; 3. LGT two to four conidia; 4. LGT > four times the size of conidium. 100 conidia per treatment were collected.

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 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 antagónico, se reportan en *P. digitatum* por *Debaryomyces 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.

40 % germinated in 100 %, and the maximum percentage of inhibition was 23 and 27 % in juice at 5 % and 10 %, respectively (Table 7). The distribution of the germination indices is totally different when the fungus is in contact with the antagonist than when it is separated by the membrane, with a negative and very small coefficient of correlation $r = -0.303$, totally different from that of the other three yeasts. Given that the production of antimycotic substances was not observed for this yeast, the results obtained are compatible with the direct interaction between the antagonist and the pathogen. This coincides with what was reported by Bonaterra *et al.* (2003), who observed a reduction of 95.7 to 2.0 % and of 98.0 to 1.3 % of the conidial germination of *Rhizopus stolonifer* and *Monilinia laxa*, respectively, when they were cocultivated with cells of *P. agglomerans* (1×10^8 ml⁻¹) in nectarine juice at 5%, effect that was not detected when the antagonist and the pathogens were separated by a filter of membranes that physically admitted the crossing of nutrients and of metabolites, give that the germination was 92.0 and 96.0 %, respectively.

Finally, the analysis of the sums of the germination indices (Table 8) confirms the results described above. For the yeasts 38-432, 22⁻²_{4a} and 24⁻²_{3a}, the germination index of *P. expansum* obtained in the presence of the yeast (with and without filter) is significantly lower ($P \leq 0.05$) than what was obtained incubating the spores of the pathogen alone, which is compatible with a mode of action by competition for nutrients and/or space. In the case of the yeast 22-111, when it is separated from the pathogen by the filter, a germination index is obtained that is statistically equal to that observed in the pathogen without the antagonist, which is compatible with a direct interaction between them. In the same table, the non-significance among blocks in all of the yeasts shows that the culture medium did not affect the germination of the spores.

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.

Table 6. Development frequency of the germination tube of conidia of *P. expansum* exposed for 24 h at 25 °C in the presence of the yeast strain 24⁻²_{3a} in different culture media.

Tratamiento Treatment	Escala de germinación / Germination scale									
	Contacto directo / Direct contact					Separados por filtro PTFE / Separated by PTFE filter				
	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 / Juice (1 %)	90	10	0	0	0	85	12	3	0	0
Jugo / Juice (5 %)	88	8	1	0	3	79	9	8	0	4
Jugo / Juice (10 %)	94	6	0	0	0	90	10	0	0	0
Suma / Sum	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.

*Germination scale: 0 = not germinated; 1. Length of germination tube (LGT) \leq one conidium; 2. LGT between one and two conidia; 3. LGT two to four conidia; 4. LGT > four times the size of conidium. 100 conidia per treatment were collected.

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 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.

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

CONCLUSIONS

The antagonistic yeasts 38-432, 24-2_{3a} and 22-2_{4a} exhibited in the bioassay a behavior compatible with a mode of action by competition for nutrients with the pathogen. In contrast, the strain 22-111 presented a mode of action based on the direct interaction with the pathogen. Under the conditions of this study, none of the four yeasts evaluated displayed a mode of action by antibiosis.

End of English Version

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.

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.

TABLE 7. Development frequency of the germination tube of conidia of *P. expansum* exposed for 24 h at 25 °C in the presence of the yeast strain 22-111 in different culture media.

Tratamiento Treatment	Escala de germinación / Germination scale									
	Contacto directo / Direct control					Separados por filtro PTFE / Separated by PTFE filter				
	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 / Juice (1 %)	93	4	1	1	1	1	15	22	20	42
Jugo / Juice (5 %)	82	18	0	0	0	23	6	19	20	32
Jugo / Juice (10 %)	91	7	2	0	0	27	29	28	14	2
Suma / Sum	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.

*Germination scale: 0 = not germinated; 1. Length of germination tube (LGT) \leq one conidium; 2. LGT between one and two conidia; 3. LGT two to four conidia; 4. LGT > four times the size of conidium. 100 conidia were collected per treatment.

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.

TABLE 8. Germination index of spores of *P. expansum* as a function of the separation of the antagonistic yeast by the filter of PTFE in the culture medium.

Tratamiento / Treatment	Levadura / Yeast			
	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 / Filter	64.00 b	40.60 b	28.80 b	272.80 a
Contacto directo / Direct contact	13.40 c	19.60 b	18.60 b	13.20 b
“F” (tratamientos / treatments)	307.91***	377.52***	631.43***	54.57***
F (bloques / blocks)	0.75 NS	1.79 NS	1.45 NS	1.01 NS
DMS / MSD	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

*Weighted sum of the germination indices of 100 spores of *P. expansum* incubated in different nutritive solutions at 25 °C during 24 hours

^z Values with the same letter within each column are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

MSD: Minimum significant difference

NS, ***; Not significant and significant at $P \leq 0.001$, respectively.

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.
- 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 post-harvest 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 post-harvest 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., HVOZDIK, 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 post-harvest pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Food Science* 76(5): M254-M259.