

Competencia por Nutrientes; Modo de Acción de *Candida oleophila* Contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*

Nutrient Competition; Action Mode of *Candida oleophila* Against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*

Víctor Manuel Guerrero Prieto, Ana Cristina Blanco Pérez, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus Cuauhtémoc, Chih., Presa La Amistad s/n, Cuauhtémoc, Chih., CP 31500, México; **César Guigón López, Carlos José Tamayo Urbina, Francisco Javier Molina Corral, David Ignacio Berlanga Reyes**, Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C., Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Conchos s/n, Parque Industrial, Apdo. Postal 781, Cuauhtémoc, Chih., CP 31570, México; **Elizabeth Carvajal Millán**, Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C., Unidad Hermosillo, Carr. a La Victoria, km 0.6, Hermosillo, Son., CP 83000, México; **Graciela Dolores Ávila Quezada**, Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C., Unidad Delicias, Av. 4ª Sur No. 3820, Delicias, Chih., CP 33089, México. Correspondencia: vguerrero@uach.mx

(Recibido: Enero 28, 2011 Aceptado: Mayo 21, 2011)

Guerrero PVM, Blanco PAC, Guigón LC, Tamayo UCJ, Molina CFJ, Berlanga RDI, Carvajal ME y Ávila QGD. 2011. Competencia por nutrientes; modo de acción de *Candida oleophila* contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Revista Mexicana de Fitopatología 29:90-97.

Resumen. Tres cepas de *Candida oleophila* y su combinación, se evaluaron para determinar la competencia por nutrientes, como modo de acción para el biocontrol de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Los tratamientos con *C. oleophila* redujeron la germinación de conidios de ambos patógenos, al ser enfrentadas en jugo de manzana 'Golden Delicious' al 1%. Conidios de *P. expansum* germinaron a 1×10^7 mL⁻¹ y conidios de *B. cinerea* germinaron a 5×10^5 mL⁻¹. Los tratamientos con *C. oleophila* disminuyeron la germinación de conidios de $2-7 \times 10^4$ mL⁻¹ para *P. expansum* y de $1-4 \times 10^4$ para *B. cinerea*. Los tratamientos con *C. oleophila* redujeron la germinación de conidios con promedios de 99% para *P. expansum* y de 96% para *B. cinerea*. Los azúcares consumidos por L07 rugosa fueron de 0.026 mg mL⁻¹ contra *B. cinerea* y de 0.056 mg mL⁻¹ contra *P. expansum*. El consumo de azúcares corrobora la reducción de germinación de conidios. *P. expansum* consumió 1.69 µg L⁻¹ de proteínas, mientras que L07 rugosa consumió la mayor cantidad con 47.95 µg L⁻¹. *B. cinerea* consumió 8.95 µg L⁻¹ y L06 36.89 µg L⁻¹, que fue estadísticamente igual al de L07 rugosa con 27.96 µg L⁻¹. Las cepas de *C. oleophila*, ejercieron un biocontrol de *B. cinerea* y *P. expansum*, en parte, por competencia de nutrientes.

Palabras clave adicionales: Control biológico.

Durante el almacenamiento en refrigeración de la manzana, se presentan pérdidas de importancia económica. Éstas son causadas por varios factores, siendo el más común, la invasión de la fruta por *Penicillium expansum* y *Botrytis*

Abstract. Three strains of *Candida oleophila* and their combination were evaluated for nutrient competition as a mode of action for the biocontrol of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *C. oleophila* treatments reduced germination of conidia of both pathogens when challenged on 1% 'Golden Delicious' apple juice. *P. expansum* conidia germination was 1×10^7 mL⁻¹ and *B. cinerea* conidia germination was 5×10^5 mL⁻¹. *C. oleophila* treatments lowered conidia germination from $2-7 \times 10^4$ mL⁻¹ for *P. expansum* and from $1-4 \times 10^4$ for *B. cinerea*. *C. oleophila* treatments reduced conidia germination on an average of 99% for *P. expansum* and 96% for *B. cinerea*. Sugar consumption for L07 rugose was of 0.026 mg mL⁻¹ against *B. cinerea* and of 0.056 mg mL⁻¹ against *P. expansum*. Sugar consumption supports conidia germination reduction. *P. expansum* consumed 1.69 µg L⁻¹ of proteins, while L07 rugose consumed the greatest amount with 47.95 µg L⁻¹. *B. cinerea* consumed 8.95 µg L⁻¹ and L06 consumed 36.89 µg L⁻¹, which was statistically equal to that of L07 rugose with 27.96 µg L⁻¹. *C. oleophila* strains biocontrol *B. cinerea* and *P. expansum*, in part, by nutrient competition.

Additional keywords: Biological control.

During the cold storage of apples, economical losses occur. They are caused by a series of factors, the most common being that the fruit become infected with *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* (Gholamnejad and Etebarian, 2009; Sharma *et al.*, 2009). Chemical control using synthetic fungicides is the most commonly used method against these fungi (Droby *et al.*, 2009). Although this type of control is highly efficient, it presents disadvantages, such as resistance development by the fungi (Kim and Xiao, 2010) and a risk to the environment and human health. The residues from the fungicides can pollute the water, soil, air and the foods to which they are applied.

cinerea (Gholamnejad y Etebarian, 2009; Sharma *et al.*, 2009). En la actualidad el control químico con fungicidas sintéticos es el más utilizado contra estos hongos (Droby *et al.*, 2009). Aunque este tipo de control es eficiente, también presenta desventajas; selección de cepas resistentes (Kim y Xiao, 2010), riesgo para la salud humana y el ambiente. La residualidad de los fungicidas sintéticos puede contaminar agua, suelo y aire, así como alimentos en los que se aplican. Debido a los riesgos toxicológicos involucrados, varios fungicidas han sido retirados del mercado (Calvo *et al.*, 2007; Gholamnejad *et al.*, 2010). Las tácticas alternativas de control de estas enfermedades son necesarias debido a los altos costos económicos para el desarrollo de nuevos grupos de agroquímicos (Yu *et al.*, 2007). El uso de levaduras antagonistas, es una estrategia viable y prometedora para el biocontrol de las enfermedades en poscosecha (Droby *et al.*, 2002; Droby *et al.*, 2009; Gholamnejad *et al.*, 2010; Janisiewicz y Korsten, 2002; Sharma *et al.*, 2009). Un número significativo de levaduras han sido estudiadas para controlar las pérdidas en poscosecha de frutas, mostrando una gran eficacia de control (Droby *et al.*, 2009; Gholamnejad *et al.*, 2010; Janisiewicz y Korsten, 2002; Punja y Utkhede, 2003). Las levaduras endémicas, presentes en frutas y hortalizas, han sido utilizadas debido a una serie de características que les confieren mayores posibilidades de colonizar las superficies de frutas y heridas en las mismas (Sharma *et al.*, 2009). Una condición previa para mejorar la actividad de biocontrol de *Candida oleophila* o de otras levaduras de biocontrol en general, es el conocimiento de su modo(s) de acción para el control de patógenos (Sharma *et al.*, 2009). Reportes demuestran que la actividad de biocontrol puede implicar diversos modos de acción, entre estos, uno de los más comunes es la competencia por nutrientes y espacio (Chan y Tian, 2005; Droby *et al.*, 2009; Janisiewicz *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2009). La competencia por nutrientes es un fenómeno bien documentado (Droby *et al.*, 2009) y se define como la demanda simultánea de los mismos recursos por dos o más poblaciones microbianas. Este modo de acción es común en bacterias y hongos, debido a la relación superficie/volumen que éstos tienen. Estas características les permiten asimilar los nutrientes disponibles y diluir las soluciones nutritivas con más rapidez y en mayor cantidad que los tubos germinativos de hongos patógenos filamentosos (Janisiewicz *et al.*, 2000). En este contexto, Vero *et al.* (2002) reportan que *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus flavus* pueden colonizar rápidamente las heridas de manzana y pera y de otras frutas bajo condiciones atmosféricas desfavorables para el desarrollo de los patógenos (1.5-2% de CO₂). Entre otros antagonistas que se han evaluado con éxito se encuentra *Rahnella aquatilis*, una bacteria antagonista, que se reporta como inhibidora de la germinación de conidios de *P. expansum* y *B. cinerea* en manzana, por medio de la competencia por nutrientes (Calvo *et al.*, 2007). *Candida oleophila* también muestra una reducción en el número de germinación de conidios germinados, tanto para *P. expansum* como para *B. cinerea* (Janisiewicz *et al.*, 2000). El rápido crecimiento y la amplia colonización de la herida por antagonistas son características importantes de muchos

Due to the toxicological risks involved, some fungicides have been removed from the market (Calvo *et al.*, 2007; Gholamnejad *et al.*, 2010). Alternative methods of disease control are necessary because of factors such as the high cost of developing new types of pesticides (Yu *et al.*, 2007). The use of antagonistic yeasts is a promising and viable strategy for biocontrol in postharvest diseases (Droby *et al.*, 2002; Droby *et al.*, 2009; Gholamnejad *et al.*, 2010; Janisiewicz and Korsten, 2002; Sharma *et al.*, 2009). A significant number of yeasts have been studied to control postharvest fruit losses and have shown great efficiency for controlling pathogens (Droby *et al.*, 2009; Gholamnejad *et al.*, 2010; Janisiewicz and Korsten, 2002; Punja and Utkhede, 2003). The epiphytic yeasts, present in fruits and vegetables, have been used because several characteristics give them higher probabilities for colonizing the surfaces of fruits and wounds on the fruit (Sharma *et al.*, 2009). A precondition to improve the biocontrol activity of *Candida oleophila* and/or other biocontrol yeasts, in general, is to understand their mode(s) of action for pathogen control (Sharma *et al.*, 2009). Various reports show that the biocontrol activity could involve diverse modes of action, the most common being nutrient and space competition (Chan and Tian, 2005; Droby *et al.*, 2009; Janisiewicz *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2009). Nutrient competition is a well-documented subject (Droby *et al.*, 2009) and is defined as the simultaneous demands for the same resources by two or more microbial populations. It is common in bacteria and yeasts due to their surface/volume ratios. These characteristics allow them to better assimilate the available nutrients and to dilute the nutritious solutions at a faster rate and in a higher quantity than the germinating tubes of filamentous pathogen fungi (Janisiewicz *et al.*, 2000). Vero *et al.* (2002), reported that *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus flavus* could quickly colonize wounds in apples, pears and other fruits under atmospheric conditions that were unfavorable for the development of the pathogens (1.5-2.0% of CO₂). *Rahnella aquatilis*, a successful antagonistic bacterium, has been reported as an inhibitor of the germination of *P. expansum* and *B. cinerea* conidia on apples by nutrient competition (Calvo *et al.*, 2007). *Candida oleophila* has also shown a reduction in the number of germinated conidia for *P. expansum* and *B. cinerea* by inhibiting the germination of spores and the growth of the pathogen (Janisiewicz *et al.*, 2000). The rapid growth and wide colonization of the wound by the antagonist are important characteristics for most postharvest biocontrol agents (Droby *et al.*, 2009). The antagonistic active cell growth implies that its mode of action is the consumption of nutrients and/or the invasion of the available space for the pathogen, there by reducing the disease incidence and growth rate (Sharma *et al.*, 2009). Guerrero *et al.* (2004) isolated five yeasts from the surface of 'Golden Delicious' apples. Three strains of these yeasts corresponded to *C. oleophila*. Their antagonistic activity was comparable to the synthetic chemical commercial products used for the control of pathogen fungi like *P. expansum* and *B. cinerea*. The objective of this study was to determine if nutrient competition is one of the modes of action used by *C. oleophila* for the control of *P. expansum*

de los agentes de biocontrol en poscosecha (Droby *et al.*, 2009). El crecimiento activo de las células de microorganismos antagonistas, supone el agotamiento de los nutrientes y/o la invasión del espacio disponible para los agentes patógenos y, por lo tanto, reduce su tasa de crecimiento y la incidencia de la infección (Sharma *et al.*, 2009). Guerrero *et al.* (2004) aislaron cinco levaduras de la superficie de la manzana 'Golden Delicious'. Tres cepas de estas correspondieron a *C. oleophila*, cuya actividad antagonista fue comparable incluso con los productos químicos sintéticos utilizados para el control de hongos patógenos como *P. expansum* y *B. cinerea*. El objetivo de este estudio consistió en determinar si la competencia por nutrientes, es un modo de acción utilizado por *C. oleophila*, para el control de *P. expansum* y *B. cinerea* en manzanas en poscosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Las cepas de *C. oleophila* L06, L07 lisa y L07 rugosa, así como *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, se obtuvieron de la colección 'Microorganismos de la Zona Templada', de la Unidad Cuauhtémoc, Chih., del CIAD, A. C.

Determinación de germinación de conidios. La germinación de conidios se utilizó para identificar la competencia por nutrientes, al ser enfrentados cada uno de ellos por separado contra los tratamientos de *C. oleophila*. Para el ensayo se usaron cajas para cultivo de tejidos de 24 pozos, en las que cada pozo contenía un inserto cilíndrico de plástico que contenía una membrana de poli carbonato de 13 mm y 4.5 μ m de tamaño de poro (Corning, NY 14831 EUA). El medio de cultivo en el que se dio la competencia por nutrientes fue una solución al 1% de jugo fresco de manzana 'Golden Delicious' en agua destilada estéril. Este medio que contenía cada una de las tres cepas de *C. oleophila* y la combinación de las tres, a una concentración de 8×10^6 UFC mL⁻¹ se inoculó individualmente a razón de 700 l en cada uno de los 24 pozos. Paralelamente, se prepararon dos soluciones: una de *P. expansum* y otra de *B. cinerea*, en agua destilada estéril, a una concentración de 2×10^5 conidios mL⁻¹. De estas soluciones, se colocaron 500 l en cada inserto, según fuera el caso. Todas las concentraciones de los microorganismos fueron ajustadas utilizando un hemocitómetro. Los hongos y levaduras se utilizaron después de 48 h de incubación a 28 °C. Las cepas de levaduras y los hongos utilizados como tratamientos en la caja de cultivo se incubaron a 26-27 °C por un periodo de 36 h (incubadora Precision Scientific, modelo 31534, EUA). Después de la incubación, se separaron los insertos, retirando por completo la membrana. La membrana se colocó en un portaobjetos, agregándole una gota de azul de algodón lacto fenol (HYCEL, México), para observar y contabilizar al microscopio (Carl Zeiss, Axiolab DRBKT), el número de conidios germinados mL⁻¹ de *P. expansum* y *B. cinerea*, según el caso (Janisiewicz *et al.*, 2000). El diseño experimental fue un bloques al azar, utilizando seis repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió tres veces, para cada uno de los hongos *P. expansum* y *B. cinerea*. La variable de respuesta fue el número de conidios

and *B. cinerea* on apples during postharvest cold storage.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms. *C. oleophila* strains (L06, L07 plain and L07 rugose), *P. expansum* and *B. cinerea* were obtained from the collection of "Microorganisms of the Temperate Region" from CIAD, A. C., in Cuauhtemoc, Chih. Mexico.

Determination of germinating conidia. The germination of conidia was used to identify nutrient competition in both fungi against the treatments of *C. oleophila*. Tissue culture plates with 24 wells that each including an insert were used. The insert included a 13 mm and 4.5 μ m pore size polycarbonate membrane (Corning, NY 14831, USA). The growing media, in which the nutrient competition was quantified, was a solution of fresh 'Golden Delicious' apple juice at 1%, prepared with sterile distilled water. Individual media were inoculated with one of the three *C. oleophila* strains, or with a combination of the three strains, to a concentration of 8×10^6 CFU mL⁻¹. 700 l of the inoculated apple juice media were added to each of the 24 wells. Two suspensions were prepared, one of *P. expansum* and another of *B. cinerea*, in sterile distilled water at a concentration of 2×10^5 conidia mL⁻¹. 500 l of these suspensions were placed in each well. The suspensions were prepared using a hemocytometer. The fungi and yeasts were used after 48 h of incubation at 28°C. Yeast isolates and fungi used as treatments in the tissue culture plate were incubated at 26-27 °C for a period of 36 h (Precision Scientific Model 31534, USA). After incubation, the inserts and the membranes were removed. Each membrane was placed in a microscope slide with a drop of cotton blue lacto phenol (HYCEL, Mexico) to be observed under a microscope (Carl Zeiss, Axiolab DRBKT) and to count the number of germinated conidia mL⁻¹ of either *P. expansum* and/or *B. cinerea* (Janisiewicz *et al.*, 2000). The experimental design was a completely randomized block, using six replications per treatment. The experiment was repeated three times each for *P. expansum* and *B. cinerea*. As a response variable, the number of germinated conidia mL⁻¹ of each fungus when exposed to *C. oleophila* was evaluated. Germination of conidia after inhibition was evaluated under a microscope, with no mycelium growth evaluation. An analysis of variance (ANOVA) was performed for the number of germinated conidia mL⁻¹. Additionally, the percentage change in the germinated conidia was reported to better describe the decrease. The remaining apple juice in each well was stored in 2 ml Eppendorf microtubes for an HPLC analysis of the sugars and the total protein determination (Bradford, 1976).

Determination of sugars by HPLC. Quantification of three carbon sources was performed on the apple juice used for the three strains studied (Guerrero *et al.*, 2004). The carbon sources were fructose, glucose and sucrose. For these measurements, the HPLC (VARIAN, UV-Vis 9050 detector, Refraction index 9040 and pump 9012, software VARIAN Star, version 5.5) conditions were set as follows: C18, 30 x 7.8 mm Supelcogel column (Supelco, SIGMA), mobile phase flux of 0.50 mL min⁻¹, 70 °C column temperature, a

germinados mL^{-1} en cada hongo al ser enfrentados contra *C. oleophila*. La germinación de conidios después de la evaluación al microscopio, no incluyó la evaluación del crecimiento del micelio. El análisis de varianza se realizó para el número de conidios germinados mL^{-1} . Adicionalmente, se reportó la disminución de la germinación de conidios en porcentaje, con la finalidad de apreciar la disminución de la misma. El jugo de manzana restante de cada pozo, se almacenó en micro tubos Eppendorff de 2 mL para el análisis de azúcares por HPLC y de proteínas totales (Bradford, 1976).

Determinación de azúcares por HPLC. Se realizó la cuantificación de tres fuentes de carbono utilizadas por las cepas estudiadas (Guerrero *et al.*, 2004) en el jugo de manzana. Las fuentes fueron; glucosa, fructosa y sacarosa. Para estas determinaciones, las condiciones del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (VARIAN, detector UV-Vis 9050, índice de refracción 9040 y bomba 9012, software VARIAN Star, versión 5.5) fueron las siguientes: columna Supelcogel C18 de 30 x 7.8 mm (Supelco, SIGMA), flujo para la fase móvil de 0.50 mL min^{-1} , temperatura de la columna 70 °C y loop de 20 μL , volumen de inyección de 100 μL , agua destilada desionizada como fase móvil. El arreglo de tratamientos fue un factorial, con los factores: azúcar por tratamiento y azúcar por microorganismo, con tres repeticiones. El experimento se repitió dos veces. La variable de respuesta consistió en las cantidades consumidas en mg mL^{-1} de cada azúcar cuantificada. El consumo de azúcar fue evaluado para cada tratamiento, ya fuera solo o en combinación.

Determinación de proteínas totales. Las proteínas totales (Bradford, 1976) se determinaron colocando 800 μL de la muestra y 200 μL de reactivo para proteínas (Bio-Rad, México), en una cubeta de poliestireno de 1.5 mL. Las muestras se dejaron reposando durante 5 min y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (VARIANUV-Vis Cary 1E, EUA). Para los cálculos finales,

loop of 20 μL , and a 100 μL injection volume. Deionized, distilled water was used as the mobile phase. A factorial experimental design was used with sugar per treatment and sugar per microorganism, using three replications. The experiment was performed twice. The response variable was the consumed quantities in mg mL^{-1} of each sugar. Sugar consumption was evaluated for each of the different treatments, either alone or in combination.

Determination of total proteins. The total protein content (Bradford, 1976) for each of the treatments was determined by mixing 800 μL of the sample and 200 μL of the protein assay reagent (Bio-Rad, Mexico) in a 1.5 mL polystyrene cuvette. The samples were in repose for 5 min, and the absorbance was read at 595 nm in a spectrophotometer (VARIAN UV-Vis Cary 1E, USA). For the final calculations, a calibration line was made using bovine serum albumin to determine the total protein amount in the samples using the equation $Y=1.4511x +0.0486$ ($R^2=0.9971$). A factorial experimental design was used with the factors: total proteins per treatment and total proteins per microorganism, with three replications. The experiment was repeated twice. The amount of total proteins consumed in $\mu\text{g mL}^{-1}$ per fungus during treatments with *C. oleophila* was used as the response variable. The percentage of total proteins consumed was also calculated for each one of the treatments.

Statistical analysis. The data were analyzed by analysis of variance, ANOVA, using the statistical program SAS (Statistical Analysis System, version 6.12. Cary, NC, USA). The mean comparison was performed with the Tukey test ($p<0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

The methodology in this paper utilized a substrate similar to that in natural conditions, where the antagonist does not permit the germination of conidia. Because the antagonist and the pathogen agent were divided by a

Cuadro 1. Efecto de *Candida oleophila* en la germinación de conidios de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en jugo de manzana al 1%.

Table 1. *Candida oleophila* effect on *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* conidia germination on 1% apple juice.

Tratamiento	Número de conidios germinados mL^{-1}	Reducción de la germinación de conidios (%)
<i>Penicillium expansum</i>	1 x 10 ⁷ a*	0
L07 rugosa + <i>P. expansum</i>	7 x 10 ⁴ b	99.3
L06 + <i>P. expansum</i>	6 x 10 ⁴ b	99.4
Combinacion levaduras + <i>P. expansum</i>	3 x 10 ⁴ c	99.7
L07 lisa + <i>P. expansum</i>	2 x 10 ⁴ c	99.8
<i>Botrytis cinerea</i>	5 x 10 ⁵ a	0
L06 + <i>B. cinerea</i>	4 x 10 ⁴ b	92
L07 lisa + <i>B. cinerea</i>	2 x 10 ⁴ c	96
Combinación levaduras + <i>B. cinerea</i>	1 x 10 ⁴ c	98
L07 rugosa + <i>B. cinerea</i>	1 x 10 ⁴ c	98

*Medias dentro de la misma columna con distintas letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$).

se elaboró una línea de calibración utilizando albúmina de suero de bovino y se determinó la concentración de las muestras mediante la ecuación $Y=1.4511x + 0.0486$ ($R^2=0.9971$). El arreglo de tratamientos fue un factorial, con los factores, proteínas totales por tratamiento y proteínas totales por microorganismo, con tres repeticiones. El experimento se repitió dos veces. La variable evaluada fue la cantidad de proteínas totales consumidas en $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cada hongo al ser enfrentado contra los tratamientos de *C. oleophila*. También se consideró el consumo de proteínas totales en porcentaje, para los diferentes tratamientos.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA), por el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 6.12. Cary, NC, EUA) y las medias se compararon por la prueba de Tukey ($p<0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para los ensayos se utilizó un sustrato similar a las condiciones naturales, en el cual el antagonista no permite la germinación de conidios. En este trabajo fue posible determinar la competencia por nutrientes con una mayor precisión ya que el antagonista y el patógeno estuvieron divididos por una barrera física (Janisiewicz *et al.*, 2000).

Germinación de conidios de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Todos los tratamientos con *C. oleophila* redujeron la cantidad de conidios germinados por mL en *P. expansum*. Las cepas de *C. oleophila*, solas o combinadas redujeron significativamente el número de conidios germinados por mL. La cepa L07 lisa ocasionó un 99.8% de reducción de germinación de conidios de *P. expansum* (Cuadro 1). El consumo más alto de azúcares y proteínas totales (Figura 1 y Cuadros 2 y 3, respectivamente) por todos los tratamientos de *C. oleophila*, en comparación a *P. expansum*, dio por resultado un promedio de reducción de germinación de conidios del 99%. La significativa reducción de la germinación de conidios de

physical barrier, it was possible to determine nutrient competition with an increased precision (Janisiewicz *et al.*, 2000).

***Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* conidia germination.** All of the *C. oleophila* treatments reduced the amount of *P. expansum* conidia germinated per mL. The *C. oleophila* strains, alone or combined, showed statistically significant differences in reducing the number of conidia germination per mL. The L07 plain strain gave a 99.8% reduction in *P. expansum* germination of conidia (Table 1). The effect of the higher consumption of sugar and total proteins (Figure 1, Table 2 and Table 3, respectively) by all of the *C. oleophila* treatments, with an average reduction in germination of 99%, can be inferred. The significant reduction in *P. expansum* conidia germination demonstrates the ability of *C. oleophila* to control this fungus. For *B. cinerea*, the effect of the *C. oleophila*-based treatments was similar to the results observed for the *P. expansum* samples. There was a statistically significant decrease in the germination of conidia/ml compared to the untreated control with an overall average reduction of 96%. L07 rugose and the combination of the three strains produced the largest reductions (Table 1). The differences in the reduction of *B. cinerea* conidia germination corresponded with the sugar consumption (Table 1 and Figure 1). Conidia germination, for both fungi, was inhibited for 48 h. The results obtained in this work are similar to the findings by Janisiewicz *et al.*, (2000) in which they found that antagonists like *Aureobasidium pullulans* reduced the germination of conidia by 50%. Bencheqroun *et al.* (2007), using yeasts as antagonists against *P. expansum* and *B. cinerea*, observed a 71% decrease in the germination of conidia in 0.5% apple juice following a 24 h incubation period and concluded that the primary mode of action by the yeasts was nutrient and space competition. Using *Metchnikowia pulcherrima* (Chian and Tian, 2005), it was concluded that the principal mode of action by this yeast was nutrient and space

Cuadro 2. Consumo de azúcares para varios microorganismos y su combinación, individualmente y enfrentados contra *B. cinerea* y *P. expansum*, en jugo de manzana al 1%.

Table 2. Sugar consumption for several microorganisms and their combination, individually and challenged against *B. cinerea* and *P. expansum*, on 1% apple juice.

Microorganismos individuales, sin enfrentamiento	Cantidad de azúcares consumidos (mg mL^{-1})	Microorganismos al ser enfrentados contra:	Cantidad de azúcares consumidos (mg mL^{-1})
<i>Botrytis cinerea</i> (Bc)	0.04	Bc + L07 rugosa	0.026 a*
<i>Penicillium expansum</i> (Pe)	0.012	Bc + L07 lisa	0.021 a
L07 lisa	0.03	Bc + L06	0.007 b
L07 rugosa	0.04	Bc + Comb. levaduras	0.005 b
L06	0.003	Pe + L07 rugosa	0.056 a
Combinacion levaduras	0.001	Pe + L06	0.045 a
Contenido total de azúcares en jugo de manzana al 1%	0.12	Pe + Comb. levaduras	0.028 a
		Pe + L07 lisa	0.027 a

*Medias dentro de la misma columna con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p<0.05$). DMS=0.0111 y 0.0977 para *B. cinerea* y *P. expansum*, respectivamente, enfrentados contra las levaduras indicadas.

Cuadro 3. Cantidad de proteínas totales en jugo de manzana al 1% consumidas por diferentes tratamientos de *Candida oleophila* contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*.Table 3. Total proteins amounts on 1% apple juice consumed by different *Candida oleophila* treatments against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*.

Tratamiento	Proteínas totales consumidas (g mL ⁻¹)	Proteínas totales consumidas (%)
Jugo de manzana 1%	126.41 a*	0.0
<i>Penicillium expansum</i>	124.72 a	1.34
Combinación de levaduras	92.77 b	26.61
L06	90.63 b	28.30
L07 lisa	81.45 b	35.57
L07 rugosa	78.46 b	37.93
<i>Botrytis cinerea</i>	117.46 ab	7.08
L07 rugosa	98.45 ab	22.12
L07 lisa	94.42 b	25.31
Combinación de levaduras	93.46 b	26.07
L06	89.52 b	29.18

*Medias dentro de la misma columna con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). DMS=23.3 y 29.3 para *P. expansum* y *B. cinerea*, respectivamente.

P. expansum demuestra la capacidad de *C. oleophila* para inhibir el desarrollo de este hongo. En el caso de *B. cinerea*, el efecto de los tratamientos a base de *C. oleophila* fue similar a los resultados observados en las muestras de *P. expansum*. Se observó un decremento significativo en la germinación de conidios al compararlos con el testigo, presentando valores promedios de reducción de germinación de conidios del 96%. La cepa L07 rugosa y la combinación de las tres cepas presentaron los mayores efectos en reducciones de germinación de conidios (Cuadro 1). Las diferencias en la reducción de la germinación de conidios en *B. cinerea* correspondieron con el consumo de azúcares (Cuadro 1 y Figura 1). La germinación de conidios, para ambos hongos, fue inhibida durante 48 h. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Janisiewicz *et al.* (2000), en los cuales encontraron que el antagonista *Aureobasidium pullulans* redujo la germinación de conidios en 50%. Bencheqroun *et al.* (2007), utilizaron levaduras como antagonistas contra *P. expansum* y *B. cinerea* y observaron una reducción de la germinación de conidios de 71% en jugo de manzana al 0.5% después de 24 h de incubación, concluyendo que el principal modo de acción de las levaduras fue la competencia por nutrientes y espacio. Cuando se utilizó *Metchnikowia pulcherrima* (Chian y Tian, 2005), se concluyó que el principal modo de acción de esta levadura fue la competencia por nutrientes y espacio, infiriendo que el medio ambiente nutritivo que se presenta en las heridas de la manzana fue favorable para que esta levadura antagonista colonizara rápidamente el tejido de la fruta y compitiera con el patógeno por nutrientes y espacio.

Consumo de azúcares. El consumo de azúcares se incrementó en los tratamientos a base de *C. oleophila* en relación a *B. cinerea* y *P. expansum* (Figura 1 y Cuadro 2). El consumo fue mayor para los tratamientos contra *P. expansum*. El Cuadro 2 y la Figura 1 muestran que *B. cinerea*

competition, inferring that the nutritional environment surrounding the apple wound was favorable for the antagonistic yeasts to rapidly colonize the fruit tissue and to compete with the pathogens for nutrients and space.

Consumption of sugars. The consumption of sugar increased for the treatments with *C. oleophila* in relation to *B. cinerea* and *P. expansum* (Figure 1 and Table 2). The consumption was larger for the treatments against *P. expansum*. Table 2 and Figure 1 show that *B. cinerea* consumed less sugar than *P. expansum*. Although the overall level of sugar consumption was lower for treatments against *B. cinerea*, statistically significant differences were present between L07 plain and L07 rugose, as compared to L06 and the combination of the three strains (Table 2). However, for treatments against *P. expansum*, there were no statistically significant differences among any of the treatments (Table 2). The reduction in germination of conidia by treatments corresponds with the sugar consumption results. The three strains of *C. oleophila* and their combination showed competitive behavior for sugars against *B. cinerea*. Similar results were found by (Filonow 1998). Although the treatments against *P. expansum* gave a greater percentage reduction in the number of germinated conidia than the treatments against *B. cinerea*, the differences among the treatments were not significant (Tables 1 and 2). The results agree with the earlier findings from Janisiewicz *et al.* (2000) and Vero *et al.* (2002) and clearly demonstrate the difference in sugar consumption between the *C. oleophila* treatments and *P. expansum*.

Total protein determination. The consumption of total protein content was similar for *P. expansum* and for *B. cinerea*, since both fungi consumed a low amount of proteins contained in the apple juice (Table 3). There were no statistically significant differences between the total protein content of the apple juice and the consumption by the consumption by the fungus. The average consumption of the

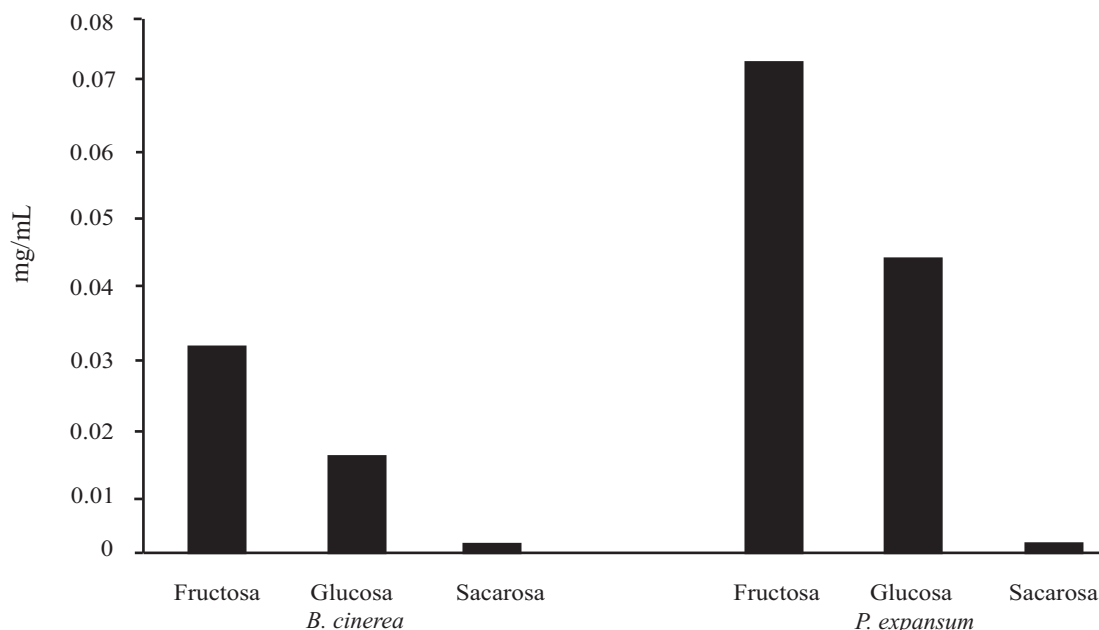


Figura 1. Consumo individual de azúcares, en jugo de manzana al 1%, para *B. cinerea* y *P. expansum*. El consumo de azúcar para *B. cinerea* fue significativo entre los tres azúcares. Para *P. expansum* no hubo diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).
 Figure 1. Individual sugar consumption, on 1% apple juice, for *B. cinerea* and *P. expansum*. *B. cinerea* sugar consumption was statistically significant among the three sugars. For *P. expansum* there were no statistically significant differences (Tukey,

consumió menos azúcares que *P. expansum*. Aunque el nivel general de consumo de azúcares fue más bajo para *B. cinerea*, las diferencias estadísticamente significativas se presentaron entre la cepa L07 lisa y la L07 rugosa, al compararlas contra la cepa L06 y la combinación de las tres cepas (Cuadro 2). Sin embargo, en los tratamientos contra *P. expansum* no hubo diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos (Cuadro 2). La reducción en la germinación de conidios por los tratamientos corresponde con los resultados para el consumo de azúcares. Las tres cepas de *C. oleophila* y su combinación presentaron un comportamiento competitivo en el consumo de azúcares contra *B. cinerea* (Filonow, 1998). Aunque los tratamientos contra *P. expansum* dieron una porcentaje mayor de reducción de la germinación de conidios que para *B. cinerea*, las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas (Cuadros 1 y 2). Los resultados concuerdan con los encontrados con anterioridad por Janisiewicz *et al.* (2000) y Vero *et al.* (2002) que demuestran la diferencia en el consumo de azúcares entre los tratamientos a base de *C. oleophila* y *P. expansum*.

Determinación de proteínas totales. El consumo de proteínas totales fue similar para *P. expansum* y para *B. cinerea*, ya que ambos hongos consumieron menor cantidad de proteínas contenidas en el jugo de manzana (Cuadros 3). No hubo diferencias significativas entre el contenido de proteínas totales en el jugo de manzana y el consumo del hongo. El consumo promedio de proteínas totales de los tratamientos a base de *C. oleophila* fue del 32.1%, contra un 1.3% para *P. expansum* (Cuadro 3). Los tratamientos de *C. oleophila*, al ser enfrentados contra *B. cinerea* presentaron un promedio de consumo de proteínas del 25.6%, contra un

total proteins by the *C. oleophila* treatments was 32.1%, compared to 1.3% for *P. expansum* (Table 3). The average consumption of total proteins for treatments with *C. oleophila* to *B. cinerea* was 25.6% versus 7.0% for the fungus alone (Table 3). Amounts of total proteins consumed by *P. expansum* and *B. cinerea* were not statistically significant when compared to those amounts contained in the apple juice and those consumed by the *C. oleophila*-based treatments. The higher total proteins consumption by the *C. oleophila*-based treatments indicates a competition for the use of these compounds, which suggests that this competition reduced the conidia per mL germination (Table 1).

CONCLUSIONS

Since there was a higher consumption of sugars and total proteins by the yeasts, and that these same compounds were consumed in lower amounts by the fungi evaluated, nutrient competition was shown as an action mode, by which *Candida oleophila* strains, partially control *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*.

Acknowledgements. To Fondo Mixto Estado de Chihuahua-CONACYT, Mexico, for financial funding, project CHIH.-2006-CO2-58803. This research work come from a section of Ana Cristina Blanco Perez's Master of Science Thesis.

LITERATURA CITADA

Bencheqroun S, Bajji M, Massart S, Labhilili M, Jaafari S and Jijakli M. 2007. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by

7.0% para el hongo (Cuadro 3). Las cantidades de proteínas consumidas por *P. expansum* y *B. cinerea* no fueron significativas al compararlos con las cantidades de proteínas contenidas en el jugo de manzana y las cantidades de proteínas consumidas por los tratamientos a base de *C. oleophila*. El mayor consumo de proteínas por los tratamientos con *C. oleophila*, indica una competencia por el consumo de estos compuestos, lo que sugiere que esta competencia redujo la germinación de conidios mL⁻¹ (Cuadro 1).

CONCLUSIONES

Ya que hubo un mayor consumo de azúcares y proteínas por las levaduras, que el consumo de estos mismos compuestos por los hongos evaluados, la competencia por nutrientes se mostró como un modo de acción por el cual las cepas de *Candida oleophila* controlan, en parte, a *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*.

Agradecimientos. Al Fondo Mixto Estado de Chihuahua-CONACYT, México, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación clave CHIH.-2006-CO2-58803. Este trabajo de investigación forma parte de la tesis de Maestría en Ciencias de Ana Cristina Blanco Pérez.

Aureobasidium pullulans evidence for the involvement of competition for nutrients. Postharvest Biology and Technology 46:128-135.

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Calvo J, Calvente V, de Orellano M, Benuzzi D and Sanz de Tosetti M. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. International Journal of Food Microbiology 113:251-257.
- Chan Z and Tian S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Postharvest Biology and Technology 36:215-223.
- Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt E and Porat R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Phytopathology 92:393-399.

- Droby S, Wisniewski M, Macarasin D and Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? Postharvest Biology and Technology 52:137-145.
- 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.
- Gholamnejad J and Etebarian H. 2009. Effect of calcium chloride on the biocontrol efficacy of two antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple fruit. Phytoparasitica 37:255-261.
- Gholamnejad J, Etebarian H and Sahebani N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science 4:001-007.
- Guerrero PVM, Trevizo EMG, Gardea BAA, Figueroa VC, Romo CA, Blanco PAC y Curry EA. 2004. Identificación de levaduras epifitas obtenidas de manzana [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] para control biológico poscosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 22:223-230.
- Janisiewicz W and Korsten L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual Review of Phytopathology 40:411-441.
- Janisiewicz W, Tworowski T and 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.
- Kim Y and Xiao C. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. Plant Disease 94:604-612.
- Punja Z and Utkhede R. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology 21:400-407.
- Sharma R, Singh D and Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50:205-221.
- Vero S, Mondino P, Burgueno J, Soubes M and Wisniewski M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. Postharvest Biology and Technology 26:91-98.
- Yu T, Chen J, Chen R, Huang B, Liu D and Zheng X. 2007. Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. International Journal of Food Microbiology 116:339-345.