

## ANTAGONISMO DE LEVADURAS NATIVAS CONTRA LA PUDRICIÓN AZUL (*Penicillium expansum* Link) EN FRUTOS DE MANZANA

### ANTAGONISM OF NATIVE YEASTS AGAINST BLUE MOULD (*Penicillium expansum* Link) IN APPLE FRUITS

Sergio E. Sánchez Ventura<sup>1</sup>, Ramón A. Martínez Peniche<sup>1\*</sup>, José Castillo Tovar<sup>2</sup> y Eduardo Fernández Escartín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química y <sup>2</sup>Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario s/n, Colonia las Campanas. 76010, Querétaro, Querétaro, México. Tel. y Fax (442) 1-92-13-04.

\*Autor para correspondencia (alvar@uaq.mx)

#### RESUMEN

La mala calidad y deficiente comercialización de la manzana (*Malus domestica* Borkh) producida en la Sierra de Querétaro, México se deben en parte al almacenamiento indebido del producto durante el cual ocurren pérdidas, principalmente por daños provocados por *Penicillium expansum* Link, causante de la pudrición azul. Una alternativa ecológica para controlar ésta y otras pudriciones es el uso de levaduras antagonicas, las cuales pueden desarrollarse a bajas temperaturas por tiempos prolongados. La capacidad antagonica de diversas levaduras, recuperadas y aisladas de frutos y productos naturales, contra *P. expansum* fue evaluada *in vitro* e *in vivo* y sobre manzanas obtenidas en Cadereyta, Querétaro. Las levaduras más sobresalientes fueron identificadas mediante el sistema Biolog®. La cepa 16-212 mostró el más alto porcentaje de inhibición sobre *P. expansum* a 96 h de incubación *in vitro* (67 %). En los experimentos *in vivo* sobre frutos, las cepas 5vtt y 23-61 mostraron el mayor poder antagonico. No se observó correlación alguna entre el antagonismo *in vitro* y sobre los frutos ( $r = 0.11$ ). El método Biolog® permitió la identificación de 5-vtt como *Candida incommunis*, con una similitud (IS) = 0.72 y con 95 % de confiabilidad; de 38-432 (*Debaryomyces hansenii* C, IS = 0.53) y de 35-111 (*Cryptococcus albidus*, IS = 0.58). La cepa 26-224 (*Torulaspota* spp.) se identificó mediante manuales especializados. Biolog® resultó un método eficiente para identificar la mayoría de cepas de levadura estudiadas.

**Palabras clave:** *Malus domestica*, levaduras, control biológico, inhibición.

#### SUMMARY

Low quality and inadequate marketing of apple (*Malus domestica* Borkh) produced in the highlands of Querétaro, México are partly due to an inadequate product storage during which losses occur, most of them due to the "blue mould" caused by *Penicillium expansum* Link. An ecologic alternative for controlling this and other decays is the use of antagonistic yeasts with ability to grow at low temperatures for long periods of time. The antagonistic potential of isolated yeasts against *P. expansum* was evaluated *in vitro* and *in vivo* on apples obtained in Cadereyta, Querétaro. The most effective yeast strains were identified by using the Biolog® system. Strain 16-

212 showed the highest inhibition against *P. expansum* after 96 h of *in vitro* incubation (67 %). On fruits experiments *in vivo*, strains 5vtt and 23-61 showed the highest antagonism. No correlation between the *in vitro* and *in vivo* antagonisms was observed ( $r = 0.11$ ). The Biolog® system allowed the identification of 5-vtt (*Candida incommunis*), with a similarity index (SI) of 0.72 and 95 % de probability, of 38-432 as *Debaryomyces hansenii* (SI = 0.53) and 35-111 as *Cryptococcus albidus* (SI = 0.58). Strain 26-224 (*Torulaspota* spp.) was also identified through specialized handbooks. Biolog® proved to be an efficient method to identify most of the studied yeast strains.

**Index words:** *Malus domestica*, yeasts, biological control, inhibition.

#### INTRODUCCIÓN

Entre los frutales de clima templado, el manzano (*Malus domestica* Borkh) ocupa en México el primer lugar en superficie con 59 826 ha (SAGARPA, 2006). En las zonas altas del centro del país crece en temporal o secano, como en San Joaquín y Cadereyta del Estado de Querétaro. La manzana de la región es de baja calidad, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para fruta fresca de manzana, (NMX-FF-061-SCFI-2003), y se comercializa a precios bajos y en pequeña escala, lo que en parte se debe al intermediarismo y al desconocimiento del almacenamiento en frío, de modo que una mejora de la calidad permitiría al productor obtener mejores precios al disponer de un periodo más amplio para comercializarla.

Durante el almacenamiento ocurren pérdidas debidas principalmente a daños producidos por hongos, de los cuales más de 80 % son atribuidas a la pudrición azul ocasionada por *Penicillium expansum* Link que es capaz de desarrollarse por debajo de 0 °C (Spotts *et al.*, 1999).

Los frutos atacados manifiestan un olor a humedad y las zonas de lesión consisten de masas blandas. Las esporas pueden llegar a sobrevivir durante largas temporadas en contenedores de madera, paredes, techos de frigoríficos, etc., donde el hongo puede crecer y reproducirse (Snowdon, 1990).

El uso de fungicidas para el control de pudriciones es poco aceptado cuando se usa mal debido a la limitación de ingredientes activos autorizados, a la toxicidad de los productos y a la posible aparición de cepas del hongo resistentes a dichos productos (Francés *et al.*, 2006); pero existen productos aceptados por las normas internacionales, como Fecundal® (i.a., imazalil) cuya efectividad depende del ingrediente activo, su concentración y el destino del producto (Ghosoph *et al.*, 2007). Una alternativa es la utilización de levaduras antagonistas capaces de crecer a bajas temperaturas y por tiempos prolongados (Usall *et al.*, 2001). Se han detectado numerosas cepas de levaduras con capacidad antagonista contra enfermedades de poscosecha, pues al ser inoculadas en conjunto con el hongo sobre manzanas heridas restringen el desarrollo de éste después de un periodo de incubación (Usall *et al.*, 2000).

*Candida sake* (CP-1) ha dado buenos resultados en el control de la pudrición azul, sola o en combinación con *Pantoea agglomerans* (CPA-2) (Nunes *et al.*, 2002) y a nivel comercial en formulaciones líquidas o liofilizadas en manzanas y peras (*Pyrus communis* L.) provenientes de distintas regiones (Torres *et al.*, 2006). Esta levadura ha sido sometida a tratamientos térmicos para inducirle termotolerancia y mejorar su viabilidad (Cañamás *et al.*, 2008). *Metchnikowia pulcherrima* se ha combinado con tratamientos térmicos y atmósferas modificadas (Janisiewicz *et al.*, 2003) o con fungicidas naturales (Spadaro *et al.*, 2004), y en ambos casos se ha logrado un efecto sinérgico en el control de la pudrición azul y de otros hongos. Sin embargo, los elevados costos de importación de los productos y su inconsistente respuesta cuando son probados en regiones distintas a las de su origen (Torres *et al.*, 2006), han frenado su uso universal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antagonista de levaduras recuperadas de productos naturales (vinos) y de la superficie de frutos de manzana producidos en la Sierra de Querétaro contra *Penicillium expansum* Link, así como estudiar la correlación entre el antagonismo *in vitro* de las levaduras y el observado *in vivo* sobre frutos, e identificar a las levaduras sobresalientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de la cepa de *P. expansum* y de las cepas de levadura

La cepa del hongo *Penicillium expansum* Link utilizada fue seleccionada en la región por su virulencia sobre manzanas 'Golden Delicious' y registrada con la clave CFNL2016. La cepa se mantuvo en papa-dextrosa agar (PDA), y sobre frutos para mantener su virulencia. Los inóculos se obtuvieron por recuento de conidios viables con la técnica de vaciado en placa en medio NYDA (caldo nutritivo, 8 g L<sup>-1</sup>; extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>; dextrosa 10 g L<sup>-1</sup>; agar 15 g L<sup>-1</sup>); con dicho recuento se calculó la dilución para obtener la concentración requerida (Viñas *et al.*, 1998).

Las levaduras se aislaron a partir de muestras de manzana colectadas en la región o de velos de vinos. La recuperación se hizo con diluyente de peptona estéril. La suspensión obtenida se sembró en PDA adicionado con Rosa de Bengala a 0.6 % y solución de ampicilina, y se incubó a 26 ± 1 °C, por 3 a 5 d (Fernández, 2000). Las colonias de levaduras seleccionadas con base en su morfología contrastada fueron purificadas por siembras en NYDA, y se adicionó solución de ampicilina (100 mcg mL<sup>-1</sup> de medio) (French y Hebert, 1980). Los cultivos puros fueron transferidos a tubos inclinados que contenían medio NYDA, e incubados (26 ± 1 °C por 48 h); después se colocó aceite mineral estéril sobre el cultivo y los tubos fueron almacenados a 1 °C hasta su utilización. Las suspensiones de las levaduras se obtuvieron por cultivo en caldo nutritivo-dextrosa para levaduras (NYDB: NYDA sin agar) durante 48 a 72 h a 26 ± 1 °C y 200 rpm de agitación. El NYDB fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 min y las células se resuspendieron en agua desionizada estéril. Diluciones decimales a partir del concentrado fueron sembradas por extensión en superficie en NYDA a 26 ± 1 °C para determinar el número de células viables (Viñas *et al.*, 1998).

### Bioensayos

Para los bioensayos *in vitro* se colocó en cajas de Petri 60 x 10 mm estériles 1 mL de una concentración de 1 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de cada levadura a evaluar, más 8 mL de NYDA a 45 °C; el medio se homogeneizó y se dejó solidificar. Posteriormente se inocularon 5 µL de una suspensión de 1 x 10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *P. expansum* en cada uno de tres puntos equidistantes de la placa. Las placas fueron incubadas a 26 ± 1 °C y los diámetros de crecimiento del hongo se midieron a las 48, 72, 96, 120 y 144 h.

Para los bioensayos *in vivo* sobre frutos se emplearon, 510 manzanas del cv. 'Golden Delicious', sumergidos en hipoclorito de sodio a 1.5 % durante 30 s y luego secados en campana de flujo laminar por 10 min. En la zona ecuatorial de la superficie de los frutos se hicieron tres perforaciones equidistantes en forma de cubo (3 mm por lado) con un escalpelo estéril. En las heridas se depositaron 25  $\mu$ L de la suspensión de la levadura y se dejó secar nuevamente. Posteriormente, se inocularon 20  $\mu$ L de la suspensión del hongo en las heridas y los frutos se colocaron en frascos de plástico desinfectados e incubados a  $26 \pm 1$  °C; luego se determinó el diámetro de la lesión después de 4, 8 y 12 d de incubación (Usall *et al.*, 2001).

#### Identificación de las cepas de levadura sobresalientes

Se utilizó el sistema de identificación Biolog® (Biolog Microstation Mod NE- 10137', Molecular Devices). Colonias de las levaduras de tres resiembras de 48 h a  $26 \pm 1$  C en NYDA se removieron del agar con un hisopo estéril y se transfirieron a un tubo con 18 mL de solución salina estéril (NaCl a 0.85 %). La turbidez del tubo se ajustó a  $47 \pm 2$  % de transmitancia (T) a 590 nm en un espectrofotómetro Mod 7550 UV-Vis (Mel de México S. A. de C. V.) con ajuste previo a 100 % T con solución salina. Los pozos de la microplaca biológica para levaduras (YT, por sus siglas en inglés) fueron inoculados con 100  $\mu$ L de la suspensión de levaduras y la placa se cubrió e incubó por 72 h a  $26 \pm 1$ °C (Biolog Inc., 2001). Las cepas que no pudieron ser identificadas por el sistema fueron reconocidas a nivel de género con la ayuda de manuales de identificación y de expertos (Malloch, 1981).

#### Análisis de los datos

El diseño experimental usado fue uno completamente al azar con tres repeticiones, en donde una caja de Petri fue una unidad experimental para los experimentos *in vitro*. Los ensayos *in vivo* tuvieron cinco repeticiones y la unidad experimental fue una manzana. La variable de respuesta fue en ambos casos el diámetro de desarrollo del hongo en tiempos distintos. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* y sobre fruto con 37 levaduras. Los datos fueron analizados con el programa estadístico para computadora "JMP" versión 4 (Castaño y Domínguez, 2001).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Bioensayos *in vitro*

La cepa 16-212 inhibió en 58 % el crecimiento diametral del hongo a 48 h de incubación. Otras cepas que in-

hibieron más de 40 % el crecimiento diametral del hongo, fueron: 44-311, 35-111, 44-511 y 6-51. A las 72 h, la cepa 16-212 inhibió al hongo en 71 % y a las 96 h en 67 %. La cepa 35-113, con 54 % de inhibición a las 96 h, continuó como una de las mejores en este ensayo (Cuadro 1). De las 37 levaduras evaluadas, 31 inhibieron significativamente el crecimiento de *P. expansum* después de 120 h de incubación. Janisiewicz (1987) evaluó *in vitro* más de 800 antagonistas, y seleccionó a 97 para ensayos posteriores *in vivo*.

#### Bioensayos sobre frutos

De 147 cepas de levaduras recuperadas de las manzanas, 104 llegaron a concentraciones superiores a  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> después de 72 h de incubación en NYDB y fueron agrupadas en varias series para su evaluación sucesiva con base en consideraciones de índole práctica como la capacidad del agitador y la disponibilidad de células viables en un momento determinado. Se seleccionaron las mejores cepas de cada serie para una prueba confirmatoria de antagonismo.

En el Grupo 1 (Cuadro 2) dos cepas (23-61 y 35-111) redujeron significativamente el crecimiento del hongo después de 4 d de incubación, con inhibiciones de 35 y 34 %, respectivamente, por lo cual fueron retenidas para la prueba confirmatoria. A 8 d de incubación la cepa 23-61 fue la única que superó al testigo (24 % de inhibición). Janisiewicz (1987) mantuvo en incubación por 14 d a manzanas heridas y protegidas con una cepa potencialmente antagonista de *Pseudomonas* spp. y logró un nivel de inhibición de 70 %, muy superior al aquí obtenido. De cuatro levaduras sobresalientes *in vitro* presentes en este grupo, únicamente la 35-111 inhibió el crecimiento del hongo, mientras que la cepa 16-212, que fue la mejor *in vitro*, no tuvo efecto alguno sobre el desarrollo *in vivo* del hongo en el fruto.

En el Grupo 2 (Cuadro 3) destacó la cepa 26-224 con 57 % de inhibición a los 4 d de incubación, aunque estadísticamente fue igual que otras tres cepas. Ésta fue la más sobresaliente a 8 y 12 d, debido a que inhibió el crecimiento del hongo en 45 y 28 %, respectivamente (Figura 1), aunque fue estadísticamente igual a otras cinco levaduras. En el Grupo 3 las cepas 44-514 y 35-33 y 44-513 resultaron superiores al testigo después de 8 d de incubación, pero con niveles de inhibición relativamente bajos (11, 9 y 8 %, respectivamente) (Cuadro 4).

En el Grupo 4 tres cepas redujeron el crecimiento de *P. expansum* significativamente a 8 d de incubación: 30-41 en 25 %, y 14-22 y 18-11 en 22 % (Cuadro 5); las dos primeras fueron retenidas para la prueba confirmatoria.

Las cepas 30-41 y 14-22 fueron de las pocas que en los experimentos *in vivo* sobre frutos inhibieron significativamente a *P. expansum* después de 12 d de incubación. En el Grupo 5 ocho cepas redujeron significativamente el crecimiento del hongo, y destacó 38-432 con 65 %, 41 % y 27 % de inhibición a 4, 8 y 12 d, respectivamente (Cuadro 6), por lo que fue retenida para la prueba confirmatoria.

En el Grupo 6 siete cepas tuvieron un comportamiento significativo y la 33-213 mostró la mejor respuesta con una inhibición relativamente modesta (36 %) a los 4 d de incubación (Cuadro 7); a los 8 d ninguna cepa mostró efecto sobre *P. expansum*. En el Grupo 7 (Cuadro 8), sólo 4bco y 5vtt, recuperadas de velos de vinos, fueron superiores al testigo después de 4 d, con porcentajes de inhibición importantes (65 y 57 %, respectivamente); a los 8 d de incubación sólo la primera superó al testigo.

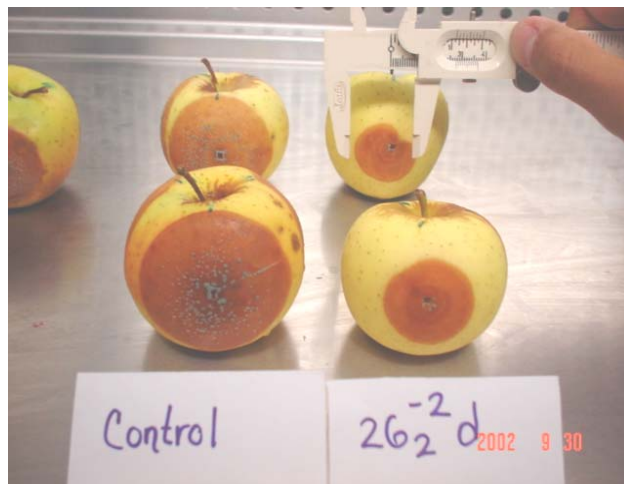


Figura 1. Desarrollo de la lesión causada por *P. expansum* en manzanas ‘Golden Delicious’ en presencia de la cepa de levadura 26-224, después de 12 d de incubación a 26 °C.

Cuadro 1. Promedios del desarrollo diametral (mm) de *P. expansum* en función de la cepa de levadura en medio PDA, en cuatro tiempos de incubación.

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vitro</i>			
	48 hd	72 h	96 h	120 h
16-212	3.47 <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	3.67 a	4.33 a	5.93 a
44-311	4.43 b	5.57 abcd	6.53 bcde	6.77 abc
35-111	4.47 bc	5.27 ab	6.50 bcd	6.83 abc
44-511	4.83 bcd	5.60 bcde	6.30 bc	6.80 abc
6-51	4.85 bcd	5.35 abc	6.30 bc	6.60 abc
35-114	5.17 bcde	5.87 bcdefg	7.50 bcdefg	8.77 defg
35-12	5.37 cdef	5.67 bcdef	6.47 bcd	7.83 bcdefg
14-422	5.37 cdef	6.13 bcdefgh	7.53 bcdefg	7.57 abcde
44-514	5.60 defg	5.90 bcdefg	6.83 bcdefg	7.63 abcdef
1-1	5.73 defgh	6.20 bcdefgh	6.90 bcdefg	7.70 abcdefg
35-411	5.73 defgh	6.13 bcdefgh	6.80 bcdefg	7.47 abcde
14-421	6.00 efghi	6.57 bcdefghij	7.20 bcdefg	7.60 abcdef
38-13	6.03 efghi	6.53 bcdefghij	7.53 bcdefg	8.37 cdefg
35-113	6.07 efghi	6.37 bcdefghi	6.20 b	6.37 ab
14-212	6.07 efghi	6.23 bcdefgh	7.27 bcdefg	7.93 bcdefg
23-512	6.07 efghi	6.47 bcdefghi	6.80 bcdefg	7.13 abcd
44-512	6.17 fghij	6.60 bcdefghij	8.17 fg	9.53 g
23-413	6.17 fghij	6.70 bcdefghij	8.00 efg	7.97 bcdefg
16-31	6.21 fghij	7.10 defghij	11.63 h	12.67 h
14-43	6.37 ghij	6.40 bcdefghi	6.70 bcdef	7.07 abcd
16-33	6.53 hijk	7.00 cdefghij	12.33 hi	13.87 hi
35-410	6.54 hijkl	6.57 bcdefghij	6.69 bcdef	7.07 abcd
23-412	6.57 hijkl	6.70 bcdefghij	6.90 bcdefg	7.43 abcde
35-33	6.83 ijklm	7.47 ghij	7.77 cdefg	8.30 cdefg
35-53	7.03 jklmn	7.77 hij	7.83 defg	8.73 defg
35-412	7.03 jklmno	8.11 jk	8.27 g	9.13 efg
23-61	7.07 jklmno	7.37 ghij	7.87 defg	8.37 cdefg
35-112	7.17 klmno	7.23 efghij	7.77 cdefg	8.90 defg
44-313	7.30 lmno	7.47 ghij	7.75 cdefg	8.07 bcdefg
16-52	7.33 lmno	7.67 hij	8.03 fg	8.07 bcdefg
14-316	7.4 lmnop	7.27 fghij	7.50 bcdefg	7.83 bcdefg
35-413	7.47 mnop	7.93 ij	8.07 fg	9.43 fg
16-213	7.50 nop	9.60 kl	12.66 hi	14.20 hij
44-411	7.57 nop	10.80 lm	12.63 hi	14.20 hij
35-521	7.83 op	11.90 mn	13.30 i	15.57 ij
44-412	7.85 op	10.07 l	13.30 i	14.33 hij
Testigo	8.27 pq	12.73 no	13.17 i	15.20 ij
35-522	9.03 q	13.67 o	15.08 j	15.90 j

<sup>1</sup> Medias obtenidas de nueve datos individuales. <sup>2</sup> Medias con letras iguales, dentro de columnas, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Teixidó *et al.* (1998) obtuvieron 68 % de inhibición con una cepa de *Candida sake* aislada de manzana y adaptada posteriormente para resistir bajas actividades de agua, a los 7 d de incubación, resultado que supera lo obtenido aquí con las levaduras más sobresalientes.

**Cuadro 2. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en función de la cepa de levadura del Grupo 1, a tres tiempos de incubación.**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
<b>23-61</b> <sup>1</sup>	1.50 <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	2.96 a	4.11 ns
<b>35-111</b>	1.54 a	3.40 b	4.85
18-511	1.63 ab	3.35 b	4.80
14-211	1.71 abc	3.52 b	5.14
18-514	1.74 abc	3.53 b	5.11
16-41	1.75 abc	3.25 b	4.93
35-112	1.79 abc	3.72 b	5.08
35-114	1.99 abc	3.28 b	4.95
35-113	2.03 abc	3.89 bc	5.52
23-412	2.06 abc	3.39 b	4.67
23-512	2.08 abc	3.51 b	5.14
44-511	2.20 abc	3.86 bc	4.74
44-311	2.29 bc	3.82 bc	5.08
Testigo	2.32 bc	3.87 bc	5.32
14-316	2.32 bc	3.74 b	5.18
16-214	2.34 bc	3.84 bc	5.11
16-212	2.35 bc	3.91 c	5.54
16-33	2.37 bc	3.78 bc	5.30
16-213	2.39 c	3.89 bc	5.20

<sup>1</sup>Las cepas retenidas para la prueba confirmatoria están marcadas en negritas. <sup>2</sup>Medias provenientes de 15 datos individuales. <sup>3</sup>Medias con letras iguales en cada columna, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ns = No significancia.

**Cuadro 3. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en función de la cepa de levadura del Grupo 2, a tres tiempos de incubación.**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
<b>26-224</b>	0.91 a <sup>1</sup>	1.71 a	3.34 a
<b>26-312</b>	1.31 ab	2.26 ab	4.19 ab
33-211	1.38 ab	2.29 ab	3.94 ab
27-314	1.44 ab	2.46 abc	4.19 ab
14-421	1.59 bc	2.53 abc	4.41 b
14-212	1.60 bc	2.54 abc	4.18 ab
14-422	1.70 bc	2.62 bc	4.52 b
14-513	1.70 bc	2.73 bc	4.28 ab
14-514	1.70 bc	2.72 bc	4.52 b
14-424	1.77 bc	2.66 bc	4.59 b
Testigo	2.12 c	3.15 c	4.64 b

Para los detalles, referirse al Cuadro 2.

En el Grupo 8 las cepas 26-115 y 27-110 redujeron la lesión en sólo 36 % después de 4 d de incubación, y en el Grupo 9 la cepa 27-117 presentó una inhibición de 35 % (datos no mostrados). No obstante, éstas no mostraron efecto alguno ni a los 8 ni a los 12 d. Ninguna de las cepas de estos dos grupos fue retenida para la prueba confirmatoria.

**Cuadro 4. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en función de la cepa de levadura del Grupo 3, a tres tiempos de incubación.**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
<b>44-514</b>	1.18 a <sup>1</sup>	4.65 a	5.12 ns
35-33	1.20 a	4.75 a	5.34
44-513	1.29 ab	4.81 a	5.36
44-312	1.37 ab	4.90 ab	5.51
38-13	1.51 ab	4.91 ab	5.33
35-12	1.53 ab	5.05 b	5.54
44-515	1.54 ab	5.03 b	5.67
Testigo	1.68 bc	5.24 b	5.81
35-413	1.70 c	5.13 b	5.52

Para los detalles, referirse al Cuadro 2.

**Cuadro 5. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en función de la cepa de levadura del Grupo 4, a diferentes tiempos de incubación.**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
<b>30-41</b>	0.56 a <sup>1</sup>	2.65 a	4.67 a
14-22	0.78 ab	2.75 a	4.79 a
<b>18-11</b>	0.79 ab	2.71 a	4.85 ab
37-212	0.94 ab	3.00 b	5.09 b
18-512	0.98 b	2.88 ab	4.95 b
26-313	0.99 b	2.95 b	4.93 b
14-43	1.01 b	2.85 ab	4.82 ab
23-42	1.02 b	2.98 b	5.02 b
14-512	1.02 b	2.96 b	4.98 b
23-414	1.05 bc	3.31 b	5.57 b
14-11	1.10 bc	3.18 b	5.23 b
Testigo	1.43 c	3.52 b	5.54 b

Para los detalles, referirse al Cuadro 2.

**Cuadro 6. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas 'Golden Delicious' en función de la cepa de levadura del grupo 5, a diferentes tiempos de incubación.**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
<b>38-432</b>	0.45 a <sup>1</sup>	2.07 a	3.95 a
26-134	0.49 ab	2.44 ab	4.45 ab
33-222	0.79 abc	2.80 abc	4.66 ab
33-212	0.81 abc	2.97 bc	5.04 bc
7-42	0.82 bcd	2.81 abc	4.83 ab
18-513	0.85 cd	2.76 abc	4.82 ab
23-413	0.90 cde	3.11 bcd	5.12 c
23-43	0.93 de	2.95 bc	4.99 bc
6-51	0.97 de	2.84 abc	4.64 ab
21-24	0.98 e	3.16 bcd	5.07 bc
18-222	1.15 ef	3.18 cd	4.91 bc
Testigo	1.36 f	3.48 d	5.41 c

Para los detalles, referirse al Cuadro 2.

En total, se seleccionaron 12 cepas de levaduras para la prueba confirmatoria, 10 de las cuales fueron obtenidas de manzanas de San Joaquín y Cadereyta y dos de vinos elaborados en laboratorio con uva producida en Querétaro. Otros autores también han recuperado cepas de levaduras con capacidad antagonista de productos diferentes a la manzana (Janisiewicz, 1987; Nunes *et al.*, 2001).

**Cuadro 7. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas ‘Golden Delicious’ en función de la cepa de levadura del Grupo 6, a diferentes tiempos de incubación.**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
33-213	1.08 a <sup>1</sup>	3.44 ns	4.66 ns
26-512	1.16 a	3.67 ns	4.96
33-221	1.17 a	3.44 ns	4.81
26-514	1.20 ab	3.21 ns	4.32
33-214	1.24 ab	3.68 ns	4.90
23-411	1.34 ab	3.64 ns	4.87
35-412	1.36 ab	3.69 ns	4.90
35-522	1.38 abc	3.90 ns	5.10
35-12	1.41 abc	3.84 ns	4.83
35-53	1.52 abc	4.01 ns	5.06
35-33	1.55 abc	3.80 ns	4.90
Testigo	1.69 c	4.10 ns	5.25

Para los detalles, referirse al Cuadro 2.

**Cuadro 8. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas ‘Golden Delicious’ en función de la cepa de levadura del Grupo 7 a diferentes tiempos de incubación.**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
5vtt	0.40 a <sup>1</sup>	1.92 a	3.72 a
4bco	0.49 ab	2.31 ab	4.19 ab
27-119	0.65 abc	2.50 ab	4.11 ab
27-33	0.66 abc	2.73 ab	4.37 ab
33-41	0.69 abc	2.59 ab	4.42 abc
2-0	0.70 abc	2.74 abc	4.68 abc
44-313	0.77 abc	2.73 ab	4.60 abc
3-0	0.79 abc	2.91 bc	4.78 bc
39-314	0.79 abc	2.75 bc	4.57 abc
1 <sup>a</sup>	0.86 abcd	3.07 c	4.58 abc
39-21	0.94 bcd	3.06 bc	4.81 bc
6-0	0.97 cd	2.98 bc	4.83 bc
Testigo	1.12 cd	3.05 bc	5.00 c
44-516	1.15 d	3.30 c	5.18 c

Para los detalles, referirse al Cuadro 2.

En la prueba confirmatoria todas las levaduras superaron al testigo a 4 d de incubación, y destacaron las cepas 23-61 y 5vtt con 94 y 88 % de inhibición, respectivamente. La superioridad ( $P \leq 0.05$ ) de estas cepas se mantuvo hasta los 8 d en que obtuvieron 54 y 53 % de inhibición. A 12 d los porcentajes de inhibición se redujeron a 30 y 23 %, respectivamente (Cuadro 9). Por su parte, las cepas 4bco y 38-432 fueron estadísticamente iguales a las arriba mencionadas en todos los tiempos, con niveles aceptables de inhibición y contrastantes con la cepa 33-213.

Los niveles de inhibición alcanzados por las cepas 23-61 y 5vtt después de 4 d de incubación son comparables a los obtenidos por dos cepas aisladas por Janisiewicz (1987) tras 6 d de incubación (90 %). Viñas *et al.* (1998) después de 7 d de incubación obtuvieron 40 % de cepas con capacidad inhibitoria significativa (de 933 probadas), 10 % de las cuales redujeron el crecimiento del hongo en más de 50 %. En el presente estudio, a 8 d de incubación solamente 39 % de las levaduras logró inhibición significativa del patógeno, y ninguna redujo el crecimiento del

hongo en más de 50 %, mientras que en la prueba confirmatoria sólo dos cepas superaron este nivel.

**Cuadro 9. Desarrollo diametral (cm) de *P. expansum* en manzanas ‘Golden Delicious’ en función de la cepa de levadura a diferentes tiempos de incubación**

Cepa	Tiempo de incubación <i>in vivo</i>		
	4 d	8 d	12 d
23-61	0.11 a <sup>1</sup>	1.35 a	2.92 a
5vtt	0.20 a	1.36 a	3.50 ab
38-432	0.62 ab	2.08 abc	3.79 ab
4bco	0.67 abc	2.01 ab	3.84 ab
35-111	0.73 abc	2.40 bc	4.17 ab
27-119	0.91 bcd	2.62 bc	4.18 ab
18-11	0.98 bcd	2.63 bc	4.53 bc
30-41	1.14 bcd	2.54 bc	4.31 bc
26-312	1.22 bcd	2.79 c	4.38 bc
26-224	1.23 bcd	2.86 c	4.47 bc
44-514	1.27 cd	2.89 c	4.57 c
33-213	1.46 d	2.92 cd	4.57 c
Testigo	1.70 e	2.92 d	4.54 c

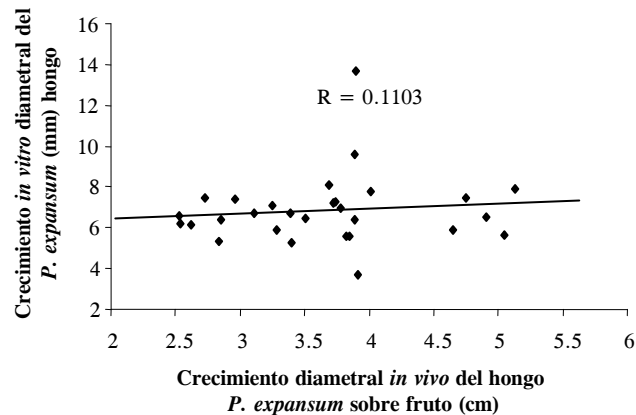
Para los detalles, referirse al Cuadro 2

### Correlación entre los bioensayos *in vitro* e *in vivo* en frutos

Las únicas correlaciones significativas observadas se presentaron entre distintos tiempos de incubación dentro de un mismo tipo de experimento, específicamente entre el crecimiento diametral *in vitro* del hongo a las 96 h y a las 120 h ( $r = 0.98$ ,  $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 10). La correlación entre la incubación *in vitro* por 72 h y la incubación *in vivo* por 8 d sobre fruto, fue muy baja ( $r = 0.11$ ,  $P \leq 0.05$ ) (Figura 2). La ausencia de correlación entre el comportamiento de las levaduras *in vitro* e *in vivo* y en frutos, coincide sensiblemente con Janisiewicz (1987) quien no detectó buena respuesta en fruto de cepas de levadura que habían destacado en pruebas *in vitro*. Lo anterior probablemente se deba a que entre los diversos mecanismos de acción que las levaduras pueden ejercer sobre el patógeno, éste es capaz de generar respuestas de defensa en el tejido del hospedero, como *Pichia guilliermondii* (US-7) que induce la síntesis de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL; EC: 4.3.1.5) y de la fitoalexina ‘Scoparon’ en la piel de fruto (Wilson *et al.*, 1994). Es probable que *in vivo* en presencia del fruto las levaduras sobresalientes primordialmente induzcan algún mecanismo de resistencia en el hospedero, mientras que *in vitro* la inhibición del crecimiento del hongo se deba fundamentalmente a una competencia por nutrientes y por espacio, como lo han sugerido diversos autores (Janisiewicz, 1987; Viñas *et al.*, 1998; El-Ghaouth *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2001).

**Cuadro 10. Coeficiente de correlación simple de Pearson entre los tiempos de análisis *in vitro*, sobre fruto y velocidad de crecimiento.**

	<i>In vitro</i> 48 h	<i>In vitro</i> 72 h	<i>In vitro</i> 96 h	<i>In vitro</i> 120 h	Fruto 4 d	Fruto 8 d	Fruto 12 d
<i>In vitro</i> 48 h	1	0.8827*	0.6727	0.6344	-0.1939	0.0898	-0.0065
<i>In vitro</i> 72 h		1	0.8310*	0.7875*	-0.1298	0.1103	0.0364
<i>In vitro</i> 96 h			1	0.9831*	0.0594	0.0385	0.0633
<i>In vitro</i> 120 h				1	0.1267	0.1294	0.1451
Fruto 4 d					1	0.1661	0.2750
Fruto 8 d						1	0.8011*
Fruto 12 d							1

\* Coeficientes de correlación significativos ( $P \leq 0.05$ ).**Figura 2. Correlación entre el desarrollo de *P. expansum* a 72 h *in vitro* con el *in vivo* en fruto a los 8 d.**

### Identificación de las cepas con mayor capacidad antagónica

El sistema de identificación Biolog® permitió la identificación de cuatro de las seis cepas de levaduras con el mayor poder antagónico en los experimentos en frutos (Cuadro 11). Se requiere un índice de similitud (IS) con la base de datos del sistema de al menos 0.5 para que la lectura sea considerada confiable (Biolog Inc., 2001). La cepa 26-224 pudo ser identificada por medio de la observación de su morfología colonial y microscópica y la 23-61 no se logró identificar.

**Cuadro 11. Identificación de las levaduras sobresalientes en ensayos en frutos**

Cepa	Especie	Similitud Biolog (IS)	% de confianza Biolog
5 vtt	<i>Candida incommunis</i>	0.723	95
38-432	<i>Debaryomyces hansenii</i> C	0.528	92
35-111	<i>Cryptococcus albidus</i>	0.584	90
4 bco	<i>Pichia membranaefaciens</i>	DNM	100
26- 224	<i>Torulaspora</i> spp.	NR	NR
23-61	-	-	-

DNM = Dato no mostrado por el sistema; NR = No reconocida.

*Candida incommunis* (correspondiente a la cepa 5-vtt, índice de similitud (IS) = 0.72; 95 % de confiabilidad) no ha sido reportada aún como antagonista potencial en enfermedades de poscosecha, aunque otras especies de *Can-*

*didia* han sido reportadas como agentes potenciales de control de daños en poscosecha. *Debaryomyces hansenii* (cepa 38-432, IS = 0.53) ha sido reportada como antagonista potencial contra pudriciones de cítricos, tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), naranja (*Citrus sinensis* L.) y limón (*Citrus limon* L.) (El-Ghaouth *et al.*, 2002). *Cryptococcus albidus* (35-111, IS = 0.58) ha sido reportada como agente de control de moho azul y gris en manzana y otros frutos, y contra la pudrición de *Mucor* en peras (Zhang *et al.*, 2004).

### CONCLUSIONES

De las levaduras analizadas *in vitro* 82 % mostraron actividad contra el crecimiento de *Penicillium expansum* Link. La cepa 16-212 mostró el mayor poder antagónico *in vitro* sobre el hongo con 67 % a las 96 h. *In vivo*, las cepas 23-61 y 5vtt tuvieron 54 y 53 % de inhibición sobre *P. expansum* en frutos respectivamente, después de 8 d de incubación. No hubo correlación entre el antagonismo *in vitro* de las levaduras sobre *P. expansum* comparado el antagonismo *in vivo*. El sistema Biolog® fue capaz de identificar a nivel de especie a cuatro de las seis mejores cepas evaluadas.

### BIBLIOGRAFÍA

- Biolog Inc (2001) YT-MicroPlate. Instruction for Use. Biolog Inc. 20 p.
- Cañamás T P, I Viñas, J Usall, N Magan, C Solsona, N Teixidó (2008) Impact of mild heat treatments on induction of thermotolerance in the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 and viability after spray-drying. J. Appl. Microbiol. 104:767-775.
- Castaño T E, D J Domínguez (2001) Diseño de Experimentos para el Desarrollo Tecnológico y Mejora Industrial. Jit Press. México. 312 p
- El-Ghaouth A, C L Wilson, M Wisniewski, S Droby, J L Smilanick, L Korsten (2002) Biological control of postharvest diseases of citrus fruits. In: Biological Control of Crop Diseases. S.S. Gnanamanickam, (ed). Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp:289-312.
- Fernández E E (2000) Microbiología e Inocuidad de los Alimentos Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 923 pp.
- Francés J, A Bonaterra, M C Moreno, J Cabrefiga, E Badosa, E Montesinos (2006) Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans* Postharv. Biol. Technol. 39:299-307.

- French E R, T T Hebert (1980)** Métodos de Investigación Fitopatológica. IICA. San José, Costa Rica. 148 p.
- Ghosoph J M, L S Schmidt, D A Margosan, J L. Smilanick (2007)** Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the *PdCYP51* promoter region of *Penicillium digitatum*. Postharv. Biol. Technol. 44:9-18.
- Janisiewicz W J (1987)** Postharvest biological control of blue mold on apples. Phytopathology 77:481-485.
- Janisiewicz W J, B Leverentz, W S Conway, R A Saftner, A N Reed, M J Camp (2003)** Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. Postharv. Biol. Technol. 29:129-143.
- Malloch D (1981)** Moulds: Their Isolation, Cultivation and Identification. University of Toronto Press. Toronto, Canada. 97 p.
- Norma Mexicana NMX-FF-061-SCFI (2003)** Productos agrícolas no industrializados para consumo humano Fruta fresca, manzana (*Malus pumila* Mill) - (*Malus domestica* Borkh)-Especificaciones. pp:1-18.
- Nunes C, J Usall, N Teixidó, I Viñas (2001)** Biological control of postharvest pear disease using a bacterium *Pantoea agglomerans* CPA-2. Internatl. J. Food Microbiol. 70:53-61.
- Nunes C, J Usall, N Teixidó, R Torres, I Viñas (2002)** Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. J. Food Prot. (65):178-184.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2006)** Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx: (11 de junio de 2008).
- Spotts R A, L A Cervantes, E A Mielke (1999)** Variability in postharvest decay among apple cultivars. Plant Dis. 83:1051-1054.
- Snowdon A L (1990)** A Color Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables Vol. 1. General Introduction & Fruits. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA. 302 p.
- Spadaro D, A Garibaldi, M L Gullino (2004)** Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. Postharv. Biol. Technol. 33:141-151.
- Teixidó N, I Viñas, J Usall, N Magan (1998)** Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. Mycol. Res. 102:1409-1417.
- Torres R, N Teixidó, I Viñas, M Mari, L Casalini, M Giraud, J Usall (2006)** Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. J. Food Prot. 69:2703-2711.
- Usall J, N Teixidó, E Fons, I Viñas (2000)** Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. Internatl. J. Food Microbiol. 58:83-92.
- Usall J, N Teixidó, R Torres, D E J Ochoa, I Viñas (2001)** Pilot Tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. Postharv. Biol. Technol. 21:147-156.
- Viñas I, J Usall, N Teixidó, V Sanchis (1998)** Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Internatl. J. Food Microbiol. 40:9-16.
- Wilson C. L, A El-Ghaouth, E Chalutz, S Droby, C Stevens, J Y Lu, V Khan (1994)** Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. Plant Dis. 78:837-844.
- Zhang H Y, C X Fu, X D Zheng, D H, L J Shan, X Zhan (2004)** Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner in combination with sodium bicarbonate on biocontrol of postharvest green mold decay of citrus fruit. Bot. Bull. Acad. Sin. 45:159-164.