

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANTAGONISMO DE LEVADURAS AISLADAS DE MANZANAS
EN ALMACENAMIENTO PROLONGADO CONTRA *Penicillium
expansum* Link EN POSCOSECHA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

JESÚS ALEJANDRO CARRASCO REYNOSO

DIRIGIDA POR

Dr. RAMÓN ALVAR MARTINEZ PENICHE

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANTAGONISMO DE LEVADURAS AISLADAS DE MANZANAS
EN ALMACENAMIENTO PROLONGADO CONTRA *Penicillium
expansum* Link EN POSCOSECHA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

JESÚS ALEJANDRO CARRASCO REYNOSO

DIRIGIDA POR

Dr. RAMÓN ALVAR MARTINEZ PENICHE

SINODALES

Dr. RAMÓN ALVAR MARTINEZ PENICHE
DIRECTOR

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR
SINODAL

Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA
SINODAL

M. en C. ROCÍO AURORA SANDOVAL CHÁVEZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Antecedentes del manzano	1
1.1.1. Origen	3
1.1.2. Importancia Mundial y Nacional	6
1.2. Botánica	10
1.2.1. Taxonomía	10
1.2.2. Morfología	10
1.2.3. Fisiología	10
1.3. Manejo del cultivo	12
1.3.1. Establecimiento y plantación	12
1.3.2. Propagación y porta injerto	13
1.3.3. Poda	14
1.3.4. Aclareo	14
1.3.5. Riego	15
1.3.6. Fertilización	15
1.3.7. Cosecha	16
1.4. Almacenamiento	17
1.5. Enfermedades de poscosecha	19
1.5.1. <i>Penicillium expansum</i> Link	20
1.5.2. Métodos de control	22
1.6. Control biológico de enfermedades	24
1.6.1. Levaduras	26
2. OBJETIVOS	30

2.1. General	30
2.2. Específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Ubicación del sitio experimental	31
3.2. Material	31
3.2.1. Manzanas	31
3.2.2. Levaduras	32
3.2.3. Patógeno	32
3.3. Obtención y aislamiento de levaduras	32
3.4. Ensayos <i>in vitro</i>	33
3.4.1. Preparación de medios	33
3.4.1.1 Agar manzana	33
3.4.1.2. Medio Agar nutritivo dextrosa para levaduras NYDA	34
3.4.1.3. Caldo Nutritivo dextrosa para levaduras NYDB	34
3.4.1.4. Diluyente peptona	34
3.4.1.5. Tween 0.05 %	34
3.4.1.6. Medio agar papa y dextrosa APD y rosa de bengala	35
3.5. Preparación de inóculos	35
3.5.1. Levadura	35
3.5.2. Patógeno <i>Penicillium expansum</i>	36
3.6. Ensayos de inoculación de la levadura y el patógeno <i>in vitro</i>	36
3.6.1. Medición del poder antagónico de la levaduras <i>in vitro</i>	37
3.7. Ensayos en fruto	37
3.8. Métodos estadísticos	38
3.8.1. Diseño de los experimentos	38
3.8.2. Análisis de los datos	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Aislamiento de levaduras	40
4.2. Bioensayos en fruto	41
4.2.1. Primera selección	41
4.2.2. Prueba confirmatoria	59

4.2.3. Análisis de correlación entre los diferentes ensayos y las pruebas con firmatorias	65
4.3. Ensayos <i>in vitro</i>	66
4.4. Correlación entre los ensayos <i>in vivo</i> con los ensayos <i>in vitro</i>	73
4.5. Ensayos confirmatorios <i>in vitro</i>	78
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	84
5.1. Aislamiento de levaduras	84
5.2. Bioensayos en fruto	84
5.3. Ensayos <i>in vitro</i>	88
6. CONCLUSIONES	90
6.1. Ensayos en fruto	90
6.2. Ensayos <i>in vitro</i>	90
6.3. Correlación entre los dos tipos de ensayos	90
6.4. Recomendaciones para futuros trabajos de investigación	91
7.REFERENCIAS	92

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales países productores de manzana, producción 2001.	7
2	Producción de manzana y rendimiento unitario por año	8
3	Situación actual de la producción nacional de manzana en México por estado al 31 de octubre 2009.	9
4	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levaduras en el Grupo 1, en manzanas después de ocho días de incubación.	42
5	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 2, en manzanas después de ocho días de incubación.	43
6	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 3, en manzanas después de ocho días de incubación.	44
7	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función a las diferentes cepas de levadura en el Grupo 4, en manzanas después de ocho días de incubación.	45
8	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 5, en manzanas después de ocho días de incubación.	46
9	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 6, en manzanas después de ocho días de incubación.	48
10	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 7, en manzanas después de ocho días de incubación.	49

11	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 8, en manzanas después de ocho días de incubación.	51
12	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 9, en manzanas después de ocho días de incubación.	52
13	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 10, en manzanas después de ocho días de incubación.	54
14	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 11, en manzanas después de ocho días de incubación.	55
15	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 12, en manzanas después de ocho días de incubación.	57
16	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 13, en manzanas después de ocho días de incubación.	58
17	Cepas seleccionadas por ensayo para prueba confirmatoria.	59
18	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 1 confirmatorio, en manzanas después de ocho días de incubación a 25 °C de temperatura.	60
19	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura. Grupo 2 confirmatorio, manzanas después de ocho días de incubación a 25 °C.	63
20	Levaduras que demostraron mismo comportamiento en el ensayo preliminar y confirmatorio.	66
21	Cepas de levaduras sobresalientes en ensayos confirmatorios.	66

22	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura.	68
23	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de jugo de manzana a cinco días de incubación a 25°C.	71
24	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C.	81
25	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de jugo de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estadios de desarrollo de los frutos de pepita.	11
2	Conidioforos y conidios de <i>P. expansum</i> .	21
3	Manzana con moho azul.	22
4	Fruto de manzana con podredumbre blanda.	23
5	Frutos afectados por <i>Penicillium</i> .	23
6	Representación esquemática de una célula de levadura que muestra la morfología típica.	27
7	Principales especies de levaduras, características morfológicas.	28
8	Levaduras aisladas de manzanas.	40
9	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en manzanas en función de diversas levaduras sobresalientes en el bioensayo confirmatorio Grupo 1.	62
10	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en manzanas en función de diversas levaduras en el bioensayo confirmatorio Grupo 1.	62
11	Desarrollo de <i>P. expansum</i> en manzanas en función de diversas levaduras en el bioensayo confirmatorio Grupo 2.	64
12	Correlación de ensayos preliminares y confirmatorios con frutos tratados con diferentes cepas de levaduras con capacidad antagónica a <i>P. expansum</i> .	65
13	Desarrollo del hongo en testigos ensayos <i>in vitro</i> .	71
14	Diferentes comportamientos de levaduras y hongo en ensayos <i>in vitro</i> .	72
15	Correlación de ensayos <i>in vivo</i> vs <i>in vitro</i> utilizando agar a base infusión de manzana Grupo 1.	73
16	Correlación de ensayos <i>in vivo</i> vs <i>in vitro</i> utilizando agar a base de jugo de manzana Grupo 1.	74

17	Correlación de ensayos <i>in vivo</i> vs <i>in vitro</i> utilizando agar a base de manzana Grupo 2.	75
18	Correlación de ensayos <i>in vivo</i> vs <i>in vitro</i> utilizando agar a base de jugo de manzana Grupo 2	76
19	Correlación de ensayos <i>in vitro</i> infusión vs <i>in vitro</i> jugo de manzana grupo 1 de levaduras.	77
20	Correlación de ensayos <i>in vitro</i> infusión vs <i>in vitro</i> jugo de manzana Grupo 2.	77
21	Correlación de ensayos <i>in vitro</i> vs <i>in vitro</i> infusión de manzana confirmatorio Grupo 2.	82
22	Correlación de ensayos <i>in vitro</i> vs <i>in vitro</i> jugo de manzana confirmatorio Grupo 2.	82
23	Correlación de ensayos <i>in vitro</i> infusión vs <i>in vitro</i> jugo de manzana confirmatorio Grupo 2.	83

RESUMEN

La mala calidad y la deficiente comercialización de la manzana (*Malus domestica* Borkh) producida en la Sierra de Querétaro, México, se debe en parte al almacenamiento indebido del producto durante el cual ocurren pérdidas, principalmente provocados por *Penicillium expansum* Link, causante de la pudrición azul. Una alternativa para el control de este patógeno es el uso de levaduras aisladas de frutos, las cuales tienen la capacidad de desarrollarse a bajas temperaturas por un largo periodo de tiempo. Es probable que levaduras originarias de frutos sanos almacenados durante tiempo prolongado tengan un mayor potencial antagonista. Para evaluar el poder antagonista de cepas de levaduras aisladas de manzanas almacenadas se inocularon frutos y a la vez se llevaron a cabo estudios *in vitro* con una concentración conocida de levadura (10^7 UFC·mL⁻¹), en presencia de una suspensión de esporas (10^4 esp·mL⁻¹) de *Penicillium expansum* Link. Se obtuvieron 20 levaduras sobresalientes como posibles antagonistas. En los experimentos *in vitro* se observó una correlación significativa ($r = 0.8582$) con relación a los resultados *in vivo* cuando se utilizó medio preparado a base de infusión de manzana a diferencia de lo ocurrido con el medio preparado a base de jugo de manzana, en los ensayos *in vitro* se seleccionaron siete cepas que mantuvieron comportamiento similar en ensayos en fruto tanto como *in vitro*. Se concluye que es factible obtener levaduras seleccionadas antagonistas en manzanas sanas en almacenamiento prolongado, y que existen ciertos medios sintéticos que permiten evaluar el comportamiento de levaduras antagonistas con resultados comparables a los que se logran en manzanas almacenadas.

1. ANTECEDENTES

1.1. Antecedentes del manzano

Entre los frutales de clima templado, el manzano (*Malus domestica* Borkh) ocupa en México el 1er lugar en superficie con 59 826 ha (SAGARPA, 2006), aportando cerca de 1% de la producción mundial. Éste se cultiva en 23 estados de la república destacando Chihuahua y Coahuila, con casi 70% de la producción nacional. En las zonas altas del centro del país, este frutal puede prosperar bajo temporal o secano. Las manzanas de estas regiones se consideran de calidad baja con base en la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-061-SCFI-2003, además de madurar cuando el mercado nacional se encuentra saturado; por ello, los productores de la región obtienen bajos ingresos por la venta del producto.

Una alternativa es el uso de métodos eficientes de conservación del producto en poscosecha en frío convencional, lo que nos permitiría encontrar ventanas de comercialización en las épocas en que no haya manzana disponible en el mercado en fresco. Sin embargo, durante el almacenamiento de la fruta, se presentan pérdidas que se estiman en más de 25 % debidas a daños producidos por hongos, principalmente *Penicillium expansum* Link, causante de la pudrición azul. Este patógeno infecta al fruto a través de heridas causadas durante la cosecha y el empaque, los frutos atacados presentan zonas de lesión que se reducen a una masa blanda, húmeda, acuosa y de color marrón, manifestando un olor a humedad (Sánchez y col., 2008).

El principal método utilizado para controlar ésta y otras pudriciones es el uso de fungicidas de síntesis química, alternativa no del todo aceptada, debido a los daños al medio ambiente, los riesgos en la salud humana y a la formación de cepas resistentes al fungicida. Por ello, el control biológico constituye una alternativa

eficaz ya que utiliza microorganismos antagónicos no patógenos para el ser humano y que pueden ser más persistentes durante el almacenamiento que los productos químicos. Un gran número de bacterias y levaduras han sido aisladas, evaluadas, seleccionadas y utilizadas en el extranjero como agentes antagonistas de diferentes patógenos de interés en manzana, fundamentalmente levaduras que tienen la capacidad de desarrollar a temperaturas bajas y por tiempos prolongados. Sin embargo, el éxito de estos productos sigue siendo limitado, y sólo unos pocos microorganismos están comercialmente disponibles para controlar el deterioro poscosecha de fruta. En México se han realizado algunos estudios preliminares tendientes a la obtención de agentes de biocontrol.

La selección de las nuevas levaduras se basa en pruebas *in vivo* que consisten en inocular al patógeno en presencia del antagonista en frutos que se almacenan a temperatura ambiente, para posteriormente evaluar la incidencia y la severidad del daño producido por el patógeno. Otra posibilidad es la de realizar ensayos *in vitro* que consisten en inocular tanto a la levadura como al patógeno en medios sintéticos basados en APD. Las pruebas *in vitro* tienen la ventaja de ser rápidas y de bajo costo, sin embargo, no se ha observado una buena correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, lo que probablemente se debe a la naturaleza del medio nutritivo utilizado, el cual difiere del de la manzana, por lo cual se piensa que un medio basado en jugo de manzana, permitiría obtener resultados similares a los de los ensayos *in vivo* (Aular, 2008).

Por otro lado, se piensa que nuevas cepas antagónicas pueden ser recuperadas con mayor frecuencia a partir de manzanas sanas almacenadas durante largo tiempo, ya que es probable que el hecho de que se mantengan sin daños aparentes por patógenos se deba a la protección que las levaduras nativas estén procurando al fruto.

1.1.1. Origen

El manzano es de los frutos de clima templado más importante junto con la pera, durazno, ciruela, albaricoque, cereza, fresa, frambuesa y moras. La manzana se encuentra clasificada en la subfamilia *Pomoideae*, que incluye a las llamadas frutas de pepita. El ancestro principal de la manzana es ahora considerado como *Malus sieversii*, que es salvaje de las montañas de Tien en el límite entre el oeste de China y la antigua Unión Soviética. Esta especie es muy diversa y cuenta con una gran gama de árboles silvestres que cuentan con gran variedad de formas, colores y sabores, se encuentran en Kazajstán y otros países independientes de Asia Central formada a partir de la desintegración de la Unión Soviética (URSS). Esta es el área de mayor diversidad y el centro de origen. Los recientes viajes de recolección en Asia central han comprobado que el ancestro *sieversii* es muy diversa y tiene todas las cualidades presentes en *M. domestica*, se dice que esta surgió de la cruce natural de las variedades *sieversii*. Las especies que han contribuido a la composición genética de la manzana se incluyen *M. orientalis*, en donde se encuentra la fruta amarga, *M. sylvestris*, el género europeo, astringente y frutos de pequeño tamaño, los nativos de un área que se extiende desde Gran Bretaña a través de Europa y el norte de Turquía, y un número de especies procedentes del este de Asia, incluyendo a *M. baccata*, las especies de Siberia resistentes, pero pequeñas, *M. mandshurica* y *M. prunifolia*, la especie más grande de China (Agustí, 2004).

El cultivo de la manzana parece haber sido practicado por los griegos y romanos, resultado de sus viajes e invasiones, que ha sido transmitida por ellos a lo largo Europa y Asia. Los cultivares fueron seleccionados y propagados en épocas muy tempranas por lo menos 2000 años atrás. A finales del siglo XIII, muchos cultivares con nombre eran conocidos, hasta la segunda mitad del siglo XX la mayoría de variedades de manzana del mundo eran seleccionadas al azar por

los productores. Más de 10000 variedades están documentadas, sin embargo, sólo unas pocas docenas se cultivan a escala comercial en todo el mundo.

En 1983, los mejores cultivares conocidos en el mundo fueron derivados en América del Norte: 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Cox Orange Pippin', 'Jonathan', de Estados Unidos, 'Reineta' y 'McIntosh' de Canadá. La propagación de las manzanas en los Estados Unidos fue principalmente utilizando semillas obtenidas de las fábricas de sidra, literalmente, decenas de millones de plantas que se cultivaron fueron evaluadas por los productores de la fruta. La evaluación de estas plantas fue el mayor logro de la pomología en Estados Unidos durante los siglos XIX y XX. El género 'Delicious' sigue dominando la producción estadounidense y domina alrededor del mundo regiones como Europa y América.

Sin embargo, en los últimos 25 años, las especies procedentes de la hibridación controlada comenzaron a encontrar un lugar en el mundo de la producción de manzanas. De esta forma se ha ido introduciendo el manzano a lo largo de mundo, en donde en la actualidad se cuenta con una gran cantidad de variedades capaces de introducirse en cualquier región.

El manzano es caracterizado por su fruta que consiste de dos a cinco carpelos encerrados en una cubierta carnosa. En el género *Malus* se encuentran de 25 a 30 especies y varias subespecies de los llamados manzanas silvestres, muchas de las cuales se cultivan como ornamentales por su floración abundante y frutos atractivos (Agustí, 2004).

Los frutales de climas templados (caducifolios), como el manzano, son originarios de zonas que se caracterizan por presentar muy bajas temperaturas en el invierno y altas temperaturas en el verano, estas características de clima producen una respuesta fisiológica en los árboles que finalmente se manifiesta en la cantidad y calidad de frutos (Cruz, 2008). Sin embargo, en zonas subtropicales y tropicales, los períodos estacionales no son tan marcados y las condiciones climáticas varían de acuerdo con las regiones ecológicas que pueden estar

influenciados por las vertientes que forman las montañas, la altitud, la nubosidad, las masas de agua, etc. Para estas condiciones climatológicas, la altitud tiene una gran relación con la temperatura y, considerando la fisiología del árbol de manzano, la acumulación de horas frío y las condiciones externas favorables son un requisito indispensable para la brotación. Los requerimientos de horas frío son propios de cada especie y variedad en particular, existen variedades de alto requerimiento de frío y otras de poca exigencia, que se comportan bien y brotan normalmente (Calderón, 1987).

El manzano es una de las especies más ampliamente distribuidas, tan solo en el estado de Querétaro se encuentra en las sierras frías y húmedas de Pinal de Amoles, San Joaquín, Huimilpan y Amealco, se observan árboles muy antiguos y vigorosos, confirmando su adaptación a las condiciones de clima y suelo de la región.

Las primeras variedades introducidas se establecieron hace más de 200 años, y se propagaron por hijuelos o por semilla, lo que ha resultado en nuevos tipos que difieren en adaptación, tipo de fruta y época de cosecha.

Introducciones más recientes durante el siglo pasado incluyen antiguas variedades Europeas y de Estados Unidos. Todas ellas con alto requerimientos de frío (superiores a 800 horas de frío durante el reposo invernal), lo que resultó en mala adaptación que se expresa como menor rendimiento y producción inestable. Los intentos por reducir estos problemas a través de inductores de brotación han sido positivos pero elevan los costos y pocos productores los conocen. Una solución para eliminar dicho problema ha sido la introducción de nuevas variedades con mejor rendimiento, mayor calidad de fruto y con mayor posibilidad de adaptación a las regiones. En la actualidad el estado de Querétaro cuenta con una amplia gama de opciones en lo que respecta a variedades, especialmente aquellas que poseen menores requerimientos de frío, maduración más rápida, de junio y julio, y mayor calidad de fruta (Montes y col., 2010).

En el estado de Querétaro se tiene que un gran número de manzanos que se encuentran bajo condiciones de temporal, en altitudes de 2200 a 2600 msnm, con precipitaciones mayores a 800 mm por año y en donde se acumulan alrededor de 600 horas frío durante el invierno de cada año. Estas condiciones son propicias para el cultivo del manzano.

Las principales variedades que se cultivan en esta región son “Golden Delicious”, “Red Delicious” y “Rayada”, las cuales poseen buenos atributos de calidad pero presentan serias limitaciones en la comercialización, debido a daños por granizo, roña (*Venturia inaequalis*), mosca de la manzana (*Rhagoletis pomonella*), heladas durante la floración o por maduración tardía.

Los precios de venta a partir del mes de agosto se reducen significativamente, cuando se tiene la cosecha en Chihuahua, Coahuila y Durango, teniendo solo la ventana de comercialización de los frutos que maduran antes del 31 de julio (Montes y col., 2010). Dichas características representan una gran oportunidad para el establecimiento de nuevos huertos, en donde en primer lugar debe analizarse el tipo de suelo, fertilidad, topografía, clima, ubicación, requerimientos nutricionales de la variedad, forma de manejo futura, sistema de plantación y manejo de la misma entre otros factores.

1.1.2. Importancia Mundial y Nacional

En la actualidad a nivel mundial se producen aproximadamente 60 millones de toneladas de manzana al año en una superficie de 5.6 millones de hectáreas, siendo China el principal productor con más de 20 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos de América (EE.UU.) con 5.0 millones. Estos países aportan 45 % de la producción mundial, mientras que México aporta 460,000 ton al año (SAGARPA, 2005).

El manzano es la especie más cultivada a escala mundial. Asia es el continente de mayor producción, el Continente Europeo es la segunda área geográfica en importancia seguida de América del Norte donde destaca EE.UU. como segundo productor del mundo; por último se encuentra América del sur, África y Oceanía, en la Cuadro 1 se muestran los principales países productores de manzana, entre los cuales México ocupa el 22º lugar.

Cuadro 1. Principales países productores de manzana, producción en 2001.

País	Producción (ton)
1.- China	21,559,000
2.- Estados Unidos	4,336,520
3.- Alemania	2,500,000
4.- Italia	2,255,001
5.- Polonia	2,223,546
22.- México	457,889

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 2001).

El Cuadro 2 nos muestra la producción nacional de manzana del año 2000 al 2009 con una producción promedio de 509,285.53 toneladas y un promedio en el rendimiento de 8.54 toneladas por hectárea en ese periodo. Cabe mencionar que a partir del año 2001 el rendimiento fue aumentando considerable mente, ya que en 2000 el rendimiento registrado fue de 3.18 y para el 2009 fue de 9.85 toneladas por hectárea.

En México se tienen reportados 23 estados que producen manzana en mayor o menor escala, de los cuales 21 presentan información completa, aunque no todos tienen sus reportes actualizados, se tienen registros de una superficie plantada a nivel nacional de 59,571 ha de las cuales se han cosechado 56,054 ha, con un total de 558,165 toneladas, lo cual genera un rendimiento promedio de 9.958 ton/ha (Cuadro 3) hasta el 31 de octubre de 2009 (SIAP, 2009).

Cuadro 2. Producción de manzana y rendimiento unitario por años.

Año	Producción (Ton)	Rendimiento Ton/ha
2000	337,974.44	3.18
2001	442,678.72	7.26
2002	479,612.96	7.88
2003	495,216.81	9.07
2004	572,905.70	9.7
2005	583,992.44	9.81
2006	601,915.50	10.42
2007	505,077.86	9.01
2008	511,988.30	9.26
2009	561,492.54	9.85

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

El mercado de la manzana en México ha tomado altos niveles de competitividad, debido a que la apertura del comercio internacional permite el acceso de fruta de los grandes productores del mundo, a nuestro país llegan manzanas principalmente de Washington y Chile, países que ofertan el producto frutícola con precios muy atractivos para los comerciantes, lo cual genera un nivel de competencia “desleal” con los productores locales.

La contribución de las cadenas de frutales caducifolios perocederos, como lo es la manzana, es de gran importancia en la industria alimentaria, tanto en su consumo fresco como en la elaboración de productos derivados. La demanda de manzana en México es del 91.3 % como consumo en fresco, el 8.5% para productos industriales (jugos concentrados y sidras) y el 0.1 % para exportaciones.

Cuadro 3. Situación actual de la producción nacional de manzano en México por estados al 31 de octubre de 2009 (SIAP).

Estado	Superficie (ha)		Producción (ton)	Rendimiento (ton /ha)
	Sembrada	Cosechada		
Baja California	16	2	3	1,350
Coahuila	7,018	6,965	56,027	8,044
Chiapas	1,270	1,250	3,314	2,650
Chihuahua	24,843	22,510	367,471	16,325
Distrito Federal	63	55	367	6,627
Durango	10,378	10,320	62,330	6,040
Guanajuato	26	26	42	1,615
Guerrero	36	28	160	5,714
Hidalgo	1,025	882	3,060	3,470
Jalisco	52	40	140	3,538
Edo. México	187	91	585	6,415
Michoacán	170	117	839	7,171
Morelos	6	6	24	4,000
Nuevo León	1,955	1,877	5,384	2,868
Oaxaca	634	511	1,581	3,093
Puebla	8,684	8,530	36,611	4,292
Querétaro	751	751	1,246	1,659
San Luis Potosí	21	20	150	7,500
Tlaxcala	42	3	24	8,000
Veracruz	872	872	10,233	11,735
Zacatecas	1,301	1,197	8,573	7,165

Fuente: SIAP. 2009.

1.2. Botánica

1.2.1. Taxonomía

Se entiende por manzana al fruto perteneciente a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Pomoideae*, género y especie *Malus pumila* Mill y *Malus domestica* Borkh de forma, tamaño, color y sabor característicos de acuerdo con la variedad (NMX-FF-061-SCFI-2003).

1.2.2. Morfología

El manzano es un árbol caducifolio de gran vigor, que alcanza los 10-12 m de altura, con un tronco y ramas principales de color grisáceo de corteza agrietada con lenticelas, y una copa redondeada y de ramificación abierta, con tendencia a la horizontalidad. Hojas simples, ovales, de bordes acerrados, de color verde oscuro en el as y con el envés de color verde blanquecino y pubescente. Las flores de las variedades de manzana varían en tamaño y forma de pétalos, y en color del blanco al rosa intenso, la flor típica se compone de 5 pétalos, un cáliz de cinco sépalos, 20 estambres y el pistilo que se divide en cinco estilos. El ovario tiene cinco carpelos, cada uno por lo general contiene dos óvulos, el contenido de semillas máxima es de 10, pero algunas variedades tienen más.

El fruto es un pomo de color variable (rojo, amarillo, verde,...) y forma entre esférica achatada y troncocónica; de pulpa blanca, jugosa, aromática y de sabor agradable. Semillas pequeñas, de cubiertas marrón oscuro y brillante (Agustí, 2004).

1.2.3. Fisiología

Como en otras especies frutales la descripción de los estadios fenológicos de las *Pomoideas* ha atendido a descripciones morfológicas y anatómicas con

aspectos puntuales de acuerdo con las áreas de cultivo y especies concretas. La floración, varía dependiendo de la especie y variedad que se trate, así como de la localidad donde se encuentre.

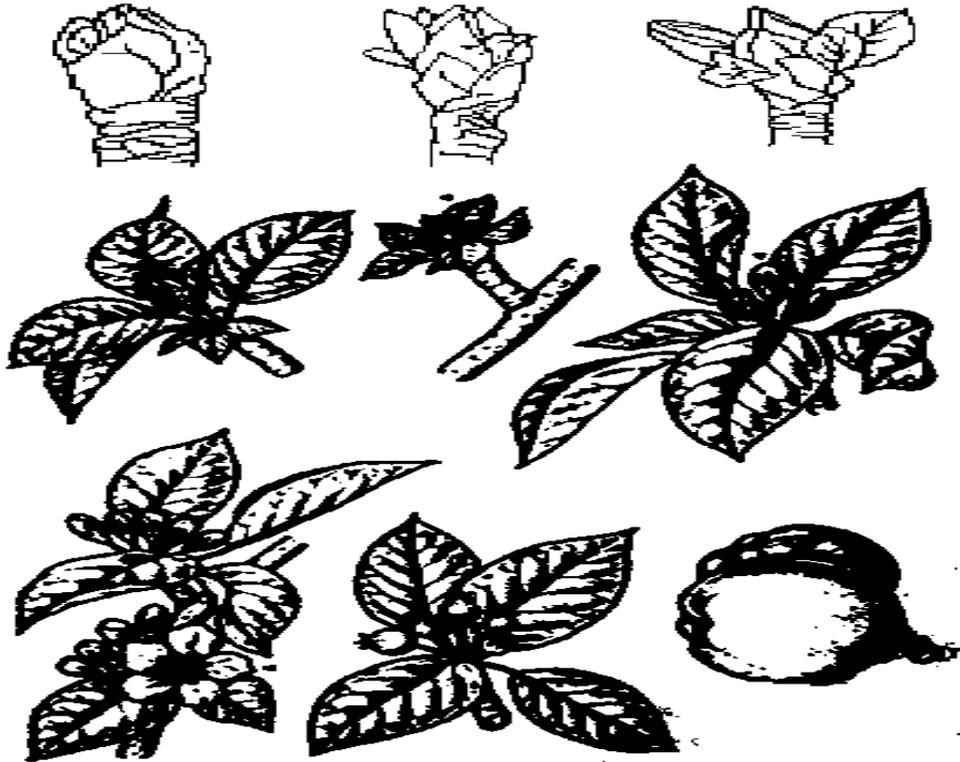


Figura 1. Estadios de desarrollo de los frutos de pepita (Agustí, 2004)

En la Figura 1 se muestran los estadios fenológicos de la manzana en donde primeramente se aprecia el letargo como estadio principal cero, las yemas foliares y florales se encuentran cerradas y cubiertas de escamas marrón oscuro. Después empieza el hinchado de las yemas foliares y con ello el comienzo de la apertura de las yemas y la aparición de ápices foliares verdes. El estadio principal uno se tiene desarrollo de las hojas, se despliegan las primeras hojas hasta alcanzar su estado varietal final. Estadio principal tres, crecimiento longitudinal de los brotes terminales donde empieza a crecer hasta alcanzar un 90 % de la longitud varietal final. Estadio principal cinco, aparición del órgano floral, las yemas se hinchan con manchas ligeramente coloreadas, se tiene apertura de yemas con puntas verdes de

las hojas que aun encierran las flores y termina cuando la mayoría de las flores con pétalos forman una bola hueca. Estadio principal seis, floración, se abren las primeras flores llegando a una plena floración con un 50% de flores abiertas, terminado con marchitamiento y caída de pétalos. Estadio principal siete, formación del fruto, cuajado y caída de frutos, crecimiento que alcanza alrededor del 70 % del tamaño varietal final. Estadio principal ocho, maduración del fruto, empieza a aparecer el color propio de la variedad aumentando la intensidad de color, alcanzando madurez de recolección con aroma y firmeza típicos de la variedad. Estadio principal nueve, senescencia y comienzo del reposo vegetativo, los brotes han completado su desarrollo, las hojas comienzan a decolorarse y caer para empezar el letargo invernal (Agustí, 2004).

1.3. Manejo del cultivo

1.3.1. Establecimiento y plantación

Es fundamental establecer la plantación en un lugar apropiado. Para ello deben considerarse factores como el clima, la topografía, profundidad y fertilidad del suelo o cultivos anteriores en la misma parcela, entre otros factores. Se preferirán suelos profundos (más de 60 cm) francos, fértiles y con buen drenaje. En localizaciones bien ventiladas, pero protegidas de vientos fuertes, sin pendientes pronunciadas, en el caso contrario se establece el uso de terrazas individuales.

Se recomienda un análisis de la fertilidad, tanto del suelo como del subsuelo, que nos permitirá determinar las cantidades fertilizantes y mejoradores de suelo que deben ser incorporados al terreno antes del establecimiento del huerto.

El cultivo del manzano requiere un manejo adecuado, se recomienda para el estado una densidad mínima de 1000 plantas/ha pero existen varios sistemas y distanciamientos de plantaciones como pueden ser:

1. Baja densidad (150 a 399 árboles/ ha.)
2. Mediana densidad (400 – 999 árboles/ ha.)
3. Alta densidad (1000 – 2500 árboles/ ha.)
4. Ultra Densas (> 2500 árboles/ ha.)

Estos especies pueden plantarse a 5 x 5 m o 6 x 5 m al tresbolillo en sistema tradicional, para sistemas de espaldera se recomienda 2 m entre plantas y 3 m entre fila. En sistemas semiintensivos y conducción en líder central pueden plantarse a 3 m entre plantas y 4 m entre filas. Para estos sistemas, en manzana debe emplearse porta injertos enanizantes. El ahoyado puede ser de 50 x 50 x 50 cm, previo a la colocación de la planta es conveniente adicionar materia orgánica descompuesta (Vasquez, 2004).

1.3.2. Propagación y porta injerto

Es poco común el establecimiento de semilleros o vivero para la obtención de planta. En términos generales se puede decir que en manzano la obtención de plántulas es en forma vegetativa. Para esto se extraen los hijuelos nacidos al pie de la planta los cuales han alcanzado una altura aproximada de 75 a 100 cm por 2 a 3 cm de diámetro, la que se alcanza al año de edad y vareta de ramas de ciclo anterior la cual se selecciona y se corta para después ser injertada.

El porta injerto es una parte fundamental para la propagación y establecimiento del cultivo de manzana, para determinar la variedad y porta injerto depende mucho la ubicación, sistema de conducción, riegos, nutrición, manejo e incluso determina el sitio para establecimiento del huerto. Recomendar un porta injerto en especial para los numerosos cultivares, mutantes y selecciones que se tienen sería erróneo, por lo tanto, podemos mencionar que dependiendo de las características de nuestro suelo, las condiciones agroclimáticas de nuestra región e incluso las demandas del mercado, utilizaremos un porta injerto en particular.

Existen en el mercado una amplia gama de materiales comerciales con características fenológicas bien determinadas y con diferentes tipos de resistencia a plagas y enfermedades, de ahí que nuestras necesidades se verán cubiertas con solo una pequeña búsqueda del material adecuado para nuestro huerto. La época de trasplante del porta injerto, depende de la especie a explotar y de la zona. En manzana son los meses de diciembre a febrero.

1.3.3. Poda

Con el establecimiento de manzano se emplea tres tipos de formación a) el vaso, para manzanos de gran desarrollo y muy productivos, en los que se precisa de una estructura sólida en el esqueleto del árbol; b) el eje central y/o huso para variedades/patrones de vigor reducido, en las que la mayoría de las operaciones pueden realizarse desde el suelo, injertadas sobre los patrones débiles, como el M-9; y c) la palmeta, indicada en variedades estándar injertadas sobre patrones de vigor medio. En las plantaciones sidreras se utilizan formación en eje central.

Los frutos de mejor calidad se producen sobre brindillas coronadas y lamburdas sobre de dos años. El equilibrio entre éstas es, por tanto, necesario y la poda de fructificación debe favorecer la formación de este tipo de estructuras y limitar el número de brotes florares. Esta poda debe efectuarse dispuestas, competidoras, etc. Asimismo, deben reducirse las más viejas con el fin de regenerarlas. La poda en verde se utiliza para frenar el desarrollo de algunos brotes y favorecer el de otros con el fin de lograr una formación más rápida y equilibrada con la estructura del árbol (Agustí, 2004).

1.3.4. Aclareo

El aclareo o eliminación selectiva de frutos para favorecer el desarrollo de los que persisten, es práctica habitual en algunas variedades de manzano. Esta

práctica se lleva a cabo manual o químicamente. En el primer caso se realiza cuando la selección del fruto puede hacerse sin dificultad y, en general cuando éste inicia su fase de expansión celular. En el segundo caso se utilizan reguladores del desarrollo y se efectúa en la época en que el fruto es más sensible a la absorción. La polinización del manzano es entomófila, siendo las abejas los principales agentes (Agustí, 2004).

1.3.5. Riego

Los manzanos utilizan gran cantidad de agua, de modo que un árbol adulto necesita entre 200 y 300 L/año y kg de fruta, siendo julio el mes de máximo consumo (Agustí, 2004). El 72.2% de la producción nacional tiene sistemas de riego (bombeo de pozo), mientras que el 20.8% es fruticultura de temporal o sin infraestructura de riego.

1.3.6. Fertilización

Esta actividad debe ir acompañada de estudios físicos y químicos de los suelos. Como regla general el manzano requiere de 30 a 60 gramos de nitrógeno puro al año, dependiendo de la edad. Lo anterior implicaría aplicar de 90 a 180 g de urea, en suelos con pH normal (6.0 a 6.5) o bien de 150 a 300 g de sulfato de amonio en suelos ligeramente alcalinos (pH arriba de 7.0).

La recomendación general para la fertilización de huertos es de aplicar el completo alrededor de 30 a 40 días después de la caída de los pétalos si existe humedad suficiente, si no, al inicio de las lluvias. La Urea se aplica en suelos con pH normal indicado anteriormente y el sulfato de amonio en suelos con pH ligeramente alcalinos. Tanto uno como el otro producto debe dividirse su dosis de

aplicación la primera en la etapa vegetativa y la segunda después de la cosecha (Agustí, 2004).

1.3.7. Cosecha

En manzana el período normal de cosecha es en los meses de julio, agosto y principios de septiembre. El período de cosecha está determinado por la variedad, región y además de las condiciones climáticas, como la cantidad y distribución de las lluvias, por ejemplo el exceso de lluvia y granizo en la etapa de floración afecta la fecha de cosecha.

La experiencia en el huerto y el mercado hacia dónde se dirige el producto también darán la pauta para tomar la decisión de cuándo cosechar. En manzanas existen indicadores de madurez para decidir cuándo cosechar. Los hay físicos tales como el color externo e interno de las frutas, el color de las semillas, la apertura del cáliz, la firmeza y el sabor. Dentro de los químicos están la cantidad de azúcares de la pulpa, el contenido de acidez, el almidón y el pH del Jugo.

Las manzanas deben haber completado su desarrollo fisiológico y presentar el color, sabor, textura y aroma característicos de la variedad. En las variedades rojas y bicoloreadas o parcialmente rojas, el contenido mínimo de sólidos solubles totales debe ser de 11 % y la firmeza de la pulpa o resistencia a la penetración de 5,0 kg (11 Lbs.), como mínimo; para las variedades amarillas, amarillas chapeadas y verdes el contenido mínimo de sólidos solubles totales debe ser de 12 % y la firmeza de la pulpa de 4,5 kg (10 Lbs.), como mínimo (NMX-FF-061-SCFI-2003).

Para realizar la cosecha todo huerto debe contar con el equipo mínimo, siendo éste el siguiente: bolsas cosechadoras, escaleras de doble banda o para mayor facilidad de una banda con tres patas, cajas de plástico o de madera y mesa clasificadora de fruta. La cosecha manual auxiliada de escaleras y canastillas, es común que el cortador escale al frutal para facilitar esta práctica, dado el tamaño

que alcanzan los árboles. Se mencionan casos extremos como el siguiente: cuando el productor observa, que la fruta es muy pequeña, se encuentra dañada por granizo, identifican estos frutos como de baja calidad, y para su cosecha se hace sacudir el árbol con el fin de que los frutos caigan al suelo para recolectar y venderlo para la industria, adquiriendo un precio bajo. Normalmente los frutos cortados, se depositan en canastas, cajas de madera o cestos de plástico.

Esta actividad es muy importante y debe realizarse con mucho cuidado, evitando dañar físicamente los frutos y además el operario deberá tener la precaución de cortar el fruto con todo y pedúnculo para mejor preservación.

1.4. Almacenamiento

En los países con clima templado, gran parte de la producción de frutas y hortalizas está confinada a períodos de crecimiento relativamente cortos, por lo que el almacenamiento de productos frescos es esencial para abastecer a la población, una vez pasada la época de cosecha. En los países tropicales el periodo de producción puede extenderse, pero aún así, el almacenamiento siempre es necesario para prolongar el abastecimiento al consumidor. A medida que mejora el poder de compra del consumidor, las razones del almacenamiento pueden dejar de ser aquellas consideradas como tradicionales, para tratar en cambio de satisfacer sus demandas. Es probable que sus demandas incluyan mejoras en la calidad y en la disponibilidad, y a medida que la presión aumente, se exigirán mejoras en las técnicas de almacenamiento. En la actualidad, la mayoría de los cultivos se almacenan por períodos hasta de doce meses como parte de la cadena normal de mercadeo y todo tipo de productos son a veces almacenados por unos cuantos días o semanas debido principalmente:

- a. Porque no hay un comprador inmediato.
- b. Porque no existe disponibilidad de transporte u otras facilidades esenciales.
- c. Para prolongar el periodo de mercadeo e incrementar el volumen de ventas.

d. Para esperar un alza en los precios.

Existen diferentes formas de almacenamiento, cuya elección dependerá de su costo y aplicabilidad. Sin embargo, antes de pensar en el almacenamiento de productos frescos, existen otros factores que deben tomarse en consideración. La vida máxima de almacenamiento de un producto cosechado depende del historial de su producción, calidad y de la madurez en el momento de la cosecha. La vida actual de almacenamiento que puede alcanzarse en la práctica, puede ser muy diferente, ya que depende de los procedimientos de cosecha, manejo y del medio ambiente del almacenamiento. Algunas características de la estructura o abastecimiento del mercado pueden crear condiciones negativas en virtud de las cuales los productos almacenados van a competir en desventaja con productos frescos recién cosechados. Englobando todas estas interacciones están los aspectos económicos del almacenamiento.

Los productores estiman que durante el proceso de producción ocurren diferentes mermas del producto que puede alcanzar hasta el 5 % de la producción debido a inclemencias del tiempo como lo son vientos fuertes, lluvias excesivas que tiran la fruta aún verde y plagas que aceleran la pudrición. Otras causas son al momento de la cosecha con la fruta caída, pisada o maltratada en el corte y en el transporte durante el envío a los centros de acopio o hacia los centros de mercado.

Las pérdidas en poscosecha varían entre productos, áreas de producción y época del año. En EE.UU. las pérdidas de frutas y vegetales se han estimado entre 2 % al 23 %, mientras que en los países en desarrollo se indican valores entre 1 y 50 %. No es económicamente factible ni práctico esperar que las pérdidas de productos hortícolas sean cero, se debe aceptar un valor razonable para cada producto en cada área y es necesario evaluar la relación costo beneficio de la implementación de determinada técnica de reducción de pérdida.

En la selección de la calidad de frutos para determinar si es razonable el uso de cadenas de almacenamiento se distinguen cuatro clases de fruta relacionadas básicamente con el tamaño del fruto y la sanidad del mismo:

- 1) Primera; Consideran la más grande para el consumo en fresco, (siendo que las cadenas comerciales no es esta la que prefieren) sin daños exteriores y sin defectos.
- 2) Segunda; Un diámetro ecuatorial aproximadamente de 8 cm y un diámetro polar de 7 cm, sin defectos externos y sin enfermedades.
- 3) Tercera; Fruto que tiene un diámetro ecuatorial menor de 8 cm y un diámetro polar menor de 7 cm, sin defectos externos y sin enfermedades.
- 4) Cuarta; ripio o desecho, no importa el tamaño tener defectos y se destina exclusivamente a la industria.

1.5. Enfermedades de poscosecha

Toda disfunción de un proceso vital que resulte en una anomalía estructural deletérea o en alteraciones fisiológicas, con síntomas acompañantes más o menos específicos, recibe el nombre de enfermedad, las anomalías y alteraciones pueden afectar a la planta entera, a alguno de sus órganos, o a sus productos, y los agentes que las producen reciben el nombre de patógenos (Agustí, 2004).

Durante el manejo en poscosecha de los frutos hay un conjunto de actividades que deben ser realizadas en forma secuencial y progresiva. Cuando estos van a ser destinados a mercados exigentes, como es el caso de los mercados internacionales, se debe seguir la siguiente secuencia: cosecha, recepción, selección, tratamiento fitosanitario (opcional), lavado, secado, aplicación de cera y secado (opcional), clasificación por tamaño, empaquetado, paletización, preenfriado, almacenamiento y transporte. Sin embargo, para el mercado local, el

cual es menos riguroso, algunas de las actividades, se obvian o se realizan en forma deficiente, lo cual afecta la eficiencia del manejo y la calidad del producto.

Los principales problemas en el manejo de los frutos poscosecha son: inadecuada aplicación de los indicadores de cosecha, realización precaria de la cosecha, selección y clasificación inadecuada, uso de embalajes impropios, ausencia de tratamientos fitosanitarios y fallas en la cadena de frío. Adicionalmente, se puede indicar que la falta de información de mercado, normalización y la escasez de recursos humanos capacitados en el área de poscosecha, son factores que inciden en las altas pérdidas que ocurren, durante la recolección, manipulación, preparación, despacho y consumo de las frutas (Aular, 2008).

En poscosecha de frutas y vegetales se tiene una pérdida de niveles significativo, se estima que alrededor del 20 a 25 % de las frutas y hortalizas frescas son perdidos por agentes patógenos durante el manejo, incluso en los países desarrollados (El-Ghaouth y col., 2002). En los países en desarrollo, las pérdidas de poscosecha son más graves debido a un almacenamiento inadecuado y las facilidades de transporte. Fungicidas sintéticos se utiliza principalmente para controlar las enfermedades de poscosecha de frutas y verduras (El-Ghaouth y col., 2002). Sin embargo, la tendencia mundial parece estar cambiando hacia un menor uso de fungicidas y por lo tanto, hay un fuerte deseo público y científico a buscar alternativas más seguras y ecológicas para reducir la incidencia de patógenos en los productos cosechados (Mari y col., 2006). Entre los diferentes enfoques biológicos, el uso microorganismos antagonistas como levaduras, hongos y bacterias es bastante prometedor y ha ganando popularidad en los últimos años.

1.5.1. *Penicillium expansum* Link

Los hongos son fundamentalmente organismos terrestres aunque algunos son de agua dulce o marinos. Muchos son patógenos e infectan plantas y animales. Los hongos son organismos eucariotes, portadores de esporas con nutrición por

absorción, carentes de clorofila, que se producen de forma asexual y sexual (Lansing, 2000). El género *Penicillium* se coloca en la división Deuteromycota si los conidioforos y conidios son los únicos orgánulos reproductores presentes, en la Figura 2 se muestran conidioforos y conidios del *P. expansum*, pero se ubican con los ascomicetos cuando se forman cleistotecias con ascosporas (James, 2005).



Figura 2. Conidióforos y conidios de *P. expansum* (Modino y col., 2009).

Penicillium expansum Link o Moho azul tiene la capacidad de enfermar todas las variedades de manzana, provocando una sintomatología de podredumbre blanda, acuosa y en general de color marrón claro, en la Figura 3 se muestra la sintomatología. Si bien el color puede variar de una fruta a otra, se distingue a esta enfermedad por la consistencia acuosa de la podredumbre. El tejido afectado se separa fácilmente del sano. En general comienza a desarrollarse a partir de una herida sobre la que aparece el hongo, primero de color blanco, recubriéndose luego de la esporulación azul característica que le da el nombre a la enfermedad. En el campo hay muy poca presencia de este hongo.



Figura 3. Manzana con moho azul.

El patógeno es incapaz de atravesar la cutícula de la fruta. La penetración se da a través de heridas o aberturas naturales. Sobre los frutos infectados se producen numerosas esporas, en la Figura 4 se muestran los síntomas de un fruto totalmente infectado en donde destaca la gran cantidad de esporas con el color característico de esta enfermedad, las que diseminadas en la cámara, pueden producir infecciones secundarias o sobrevivir adheridas a las maderas de los bins o cajas, a los materiales de empaque o a las paredes de las cámaras frigoríficas, si éstas no son adecuadamente desinfectadas (Mondino y col., 2009). Se manifiesta como pequeños cojines de micelio productores de esporas y es capaz de desarrollarse por debajo de los 0 °C, la superficie de las lesiones más antiguas puede estar cubierta por esporas de color verde azulado, que inicialmente son de color blanco. Las esporas pueden llegar a sobrevivir durante largas temporadas sobre los contenedores, especialmente si estos son de madera donde el hongo puede crecer y reproducirse.

1.5.2. Métodos de control

El uso de fungicidas para el control es el principal pero es poco aceptado por ello es muy importante llevar a cabo la práctica adecuada de manejo para evitar la producción de heridas durante la cosecha y el empaque. El personal de cosecha

debe ser muy cuidadoso con el manejo de la fruta, para evitar que la misma sufra golpes o heridas. A su vez, la línea de empaque debe ser cuidadosamente revisada para impedir todo tipo de daños durante el proceso. Una alternativa es la utilización de microorganismos antagonistas que ayuden a complementar el cuidado con los métodos antes mencionados. En la Figura 5 se muestra la diferencia de frutos sanos e infectados por *Penicillium expansum* Link en donde se puede destacar las características y la capacidad de daño del hongo en las heridas efectuadas durante el manejo del fruto.



Figura 4. Fruto de manzana con podredumbre blanda.



Figura 5. Frutos afectados por *Penicillium expansum*.

1.6. Control biológico de enfermedades

El control biológico, que se define como la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos que de forma natural tienen la capacidad de control. Esta manipulación provoca un incremento de su capacidad de inhibición de los patógenos en poscosecha (Nigam y Mukerji, 1988).

En los últimos años ha sido objeto de estudio con resultados favorables en el control de algunas enfermedades en poscosecha, como es el caso de la levadura *Candida sake*, la cual colonizó rápidamente la superficie de manzanas (*Malus sylvestris Mill*), inhibiendo a *P. expansum* en 80 % después de 60 días a 1 °C (Usall y col., 2000). Zhang y col. (2005) encontraron que *Cryptococcus laurentii* tiene un efecto variable contra *B. cinerea* en pera (*Pirus comunis L.*) en función del momento de aplicación del inoculo.

Un antagonista deseable debe ser genéticamente estable, efectivo a bajas concentraciones, poco exigente en nutrientes, adaptado a diferentes condiciones del medio, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en diversas frutas y hortalizas, fácilmente cultivable, manipulable, resistente a fungicidas, compatible con los procesos comerciales, no dañino para el hospedero y que no produzca sustancias nocivas para el humano (Spadaro y Lodovica, 2004).

Hay dos enfoques básicos para el uso de los antagonistas microbianos para el control de las enfermedades de poscosecha de frutas y verduras: (1) el uso de microorganismos que ya existen en la fruta o verdura, o (2) aquellos que pueden ser introducidos artificialmente en contra de los agentes patógenos de poscosecha. Antagonistas microbianos naturales son los que están presentes naturalmente en la superficie de frutas y verduras, y después de su aislamiento de antagonistas se utilizan para el control de enfermedades de postcosecha (Janisiewicz, 1987). Wilson y colaboradores (1994) encontraron que lavados obtenidos desde la superficie de cítricos sembrados en medio de agar, sólo las

bacterias y levaduras apareció tiempo después de la dilución de estos lavados, varios hongos de pudrición apareció en el agar, lo que sugiere que la levadura y bacterias pueden suprimir la proliferación de hongos. Por lo tanto, indica que cuando las frutas y verduras se lavan, son más susceptibles al deterioro que aquellos, que no se lavan en absoluto.

Hay muchos factores implicados para la introducción de un microorganismo antagonista en el control eficaz de enfermedades de postcosecha. Diversos estudios han indicado que el agente antagonista debe ser introducido al lugar de la herida antes de la llegada del patógeno (El-Ghaouth y col., 2002). Por ejemplo, *Trichoderma viride* Pers.: Antagonista de los papas sólo era efectivo en el control de *Lasiodiplodia theobromae* (Patente) de frutas y *Griffith Maubl* en plátano (*Musa* spp), cuando se presentó cuatro horas antes de la inoculación del patógeno, de lo contrario no es efectivo en absoluto. Otro factor, que es igualmente importante para la eficacia de un antagonista microbiano, es la presencia de humedad en los sitios de la herida. Por ejemplo, la levadura *Candida oleophila* Montrocher fue eficaz en el control de *Botrytis cinerea* en manzana sólo cuando se aplicó a las heridas frescas, pero cuando la humedad es baja en la herida de frutos se convierte en un factor limitante para el crecimiento de la levadura y por lo tanto para el control del patógeno (Wilson y col., 1994).

Numerosos estudios han demostrado un gran potencial para el control biológico de enfermedades de poscosecha con microorganismos antagónicos (Janisiewicz 1987; Wilson y col., 1994; Viñas y col., 1998). La fase posterior a la cosecha de las frutas está restringida por los parámetros ambientales tales como la temperatura, los gases atmosféricos y la humedad relativa, que puede ser alterado para retrasar la senescencia y reducir la descomposición. El potencial de un agente de control biológico dependerá de su compatibilidad con estas prácticas de almacenamiento. Por otra parte, el ambiente controlado puede ayudar a cambiar el equilibrio de las interacciones entre el huésped, el patógeno y el antagonista a favor del antagonista (Wilson y col., 1994). Algunos de los antagonistas han sido probados a gran escala bajo condiciones comerciales (Usall y col., 2000).

La aceptación definitiva de control biológico dependerá de su eficacia y su compatibilidad con la manipulación y el almacenamiento actual. Se necesita más investigación para determinar los efectos de las prácticas poscosecha diversos (como el lavado, encerado y residuos de fungicidas de precosecha aplicaciones) sobre la dinámica poblacional y la actividad biológica del antagonista.

1.6.1. Levaduras

Las levaduras pueden considerarse como hongos unicelulares. Sin embargo, esta no es una precisa definición por que muchos de los microorganismos reconocidos como levaduras realmente producen micelio en diverso grado (James, 2005).

Una levadura es un hongo con un único núcleo que se reproduce de forma asexual por germinación y división transversal o por reproducción sexual a través de la formación de esporas. Cada yema que se separa puede crecer y convertirse en una nueva levadura, y algunas se agrupan para formar colonias, en la Figura 6 se muestra el esquema de la morfología de una levadura, en donde se encuentran los órganos que comprenden la célula de una levadura. En general las levaduras tiene un tamaño mayor que las bacterias, no tienen flagelos pero poseen la mayoría de los restantes orgánulos de las eucariotas (Lansing, 2000).

Las levaduras se diferencian de las bacterias porque aquellas tienen un tamaño celular mayor y sus formas son ovales, elongadas, elípticas y esféricas. Las células típicas de levaduras tienen un diámetro de entre 5 y 8 μm y algunas incluso mayor. Los cultivos de levaduras viejos tienden a tener células más pequeñas (James, 2005). Las colonias pastosas corresponden al grupo de hongos conocido como levaduras. Éstas son organismos unicelulares en algún momento de su ciclo de vida y se multiplican por brotación o fisión. Muchas especies tienen un teleomorfo ascomicético, algunas basidiomicético. Las características macro y

micromorfológicas son importantes para la identificación como se muestra en la Figura 7 donde identifican 14 especies de las más comunes (Carrillo, 2003).

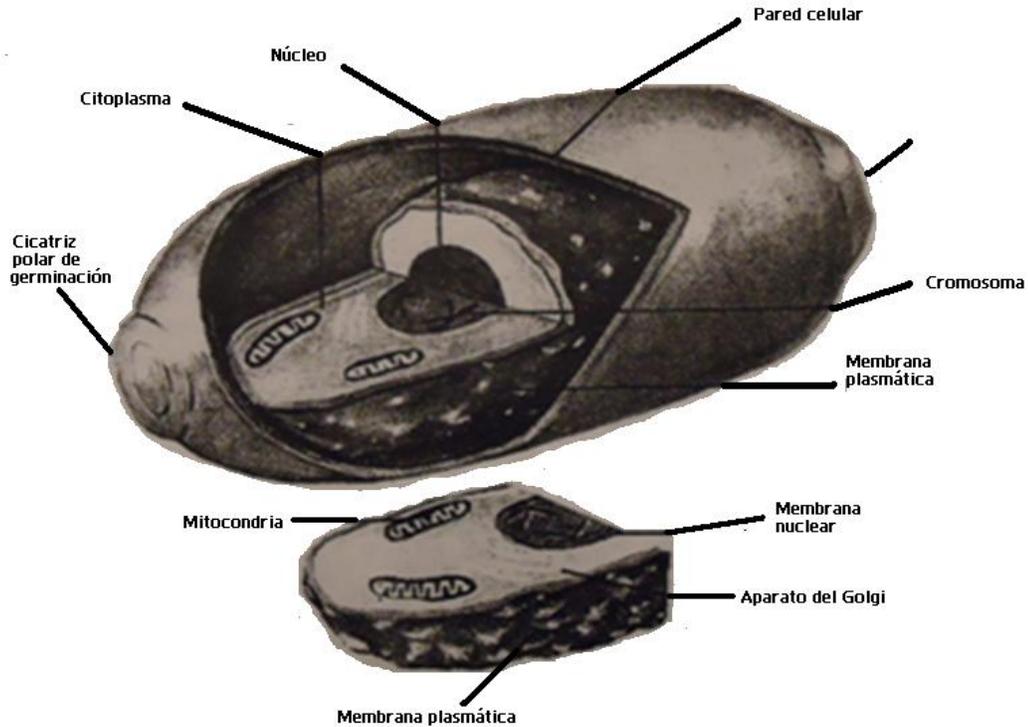


Figura 6. Representación esquemática de una célula de levadura que muestra la morfología típica (Brescott, 2000).

La vasta mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48 °C. Solo unas pocas (2 %) son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24 °C, pero mayor es el número de las levaduras que tienen la temperatura óptima de crecimiento por debajo de 20 °C. No hay levaduras que puedan crecer a 50 °C y solamente unas pocas pueden desarrollar cerca de 0 °C. La mayoría de las levaduras que crecen a una actividad de agua mínima de 0,90 - 0,95 %. Pueden crecer sobre substratos azucarados a una actividad de agua igual a 0,62 %, pero son pocas las levaduras que desarrollan en presencia de altas concentraciones de azúcar o sal (Carrillo, 2003).

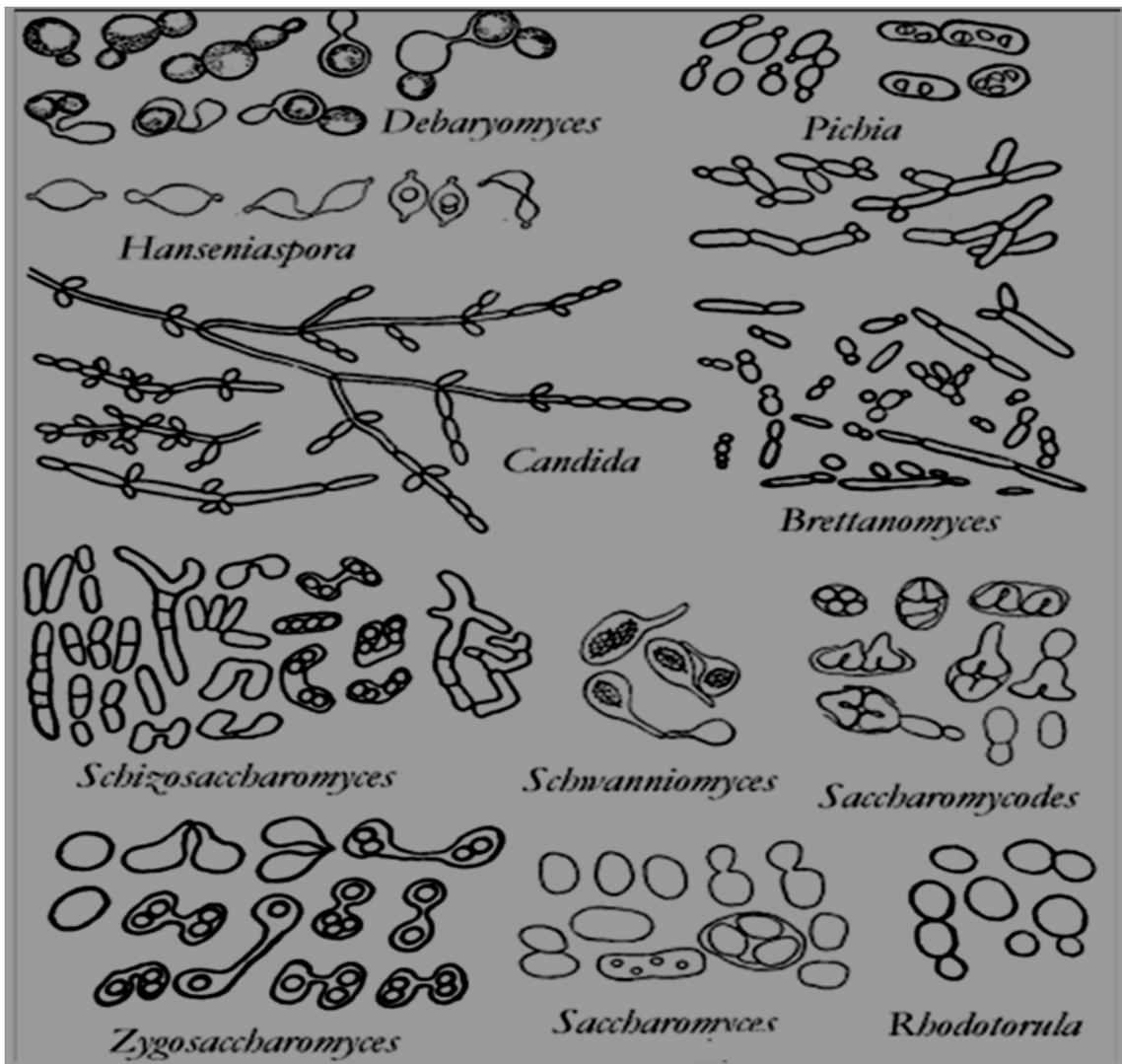


Figura 7. Principales especies de levaduras, características morfológicas (Carrillo, 2003).

Las levaduras pueden crecer en un amplio intervalo de valores de pH en la zona ácida y hasta en un 18 % de etanol, la mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4,5 a 6,5. Muchas se multiplican en presencia del 55 - 60 % de sacarosa. Producen muchos colores desde el crema hasta el rosa y rojo (James, 2005). Las levaduras son organismos aerobios y aunque unas especies son fermentadoras otras no lo

son como por ejemplo los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y unos pocos géneros más.

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se hallan sobre hojas, flores, frutos, piel, cuero, plumas y tracto digestivo de animales herbívoros y omnívoros. Algunas están asociadas con insectos pero el suelo es el mayor reservorio. Las levaduras constituyen la causa más probable de alteración de productos tales como frutas y bebidas sin alcohol, las cuales contienen azúcares fermentables, y de aquel los substratos donde la elevada acidez, la baja actividad del agua o la presencia de etanol, reducen el desarrollo bacteriano (Carrillo, 2003).

Se ha demostrado en estudios anteriores, que las levaduras tienen un gran potencial para utilizarse como agentes de biocontrol, un ejemplo de ello es la levadura natural, *Candida sake* (Saito y Ota) Van Uden y Buckley (cepa CPA-1), fue aislado de la superficie de las manzanas y exhibió actividad antagonista *in vivo* contra un amplio espectro de patógenos postcosecha de peras y las manzanas (Viñas y col., 1998). Algunas levaduras están disponibles comercialmente y varios más están en etapas avanzadas de comercialización. Así tenemos que las levaduras son organismos antagonistas potenciales, con una la capacidad crecer a bajas temperaturas por tiempos prolongados lo que hace una alternativa para el uso de estos como control biológico en poscosecha.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Seleccionar nuevas cepas de levaduras con capacidad antagónica a *P. expansum* recuperadas de frutos de manzana conservados en refrigeración por tiempo prolongado y recién cosechados.

2.2. Específicos

1. Aislar y caracterizar la microbiota nativa presente en manzanas producidas en la “Sierra de Querétaro” que se almacenaron en cadena de refrigeración por un largo periodo.
2. Purificar y almacenar distintas cepas de levaduras presentes en la superficie de manzanas.
3. Diseñar ensayos *in vitro* a partir de un medio de cultivo a base manzana para evaluar la capacidad antagónica de cepas de levaduras contra el hongo *P. expansum*.
4. Evaluar la capacidad antagónica de levaduras en ensayos en fruto contra el hongo.
5. Estudiar la correlación entre el efecto antagónico de las levaduras entre resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*.
6. Seleccionar las cepas de levaduras que manifestaron el mejor efecto antagónico sobre *P. expansum*.

3. METODOLOGIA

3.1. Ubicación del sitio experimental

El presente trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de Fermentaciones Fisiología de frutas y hortalizas de la Facultad de Química en la Universidad Autónoma de Querétaro, el material biológico se obtuvo de la huerta semicomercial localizada en la comunidad de “El Suspiro”, en el municipio de Cadereyta de Montes, Querétaro.

3.2. Material

3.2.1. Manzanas

Con el fin de realizar la recuperación de cepas de levaduras de la superficie de los frutos, se colectaron manzanas de la producción 2011 en meses de agosto a septiembre de diferentes cultivares que se localizan en la Comunidad de El Doctor, en el municipio de Cadereyta, éstas fueron almacenadas en cadena de frío en una temperatura promedio de 4 °C. En el mes de junio de 2012 se seleccionaron aquellas que se encontraban en buenas condiciones sin presentar signos visibles de deterioro por patógenos, entre las variedades seleccionadas se encontraban ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’ y ‘Rayada’ así como diferentes genotipos establecidos en el huerto, seleccionando alrededor de 300 frutos en diferentes proporciones de los antes mencionados.

En el ciclo 2012 se recolectaron muestras de manzana de la variedad ‘Golden Delicius’ directamente de árboles en el mismo huerto. Éstas fueron utilizadas para evaluar la capacidad antagónica de las levaduras aisladas y recuperadas, además con la manzana recolectada se preparó el medio de cultivo con base de manzana y agar para los ensayos de antagonismo de las levaduras *in*

vitro. Una vez colectadas, las manzanas fueron rotuladas, colocadas en caja y almacenadas en cámara frigorífica a una temperatura de 4 ± 1 °C hasta su utilización.

3.2.2. Levaduras

Se utilizaron alrededor de 420 cepas de levadura las cuales fueron recuperadas de las manzanas colectadas en la Comunidad de El Doctor, en el municipio de Cadereyta almacenadas en frío conservadas en buen estado y sin presentar síntomas de daño.

3.2.3. Patógeno

Se utilizó la cepa de hongo *Penicillium expansum* Link CFNL2016, la cual fue recuperada de manzana 'Golden Delicious' en proceso de pudrición habiendo sido seleccionada por su elevada virulencia sobre manzanas almacenadas. La cepa fue registrada en junio 2003. La cepa se almacena en medio APD efectuando resiembras cada dos meses e inoculando sobre frutos para mantener la virulencia.

3.3. Obtención y aislamiento de levaduras

Se tomaron del frigorífico frutos almacenados durante 12 meses que no presentaban síntomas visibles de ataques por patógenos. Éstos se colocaron en bolsas de plástico con 100 ml de diluyente de peptona estéril. Posteriormente se frotaron la superficie de las manzanas desde afuera de la bolsa durante 2 min sin provocar su rompimiento, con el fin obtener la flora nativa.

La suspensión obtenida del frotamiento se sembró utilizando la técnica de vaciado en placa en medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) adicionado con

rosa de bengala a 0.6 % y solución de ampicilina a 1 %. Al solidificar el medio se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ entre tres y cinco días, en función del crecimiento obtenido.

Las levaduras que crecieron en las cajas se purificaron en cajas de Petri con medio “Agar nutritivo-dextrosa para levaduras” (NYDA: 8 g de caldo nutritivo, 5 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa, 20 g de agar y 1000 mL de agua), adicionado de solución de ampicilina (100 mcg/mL de medio).

3.4. Ensayos *in vitro*

3.4.1. Preparación de medios

3.4.1.1 Agar manzana

- a) Agar manzana jugo de manzana: Para la preparación de este medio se tomaron manzanas en buen estado a las cuales se les quito el corazón y se partieron en trozos pequeños capaces de entrar al extractor de jugo para la obtención del jugo de manzana. El medio se preparó a una concentración de 200 mL de jugo de manzana aforado a un litro con agua destilada y 20 g de agar, el cual se calentó para disolver el agar y se esterilizo en autoclave.

- b) Agar manzana infusión: Para la preparación de este medio se tomaron manzanas en buen estado a las cuales se les quitará el corazón y se partieron en trozos pequeños de los cuales se tomara la cantidad de 500 g y se calentaron en agua destilada a una porción de un 1000 mL a una temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una hora y se filtró el liquido en gasa, la cantidad obtenida se aforó a 1000 mL y se le agregaron 20 g de agar, el cual se calentó para disolver el agar y se esterilizo en autoclave (David Malloch,1981).

3.4.1.2. Medio Agar nutritivo dextrosa para levaduras NYDA

Se calentó agua en agitación a la cual se le adicionó 8 g de caldo nutritivo, 5 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa y 20 g de agar por cada 1000 mL de agua, después de que la mezcla se vea homogénea se esterilizó el medio, cuando estaba estéril a una temperatura aproximada de 45 °C se le adicionó 0.1 g de ampicilina y se vació en cajas de Petri.

3.4.1.3. Caldo nutritivo dextrosa para levaduras NYDB

Se calentó agua en agitación a la cual se le adicionó 8 g de caldo nutritivo, 5 g de extracto de levadura y 10 g de dextrosa por cada 1000 mL de agua, cuando la mezcla se vio homogénea se esterilizó y se pasó a tubos de ensayo en cantidades de 10 mL.

3.4.1.4. Diluyente peptona

Se agregó por cada 100 mL de agua 0.1 g de peptona de caseína, esta mezcla se debe homogenizar o asegurar que la peptona de caseína se disuelva completamente para después pasar a tubos de ensayo en cantidades de 9 y 10 mL según sea el uso.

3.4.1.5. Tween 0.05 %

Se agregaron 50 µL de Tween 80 o 20 por cada 100 mL de agua, hay que asegurarse que el Tween 80 o 20 se disuelva completamente para después pasarlo a tubos en cantidades de 9 o 10 mL según sea el uso. Por último se esterilizó.

3.4.1.6. Medio agar papa y dextrosa APD y rosa de bengala

Se colocaron 39 g de agar papa y dextrosa por cada 1000 mL de agua, esta mezcla se calentó en agitación y se esterilizó cuando la mezcla se encontraba homogénea. Para preparar el medio Rosa de Bengala se utilizó la misma base del APD y de este antes de ser esterilizado se le adiciona 0.5 mL de Rosa de Bengala al 0.6 % (0.6 g por cada 100 mL de agua) por cada 100 mL de APD, al tener la mezcla homogenizada se esterilizó, después de esterilizar al tener la mezcla a una temperatura menor de 45 °C se le adicionó ampicilina 0.1 g por cada 1000 mL de APD.

3.5. Preparación de inóculos

3.5.1. Levaduras

Las levaduras se activaron previamente en “Caldo nutritivo dextrosa para levaduras” (NYDB). Se transfirió una asada de cada cepa de levadura a probar a tubos NYDB y se incubaron durante 72 h a 24 ± 1 °C y 200 rpm de agitación (Usall y col., 2001). Se realizaron dos transferencias sucesivas cada 72 h y las células de la última transferencia se centrifugaron (12 000 rpm, 10 min). El sobrenadante fue eliminado y las células de levadura se colocaron en un tubo con 10 mL de diluyente peptona.

Se realizó un recuento de células latentes en la solución de levadura en diluyente peptona por extensión en superficie y se ajustará el inóculo a 10^7 UFC/mL (Nunes y col., 2001).

3.5.2. Patógeno *Penicillium expansum*

La cepa del hongo primeramente se activó realizando con ayuda del asa bacteriológica en forma de “L” la colocación de micelio en una nueva placa de cultivo APD, inoculando la placa realizando picaduras en cuatro a seis puntos equidistantes dentro de la placa, después se colocó la nueva placa a una temperatura promedio de 26 ± 2 °C durante ocho días. Al tener el crecimiento al octavo día se recolectaron las esporas utilizando una solución de Tween a 0.05 %, se agregaron 10 mL de Tween dentro de la placa y se realizaron movimientos circulares para realizar el barrido de las esporas, la solución con las esporas se filtró a través de gasa a un tubo de ensayo.

Se realizó un recuento de conidios viables por medio de la técnica vaciado en placa en medio agar papa dextrosa (APD) adicionado con rosa de bengala a 0.6% y solución de ampicilina a 1 %. Finalmente se ajustará la concentración a 10^4 esp mL⁻¹.

3.6. Ensayos de inoculación de la levadura y el patógeno *in vitro*

Se realizó una prueba para evaluar el antagonismo entre la levadura y el patógeno en un medio preparado con agar manzana dado que anteriormente se han realizado pruebas en medios sintéticos pero estos no han respondido adecuadamente para diseñar una prueba práctica y confiable que de los mismos resultado que en pruebas *in vivo* o en fruto.

La prueba consistirá en colocar 1 mL de inóculo de levadura en cajas estériles adicionándole 8 mL del medio agar de manzana temperado a 45 °C, se homogeniza y se deja solidificar. Las placas de agar de manzana exentas de levadura serán utilizadas como testigo. Posteriormente se inoculan 5 µL de la suspensión de patógeno en cada uno de los cuatro puntos equidistantes de la

placa. Las placas inoculadas serán incubadas a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y se medirá el diámetro de crecimiento del patógeno en presencia de la levadura a las 120 horas.

3.6.1. Medición del poder antagónico de la levaduras *in vitro*

Se probaron 422 cepas de levaduras recuperadas de manzana, se colocó 1 mL de la levadura a probar, preparada de acuerdo a 4.3.2.1, en cajas petri estériles, estas fueron adicionadas con 10 mL de Agar de manzana temperado a 45°C , el medio se homogenizó y se dejó solidificar. Posteriormente se inoculó una suspensión de patógeno a una concentración de 200 esp de acuerdo a 4.3.3.2, realizando la inoculación en cada uno de tres puntos equidistantes de la placa. Las placas fueron incubadas a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y se midieron los diámetros de crecimiento del hongo en presencia de la levadura con ayuda de un vernier a un tiempo de 120 horas (cinco días), las mediciones se compararan con el testigo (sin presencia de levadura).

3.7. Ensayos en fruto

Las muestras de manzana utilizadas fueron de la variedad 'Golden Delicious' proveniente del municipio de Cadereyta, Querétaro, los frutos fueron recolectados en un estado fisiológico de madurez aparente. Los frutos para los ensayos fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio a 1.5 % durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada estéril y después se dejaron secar dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente, se colocaron en un campo estéril utilizando mechero Fisher en donde a cada fruto se realizaron cuatro perforaciones equidistantes en el epicarpio con un punzón esteril de acero inoxidable.

En las perforaciones realizadas en el epicarpio se realizó la inoculación de la levadura en donde se depositaron 10 μL que contenían una concentración de

1×10^7 de células activas de levadura, en el caso del testigo solo se depositó diluyente peptona en ausencia de levadura. Posteriormente se colocaron 10 μL de la suspensión del hongo *Penicillium expansum* Link (4.3.3.2) en la perforación del fruto que contiene la levadura. Después de ser inoculados los frutos se colocaron en el interior de frascos de plástico desinfectados previamente con etanol al 70 %, los frascos fueron tapados y se incubaron durante ocho días a $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, determinando la severidad e incidencia del ataque del patógeno en cada herida.

Se consideró a una levadura como antagonista potencial cuando redujo la severidad del daño en más de un 50 % comparado con el testigo.

3.8. Métodos estadísticos

3.8.1. Diseño de los experimentos

- Diseño experimental: Completamente al azar
- Factores de estudios: Cepas de levaduras
- Unidad experimental: Una manzana con cuatro heridas en ensayos *in vivo* y una caja de Preti con tres inoculaciones en ensayos *in vitro*.
- Tratamientos: 420 levaduras evaluadas en ensayos diferidos. Después se realizó una prueba confirmatoria con las levaduras más sobresalientes.

VARIABLES A EVALUAR:

- Severidad del daño causado por el hongo en mm *in vivo* e *in vitro* medido con un vernier después de ocho y cinco días de incubación respectivamente.

- Incidencia como el número de heridas con síntomas visibles de enfermedad causado por el hongo.

3.8.2. Análisis de los datos

a) Análisis de varianza: Se realizará un análisis de varianza de 'Fisher' con una separación de medias de Student ($P \leq 0.05$).

b) Análisis de correlación: Se realizara un ensayo de correlación simple por pares entre los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* y los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de levaduras

Un total de 420 cepas de levaduras nativas se aislaron de manzanas de distintas variedades cosechadas en 2011 en el huerto semicomercial localizado en la comunidad de “El Suspiro”, municipio de Cadereyta de Montes, Querétaro y que fueron almacenadas en frío (0 °C) por un año. El criterio de selección consistió en que las manzanas se encontraran en buen estado y sin daños visibles de enfermedad, ya que podría darse el caso de que se conservaron en buen estado durante un largo periodo en almacenamiento fue gracias a la protección brindada por la microflora que se encuentran en la superficie del fruto, en especial las levaduras que pueden ser capaces de protegerlos. En la Figura 8 se muestran levaduras aisladas en el presente trabajo con el criterio de selección de frutos antes mencionado antes descritas.



Figura 8. Levaduras aisladas de manzanas.

4.2. Bioensayos en fruto

Se utilizaron 388 cepas de levaduras para los ensayos en fruto debido a que alcanzaron la concentración deseada durante su incubación (1×10^7 UFC / mL) . Para la evaluación de todas las levaduras se realizaron 13 ensayos sucesivos incluyendo en cada uno un testigo (manzanas inoculadas con el hongo en ausencia de levaduras). Finalmente, con las levaduras más sobresalientes, se realizó una prueba confirmatoria.

4.2.1. Primera selección

En el Cuadro 4 (Grupo 1 de 29 levaduras) se muestra el desarrollo diametral del hongo sobre frutos de manzana en función de las diferentes cepas de levadura, se señalan en caracteres grasos 14 levaduras que resultaron ser las más sobresalientes, considerando primeramente como criterio que sean estadísticamente diferentes al testigo (diámetro de crecimiento del hongo menor que el testigo) y, enseguida, que hayan tenido un porcentaje de inhibición mínimo de 60 %. Las cepas M75B, M17/1A, M20/2A inhibieron 100 % al hongo, lo que indica que en ninguna de las 12 heridas que se realizaron en total en tres manzanas hubo crecimiento del hongo, por otro lado, M16/2A, Mora, M18/3B destacaron por tener más de 80 % de inhibición diametral y más de 95 % en área, M12A, M15/4A, M53A cepas que inhibieron el crecimiento del hongo en diámetro más del 70 % y en área más de 90 % y por ultimo M11/2B, M15/1 A, M18/3 A, M20/A, cepas que inhibieron el crecimiento del hongo en más de 60 % diametral y más de 80 % en área. Cabe destacar que ninguna de las levaduras propició un crecimiento superior al obtenido en el testigo.

Cuadro 4. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levaduras en el Grupo 1, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
M75B	0.0	a	100.0	0.0
M17/1A	0.0	a	100.0	0.0
M20/2A	0.0	a	100.0	0.0
M16/2A	3.0	a b	86.4	6.9
Mora	3.2	a b	85.2	8.2
M18/3B	3.6	a b	83.6	10.0
M12A	4.7	a b	78.6	17.1
M15/4A	5.4	a b	75.4	22.6
M18/2B	6.2	a b	71.4	30.5
M53A	6.2	a b	71.4	30.5
M11/2B	6.9	a b	68.5	37.0
M15/1A	7.2	a b c	67.1	40.3
M18/3A	7.4	a b c	66.2	42.6
M20/A	8.4	a b c	61.6	55.0
M5/4A	9.4	a b c d	56.7	69.9
M _{1/2} B	9.8	a b c d	55.0	75.4
SMG2	10.2	a b c d	53.2	81.7
M15/A	10.4	a b c d	52.4	84.4
M14/2A	10.8	a b c d	50.6	91.0
M17/2A	11.0	a b c d	49.5	95.0
M9/3A	11.0	a b c d	49.5	95.0
M11/2B	12.2	a b c d	44.2	116.3
M15/1A	12.6	a b c d	42.0	125.4
M11 B	12.7	a b c d	41.7	126.7
M11/3 B	12.8	a b c d	41.4	128.0
?	12.8	a b c d	41.4	128.0
M43 A	13.6	b c d	37.6	145.3
M13 C	13.9	b c d	36.4	151.0
Moa	20.0	c d	8.3	314.2
Testigo	21.8	d	-	373.3

²DMS (Student) 12.9

Valor "F" : 1.3^{NS}

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

fueron: H50 con 87 % y 98 % de inhibición en diámetro y área respectivamente, H56 y H57, que inhibieron en su totalidad el crecimiento del hongo en algunas de las heridas; las cepas H55, H53, H54 y H52, que alcanzaron a inhibir más de 55 % en diámetro. Ninguna de las levaduras propició un crecimiento superior al obtenido en el testigo.

Cuadro 5. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 2, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
H50	3.0 a	87.5	6.9	98.4
H57	4.4 ab	81.4	15.2	96.6
H55	6.3 ab	73.4	31.2	92.9
H56	6.5 ab	72.6	33.2	92.5
H53	8.0 ab	66.2	50.3	88.6
H54	8.4 ab	64.6	55.4	87.4
H52	10.2 b	57.0	81.7	81.5
Testigo	23.7 c	-	441.2	-
	² DMS (Student) 6.3			
	Valor "F" 9.2**			

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 6 (Grupo 3) se muestran 16 cepas de levaduras evaluadas. En este caso, A60 mostró un relativamente elevado efecto inhibitorio (41 % en diámetro y 65.8 % en área), mientras las cepas A67, A69, A64, A14 y H51 sólo lograron inhibir entre 18 a 27 % en diámetro y de 33 a 47 % en área, por lo que no se selecciono ninguna para los ulteriores ensayos confirmatorios. A diferencia de las cepas de levaduras anteriores, se observa que las cepas A18, A17, A12 y A16 propiciaron un mejor desarrollo del hongo con relación al testigo.

Cuadro 6. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 3, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
A60	17.9 a	41.5	251.7	65.8
A67	22.3 ab	27.1	390.6	46.9
A69	23.9 abc	21.9	448.6	39.0
A64	24.1 abc	21.2	456.2	38.0
A14	24.6 abcd	19.6	475.3	35.4
H51	25.0 abcd	18.3	490.9	33.3
H58	25.7 bcd	16.0	518.7	29.5
A62	25.7 bcd	16.0	518.7	29.5
A63	26.7 bcde	12.7	559.9	23.9
A10	28.3 bcde	7.5	629.0	14.5
A61	28.5 bcde	6.9	637.9	13.3
A11	30.2 cde	1.3	716.3	2.6
Testigo	30.6 cde	-	735.4	-
A18	31.3 cde	-	769.4	-
A17	31.4 cde	-	774.4	-
A12	31.8 de	-	794.2	-
A16	33.8 e	-	895.1	-
	² DMS (Student) 7.62			
	Valor "F" : 2.4*			

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 7 (Grupo 4) se muestran 17 cepas de las cuales D53 y D34 resultaron las más sobresalientes con 54.9 y 53.4 % de inhibición diametral y 79.7 y 78.3 % de inhibición en área respectivamente con respecto al testigo.

En el Cuadro 8 (Grupo 5) se seleccionaron 21 cepas de levadura de 35 que componen el ensayo. A32, A25, D25, H27 y A99 inhibieron totalmente el crecimiento del hongo, mientras que, las cepas H25, H28, A35, H61, A27, A20, H65, A24, A94, H62, H60 y A22 inhibir el hongo desde un 51 hasta 87% diametral mientras que en área lograron inhibir desde un 76 a un 98.3 %.

Cuadro 7. Desarrollo de *P. expansum* en función a las diferentes cepas de levadura en el **Grupo 4**, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
D53	14.6 a	54.9	167.4	79.7
D34	15.1 a	53.4	179.1	78.3
D50	21.7 b	33.0	369.8	55.1
D51	27.5 c	15.1	594.0	28.0
A15	30.3 cd	6.5	721.1	12.5
B60	30.5 cd	5.9	730.6	11.4
A69	30.7 de	5.2	740.2	10.2
D84	32.0 de	1.2	804.2	2.5
D32	32.2 de	0.6	814.3	1.2
Testigo	32.4 de	-	824.5	-
B69	32.4 de	-	824.5	-
B62	32.6 de	-	834.7	-
B66	32.8 de	-	845.0	-
B67	32.9 de	-	850.1	-
B63	32.9 de	-	850.1	-
B65	33.3 de	-	870.9	-
B64	33.4 de	-	876.2	-
B68	35.4 e	-	984.2	-
² DMS (Student) 4.62				
Valor "F" : 18.9**				

Para los detalles, ver Cuadro 4.

De igual manera en el cuadro 8 se muestra que las levaduras H25, H28, A35, H61, A27, A20, H65, A24, A94, H62, H60, A22, A31, B30, H10, H39 y H10 forman otro grupo en donde no se tiene diferencia significativa, en este grupo se tienen levaduras que inhiben desde un 51.3 % hasta 87 % en diámetro y área de 76 a 98.3 %, al no tener una diferencia significativa con las levaduras antes mencionadas y tener una alta capacidad antagónica fueron seleccionadas como candidatas como levaduras antagonistas y seguir su estudio en ensayos confirmatorios.

Cuadro 8. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 5, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm) ¹	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
A32	0.0 a	100.0	0.0	100.0
A25	0.0 a	100.0	0.0	100.0
D25	0.0 a	100.0	0.0	100.0
H27	0.0 a	100.0	0.0	100.0
A99	0.0 a	100.0	0.0	100.0
H25	3.0 ab	87.0	7.1	98.3
H28	3.2 ab	86.0	8.2	98.0
A35	3.3 ab	85.7	8.6	98.0
H61	3.4 ab	85.4	8.9	97.9
A27	5.8 abc	74.8	26.7	93.6
A20	5.8 abc	74.8	26.7	93.6
H65	5.8 abc	74.8	26.7	93.6
A24	7.0 abcd	69.7	38.5	90.8
A94	7.2 abcd	68.7	41.1	90.2
H62	7.3 abcd	68.7	41.9	90.0
H60	8.0 abcde	65.3	50.7	87.9
A22	8.7 abcde	62.5	59.0	86.0
A31	10.4 bcde	54.9	85.5	79.7
B30	11.0 bcdef	52.3	95.6	77.3
H10	11.2 bcdefg	51.6	98.5	76.6
H39	11.3 bcdefg	51.3	99.7	76.3
A91	12.4 cdefg	46.3	121.4	71.1
H72	12.7 cdefg	45.2	126.0	70.0
H23	13.0 cdefg	43.7	133.4	68.3
H66	13.0 cdefg	43.7	133.4	68.3
A98	13.2 cdefg	43.1	136.2	67.6
H69	13.7 cdefg	40.6	148.1	64.8
A97	14.2 cdefgh	38.8	157.6	62.5
H68	14.6 cdefgh	37.0	166.7	60.3
D22	14.7 cdefgh	36.3	170.5	59.4
H26	15.5 defgh	32.9	189.5	54.9
A93	15.6 defgh	32.6	191.1	54.5
H64	16.5 efgh	28.5	214.7	48.9
H21	19.9 fgh	14.1	310.0	26.2
A90	20.2 gh	12.8	319.4	24.0

Cuadro 8. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 5, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm) ¹		% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
Testigo	23.1	h	-	420.3	-
² DMS (Student)		8.95			
Valor "F"		3.92*			

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

El Cuadro 9 muestra que las cepas D08, D01 y 2R fueron las cepas más sobresalientes, al ser diferentes al testigo y con diámetro de inhibición de inhibieron de 62.6, 60.7 y 43.7 % en diámetro 86, 84.5 y 68.3 % y en área respectivamente.

Cuadro 9. Desarrollo de *P. expansum*¹ en función de diferentes cepas de levadura en el **Grupo 6**, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
D08	8.9 a	62.6	62.7	86.0
D01	9.4 a	60.7	69.4	84.5
2R	13.5 a	43.7	142.4	68.3
9R	14.9 bcd	37.8	173.6	61.3
A47	16.7 cde	30.3	218.2	51.4
D03	16.8 cdef	29.8	220.8	50.8
A45	17.1 cdef	28.5	229.7	48.8
A46	17.2 cdef	28.0	232.4	48.2
6R	17.6 cdefg	26.2	244.2	45.6
A43	17.9 cdefgh	25.0	252.6	43.7
14R	18.0 cdefgh	24.7	254.5	43.3
B77	18.2 cdefghi	24.0	259.2	42.2
4R	18.2 cdefghi	23.7	261.1	41.8
D02	18.2 cdefghi	23.7	261.1	41.8
D00	19.9 defghij	16.7	311.0	30.7

Cuadro 9. Desarrollo de *P. expansum*¹ en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 6, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área	
A42	20.0	defghijk	16.3	314.2	30.0
20R	20.3	defghijkl	14.9	324.7	27.6
D07	20.8	efghijklm	12.8	340.9	24.0
B73	21.2	efghijklm	11.4	351.9	21.6
D05	21.4	efghijklm	10.3	360.8	19.6
A44	21.8	efghijklmn	8.6	374.4	16.5
A40	22.1	efghijklmno	7.5	383.6	14.5
6R-2	22.3	efghijklmnop	6.7	390.6	12.9
B72	22.4	efghijklmnop	6.4	392.9	12.4
B78	22.5	fghijklmnop	6.0	396.4	11.6
11R	23.0	ghijklmnop	3.8	415.5	7.4
D04	23.1	ghijklmnop	3.3	419.1	6.6
34W	23.4	hijklmnop	2.0	431.3	3.9
D06	23.7	hijklmnop	0.8	441.2	1.7
D09	23.8	ijklmnop	0.4	444.9	0.8
Testigo	23.9	ijklmnop	-	448.6	-
B70	24.5	jklmnop	-	470.2	-
B79	24.5	jklmnop	-	471.4	-
7R	25.2	jklmnop	-	499.4	-
10R	25.4	jklmnop	-	508.0	-
5R	25.8	klmnop	-	521.4	-
B76	25.8	lmnop	-	522.8	-
3R	25.8	mnop	-	524.1	-
B75	26.4	mnop	-	548.8	-
19R	26.5	mnop	-	552.9	-
B74	27.3	nop	-	583.9	-
1R	27.4	nop	-	588.2	-
3W	27.4	nop	-	591.1	-
10W	27.6	op	-	599.7	-
B71	27.9	p	-	611.4	-
18R	29.0	p	-	660.5	-
² DMS (Student)	5.8				
Valor "F"	5.24*				

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 10 (Grupo 7) las cepas B54 y A56 se revelan como las más sobresalientes mostrando diferencia con las otras 28 cepas y con el testigo, con un porcentaje de inhibición de 65.1 y 61.9% en diámetro y 87.8 y 85.5 % en área respectivamente con relación a dicho testigo.

Cuadro 10. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 7, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
B54	10.1 a	65.1	80.6	87.8
A56	11.1 a	61.9	96.2	85.5
C10	15.1 b	47.9	179.9	72.8
C09	20.6 c	29.0	333.3	49.7
A05	25.0 d	14.0	489.6	26.1
C05	25.3 d	12.7	504.1	23.9
C11	25.5 def	12.2	510.7	22.9
A09	25.7 defg	11.4	520.1	21.4
A01	26.4 defgh	9.0	548.8	17.1
A08	26.4 defgh	9.0	548.8	17.1
C13	26.9 defgh	7.5	566.9	14.4
A06	27.2 defgh	6.2	582.5	12.0
C14	27.4 defgh	5.7	588.2	11.2
A00	27.4 defgh	5.6	589.6	10.9
C12	27.6 efgh	4.8	599.7	9.4
A55	27.9 efghi	3.9	611.4	7.7
C15	27.9 efghi	3.9	611.4	7.7
A53	28.0 fghi	3.4	617.2	6.8
A48	28.1 fghi	3.3	618.7	6.5
A54	28.1 fghi	3.2	620.2	6.3
A57	28.2 ghi	3.0	623.1	5.9
A58	28.3 ghi	2.6	627.5	5.2
A04	28.4 hi	2.3	632.0	4.5
A03	28.4 hi	2.2	633.5	4.3
A50	28.5 hi	2.0	636.4	3.9
A59	28.6 hi	1.6	640.9	3.2
A07	28.6 hi	1.4	643.9	2.7
A51	28.6 hi	1.4	643.9	2.7
C07	28.8 hi	0.8	651.4	1.6
Testigo	29.0 hi	0.0	662.0	-

Cuadro 10. Desarrollo de *P. expansum*¹ en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 7, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área	
A49	30.5	i	-	730.6	-
	² DMS (Student)	2.95			
	Valor "F" :	29.1**			

Para los detalles, ver Cuadro 4.

El Cuadro 11 (Grupo 8) se encuentran 35 cepas de levaduras en donde las más destacadas son B33 y B39, la cepa B33 demostró ser mejor agente antagónico al inhibir en 60.6 % el diámetro de crecimiento y en 84.5 % en área, mientras que la cepa B39 inhibió en 50.7 % en diámetro y 75.7 % en área.

Cuadro 11. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 8, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
B33	13.0 a	60.6	132.7	84.5
B39	16.3 b	50.7	207.8	75.7
A52	20.8 c	37.1	338.7	60.4
A83	21.2 cd	35.9	351.9	58.9
A85	22.1 cd	33.0	383.6	55.2
B94	22.6 cde	31.6	400.0	53.2
A21	22.8 cdef	30.9	408.3	52.3
A82	23.6 defg	28.5	437.4	48.9
A87	23.7 defg	28.3	439.9	48.6
A89	24.5 efgh	25.9	470.2	45.0
B88	25.5 fghi	22.8	509.4	40.4
D10	25.9 ghij	21.4	528.2	38.2
B93	26.3 ghijk	20.3	543.3	36.5
A80	26.3 ghijk	20.2	544.6	36.3
C15	26.8 hijk	18.9	562.7	34.2
B57	26.8 hijk	18.7	565.5	33.9
B59	26.9 hijk	18.5	568.3	33.6

Cuadro 11. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 8, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)		% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
D11	27.0	hijk	18.2	572.6	33.1
B53	27.2	hijkl	17.6	581.1	32.1
B91	27.3	ijklm	17.4	583.9	31.7
B52	27.3	ijklm	17.2	586.8	31.4
D19	27.3	ijklm	17.2	586.8	31.4
D16	27.4	ijklm	17.0	589.6	31.1
B90	27.4	ijklm	16.9	591.1	30.9
B5	27.8	ijklmn	15.9	605.5	29.2
D12	27.8	ijklmn	15.7	608.4	28.9
D13	28.2	ijklmn	14.6	623.1	27.1
B95	28.3	jklmn	14.3	627.5	26.6
B51	28.5	jklmn	13.5	639.4	25.2
D15	28.8	klmn	12.6	653.0	23.7
B50	28.9	klmn	12.3	657.5	23.1
B92	29.8	lmno	9.8	695.9	18.6
D14	30.0	mno	9.2	705.3	17.5
A81	30.3	no	8.1	722.7	15.5
B89	32.3	o	2.1	819.4	4.2
Testigo	33.0	o	-	855.3	-
² DMS (Student)		2.7			
Valor "F"		16.8**			

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 12 se muestra un grupo de 33 cepas de levadura en donde H86 es la más sobresaliente inhibiendo un 63 % en diámetro y 86 % en área, mientras que, en un segundo grupo de cepas con diferencia significativa y alto grado de antagonismo son B34, B35, B32, B37, B36, 33, B31 y B38 teniendo un porcentaje de inhibición diametral de 32.3, 32, 32, 31.7, 31.7, 31.4, 31.1 y 31 % y de área 54.2, 53.8, 53.3, 53.3, 52.9 y 52.4 % respectivamente.

Cuadro 12. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 9, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de inhibición en área
H86	11.2 a	63	98.5	86.3
B34	20.5 b	32.3	330.1	54.2
B35	20.6 b	32	333.3	53.8
B32	20.6 b	32	333.3	53.8
B37	20.7 b	31.7	336.5	53.3
B36	20.7 b	31.7	336.5	53.3
33	20.8 b	31.4	339.8	52.9
B31	20.8 b	31.1	339.8	52.9
B38	20.9 b	31	343.1	52.4
44	25.1 cd	17.3	493.5	31.6
B14	25.1 cde	17.1	496.1	31.2
H87	25.3 cdef	16.4	504.1	30.1
3	25.4 cdef	16.3	505.4	29.9
H88	25.7 cdefg	15.3	517.4	28.2
A36	25.7 cdefg	15.2	518.7	28.1
A37	25.7 cdefg	15.2	518.7	28.1
B11	26.1 cdefgh	13.8	536.4	25.6
46	26.2 cdefgh	13.6	537.8	25.4
39	26.3 cdefgh	13.3	541.9	24.9
H80	26.7 cdefghi	11.8	561.3	22.2
B12	27.0 defghij	11	571.1	20.8
B10	27.2 efghij	10.2	581.1	19.4
8	27.6 ghijk	8.9	598.3	17
A84	27.6 hijk	8.8	599.7	16.8
B13	28.0 hijkl	7.7	614.3	14.8
B58	29.0 jklm	4.2	662	8.2
XX	29.4 klmn	2.9	680.4	5.6
B17	29.5 klmn	2.6	683.5	5.2
B16	29.8 lmn	1.8	695.9	3.5
45	29.9 lmn	1.4	700.6	2.8
B19	30.2 mn	0.2	717.9	0.4
Testigo	30.3 mn	-	721.1	-
H83	31.3 n	-	767.8	-
H89	31.5 n	-	779.3	-

Cuadro 12. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 9, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

²DMS (Student) 2.1
 Valor "F" : 24.3**

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 13 (Grupo 10) se observa que la cepa H40 que inhibió totalmente al hongo siendo diferente al testigo y a las cepas evaluadas, por el contrario otras cepas que propiciaron el crecimiento del hongo.

Cuadro 13. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 10, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
H40	0.0 a	100	0	100
H38	18.2 b	32.1	259.2	53.9
H49	21.1 bc	21.2	349.7	37.9
H79	21.9 cd	18.1	377.8	32.9
H42	22.3 cde	16.8	389.4	30.8
H45	22.9 cdef	14.6	410.7	27.0
H48	23.1 cdefg	13.6	420.3	25.3
H39	23.2 cdefg	13.4	421.5	25.1
Y40	23.3 cdefg	13.0	426.4	24.2
B40	23.6 cdefgh	12.0	436.2	22.5
H47	23.6 cdefgh	12.0	436.2	22.5
B42	23.7 cdefghi	11.5	441.2	21.6
B43	24.0 defghij	10.5	451.1	19.8
B41	24.1 defghij	10.1	454.9	19.2
H36	24.2 defghijk	9.6	460.0	18.3
H46	24.4 defghijkl	9.0	466.3	17.1
Y5	24.5 defghijkl	8.3	472.7	16.0
B47	24.6 defghijkl	8.0	476.6	15.3
Y25	24.8 defghijkl	7.3	483.1	14.2
H33	24.9 efghijkl	6.8	488.3	13.2

Cuadro 13. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 10, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
H35	24.9	efghijkl	488.3	13.2
Y26	25.0	efghijkl	489.6	13.0
B49	25.3	fghijklm	502.7	10.7
H41	25.3	fghijklm	504.1	10.4
H43	25.4	fghijklm	506.7	10.0
H37	25.5	fghijklm	509.4	9.5
Y1	25.7	fghijklmn	520.1	7.6
B46	26.3	hijklmn	541.9	3.7
B44	26.3	hijklmn	544.6	3.2
H78	26.6	ijklmn	555.7	1.2
H30	26.8	jklmn	562.7	-
Testigo	26.8	jklmn	562.7	-
H44	25.8	ghijklmn	524.1	6.9
B46	26.3	hijklmn	541.9	3.7
Y38	26.8	jklmn	562.7	-
B45	27.0	klmn	574.0	-
Y24	27.2	lmn	581.1	-
Y28	27.2	lmn	581.1	-
Y30	28.1	mn	618.7	-
Y36	28.6	n	642.4	-
² DMS (Student)		2.85		
Valor "F"		17.7**		

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 14 (Grupo 11) se observa que las cepas H03, H99, H76, 81 y H94 mostraron un mejor poder de antagonismo contra el hongo, inhibiendo su crecimiento en 61.7, 59.9, 56.3, 49 y 46.8 % en diámetro respectivamente y 85.4, 83.9, 80.9, 74 y 71.7 en área comparado con el testigo.

Cuadro 14. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 11, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
H03	11.2 a	61.7	99.1	85.4
H99	11.8 ab	59.9	108.7	83.9
H76	12.8 ab	56.3	129.4	80.9
81	15.0 abc	49.0	175.9	74.0
H94	15.6 abcd	46.8	192.0	71.7
H04	17.4 bcde	40.6	238.7	64.8
C04	19.7 cdef	32.8	305.8	54.8
H75	20.1 cdef	31.7	316.3	53.3
H07	20.2 cdef	31.3	319.4	52.8
H00	20.4 cdef	30.6	325.8	51.9
H09	20.8 cdef	29.3	338.7	50.0
H06	20.9 defg	28.8	343.1	49.3
16	21.3 defgh	27.5	356.3	47.4
H01	21.7 efghi	26.1	369.8	45.4
H97	22.0 efghij	25.2	379.0	44.0
B97	22.0 efghij	25.1	380.1	43.9
B100	22.4 efghijk	23.8	392.9	42.0
B101	22.5 efghijk	23.3	398.8	41.1
80	22.9 efghijkl	22.0	411.9	39.2
H95	23.2 efghijkl	21.0	422.7	37.6
15	23.2 efghijkl	20.9	423.9	37.4
C02	23.5 fghijklm	19.9	435.0	35.8
20	24.0 fghijklmn	18.3	452.4	33.2
¿	24.1 fghijklmn	18.0	454.9	32.8
H08	24.3 fghijklmno	17.3	463.8	31.5
H93	24.5 fghijklmno	16.7	470.2	30.6
C01	24.5 fghijklmno	16.5	472.7	30.2
H05	24.6 fghijklmno	16.3	474.0	30.0
H90	24.7 fghijklmno	15.8	480.5	29.1
82	26.5 ghijklmno	9.9	550.2	18.8
B99	26.5 ghijklmno	9.6	552.9	18.4
H98	26.9 hijklmno	8.3	569.7	15.9
41	27.0 hijklmno	7.9	574.0	15.3
H92	27.1 hijklmno	7.7	576.8	14.8
H91	27.4 ijklmno	6.6	591.1	12.7
B98	27.8 jklmno	5.4	605.5	10.6
H02	28.0 klmno	4.7	615.8	9.1

Cuadro 14. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 11, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)		% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
C03	28.5	lmno	3.1	636.4	6.0
17	28.6	lmno	2.7	640.9	5.4
Testigo	29.4	mno	-	677.3	-
83	29.6	no	-	686.6	-
42	29.9	o	-	703.7	-
H96	30.1	o	-	713.2	-
² DMS (Student)		5.8			
Valor "F" :		5.3*			

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 15 solo se seleccionó una cepa de 4, (B86) con porcentajes de inhibición de 91.7 y 99.3 % en diámetro y área respectivamente.

Cuadro 15. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 12, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
B86	3.0 a	91.7	6.9	99.3
H14	24.1 b	32.4	456.2	54.3
H73	24.9 b	30.3	485.7	51.4
H11	25.7 b	28.3	513.4	48.6
H71	29.1 c	18.5	663.6	33.6
H15	29.2 c	18.0	671.2	32.8
H12	29.4 cd	17.6	678.9	32.1
H72	29.8 cde	16.4	699.0	30.0
H74	29.9 cde	16.2	702.2	29.7
B27	30.5 cdef	14.6	729.0	27.0
A70	31.0 cdefg	13.1	754.8	24.5
A71	31.1 cdefg	12.9	758.0	24.1
H19	31.2 cdefgh	12.4	766.2	23.3
H16	31.4 cdefghi	11.9	776.0	22.3
H20	31.5 cdefghij	11.8	777.7	22.2

Cuadro 15. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 12, en manzanas después de ocho días de incubación (continuación).

Cepa	Diámetro de crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
B82	32.2 cdefghijk	9.8	812.6	18.7
B29	32.2 cdefghijk	9.7	814.3	18.5
B83	32.2 cdefghijk	9.7	815.2	18.4
B28	32.2 cdefghijk	9.6	816.0	18.3
B26	32.5 defghijkl	8.8	831.3	16.8
B81	32.6 defghijkl	8.7	833.0	16.6
B85	32.6 efghijkl	8.6	833.8	16.5
A79	32.7 efghijkl	8.4	838.1	16.1
A78	32.9 efghijkl	7.8	850.1	14.9
B84	33.0 efghijkl	7.6	853.6	14.6
A76	33.1 fghijkl	7.2	860.5	13.9
B25	33.3 fghijkl	6.7	869.2	13.0
A77	33.4 fghijkl	6.4	876.2	12.3
B21	33.4 fghijkl	6.3	877.9	12.1
B22	33.5 fghijkl	6.2	879.7	12.0
A75	33.5 fghijkl	6.0	883.2	11.6
B20	33.8 ghijkl	5.1	899.0	10.0
H13	34.1 ghijkl	4.3	915.1	8.4
H18	34.2 ghijkl	4.2	916.8	8.2
B80	34.3 hijkl	3.8	924.5	7.5
B24	34.3 hijkl	3.7	925.8	7.3
B87	34.4 hijkl	3.6	929.4	7.0
H70	34.5 ijkl	3.4	932.6	6.7
A72	34.7 jkl	2.8	943.9	5.5
A74	34.7 jkl	2.7	945.7	5.3
A73	34.9 jkl	2.1	958.5	4.1
B23	35.3 kl	0.9	980.5	1.9
Testigo	35.7 l	-	999.1	-

²DMS (Student) 3.2

Valor "F" : 20.7**

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En el Cuadro 16 (Grupo 13) se muestran 19 levaduras de las cuales se seleccionaron dos (H84 y A30) que inhibieron un 42.5 y 39.3 % en diámetro y 66.9 y 63.2 % en área cepas.

Cuadro 16. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en el Grupo 13, en manzanas después de ocho días de incubación.

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
H84	20.1 a	42.5	317.4	66.9
A30	21.2 a	39.3	353.1	63.2
H29	26.8 b	23.4	564.3	41.2
H26	27.3 b	21.8	587.3	38.8
H81	27.5 b	21.2	595.9	37.9
A26	29.6 bc	15.4	686.0	28.5
A38	29.7 bcd	15.0	693.4	27.7
A88	29.8 bcde	14.6	699.3	27.1
H22	30.3 bcde	13.2	722.9	24.6
D23	30.7 bcdef	12.2	739.7	22.9
H83	30.8 bcdef	11.9	743.7	22.5
H82	31.0 bcdef	11.4	753.0	21.5
H18	31.0 bcdef	11.3	754.2	21.4
B61	31.0 bcdef	11.2	755.8	21.2
A28	31.1 bcdef	11.1	758.3	20.9
H77	31.2 bcdef	10.9	762.3	20.5
B96	33.3 cdef	4.7	871.6	9.1
Testigo	34.9 def	-	959.2	-
A23	35.2 ef	-	970.7	-
B18	35.7 f	-	1001.8	-
² DMS (Student)	5.15			
Valor "F"	1.96*			

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$). En caracteres grasos se marcan las cepas seleccionadas para la prueba confirmatoria.

En resumen en el Cuadro 17 se muestran las 70 cepas que fueron seleccionadas para las pruebas confirmatorias después de realizar los bioensayos en fruto con 388 cepas de levadura.

Cuadro 17. Cepas seleccionadas por ensayo para prueba confirmatoria

Cepa	Grupo	Cepa	Grupo	Cepa	Grupo	Cepa	Grupo	Cepa	Grupo
M11/2B	1	H03	1	A20	5	H28	5	B39	8
M12A	1	H54	2	A94	5	H39	5	B32	9
M15/1A	1	H55	2	A99	5	H61	5	H86	9
M15/4A	1	H56	2	B30	5	H62	5	B34	9
M16/2A	1	H57	2	D25	5	D01	6	33	9
M17/1A	1	H53	2	A27	5	D08	6	B31	9
M18/2B	1	H50	2	A31	5	2R	6	H40	10
M18/3A	1	H52	2	A32	5	B35	9	H76	11
M18/3B	1	A60	3	A35	5	B36	9	81	11
M20/2A	1	D34	4	H60	5	B37	9	H94	11
M20/A	1	D53	4	H10	5	B38	9	H99	11
M53A	1	A22	5	H25	5	B54	7	B86	12
M75B	1	A24	5	H27	5	A56	7	H84	13
Mora	1	A25	5	H65	5	B33	8	A30	13

4.2.2. Prueba confirmatoria

A partir de los bioensayos en fruto se seleccionaron 70 levaduras que fueron sometidas a una prueba para confirmar su potencial antagónico a *Penicillium expansum* potenciales. Éstas se dividieron en dos grupos para facilitar su manipulación, cada una de las cuales fue comparado con un testigo.

En el Cuadro 18 (Grupo 1 confirmatorio), se evaluaron 39 cepas de levadura. Se advierte que 2R inhibió en 56.7 % el crecimiento del hongo en diámetro y 81.3 % en área, mientras que otras ocho de las levaduras B54, B30, B33, B39, M18/3B, H03, M18/3A y B38 inhibieron en diámetro en 50.5, 49.1, 47.9, 46.4, 44.0, 42.9, 42.3 y 42.2 y en área 75.5, 74.1, 72.9, 71.3, 68.6, 67.4, 66.7 y 66.6 respectivamente.

Cuadro 18. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura.
Grupo 1 confirmatorio, después de ocho días de incubación a 25 °C.

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
2R	13.6 a	56.7	144.6	81.3
B54	15.5 ab	50.5	189.5	75.5
B30	16.0 abc	49.1	200.2	74.1
B33	16.3 abcd	47.9	209.5	72.9
B39	16.8 abcde	46.4	221.7	71.3
M18/3B	17.6 abcde	44.0	242.4	68.6
H03	17.9 abcdef	42.9	251.7	67.4
M18/3A	18.1 abcdef	42.3	257.3	66.7
B38	18.1 abcdef	42.2	258.3	66.6
A99	18.7 bcdef	40.5	273.7	64.6
M12 A	19.3 bcdefg	38.5	292.6	62.1
A27	19.9 bcdefgh	36.7	310.0	59.9
M11/2B	20.6 cdefghi	34.4	332.2	57.0
M16/2A	20.6 cdefghi	34.3	333.3	56.9
B34	20.7 cdefghij	34.0	336.5	56.4
Mora	20.9 defghij	33.3	344.2	55.5
M75 B	21.1 defghij	32.6	350.8	54.6
M15/4A	21.5 efghijk	31.6	361.9	53.2
B86	22.7 fghijkl	27.7	403.5	47.8
B35	22.7 fghijkl	27.5	405.9	47.5
B32	23.7 ghijklm	24.5	439.9	43.1
D34	23.7 ghijklm	24.4	441.2	42.9
A60	23.8 ghijklmn	24.0	446.1	42.3
B37	23.8 ghijklmn	24.0	446.1	42.3
B36	23.9 ghijklmn	23.9	447.4	42.1
H99	24.0 ghijklmn	23.5	452.4	41.5
D53	24.4 hijklmn	22.1	468.9	39.3
A25	24.8 ijklmn	20.9	483.1	37.5
A94	24.9 ijklmn	20.7	485.7	37.2
M53	25.0 ijklmn	20.3	490.9	36.5
A20	25.4 ijklmn	19.1	505.4	34.6
A22	25.5 jklmn	18.7	510.7	33.9
H55	26.1 klmn	16.9	533.7	30.9
33	26.1 klmn	16.7	536.4	30.6
H94	26.2 klmn	16.4	540.5	30.1

Cuadro 18. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura. Grupo 1 confirmatorio, después de ocho días de incubación a 25 °C (continuación).

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)		% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
M20/A	26.3	klmn	16.3	541.9	29.9
H39	27.4	lmno	12.8	588.2	23.9
A24	28.0	mno	10.8	614.3	20.5
B31	28.6	no	8.7	643.9	16.7
Testigo	31.4	o	-	772.7	-
² DMS (Student)		5.8			
Valor "F" :		1.96*			

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$).

En las Figuras 9 y 10 se aprecia el desarrollo del hongo en función de la levadura en el grupo uno del ensayo confirmatorio. Se observa la comparación del desarrollo del hongo en el testigo (sin presencia de levadura del lado izquierdo) y el hongo en interacción con una cepa de levadura a la cual se atribuye la capacidad de inhibir en cierto porcentaje el desarrollo del hongo (lado derecho).



Figura 9. Desarrollo de *P. expansum* en manzanas en función de diversas levaduras sobresalientes en el bioensayo confirmatorio Grupo 1.



Figura 10. Desarrollo de *P. expansum* en manzanas en función de diversas levaduras en el bioensayo confirmatorio Grupo 1.

En el Cuadro 19 se muestra el segundo grupo de levaduras de la prueba confirmatoria. La cepa H54 redujo en 45.9 % el diámetro y 70.7 % en área el crecimiento del hongo. Igualmente, las cepas H10, H28, H50, H25, A32, H40, 81, H57, M20/2 A, A31, M17/1 A, H52, H56, D25 y H53, inhibieron más del 30 % en diámetro y más del 50 % en área el crecimiento del hongo mientras que B86 y H27 que inhibieron en un 30.5 y 29.6 % en diámetro y en un 51.8 y 50.4 % en área respectivamente comparado con el testigo.

Cuadro 19. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura. Grupo 2 confirmatorio, después de ocho días de incubación a 25 °C.

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
H54	17.4 a	45.9	237.8	70.7
H10	17.8 ab	44.7	247.9	69.4
H28	17.9 ab	44.3	251.2	69.0
H50	18.3 abc	42.9	264.0	67.4
H25	19.0 abcd	41.0	282.5	65.2

Cuadro 19. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura. Grupo 2 confirmatorio, después de ocho días de incubación a 25 °C (continuación).

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
A32	19.0 abcd	40.9	283.5	65.0
H40	19.9 abcde	38.2	310	61.8
81	20.9 abcdef	34.9	344.2	57.6
H57	21.3 abcdef	33.7	356.9	56.0
M20/2A	21.4 abcdef	33.3	360.5	55.5
A31	21.8 abcdefg	32.2	373	54.0
M17/1A	21.8 abcdefg	32.2	373.3	54.0
H52	21.9 abcdefg	32.0	375.5	53.7
H56	22.1 abcdefg	31.2	383.6	52.7
D25	22.2 abcdefg	31.0	385.6	52.4
H53	22.2 abcdefg	30.9	387.1	52.3
B86	22.3 bcdefg	30.5	391.2	51.8
H27	22.6 bcdefgh	29.6	402.3	50.4
A35	22.9 cdefgh	28.6	413.1	49.1
M15/1A	23.0 cdefgh	28.4	415.8	48.7
H86	23.3 defghi	27.5	426.4	47.4
H65	24.4 efghij	24.2	466.3	42.5
M18/2B	25.3 fghijk	21.4	501.4	38.2
D08	25.4 fghijk	21.1	504.7	37.8
A30	26.5 ghijk	17.5	552.2	31.9
H76	27.3 hijkl	15.1	583.9	28.0
H60	27.3 hijkl	15.0	585.7	27.8
D01	27.3 hijkl	14.9	586.8	27.6
H84	28.2 ijkl	12.3	623.1	23.2
H62	28.5 jkl	11.2	639.4	21.2
A56	29.6 kl	7.9	688.1	15.1
H61	30.1 kl	6.3	711.6	12.3
Testigo	32.1 l	-	811	-

²DMS (Student) 7.62

Valor "F" : 1.86*

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$).

En la Figura 11 se aprecia el desarrollo del hongo en función de las levaduras más sobresalientes del Cuadro 19 en comparación del testigo (manzana lado izquierdo) contra el desarrollo del hongo en presencia de una cepa de levadura (manzana lado derecho). En la figura se muestran las cepas de levaduras que resultaron sobresalientes en el ensayo confirmatorio.

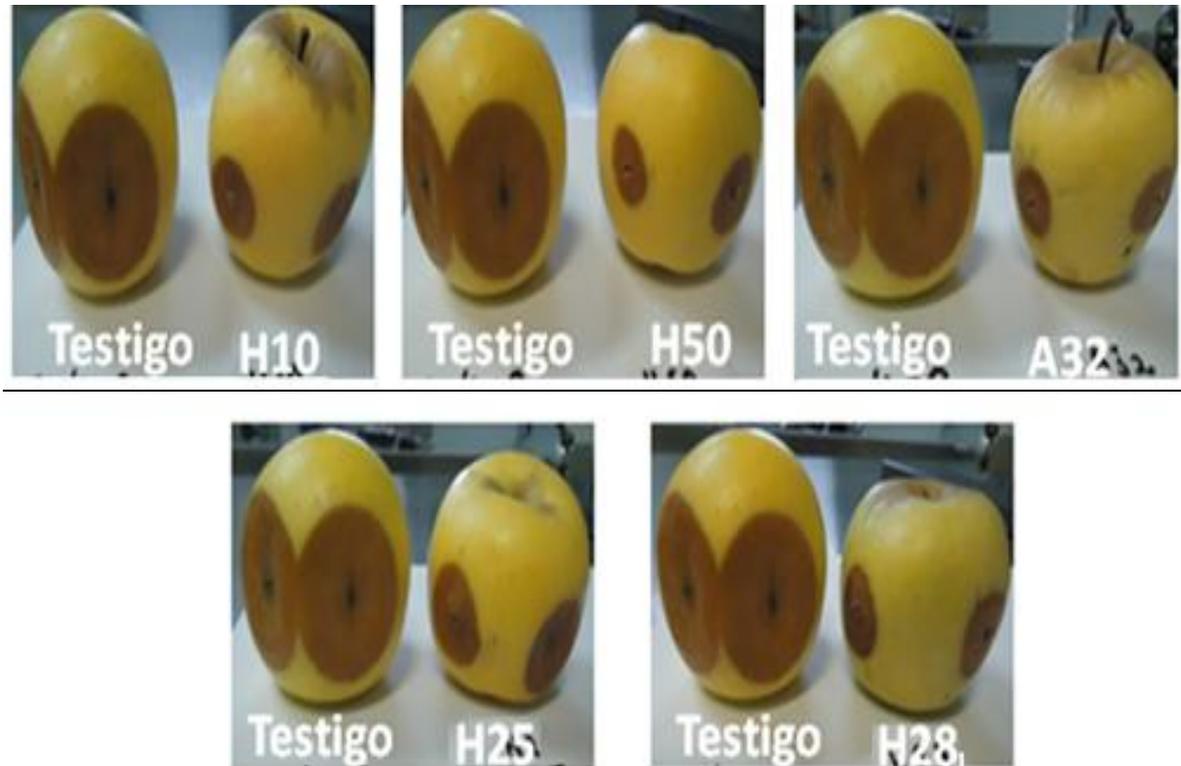


Figura 11. Desarrollo de *P. expansum* en manzanas en función de diversas levaduras en el bioensayo confirmatorio Grupo 2.

En resumen, en los ensayos confirmatorios se mostró que la mayoría de las cepas seleccionadas previamente mantuvieron un comportamiento antagónico al patógeno con excepción de 11 cepas que tuvieron un comportamiento sinérgico con el patógeno

4.2.3. Análisis de correlación entre los diferentes ensayos y las pruebas confirmatorias

En la Figura 12 se muestra la grafica de correlación entre los ensayos confirmatorios y los previos, se observa un coeficiente de correlación de 0.18, indicando que el comportamiento de la mayoría de las distintas levaduras es cambiante en el tiempo, es decir, el efecto antagónico de éstas tiende a ser inestable. Sin embargo existen algunos puntos que son cercanos a la recta de regresión, indicando que a la vez algunas cepas tuvieron comportamiento similar en ambos ensayos.

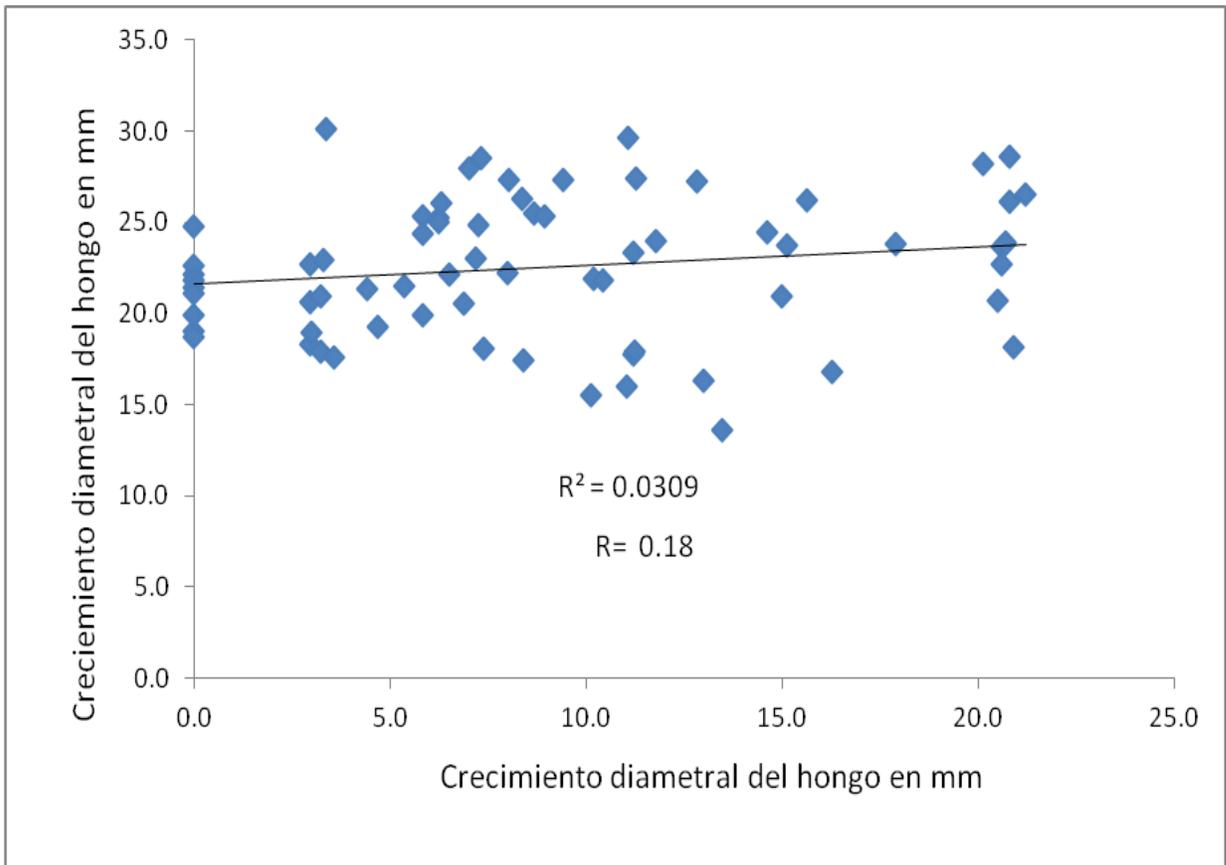


Figura 12. Correlacion de ensayos preliminares y confirmatorios con frutos tratados con diferentes cepas de levaduras con capacidad antagónica a *P. expansum*.

En el Cuadro 20 se encuentran las levaduras que mostraron comportamientos similares tanto en los ensayos preliminares como en el confirmatorio.

Cuadro 20. Levaduras que demostraron mismo comportamiento en el ensayo preliminar y confirmatorio.

Cepa	Ensayo previo (mm)	Confirmatorio (mm)	Diferencia
2R	13.5	13.6	0.1
B34	20.5	20.7	0.2
B39	16.3	16.8	0.5
B35	20.6	22.7	2.1
B38	20.9	18.1	2.8
B32	20.6	23.7	3.1
B37	20.7	23.8	3.1
B36	20.7	23.9	3.2
B33	13.0	16.3	3.3

Por otro lado, tomando en cuenta el porcentaje de inhibición, se seleccionaron 20 cepas debido a que inhibieron en más de 40 % el diámetro de crecimiento del patógeno (Cuadro 21).

Cuadro 21. Cepas de levaduras sobresalientes en ensayos confirmatorios.

2R	H53	A31	H54	M18/3B
H28	H40	M17/1 A	B54	H03
H50	81	H52	B30	M18/3A
H25	H57	H56	B33	B38
A32	M20/2 A	D25	B39	H10

4.3. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* realizados se hicieron a la par de los ensayos confirmatorios *in vivo* con el fin de utilizar los mismos inóculos de cepas de levadura y del patógeno para disminuir fuentes de error de igual manera se utilizó la misma

variedad de manzana (‘Golden Delicious’) con las mismas características. Se utilizaron dos métodos para preparar el medio de cultivo a base de manzana, utilizando el primero, una infusión de cortes del fruto de manzana y el otro con jugo de manzana con el fin comparar el comportamiento de las 70 cepas de levaduras seleccionadas con el hongo *in vivo* contra *in vitro* y de igual manera ver con una de las dos técnicas cual se asemeja al comportamiento del los ensayos *in vivo*. Las mediciones se realizaron después de cinco días de incubación (120 horas).

En el Cuadro 22 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* realizados en el medio de manzana a base de infusión de manzana, los datos que se muestran están en base al crecimiento del hongo, ya que la comparación que se realiza entre ensayos *in vitro* e *in vivo* se basan en el diámetro de crecimiento del hongo. Se observa que en el tratamiento con la levadura H99 no existió crecimiento alguno del hongo mientras que en otras levaduras como B33, M12 A, H03, B54, B86 el crecimiento del hongo solo se dio en el lugar donde se inoculo. En cambio 2R, M18/3B, B39, B38 y A99 disminuyeron el crecimiento menor del hongo en comparación del punto de inoculación considerando a estas levaduras como posibles antagonistas al tener un comportamiento similar al que se vio en los ensayos en fruto, el crecimiento del testigo fue muy similar a los ensayos en frutos al tener un crecimiento en diámetro de 33.0 mm. Finalmente cabe mencionar que comparado con el testigo todos los tratamientos con las cepas mostraron tener diferencia significativa en el crecimiento del hongo.

Cuadro 22. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura.

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de crecimiento diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de crecimiento área
H99	0.0 a	0.0	0.0	0.0
B33	6.7 b	19.8	35.3	3.9
M12 A	7.0 b	20.7	38.6	4.3
H03	7.3 b	21.4	41.5	4.6

Cuadro 22. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura (Continuación).

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de crecimiento diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de crecimiento área
B54	7.8 b	22.9	47.4	5.3
M18/3A	7.8 b	23.0	47.7	5.3
B86	7.8 b	23.1	47.9	5.3
B30	9.5 c	27.9	70.2	7.8
2R	10.0 c	29.5	78.2	8.7
M18/3B	14.2 d	42.0	159.4	17.7
B39	15.4 de	45.3	185.3	20.5
B38	15.4 e	45.6	187.1	20.8
A99	17.1 f	50.5	230.0	25.5
A20	20.2 g	59.6	320.6	35.6
D53	20.2 g	59.6	320.6	35.6
A27	20.2 g	59.7	320.9	35.6
B34	20.2 g	59.7	320.9	35.6
B35	20.2 g	59.7	320.9	35.6
D34	20.2 g	59.7	320.9	35.6
M16/2A	20.2 g	59.7	320.9	35.6
M53	21.3 gh	62.9	356.4	39.5
33	21.3 gh	62.9	356.4	39.5
B36	21.3 gh	62.9	356.4	39.5
M15/4A	21.3 gh	62.9	356.4	39.5
A22	21.7 hi	64.1	370.0	41.0
A25	21.7 hi	64.1	370.0	41.0
A60	21.7 hi	64.1	370.0	41.0
B32	21.7 hi	64.1	370.0	41.0
M11/2B	21.7 hi	64.1	370.0	41.0
Mora	21.7 hi	64.1	370.0	41.0
M20/A	21.9 hij	64.6	376.0	41.7
A94	22.3 hij	65.8	390.7	43.3
B37	22.3 hij	65.8	390.7	43.3
H55	22.3 hij	65.8	390.7	43.3
M75 B	22.3 hij	66.2	394.6	43.8
A24	22.4 hij	66.6	400.5	44.4
H94	22.6 ij	67.7	413.6	45.9
H39	22.9 j	83.9	634.7	70.4

Cuadro 22. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura (Continuación).

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)		% de crecimiento diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de crecimiento área
B31	28.4	k	65.8	901.7	44.4
Testigo	33.9	l	-	390.7	-
	² DMS (Student) 2.54				
	Valor "F" : 294.4**				

Para los detalles, ver Cuadro 18

En el Cuadro 23 se muestra el crecimiento del hongo que se obtuvo en el medio a base de jugo de manzana, en las primeras nueve levaduras se observa que el crecimiento del hongo fue nulo, mientras M18/3A, B38, 12 A, M75 B, B37 y H55 en hongo creció solo en el lugar donde se realizó la inoculación y otras como H39, A94, A22, A25, M53, B36, B34, B35, D34, A27 mostraron un crecimiento mayor al de la zona donde fue inoculado el hongo, en comparación con el testigo que tuvo un crecimiento de 26.7. Únicamente B31 no mostro diferencia con el testigo.

Cuadro 23. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura.

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
A99	0.0 a	0.0	0.0	0.0
B30	0.0 a	0.0	0.0	0.0
B54	0.0 a	0.0	0.0	0.0
B86	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H03	0.0 a	0.0	0.0	0.0
B33	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H99	0.0 a	0.0	0.0	0.0
M18/3B	0.0 a	0.0	0.0	0.0
2R	0.0 a	0.0	0.0	0.0

Cuadro 23. Desarrollo de *P. expansum* en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura (Continuación).

Cepa	Diámetro de Crecimiento ¹ (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
B39	4.5 b	17.0	16.1	2.9
M18/3A	7.0 c	26.2	38.5	6.9
B38	7.0 c	26.2	38.5	6.9
M12 A	7.0 c	26.3	38.7	6.9
M75 B	7.7 cd	28.9	46.9	8.3
B37	7.7 cd	28.9	46.9	8.3
H55	7.7 cd	28.9	46.9	8.3
H39	9.7 de	36.4	74.6	13.3
A94	9.8 de	36.8	76.0	13.5
M11/2B	11.1 ef	41.4	96.4	17.2
A22	11.1 ef	41.4	96.4	17.2
A25	11.1 ef	41.4	96.4	17.2
A60	11.1 ef	41.4	96.4	17.2
M20/A	11.1 ef	41.4	96.4	17.2
Mora	11.1 ef	41.4	96.4	17.2
A24	11.9 ef	44.7	112.1	19.9
M53	12.9 ef	48.4	131.6	23.4
B32	13.1 fg	48.9	134.4	23.9
M15/4A	13.7 fg	51.3	147.9	26.3
B36	13.7 fg	51.3	147.9	26.3
33	13.7 fg	51.3	147.9	26.3
B34	14.1 fg	52.6	155.7	27.7
B35	14.1 fg	52.6	155.7	27.7
D34	14.1 fg	52.6	155.7	27.7
D53	14.1 fg	52.6	155.7	27.7
A20	14.1 fg	52.6	155.7	27.7
A27	14.1 fg	52.6	155.7	27.7
B31	24.9 h	93.1	487.1	86.7
Testigo	26.7 h	-	561.9	-

¹Promedio de 12 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$).

En la Figura 13 se muestra el crecimiento del hongo en los testigos (hongo en ausencia de levadura) en donde se aprecia que en los tres puntos donde se inoculó el hongo creció sin problema durante las 120 horas (5 días) alcanzando 26.7 mm en promedio, cabe mencionar que en la figura se muestra el medio preparado utilizando las dos técnicas que se plantearon para el trabajo y de igual manera se puede apreciar el hongo desarrolla en estos medios a diámetros similares que en los ensayos con fruto.

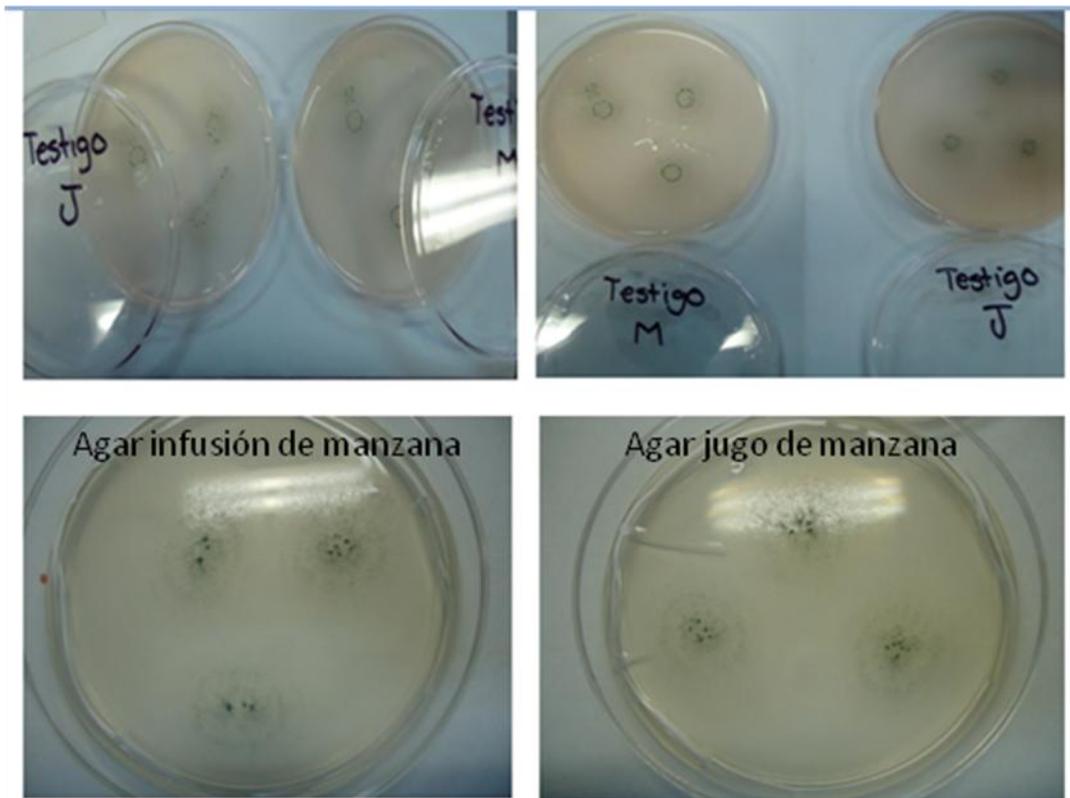


Figura 13. Desarrollo del hongo en testigos ensayos *in vitro*.

En la Figura 14 se muestran algunos casos que se dieron en los ensayos *in vitro* al tener la interacción del hongo con las diferentes levaduras, dichos casos fueron los que más se repitieron en los diferentes tratamientos. En el inciso “a” se aprecian los aros que indican el comienzo del desarrollo del hongo después de ser inoculado, pero con el crecimiento de la levadura se va inhibiendo en su totalidad

quedando como en un principio, en el inciso “b” se aprecia una levadura de color rosa que invadió en poco tiempo todo el medio y con ello el desarrollo del hongo fue nulo, no se vio crecimiento en los lugares donde se inoculó directamente.

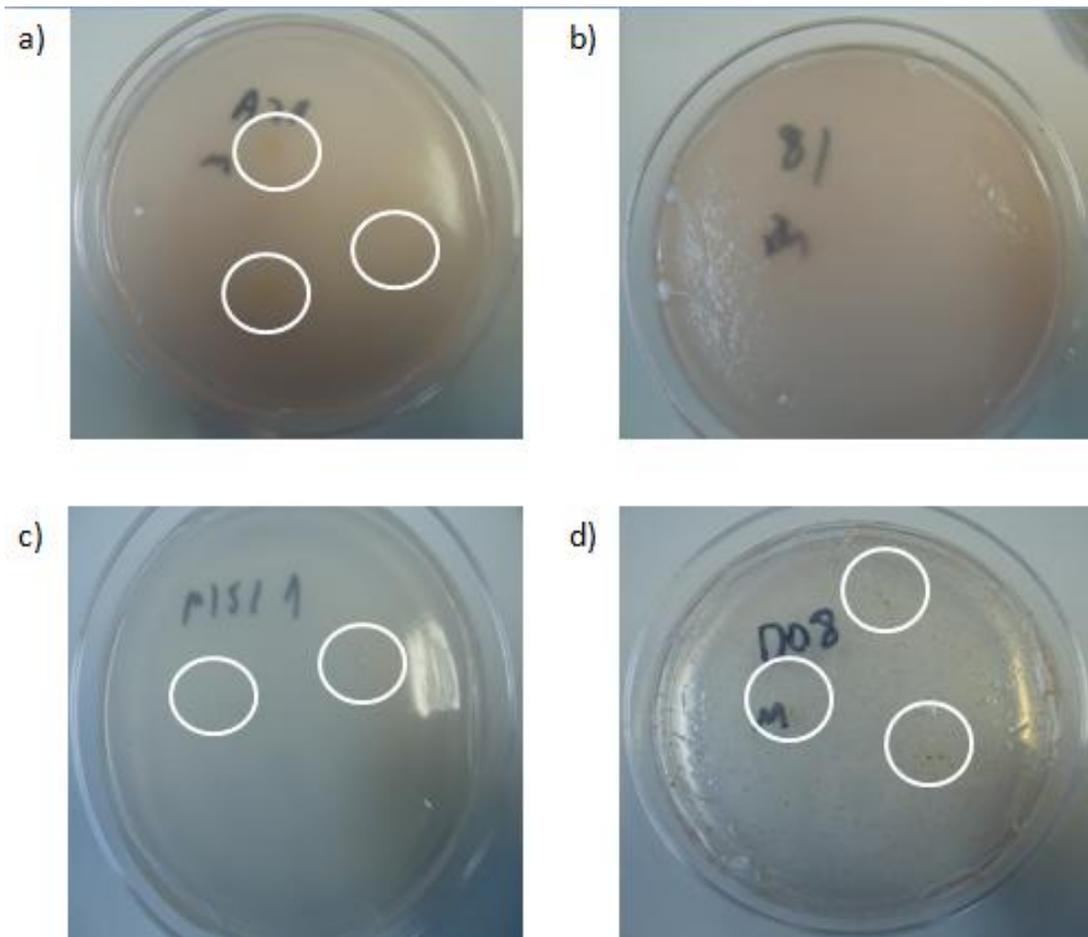


Figura 14. Diferentes comportamientos de levaduras y hongo en ensayos *in vitro*.

En el inciso “c” se aprecia una levadura que tuvo su mejor desarrollo en los lugares donde se inoculó el hongo, en la imagen se alcanza apreciar una especie de gotas pequeñas que son las levaduras desarrolladas, y en el ultimo inciso “d” se observa el crecimiento de la levadura y del hongo al mismo tiempo pero comparando con el testigo el hongo crece menos, situación más común en los ensayos como muestra la figura. Después de las 120 horas de incubación se

apreciaron las tres colonias del hongo en pequeña escala comparado con el testigo (Figura 13).

4.4. Correlación entre los ensayos *in vivo* con los ensayos *in vitro*

En la Figura 15 se muestra la grafica del primer grupo de levaduras (Cuadro 18) de los ensayos confirmatorios en donde se compara el crecimiento del hongo en el fruto (eje horizontal) y el (eje vertical) crecimiento en agar a base de infusión de manzana. Se puede observar una correlación lineal significativa ($R=0.8582$), que nos indica que existe un comportamiento similar de las levaduras y el patógeno en fruto e *in vitro*.

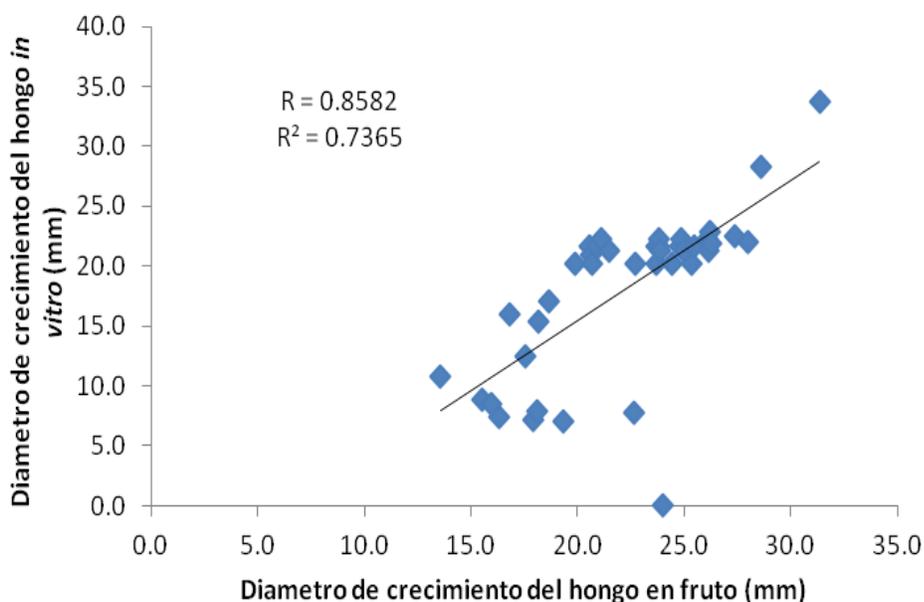


Figura 15. Correlación de ensayos *in vivo* vs *in vitro* utilizando agar a base infusión de manzana Grupo 1.

En la Figura 16 se muestra la grafica de correlación entre el desarrollo del hongo en el ensayo confirmatorio del grupo uno (Cuadro 18) en fruto y el desarrollo *in vitro* en medio preparado a base de jugo de manzana, como muestra la grafica el modelo lineal adaptado muestra una correlación no mayor al método de infusión de manzana, debido a que se observan gran cantidad de puntos que se encuentran

lejos de la recta. Este comportamiento hace que el coeficiente no sea estadísticamente significativo. En este caso también se obtuvo un coeficiente de correlación significativo, es decir que el medio utilizado mostro cierta similitud con los resultados obtenidos *in vitro* y en fruto.

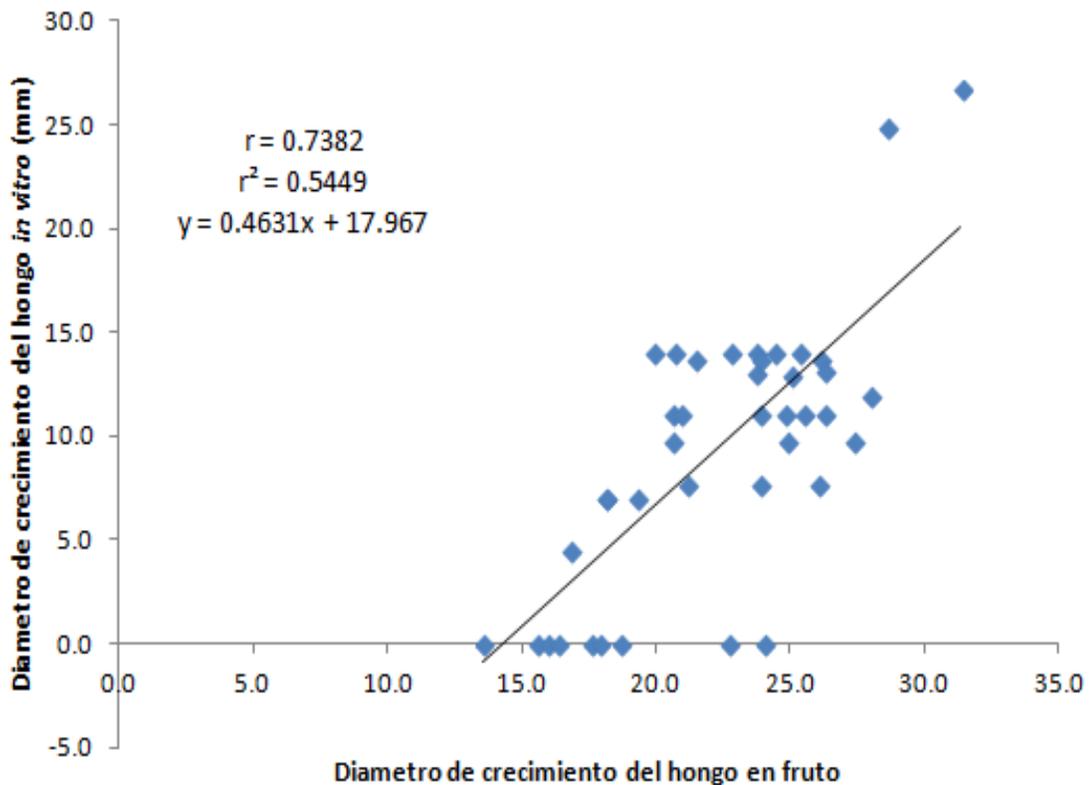


Figura 16. Correlación de ensayos *in vivo* vs *in vitro* utilizando agar a base de jugo de manzana Grupo 1.

En la Figura 17 se muestra la grafica del segundo grupo de levaduras (Cuadro 19) de los ensayos confirmatorios en donde se compara el crecimiento del hongo en el fruto (eje horizontal) contra el crecimiento del mismo hongo en agar a base de infusión de manzana (eje vertical), como se muestra en la grafica se tiene una correlación no significativa. Esto indica que hubo un comportamiento diferente tanto en fruto como *in vitro*.

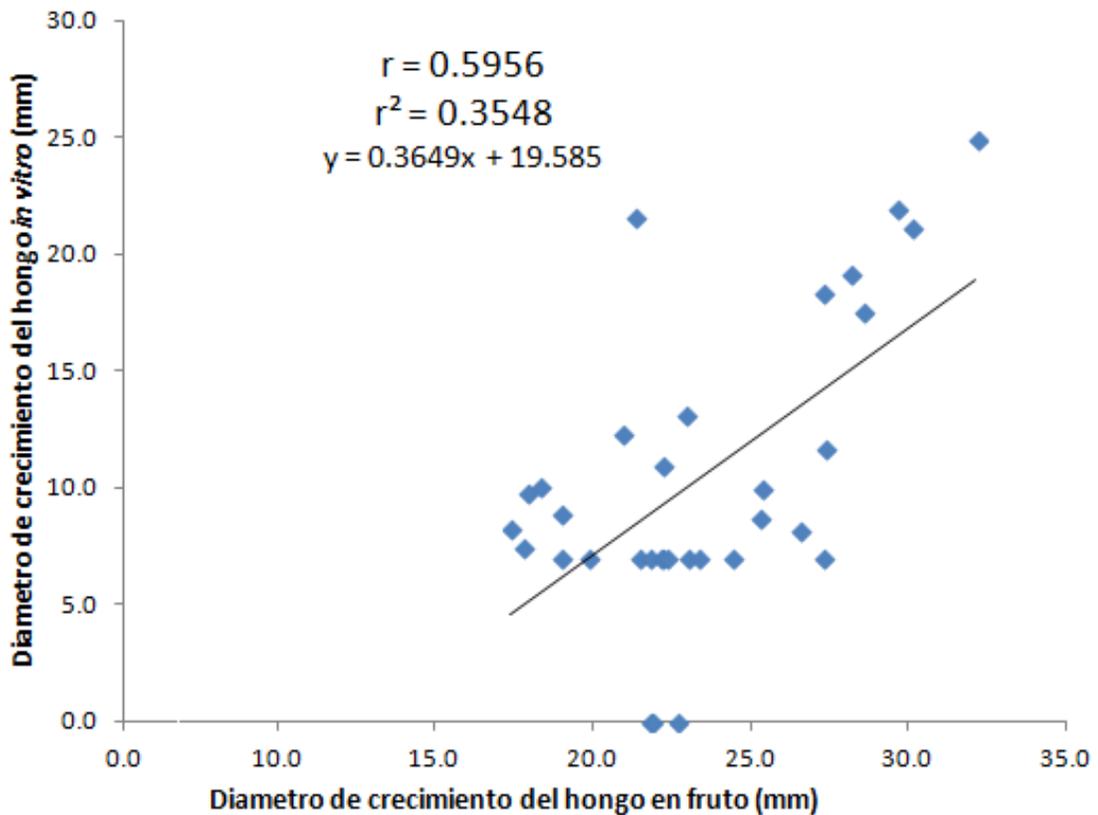


Figura 17. Correlación de ensayos *in vivo* vs *in vitro* utilizando agar a base de manzana Grupo 2.

En la Figura 18 se muestra la grafica de correlación en donde se compara el desarrollo del hongo en el ensayo confirmatorio del grupo dos (Cuadro 19) en fruto contra el desarrollo *in vitro* en medio preparado a base de jugo de manzana, como muestra la grafica el modelo lineal adaptado muestra no ser significativo, encontrando gran cantidad de puntos que se encuentran lejos de la recta. Sin embargo existen puntos cercanos a la recta que nos indica que hay cepas que demostraron el mismo comportamiento en los dos medios a base de manzana.

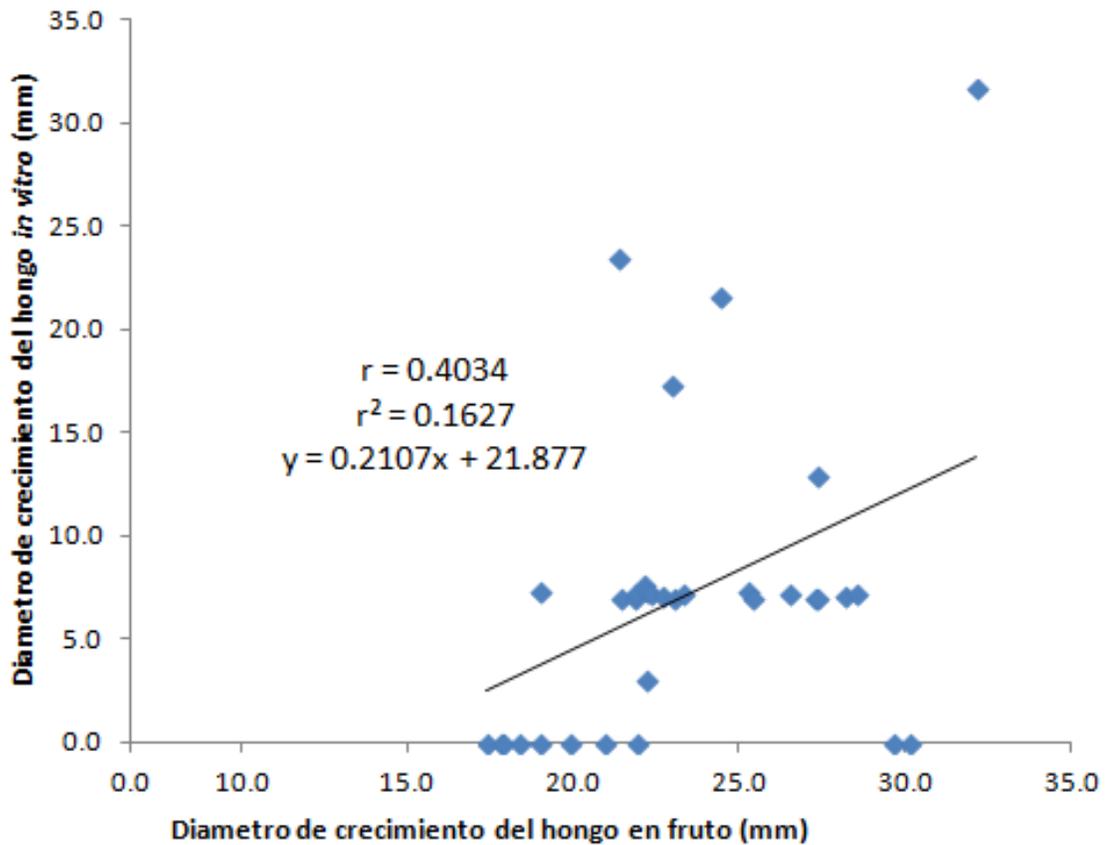


Figura 18. Correlación de ensayos *in vivo* vs *in vitro* utilizando agar a base de jugo de manzana Grupo 2.

En la Figura 19 se muestra la grafica de correlación comparando los dos métodos para preparar el medio a base de manzana en el grupo uno de cepas de levaduras (Cuadro 18). Esto nos permite ver si hay alguna diferencia entre los métodos utilizados para los ensayos *in vitro*. Como se muestra en la figura la correlación no es significativa, que indica que la mayoría de cepas de levaduras se comportan diferentes en los medios de cultivo evaluados.

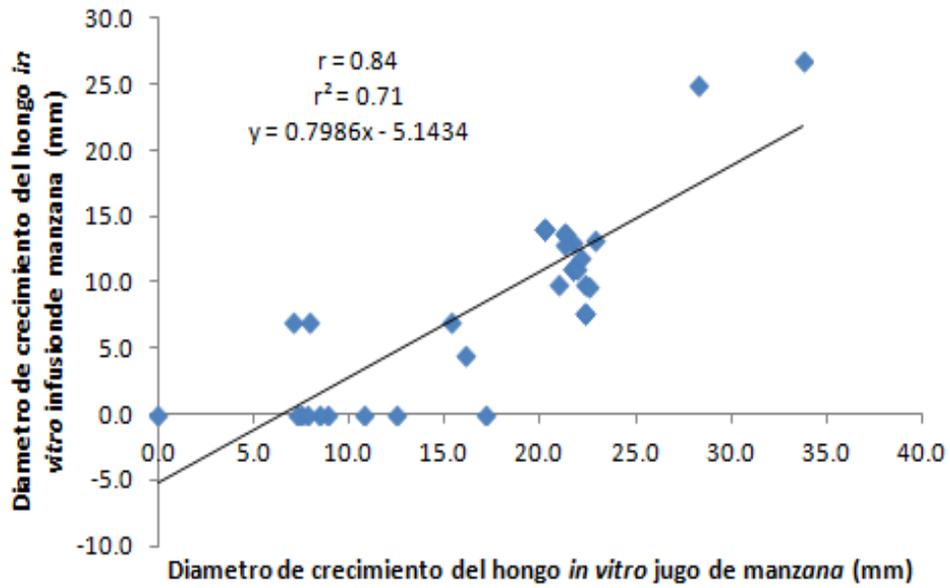


Figura 19. Correlación de ensayos *in vitro* infusión vs *in vitro* jugo de manzana grupo 1 de levaduras.

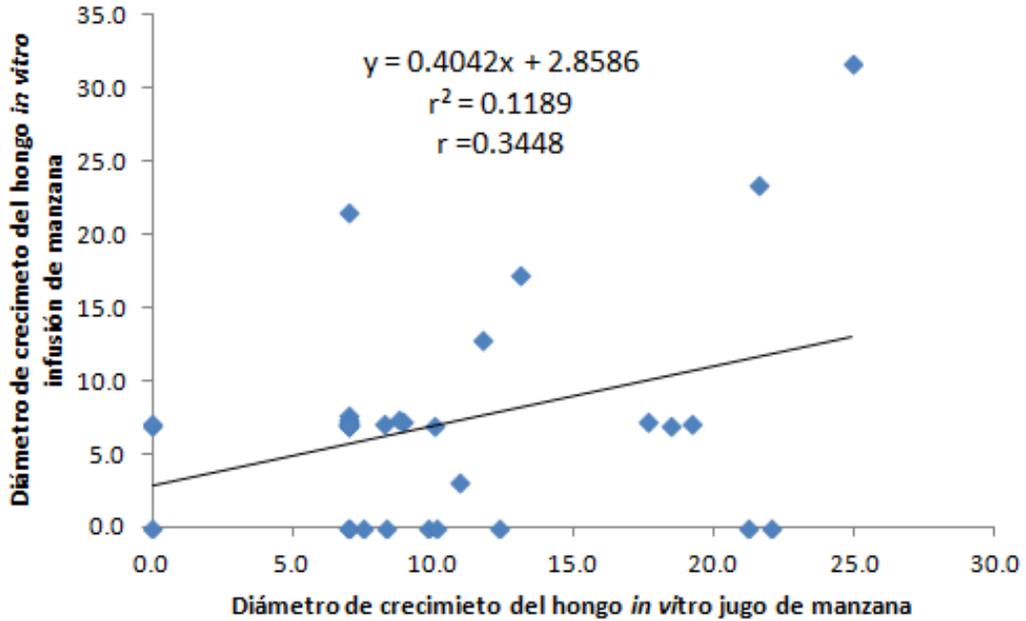


Figura 20. Correlación de ensayos *in vitro* infusión vs *in vitro* jugo de manzana Grupo 2.

En la Figura 20 se muestra la correlación comparando los dos métodos para preparar el medio a base de manzana en el grupo uno de cepas de levaduras (Cuadro 19), como se muestra en la grafica la correlación lineal no significativa con solo algunos puntos cercanos a la recta esto nos indica que el comportamiento entre las dos técnicas para preparar el medio arroja resultados diferentes con excepción de algunos casos, lo que nos indica que no se pueden comparar los métodos y tal vez demostrando que uno es mejor que otra para los ensayos *in vitro*.

4.5. Ensayos confirmatorios *in vitro*

Dentro de los ensayos *in vitro* se realizaron ensayos confirmatorios con el fin de evaluar la reproducibilidad y determinar si se puede utilizar las técnicas *in vitro* con medio preparado a base de manzana para estudios mas práctico del antagonismo de levaduras a enfermedades de poscosecha, en el Cuadro 22 se muestra el crecimiento del hongo en presencia de levaduras en medio preparado a base de infusión de manzana. Podemos observar que en los tratamientos con A31, H54, H27, H10, H28, H50, H52, H61 no se presenta crecimiento del hongo, mientras en el caso de 81, H62, D25, B86, H25, H40, H56, H60, H65, H84 existe crecimiento solo en el lugar donde se realizo la inoculación. Por su parte, el testigo mostro un crecimiento máximo de 24.9 mm (diferente al desarrollado mostrado en ensayos anteriores), siendo diferente significativamente con los demás tratamientos.

Cuadro 24. Desarrollo de *P. expansum*¹ en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C.

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
A31	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H54	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H27	0.0 a	0.0	0.0	0.0

Cuadro 24. Desarrollo de *P. expansum*¹ en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de infusión de manzana después de cinco días de incubación a 25°C (Continuación).

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
H10	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H28	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H50	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H52	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H61	0.0 a	0.0	0.0	0.0
81	2.3 a	9.4	4.3	0.9
H62	2.3 a	9.4	4.3	0.9
D25	7.0 b	28.1	38.5	7.9
B86	7.0 b	28.1	38.5	7.9
H25	7.0 b	28.1	38.5	7.9
H40	7.0 b	28.1	38.5	7.9
H56	7.0 b	28.1	38.5	7.9
H60	7.0 b	28.1	38.5	7.9
H65	7.0 b	28.1	38.5	7.9
H84	7.0 b	28.1	38.5	7.9
H86	7.0 b	28.1	38.5	7.9
M15/1A	7.0 b	28.1	38.5	7.9
M17/1A	7.0 b	28.1	38.5	7.9
M20/2A	7.0 b	28.1	38.5	7.9
A32	7.0 b	28.1	38.5	7.9
A30	8.2 bc	33.0	53.0	10.9
M18/2B	8.8 bcd	35.1	60.2	12.4
D08	10.0 cde	40.1	78.6	16.1
H53	11.0 cdef	44.0	94.3	19.3
D01	11.7 ef	47.1	108.0	22.1
A35	13.1 f	52.6	135.1	27.7
H76	18.4 g	74.0	266.6	54.7
H57	21.6 h	86.8	366.9	75.3
A56	22.0 h	88.4	380.6	78.1
Testigo	24.9 i	-	487.5	-
² DMS (Student) 2.7				
Valor "F" : 61.85**				

Para los detalles, ver Cuadro 18

En el Cuadro 25 se observa el crecimiento del hongo en respuesta a la presencia de levaduras en medio a base de jugo de manzana en donde en primer instancia se observa una gran cantidad de tratamientos como H42, D25, H84, H10, H54, H62, H28, B86, A30 que inhibieron completamente el crecimiento del hongo, mientras que H53, H76, D08, M15/1 A, A32, H56 mostraron solo crecimiento en la zona donde se realizó la inoculación y solo en D01, A35, H65, H57 se observó un crecimiento mayor y sin embargo ningún de ellos mostro ser similar al testigo.

Cuadro 25. Desarrollo de *P. expansum*¹ en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de jugo de manzana después de cinco días de incubación a 25°C.

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)	% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
H42	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H40	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H41	0.0 a	0.0	0.0	0.0
M17/1A	0.0 a	0.0	0.0	0.0
M18/2B	0.0 a	0.0	0.0	0.0
D25	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H52	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H84	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H86	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H10	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H27	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H54	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H61	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H62	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H25	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H28	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H50	0.0 a	0.0	0.0	0.0
B86	0.0 a	0.0	0.0	0.0
81	0.0 a	0.0	0.0	0.0
A30	0.0 a	0.0	0.0	0.0
A56	0.0 a	0.0	0.0	0.0
H53	3.1 b	9.7	7.5	1.0
H76	7.0 c	22.1	38.5	4.9
A31	7.0 c	22.1	38.5	4.9

Cuadro 25. Desarrollo de *P. expansum*¹ en función de diferentes cepas de levadura en medio preparado a base de jugo de manzana después de cinco días de incubación a 25°C de temperatura (Continuación).

Cepa	Diámetro de crecimiento (mm)		% de inhibición diámetro	Área de crecimiento (mm ²)	% de Inhibición en área
D08	7.0	c	22.1	38.5	4.9
H60	7.0	c	22.1	38.5	4.9
M15/1A	7.0	c	22.1	38.5	4.9
M20/2A	7.0	c	22.1	38.5	4.9
A32	7.3	c	23.1	42.1	5.3
H56	7.7	c	24.3	46.6	5.9
D01	13.0	d	40.9	131.9	16.7
A35	17.4	e	54.8	236.6	30.0
H65	21.6	f	68.2	366.6	46.5
H57	23.5	g	74.1	433.1	54.9
Testigo	31.7	h	-	788.9	-
	² DMS (Student)	3.17			
	Valor "F" :	292.4**			

¹Promedio de 9 valores individuales. ²Diferencia mínima significativa. ^{NS} no significativo, *significativo y **altamente significativo a $P \leq 0.05$. Promedios con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Student; $P \leq 0.05$).

En la Figura 21 se muestra la correlación entre las mediciones en el primer ensayo y el confirmatorio utilizando el medio a base de infusión de manzana. En la grafica se muestra una correlación estadísticamente significativa lo que nos indica que hubo un comportamiento similar.

En la Figura 22 se muestra la grafica de correlación utilizando medio a base de jugo de manzana en donde se ve una correlación estadísticamente significativa lo que nos indica que se repitió el comportamiento de varias cepas de levaduras en el primer ensayo *in vitro* comparando con el ensayo confirmatorio, con cierto reserva ya que en la grafica se aprecian puntos que se encuentran lejanos a la recta los que nos indican que no tuvieron el comportamiento lineal esperado, lo que nos dice que algunas levaduras mostraron un comportamiento diferentes al esperado.

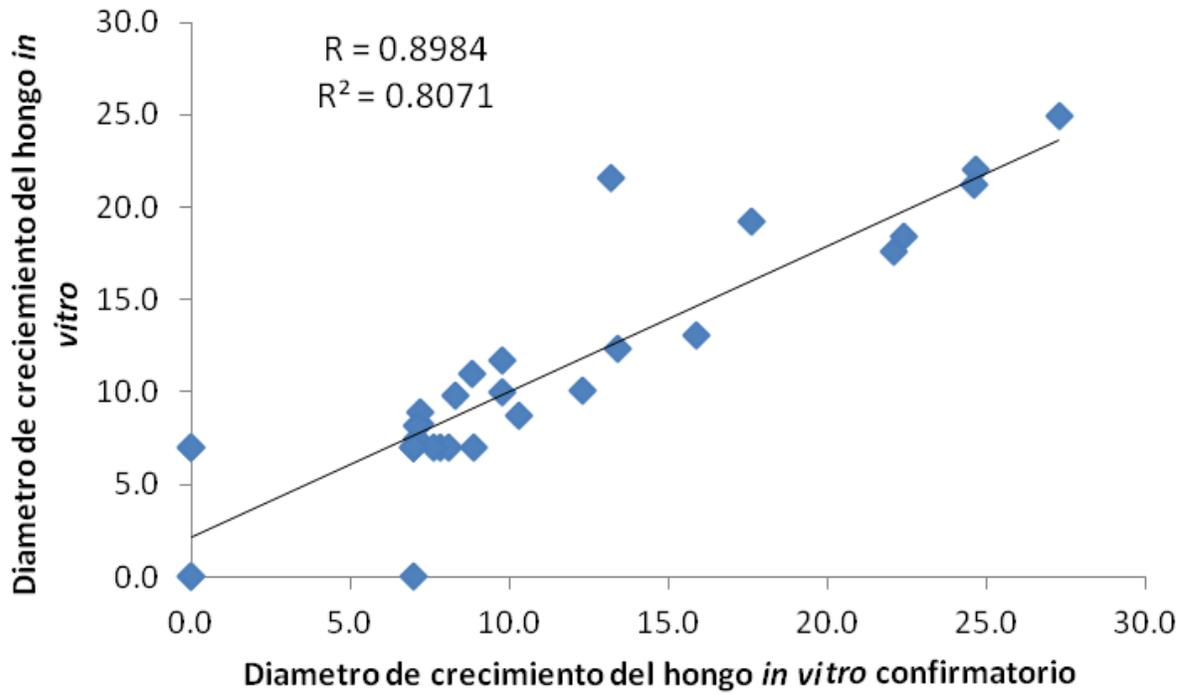


Figura 21. Correlación de ensayos *in vitro* vs *in vitro* infusión de manzana confirmatorio Grupo 2.

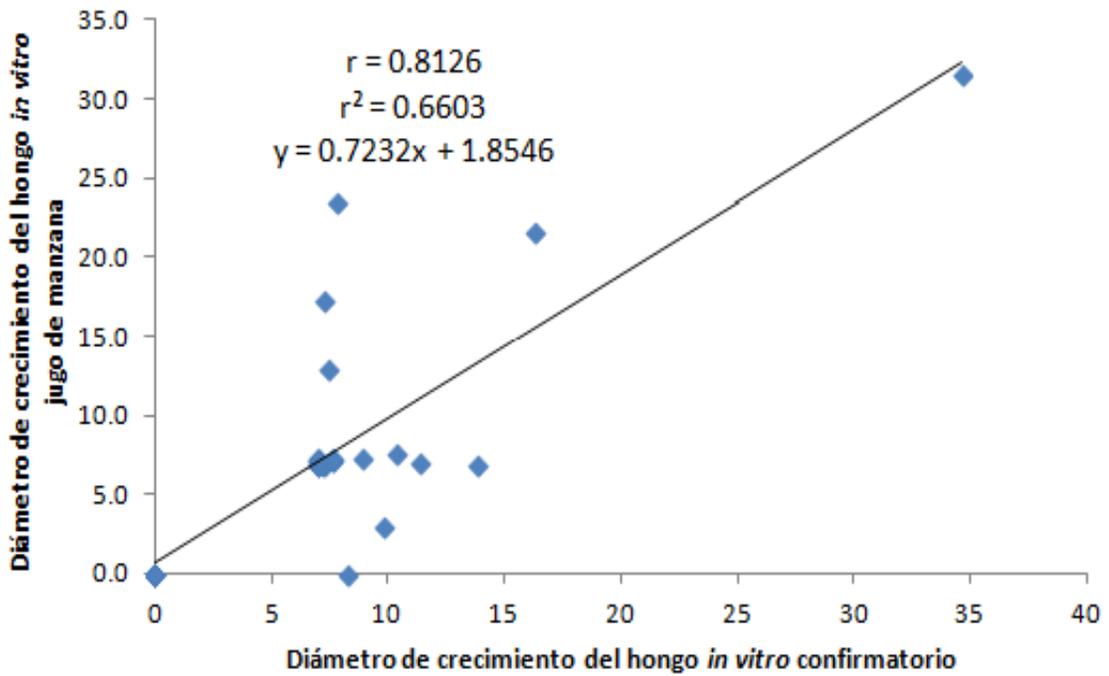


Figura 22. Correlación de ensayos *in vitro* vs *in vitro* jugo de manzana confirmatorio Grupo 2.

En la Figura 23 se muestra la correlación comparando los dos métodos para preparar el medio a base de manzana, como se muestra en la grafica la correlación lineal no es significativa indicando que el comportamiento de las cepas entre las dos técnicas para preparar el medio es diferente con excepción de solo algunos casos.

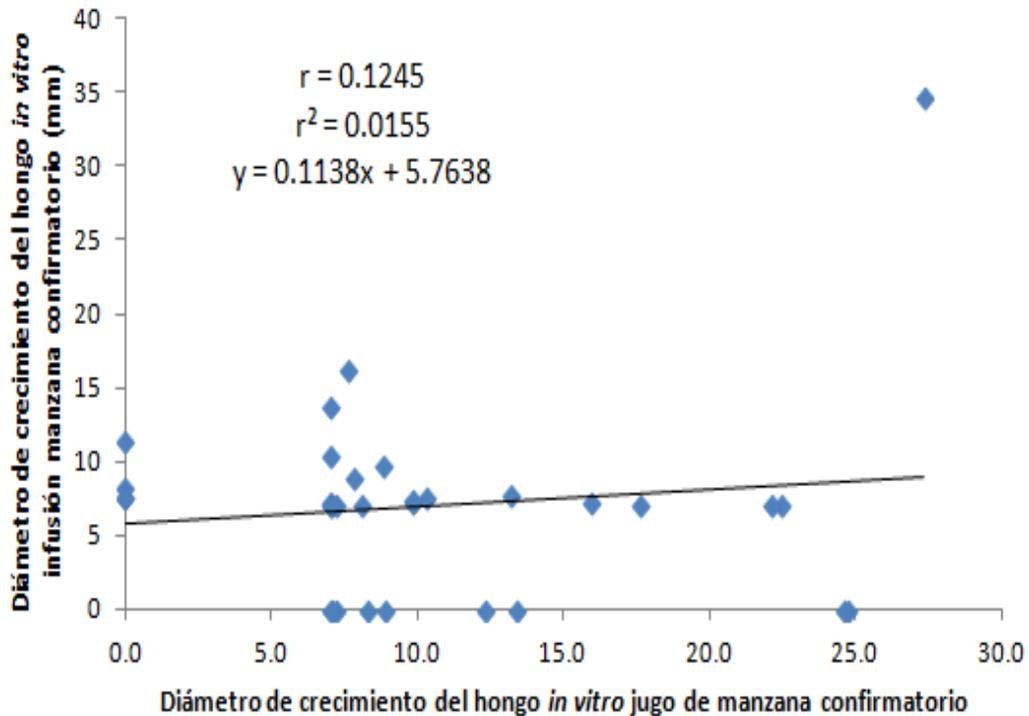


Figura 23. Correlación de ensayos *in vitro* infusión vs *in vitro* jugo de manzana confirmatorio Grupo 2.

Con los análisis realizados en media a base de manzana se pueden destacar siete cepas de levaduras como sobresalientes (81, B33, H03, H10, H28, H50 y H52) como posibles agentes de biocontrol contra *Penicillium expansum* en manzana.

5. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento de levaduras

Varias enfermedades de poscosecha pueden ser controladas por antagonistas microbianos (Wilson y col., 1994), por lo cual esta investigación se ha concentrado en la selección y estudio de nuevas cepas de levaduras. Se piensa que existe una mayor posibilidad de encontrar cepas con poder antagónico contra patógenos en frutos que tienen tiempo prolongado en almacenamiento al no presentar signos visibles de daños. Por ello se realizó la empresa de aislar cepas de levaduras de frutos de manzana en una bodega de almacenamiento en frío convencional. Así, se aislaron 420 cepas de las cuales se utilizaron 388 para evaluar su eficacia antagonista contra *Penicillium expansum* Link en frutos de manzana. Diversos autores han aislado levaduras antagónicas de la superficie de manzanas almacenadas (Roberts, 1990; Janisiewicz., 1996; Leibinger y col., 1997; Viñas y col., 1998) y de igual manera otros autores han aislado cepas de levaduras pero en frutos frescos como Castañeda (2005), quien aisló 263 cepas de levaduras de las cuales 128 fueron seleccionadas para las pruebas de antagonismo en presencia de *Penicillium expansum* y Sánchez y col. (2008), quienes aislaron 140 cepas de levaduras nativas de manzana de las cuales evaluaron el poder antagónico de 104 contra *Penicillium expansum* Link en manzana.

5.2. Bioensayos en fruto

Con las 420 cepas de levaduras aisladas se realizaron diversos ensayos en donde se determinó el potencial antagonista en presencia del patógeno en frutos de manzana. Diversos autores han realizado estudios de este tipo, en los cuales se determina el porcentaje de inhibición del patógeno por el potencial antagonista de la levadura (Pusey y col., 1988; Teixidó y col. 1999; Sánchez y col., 2008). La eficacia de un antagonista se ve afectada tanto por la concentración de las células

en la herida como por el número de esporas de patógeno utilizadas para la inoculación (Sánchez y col., 2008). En el caso particular del presente trabajo, en lugar de utilizar la cámara de Neubauer, como Castañeda (2005) y Sánchez y col. (2008) para el recuento de células en la preparación de inóculos de las levaduras y patógeno, se usó la técnica de extensión en superficie para las levaduras y vaciado para el patógeno en placa, que permite el recuento de células viables, mientras que la cámara de Neubauer permite conocer el número de células totales, ya sean viables o no, pero la desventaja de utilizar la primera es que se requiere mayor tiempo para conocer la concentración inicial de la cual se parte para la preparación de inóculos.

Se sabe que a mayor concentración de inóculo de levadura hay una mayor inhibición del patógeno, sin embargo se trabaja en la búsqueda de cepas que sean efectiva a bajas concentraciones (Sánchez y col., 2008). Diversos autores han estudiado las concentraciones adecuadas para realizar ensayos en frutos tanto de la levadura como del patógeno, El Ghaout y col. (1998), Teixido y col. (1999), Usall y col. (2000), Nunes y col. (2001) y Sánchez y col. (2008). Con base en los estudios realizados por estos autores, se ha determinado que la concentración óptima para los bioensayos tanto en *in vitro* como *in vivo* (fruto) es de 1×10^7 UFC/mL en el caso de la levadura y de 1×10^4 UFC/mL, de total cepas aisladas se probaron únicamente 388 que correspondieron a aquellas que alcanzaron dicha concentraciones durante la fase de multiplicación en medio líquido bajo agitación.

Cuando una levadura llega a tener efecto directo en la inhibición del crecimiento de un patógeno en frutos se debe a diversos mecanismos que es capaz de desarrollar, teniendo como principales la competencia por espacio y nutrientes, el parasitismo directo o la resistencia inducida (Droby, 2006), de igual manera existen otros mecanismo más complejos, como la producción de antibióticos (Singh y Sharma, 2007).

El comportamiento de las levaduras varió en función del ensayo, en el caso de los ensayos de selección y los ensayos confirmatorios. En efecto, muchos

potenciales antagonistas inhibieron el crecimiento del hongo en 100 %, pero una vez que fueron probados en los ensayos confirmatorios, disminuyó dicho porcentaje de inhibición. En general, las 70 cepas que se seleccionaron para los ensayos confirmatorios mostraron este tipo de comportamiento. Por ejemplo las cepas M75B, M17/1A, M20/2A, A32, A25, D25, H27, A99 con diámetros respectivos en las pruebas confirmatorias de 21.1, 21.8, 21.4, 19.0, 24.8, 22.2, 22.6 y 18.7 mm respectivamente. Este comportamiento peculiar pudo haberse debido primeramente a la inestabilidad en el comportamiento de las levaduras de un ensayo a otro (Usall y col., 1996). Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, como los conducidos por Castañeda (2005) y Sánchez y col. (2008) que muestran situaciones similares, es decir, una falta de consistencia en el comportamiento de las levaduras en distintos ensayos realizados Castañeda (2005), por ejemplo, reporta que la cepa 22-211, inhibió en desarrollo diametral un porcentaje del 23.9 % en pruebas confirmatorias y en ensayos previos lo inhibió en 62 %. En el caso de la búsqueda de ABC es importante que sean genéticamente estables (Teixido y col., 1999)

Por otro lado, durante los ensayos realizados se detectaron algunas cepas como A18, A17, A12 y A16, que incluso, propiciaron un mayor desarrollo del hongo con relación al testigo. Esto pudo haberse debido a que en lugar de inhibir el desarrollo del patógeno lo estimularon a un mejor desarrollo (sinergismo). Este resultado concuerda con lo obtenido en algunos de los experimentos realizados por Castañeda (2005).

En los ensayos realizados en el presente trabajo se encontró que el crecimiento del patógeno en el fruto oscila en ausencia de la levadura (testigo), desde 21.8 mm y un máximo de 35.4 mm a ocho días después de ser inoculados. Esta misma cepa (CFNL2016) fue utilizada por Castañeda (2005) y Sánchez y col. (2008), quienes obtuvieron crecimientos del hongo sensiblemente similares. En efecto, Castañeda (2005) reportó que el crecimiento diametral del patógeno estuvo en un rango de 30.0 mm a de 41.0 mm, mientras que Sánchez y col. (2008) reportan un mínimo de 35.1 y un máximo de 41.0 mm después de ocho días de

incubación. Rivera (2009), por su parte, reporta un crecimiento promedio del 35.7 mm. Con lo anterior se demuestra que la agresividad del patógeno utilizado sigue siendo muy alta, por lo que los resultados obtenidos con las levaduras realmente son significativos, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de un patógeno que presenta un gran nivel de virulencia en el fruto.

En total se retuvieron 70 cepas de levaduras para la prueba confirmatoria de las cuales 20 mantuvieron un buen comportamiento al inhibir en más de 40% el desarrollo del hongo. La cepa 2R mostró el mayor porcentaje de inhibición en un 57.7 y 81.3 % en diámetro y área respectivamente. En las pruebas confirmatorias todas las cepas resultaron ser diferentes al testigo. Estos resultados son sensiblemente similares a los obtenidos por Castañeda (2005) y Sánchez y col. (2008).

Como se mencionó anteriormente, existen cepas que cambian su comportamiento en función de un ensayo a otro, comparando los resultados obtenidos en los ensayos de selección para de cepas que mostraran comportamiento antagonista contra *P. expansum* y el ensayo confirmatorio se aprecia que algunas levaduras mostraron diferente porcentajes de inhibición, tal como Castañeda (2005) y Sánchez y col. (2008) reportaron cepas de levaduras que llegaron a inhibir mas el crecimiento del hongo o en otros casos demostraron lo contrario en sus ensayos confirmatorios. Para expresar de mejor manera este comportamiento se realizó un análisis de correlación para determinar si existía variación entre observaciones realizadas. La baja correlación encontrada sugiere la existencia de diferencia significativa en algunas de las levaduras. En efecto, algunas cepas levaduras como B34 y B39 prácticamente tuvieron el mismo comportamiento (56.4 y 71.3 % de porcentaje de inhibición respectivamente) en los ensayos preliminares, mientras que en el ensayo confirmatorio se obtuvo un porcentaje de inhibición de 54.2 % con B34 y 75.7 % con B39 en ensayos confirmatorios. De igual manera, existen cepas como 2R que mostraron

comportamientos similares al inhibir en 81.3 % en ensayos selectivos y un 68.3 % en ensayos confirmatorios.

5.3. Ensayos *in vitro*

En los ensayos *in vitro* el hongo mostró un comportamiento similar al que obtuvo en fruto, con un crecimiento diametral de entre 30 a 35 mm después de cinco días de incubación, lo que indica que el hongo no sufre cambios en su comportamiento al estar presente en un fruto ó un medio preparado a base del fruto, Sánchez y col. (2008) reportaron un crecimiento promedio del hongo de 15 mm en el medios sintético APD a las mismas 72 horas mientras que en fruto a los ocho días de incubación reportaron un crecimiento promedio de 35 mm.

Con estas condiciones fijas, se realizaron los ensayos de las 70 levaduras seleccionadas en los ensayos en fruto, ya que un gran número de autores mencionan que no existe una correlación entre la inhibición en el crecimiento de patógenos en poscosecha por antagonistas a través de experimentos *in vitro* con los obtenidos en fruto (Chalutz y col., 1988; Wilson y Chalutz, 1989; McLaughlin y col., 1990; Wilson y col., 1994; Sánchez y col., 2008), sin embargo, la necesidad de realizar experimentos *in vitro* surge de una idea de contar con pruebas sencillas y rápidas, además, las pruebas *in vitro* son sugeridas para evaluar posibles mecanismos de acción de las levaduras contra el patógeno.

En los ensayos *in vitro* se encontró si bien que varias levaduras que no desarrollaron en el medio, lo que podría deberse a que las condiciones del medio son adecuadas para el patógeno, no lo son para el establecimiento de las levaduras.

Con los datos obtenidos en los ensayos *in vivo* e *in vitro* se realizó un análisis de correlación entre ambos, con el fin de ver si existían comportamientos similares entre las levaduras al interactuar con medio o en fruto. Se observo que

con el medio a base de manzana preparado por infusión los antagonistas manifestaron un comportamiento similar al que mostraron en fruto. Por otro lado el análisis de correlación entre el comportamiento de las levaduras en los dos medios sintéticos mostraron valores de “r” bajos, indicando una ausencia de correlación del comportamiento de los antagonistas.

La correlación obtenida entre los resultados en fruto y usando como medio infusión de manzana se debe probablemente a que el medio basado en manzana debe contener los nutrientes o componentes que se encuentran en ésta tales como pectina, aminoácidos como cisteína, glicina, arginina, lisina, ácidos como glutamínico, linoleico, málico, oleico, palmítico y cafeico, azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa, catequinas, quercetina, fibras, calcio, hierro, magnesio, nitrógeno, fósforo, potasio (Rodríguez y col. 2010), entre otros, nutrientes o compuestos que quizá interactúen en las levaduras para poder desarrollar en la manzana y en este caso propician un buen crecimiento en el medio.

Diferentes autores como Janisiewicz (1988) y Sánchez y col. (2008) han reportado que el comportamiento de las levaduras en medio de cultivo y en frutos es diferente, lo que puede deberse a que éstas son capaces de desarrollar diferentes mecanismos de acción de un medio a otro. En presencia del fruto las levaduras pueden inducir mecanismos de defensa en el huésped o actuar directamente contra el patógeno mientras que medios sintéticos interactúan directamente con el patógeno ya sea por competencia por nutrientes o espacio, depredación.

De igual manera en los ensayos *in vitro* se observaron siete cepas que presumen se posibles agentes de biocontrol, esto en base a que estas cepas mostraron de igual manera ser sobresalientes en ensayos en fruto y mostraron comportamiento similar en los ensayos *in vitro*. Por lo anterior, se considera que el medio preparado a base de infusión de manzana puede ser considerado como un método viable en el estudio ABC debido a que los resultados en este caso son comparables a los obtenidos en el fruto.

6. CONCLUSIONES

6.1 Ensayos en fruto

- El aislamiento de levaduras a partir de frutos en buen estado después de almacenamiento prolongado permitió la selección de 20 levaduras con un poder antagónico superior a 40 % tanto en las pruebas preliminares como en las confirmatorias y algunas cepas mostraron un comportamiento similar en los diferentes ensayos realizados por lo que se podrían considerar como genéticamente estables.

6.2 Ensayos *in vitro*

- La utilización de medios nutritivos a base de manzana permitió determinar el poder antagónico de las levaduras y seleccionar siete cepas como agentes de control, por ser sobresalientes en ensayos en fruto y mostraron comportamiento similar entre ensayos *in vitro*.

6.3 Correlación entre los dos tipos de ensayos

- En los ensayos *in vitro* el medio preparado a base de infusión de manzana mostró un comportamiento similar a los ensayos en frutos en comparación con el medio preparado a base de jugo de manzana, mostrando un comportamiento lineal ($r = 0.8582$), mientras que en los ensayos confirmatorios la correlación fue de r de 0.8984.

- El medio preparado a base de infusión de manzana mostró una mayor estabilidad en los ensayos, al presentar características en donde el hongo y la levadura mostraron una mejor adaptación al ser más firme y presentar una menor presencia de humedad.

- Además el medio preparado a base de infusión de manzana mostró una correlación positiva con los resultados obtenidos en fruto por lo que se puede proponer para estudios posteriores de este tipo.

6.4 Recomendaciones para futuros trabajos de investigación

- Dar seguimiento a las mejores levaduras reportadas en este trabajo, en sentido de ver que sean genéticamente estables, determinar su agresividad ante otros patógenos, determinar sus posibles modos y mecanismos de acción etc.

- Llevar a cabo otros trabajos *in vitro* en los cuales se utilicen realizando modificaciones a los medios, ya sea al ajustar pH o realizar fortificaciones utilizando azúcares, con el fin de facilitar el desarrollo del patógeno y el antagonista y poder simular mejor las condiciones en que se encuentran estos microorganismos en los ensayos *in vivo*.

7. REFERENCIAS

Agustí Manuel. Fruticultura. Ediciones Mundi-Prensa. **2004**.

Ascasíbar Errasti Javier, Otero Francisco. Guía técnica para el cultivo de manzano. España. **2009**.

Aular Urrieta Jesús E. Consideraciones sobre el manejo poscosecha de frutas en Venezuela. Venezuela. UCLA-Postgrado de Horticultura. **2008**.

Calderón, A. E. Fruticultura general. El esfuerzo del hombre. Editorial Limusa, México. **1987**.

Carrillo Leonor. Los Hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-19-X. Capitulo 9. **2003**.

Castañeda Desales Deyanira. Evaluación de fungicidas y antagonistas microbianos aplicados en el campo y de levaduras inoculadas en manzanas en poscosecha, en la prevención de la pudrición azul (*Penicillium expansum* Link). **2005**.

Chalutz E., Ben-Arie, R., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B., Wilson, C.L., Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit. Phytoparasitica. **1988**;16:69.

Cruz A. M. Informativo Agropecuario Bioleche-INIAQUILAMAPU. Boletín 35. Publicaciones INIA Quilamapu. Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura. **2008**.

Droby S., Wisniewski M., Macarasin D., Wilsonc C. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. Postharvest Biology and Technology. **2006**;52:137-145.

EI-Ghaout A., Wilson C. L. Wisnieski M. Ultrastructural and cytochemical aspects od the biological control of Botrytis cinerea by Candida Saitoana in apple fruit. Phytopathology. **1998**;20:96-101.

El-Ghaouth A, CL. Wilson, M Wisniewski, S. Droby, J L Smilanick L Korsten. Biological control of postharvest diseases of citrus fruit. In Biological Control of Crop Diseases. S.S. Gnanamanickam. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 2002.

FAO. Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas Parte I (Cosecha y Empaque). Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. Serie: Tecnología Postcosecha 6. **1987.**

French, E.R., T.T. Hebert. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA), San José, Costa Rica. **1980.**

James M. Jay, Martin J. Loesner, David A. Golden. Microbiología moderna de los alimentos. 5ta edición, Editorial ACRIBIA, SA. **2005.**

Janisiewicz W J. Postharvest biological control of blue mold on apples. Phytopathology. **1987**;77:481-485.

Janisiewicz J. W. Ecological Diversity, Niche Overlap, and Coexistence of Antagonists Used in Developing Mixtures of Biocontrol of Postharvest Diseases of Apples. Phytopathology. **1996**;86:473-479.

Jules Janick, James N. Cummins, Susan K. Brown, and Minou Hemmat. Fruit Breed, Volume I: Tree and Tropical Fruits, edited by Jules Janick and James. Chapter 1, Apples. N. Moore ISBN 0-471-31014-X John Wiley & Sons, Inc. **1996.**

Lansing M. Brescott, John P. Harley, Donald A. Klein. Microbiología. 4ta Edición. MacGraw-Hill. **2000.**

Leibinger W., Breuker B., Hahn M. and Mendgen K. Control of Postharvest Pathogens and Colonization of apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology. **1997**; 87:1103-1110.

McLaughlin R., Chalutz E. and Droby S. Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: Alternatives to synthetic fungicides. Crop Protection. **1990**;10:172-177.

Malloch David. Moulds. Their Isolation, cultivation and identification. University of Toronto press. Toronto Buffalo London. **1981**.

Mari M, Torres R, Teixido N, Vinas I, Casalini L, Giraud M, Usall J. Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. J.Food Prot. **2006**;64:856–861.

Mendoza González Silvia. Evaluación de la época de floración, maduración, calidad y potencial de almacenamiento de genotipos de manzana establecidos en Cadereyta, Qro. **2007**.

Mendoza González S., Martínez-Peniche R. Á., Fernández-Montes M. R., Rumayor-Flores A., Castillo-Castañeda E. Época de maduración y calidad del fruto de genotipos de manzana en Cadereyta, Qro. México. **2008**.

Modino Pedro, Di Masi Susana, Falconí Cesar, Montealegre Jaime, Henríquez José Luis, Nunes Carla, Salazar Miguel, Stadnik Marciel, Vero Silvana, Usall Josep. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha. Editorial Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Montevideo – Uruguay, Universidad de la Republica – Facultad de Agronomía. **2009**.

Montes M. Rafael, Parra Quezada Rafael A., Pérez González Salvador, Vera Morales J. Manuel, Zacatenco González M. Guadalupe. Variedades de manzana recomendadas para las serranías de Hidalgo y Querétaro. Instituto nacional de investigación forestal, agrícola y pecuaria, Centro de Investigación Regional del Centro. Publicación Técnica Núm. 1. México. Diciembre **2010**.

Nigam, N.; Mukerji, K. G. Biological control. Concepts and practice. *In*: Biocontrol of Plant Diseases. Vol. 1. Mukerji, K. G.; Garg, K. L. (Eds.). CRC Press Boca Ratón. EE.UU. **1988**.

NMX-FF-061-SCFI-2003. Productos Agrícolas no Industrializados para consumo Humano - Fruta fresca - Manzana (*Malus pumila* Mill) (*Malus domestica* Borkh) Especificaciones.

Nunes C., Usall J., Teixidó N., Torres R. and Viñas I. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinérea* on apples and pears with combination of *Candida sake* and *Pantonea agglomerans*. **2001**.

Pusey L. P., Wilson L. C., Hotchkiss W. M., and Franklin D. J. Compatibility of *Bacillus subtilis* for Postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran and cold-storage condition. **1988**.

Rivera Avalos Sergio, Capacidad antagónica a 4°C y mecanismo de acción de levaduras nativas contra *Penicillium expansum* Link en manzana en poscosecha. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. **2009**.

Roberts R.G. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*. **1990**;80:526–530.

Rodríguez Muela Carlos, Becerra Bernal Agustín, Rodríguez Ramírez Héctor Esteban, Díaz Plascencia Daniel, Hernández Gómez Camilo, Gutiérrez Piña Francisco, Gallegos Acevedo Mario Alejandro, Romero Villalobos Sergio, Lucero Acosta Francisco, Valor nutricional de la manzarina, obtenida de subproductos de manzana para la alimentación animal. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. **2010**.

Sánchez Ventura Sergio E., Martínez Peniche Ramón A., Castillo Tovar José, Fernández Escartín Eduardo. Antagonismo de levaduras nativas contra la pudrición azul (*Penicillium expansum* Link) en frutos de manzana. *Revista Fitotecnia Mexicana*. México. **2008**;31:359-366.

Sandoval Chávez Rocío Aurora, Martínez-Peniche Ramón Álvaro; Hernández-Iturriaga Monserrat, Fernández-Escartín Eduardo, Arvizu-Medrano Sofía; Soto-Muñoz Lourdes. Control Biológico y Químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morron (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, vol. 17, núm. 2, mayo-agosto, pp. 161-172 Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. **2011**.

SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Evaluación del Programa de Transferencia de Tecnología. Chihuahua. **2005**.

SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la producción Agrícola. Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx. **2006**. Revisión julio 2012

SIAP. Reporte de producción nacional de manzana en México al 31 de octubre de 2009 Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. **2009**.

Singh D., Sharma R.R. Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. Sustainable Pest Management. Daya Publishing House, New Delhi, India. **2007**.

Spadaro, D.; Lodovica, G. M. State of the art and future prospect of biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology. **2004**; 91:794-800.

Teixidó N., Usall J., and Viñas I. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida* sake biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. International Journal of food Microbiology. **1999**;91:185–194.

Teixidó, N.; Torres, R.; Viñas, I.; Abadias, M. y Usall, J. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. En: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Ed. Christophe Lacroix. Woodhead publishing series in food science technology and nutrition. Great Abington, Cambridge. **2011**.

Usall J. Teixido N., Nunes C. and Viñas I. Tratamientos de Biocontrol una alternativa real. Fruticultura Profesional. **1996**;153:31-36.

Usall Josep, Teixido Neus, Torres Rosario, Ochoa de Eribe Xavier, Immaculada Viñas. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Valencia, Spain*. **2000**.

Vasquez Santizo Josué. Recomendaciones Técnicas para el Cultivo de Manzanos. [Consultado 2012 Julio 10]. Disponible: www.icta.gob.gt/reco_frutales.htm. **2004**.

Vázquez Ramos José A., Contreras de la Reé Francisco Javier, Covarrubias Juan Manuel. Las variedades de manzano en México. **2010**.

Viñas I., J. Usall, Teixido N., Sanchis V. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Catalonia, Spain. *International Journal of Food Microbiology*. **1997**; 92:24-255.

Viñas, I.; Usall, J.; Teixidó, N.; Sanchis, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*. **1998**; 40:9-16.

Wilson C.L., and Chalutz E. Postharvest Biocontrol of Green and Blue Mold and Sour Rot of citrus Fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant disease*. **1989**;76:47-473.

Wilson C. L, A El-Ghaouth, E Chalutz, S Droby, C Stevens, J Y Lu, V Khan. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruit and vegetables. *Scientia Horticulturae*. **1994**;29:262–273.