

# Isolation of killer yeasts from ants of the genus *Atta* and their effect on the red tomato's fungal pathogen *Geotrichum candidum*

## Aislamiento de levaduras killer a partir de hormigas del género *Atta* y su efecto sobre el hongo patógeno del tomate rojo *Geotrichum candidum*

**Efrén Robledo-Leal**, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México C.P. 66451; **Mariana Elizondo-Zertuche**, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. E. A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México C.P. 64460; **Rogelio de Jesús Treviño-Rangel**, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. E. A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México C.P. 64460; **Gloria M. González**, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. E. A. Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México C.P. 64460; **Carlos Hernández-Luna**, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México C.P. 66451; **Nohemí Huerta-González**, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México C.P. 66451. Correspondencia: [efren.robledoll@uanl.edu.mx](mailto:efren.robledoll@uanl.edu.mx).

**Recibido:** 11 de Mayo, 2016      **Aceptado:** 04 de Agosto, 2016

Robledo-Leal E, Elizondo-Zatuche M, Treviño-Rangel RJ, González GM, Hernández-Luna C y Huerta-González N. Isolation of killer yeasts from ants of the genus *Atta* and their effect on the red tomato's fungal pathogen *Geotrichum candidum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 258-269. DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1605-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-3)  
Primera publicación DOI: 04 de Agosto, 2016.  
First DOI publication: August 04, 2016.

**Resumen.** Una de las enfermedades que sufre el tomate es la pudrición ácida causada por *Geotrichum candidum*. Para lo cual se aislaron levaduras a partir de hormigas del género *Atta* y se seleccio-

**Abstract.** One of the diseases occurring in tomato is the sour rot caused by *Geotrichum candidum*. In order to evaluate the antagonism of killer yeasts, isolates were obtained from ants belonging to the genus *Atta* and those with killer activity were selected, resulting in 8 killer isolates (M1 – M8). Then, isolates of *G. candidum* were obtained from infected tomatoes and the most aggressive one was selected. Each killer yeast was inoculated in 1x1 cm<sup>2</sup> cuts made to tomato fruits and after a 3 hour incubation, 50 µL of a *G. candidum* suspension of 1x10<sup>4</sup> cells/mL was inoculated. After incubation for 72 h in a moist chamber, the lesions were quantified using the Tukey test (p<0.05) resulting in yeast

naron aquellas que mostraron actividad killer frente, resultando en 8 cepas killer (M1 – M8). Posteriormente se aislaron cepas de *G. candidum* a partir de tomates infectados y se seleccionó la más agresiva. Cada levadura killer fue inoculada en cortes hechos a los tomates de 1x1 cm<sup>2</sup> y después de 3 horas de incubación, la cepa seleccionada del fitopatógeno fue inoculada en un volumen de 50 µL con una concentración de 1x10<sup>4</sup> células/mL. Después de 72 h de incubación en cámara húmeda, los daños fueron cuantificados mediante la medición de las lesiones alrededor del sitio de inoculación. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Tukey (p<0.05) resultando que las levaduras M1 y M2 presentaron las mayores actividades antagonistas. La identificación por API 20C AUX arrojó que las cepas corresponden a *Candida (Pichia) guilliermondii*.

**Palabras clave adicionales:** Levaduras killer, antagonismo, *Pichia guilliermondii*, *Geotrichum candidum*.

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es uno de los cultivos de mayor comercialización en el mundo, así como uno de los de mayor valor económico. México representa el décimo lugar a nivel mundial en la producción del tomate y el primero en su exportación, lo que en promedio da un ingreso al país de 1,000 millones de dólares. Se ha estimado que 1 de cada 3 tomates rojos se produce en Sinaloa, generando 867 mil toneladas del total nacional de 2.8 millones (SIAP, 2016). Durante la poscosecha, una de las enfermedades que se presentan en este fruto es la pudrición ácida, ocasionada por el hongo *G. candidum*, alteración común prácticamente en cualquier lugar donde se produzcan y exista prefe-

isolates M1 and M2 as the most protective ones. The auxanogram test API 20C AUX identified them as *Candida (Pichia) guilliermondii*.

**Additional keywords:** Killer yeasts, antagonism, *Pichia guilliermondii*, *Geotrichum candidum*.

## INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum* L) is one of the most widely sold crops in the world, and one with the highest commercial value. Mexico is the tenth largest tomato producer worldwide, and the single most important exporter, providing the country with an average of one billion dollars. It has been estimated that 1 out of every 3 red tomatoes is produced in the state of Sinaloa, for a total of 867 thousand tons, out of the total of 2.8 millions produced in Mexico (SIAP, 2016). During postharvest, one of the diseases that appear in this fruit is sour rot, caused by the fungus *G. candidum*, a common alteration in practically any place in which this fruit is produced, and the temperature is preferably of around 30 °C (Ruiz-Martínez *et al.*, 2012). The damage regularly begins through lesions caused by insects, or mechanically, when handling the product in the commercialization process. There are several alternatives to avoid the deterioration of tomatoes and to preserve their quality for longer time periods, including biological control using antagonistic microorganisms such as yeasts, the different action mechanisms include antibiosis, competition for space and nutrients, and direct interaction (Bautista-Baños, 2006; Khaled & Sivasithamparam, 2006). Among the antagonistic yeasts are what are called killer yeasts, capable of secreting metabolites of a protein nature and variable molecular weights, named killer toxins, capable of inhibiting other microorganisms by

rentemente una temperatura de alrededor de 30 °C (Ruiz-Martínez *et al.*, 2012). El daño inicia regularmente a través de lesiones ocasionadas por insectos o mecánicamente por el manejo del producto en el proceso de comercialización. Existen diversas alternativas para evitar el deterioro del tomate y preservar su calidad por más tiempo, entre las que se encuentra el control biológico empleando microorganismos antagonistas, tales como las levaduras, cuyos diferentes mecanismos de acción incluyen la antibiosis, la competencia por espacio y nutrientes, y la interacción directa (Bautista-Baños, 2006; Khaled & Sivasithamparam, 2006). Entre las levaduras antagonistas, se encuentran las denominadas levaduras killer, capaces de secretar metabolitos de naturaleza proteica y peso molecular variable, denominadas toxinas killer, con capacidad de inhibir otros microorganismos mediante alteraciones de la pared celular, membrana o núcleo de la célula susceptible (Buzzini *et al.*, 2007). Actualmente existen numerosos reportes de la efectividad y potencial de las levaduras killer para el control de hongos causantes de deterioro de vegetales. El hongo *Botrytis cinerea*, uno de los patógenos más dañinos en el cultivo de uvas y fresas, logró ser inhibido empleando las toxinas parcialmente purificadas de la cepa *Pichia membranifaciens* CYC 1106 (Santos & Marquina, 2004). Este mismo hongo fue posteriormente inhibido con cepas de *Pichia anomala* y *Debaryomyces hansenii*, aumentando el arsenal biológico con potencial biocontrolador frente a este patógeno (Santos *et al.*, 2004). Cepas de *Issatcehnkia orientalis*, *Candida guilliermondii*, *P. ohmeri* y *Torulaspora globosa*, entre otras, han sido reportadas para la inhibición exitosa de hongos fitopatógenos de importancia tales como *Aspergillus cabonarius*, *A. niger*, *Penicillium expansum* y *Colletotrichum sublineolum* en cultivos de uva, pera, manzana y sorgo, respectivamente (Bleve *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010). En México, Hernán-

altering cell walls, membranes, or vulnerable cell nuclei (Buzzini *et al.*, 2007). There are several reports on the effectiveness and the potential of killer yeasts for the control of fungi that cause plant deterioration. The fungus *Botrytis cinerea*, one of the most harmful pathogens in grape and strawberry crops, was inhibited using the partially purified of the strain *Pichia membranifaciens* CYC 1106 (Santos & Marquina, 2004). This same fungus was later inhibited using strains of *Pichia anomala* and *Debaryomyces hansenii*, increasing the biological arsenal with biocontrolling potential over this pathogen (Santos *et al.*, 2004). Strains of *Issatcehnkia orientalis*, *Candida guilliermondii*, *P. ohmeri* and *Torulaspora globosa*, among others, have been reported to successfully inhibit important plant pathogenic fungi, such as *Aspergillus cabonarius*, *A. niger*, *Penicillium expansum* and *Colletotrichum sublineolum* in grape, pear, apple, and sorghum crops, respectively (Bleve *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010). In Mexico, Hernández-Montiel *et al.*, (2011) reported a significant reduction of *Geotrichum citri-aurantii* in limes during postharvest, using epiphytic *D. hansenii* yeasts.

Yeasts present an ecologically diverse association with insects; over 200 species of only beetles have been reported, along with 12 of termites, 17 for ants, and other insects such as wood-eaters, homoptera, dipterous, hymenoptera, neuroptera, etc. (Rosa & Gábor, 2006). Carreiro *et al.*, (2002) reported that 77 out of 99 yeast strains isolated from ants of the genus *Atta* presented the killer phenotype, including some genera in which this phenomenon had not been previously reported. To study the applicability of this knowledge in preventing the postharvest damage in tomatoes by *G. candidum*, the aim was set to evaluate the antagonistic capability of killer yeast strains taken from ants, against isolations of *G. candidum*

dez-Montiel *et al.*, (2011) reportaron una reducción significativa de *Geotrichum citri-aurantii* en limón durante poscosecha, empleando levaduras epífitas de *D. hansenii*.

Las levaduras presentan una asociación ecológicamente diversa con los insectos; tan sólo de escarabajos se reportan más de 200 especies, así como 12 reportadas en termitas, 17 para hormigas, y otros insectos como los xilófagos, homópteros, dípteros, himenópteros, neurópteros, etc. (Rosa & Gábor, 2006). Carreiro *et al.*, (2002) reportaron que 77 de 99 cepas de levaduras aisladas de hormigas del género *Atta* presentaron el fenotipo killer, incluyendo algunos géneros en los cuales no se encontraba previamente reportado este fenómeno. Para estudiar la aplicabilidad de este conocimiento en la prevención del daño poscosecha en tomate por *G. candidum*, se planteó el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de cepas de levaduras killer obtenidas de hormigas, frente a aislamientos de *G. candidum* obtenidos de muestras de tomate con síntomas característicos de pudrición ácida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de levaduras

Las levaduras fueron aisladas de hormigas rojas (*Atta* spp.) con base en lo reportado previamente (Carreiro *et al.*, 2002). Las hormigas fueron colectadas de diferentes localidades en bolsas de plástico y transportadas en frío al laboratorio. Para el aislamiento, se efectuó el procedimiento descrito por Torres-Mireles (2013); de forma individual, las hormigas fueron maceradas en un mortero estéril adicionando 1 ml de solución salina (0.85 % NaCl) estéril. A partir de cada homogeneizado obtenido, se realizaron 4 diluciones seriadas y 100 µl de cada dilución fueron inoculados por extensión en placas

obtainadas from tomato samples with characteristic symptoms of sour rot.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of yeasts

Yeasts were isolated from red ants (*Atta* spp.) based on previous reports (Carreiro *et al.*, 2002). The ants were gathered from different locations in plastic bags and transported to the lab in a low temperature. For the isolation, we carried out the procedure described by Torres-Mireles (2013); one by one, the ants were macerated in a sterile mortar adding 1 ml of sterile saline solution (0.85 % NaCl). From each homogenization obtained, we performed 4 dilutions in series, and 100 µl of each one were inoculated by extension in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 °C for up to 72 h. The yeasts obtained, recognized macroscopically by their creamy look and opaque color, and microscopically by their cell size, observable under an optic microscope at a 400x magnification, were preserved in vials with sterile distilled water at room temperature until used.

### Determining the killer phenotype

To evaluate the presence of the phenotype killer in the isolated yeasts, we used the strains of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26609 and ATCC 38527 as yeasts sensitive to the killer toxins (Robledo-Leal *et al.*, 2012), using the medium YEPD-MB (0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 0.5% tryptone, 1 % glucose, 2 % agar, and 0.003 % methylene blue) adjusted to a pH of 4.5 with a citrate-phosphate regulator 0.1 M. Inóculos of  $1 \times 10^6$  cells/ml were prepared from 24h cultures

de Petri con agar dextrosa y papa (PDA) e incubadas a 25 °C hasta por 72 h. Las levaduras obtenidas, reconocidas macroscópicamente por su aspecto cremoso y color opaco, y microscópicamente por su tamaño celular observable al microscopio óptico a 400 aumentos, fueron preservadas en viales con agua destilada estéril a temperatura ambiente, hasta su empleo.

### Determinación del fenotipo killer

Para evaluar la presencia del fenotipo killer en las levaduras aisladas, se emplearon las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26609 y ATCC 38527 como levaduras sensibles a toxinas killer (Robledo-Leal *et al.*, 2012), empleando el medio YEPD-MB (0.3 % de extracto de levadura, 0.3 % de extracto de malta, 0.5 % de peptona, 1 % de glucosa, 2 % de agar y 0.003 % de azul de metileno) ajustado a un pH de 4.5 con regulador de citrato-fosfato 0.1 M. Se prepararon inóculos de  $1 \times 10^6$  células/ml a partir de cultivos de 24h de las cepas sensibles, de los cuales se depositaron 400 µl en placas con medio YEPD-MB empleando hisopos estériles, sembrando en 4 direcciones para generar un “césped” uniforme. Una vez eliminado el exceso de humedad, se inocularon las cepas de levaduras a evaluar a manera de estría gruesa y las placas fueron incubadas a 25 °C por 72h. El fenotipo killer se consideró positivo si se presentó una zona clara de inhibición delineado por un borde azul.

### Aislamiento y selección de las cepas de *G. candidum*.

Se obtuvieron muestras de tomate rojo con síntomas compatibles con la pudrición ácida (reblandecimiento, exudado, micelio blanco, producción de gas). Las muestras fueron lavadas a chorro del agua de la llave, después se cortaron trozos del

of the sensitive strains, out of which 400 µl were placed on plates with a YEPD-MB medium, using sterile cotton swabs, plating in 4 directions to generate an even “lawn”. Once the excess humidity was removed, the yeast strains to be evaluated were inoculated as a thick smear and the trays were incubated at 25 °C for 72h. The killer phenotype was considered positive if a clear area of inhibition appeared, surrounded by a blue edge.

### Isolation and selection of *G. candidum* strains

Samples were taken of red tomato with symptoms compatible with sour rot (softening, exudate, white mycelium, production of gas). The samples were washed under the faucet, then pieces of the damaged area were cut (1 cm<sup>2</sup> approx.) and submerged for 2 min in a 2 % hypochlorite solution. They were later moved to a Petri dish with sterile distilled water and washed; this process was carried out twice. Under conditions of sterility, the pieces of tomato were transferred to trays with PDA. The trays were incubated at 30 °C until the cultures appeared. The isolates were identified as *G. candidum* due to their macroscopic and microscopic characteristics, such as rapid growth, whitish color, dry culture aspect, hyaline, septed, branched hyphae, and the production by fragmentation of hyaline, unicellular arthroconidia, without conidiophores or blastoconidia (Watanabe, 2002). Once the pure isolations were obtained, they were kept in glycerol at 20 %, at a temperature of -20 °C, until they were used.

Under conditions of sterility, a tray with PDA was inoculated by puncturing for each strain obtained in the stage of isolation and incubated at 28°C, allowing them to grow until the area of the tray was completely covered. Later, using a needle, a sample of the mycelium was taken and a healthy tomato was inoculated by puncturing after

área dañada (1 cm<sup>2</sup> aprox.) y se sumergieron durante 2 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2 %. Posteriormente se pasaron a una caja Petri con agua destilada estéril y se lavaron; este proceso se realizó 2 veces. En condiciones de esterilidad, los trozos del tomate se transfirieron a placas con PDA. Las placas se incubaron a 30 °C hasta que aparecieran las colonias. Los aislamientos fueron identificados como *G. candidum* por sus características macroscópicas y microscópicas tales como rápido crecimiento, color blanquecino, aspecto colonial seco, hifas hialinas, septadas, ramificadas y la producción por fragmentación de artroconidias hialinas, unicelulares, sin conidióforos ni blastoconidios (Watanabe, 2002). Una vez obtenidos los aislamientos puros, se resguardaron en glicerol al 20 %, a una temperatura de -20 °C, hasta su utilización.

En condiciones de esterilidad, se inoculó por picadura una placa con PDA por cada cepa obtenida en la etapa de aislamiento y se incubaron a 28 °C, dejándolas crecer hasta que el área de la placa estuviera completamente cubierta. Posteriormente, empleando una aguja se tomó una muestra del micelio y se inoculó por picadura un tomate sano previamente sanitizado con hipoclorito de sodio al 2%. Cada tomate recibió 10 picaduras y posteriormente se colocó dentro de una cámara húmeda y después se incubó a 28 °C. Se observaron resultados a las 24 y 48 h. Estos experimentos se realizaron en dos ocasiones separadas con 2 réplicas por ensayo. La cepa más agresiva se seleccionó con base en la cantidad de picaduras infectadas (*i.e.* con crecimiento de micelio), el diámetro de las lesiones en las picaduras y el grado de ablandamiento establecido de forma visual.

### Pruebas de antagonismo en fruto

Se realizaron 2 experimentos de forma inde-

sanitizing with sodium hypochlorite at 2 %. Each tomato was punctured 10 times, then placed inside a damp chamber then incubated at 28 °C. Results were observed after 24 and 48 h. These experiments were carried out in two different moments, separated by replications per test. The most aggressive strain was chosen based on the amount of punctures infected (*i.e.* with mycelial growth), the diameter of the damages in the punctures and the degree of softening established visually.

### Antagonism test on fruit

Two experiments were carried out independently with 3 replications each. Along with the strains of killer yeasts, we included a control treatment without added yeast, and another one with the strain of *Candida albicans* ATCC 90028 as a non-antagonistic yeast control. From young cultures of the strain of *G. candidum* chosen as the most aggressive for tomato, a suspension was prepared of 1 x 10<sup>4</sup> cells/ml. The yeasts of each treatment, including the *C. albicans* control, were adjusted to 1 x 10<sup>8</sup> cells/ml in a sterile salt solution (Ren *et al.*, 2012).

Once the suspensions required for the tests were prepared, the tomatoes were sanitized using cotton soaked in 2 % sodium hypochlorite and using a scalpel, semicircle-shaped holes were carved around the pedicle, with incisions of 1 cm<sup>2</sup> x 0.5 cm in depth in the mesocarp. In each hole 100 µl of the yeast suspension were inoculated, the tomato was placed inside a humidity chamber and incubated at 28 °C for 3 hours, to allow for the pre-establishment of the yeast in the fruit. After this time, 50 µl of the *G. candidum* suspension was inoculated in each hole; it was placed back into the humidity chamber and incubated at 28 °C. The effectiveness of each treatment was evaluated after 72h by measuring the lesions, which were quantified by adding their

pendiente con 3 réplicas cada uno. Además de las cepas de levaduras killer, se incluyó un tratamiento control al que no se le adicionó levadura y otro en el que se empleó la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 como un control de levadura no antagonista. A partir de cultivos jóvenes de la cepa de *G. candidum* seleccionada como la más agresiva frente al tomate, se preparó una suspensión de  $1 \times 10^4$  células/ml. Las levaduras de cada tratamiento, incluyendo el control de *C. albicans*, se ajustaron a  $1 \times 10^8$  células/ml en solución salina estéril (Ren *et al.*, 2012).

Una vez preparadas las suspensiones requeridas para las pruebas, se sanitizaron los tomates con algodón humedecido con hipoclorito de sodio al 2 % y empleando un bisturí se realizaron pocillos alrededor del pedículo haciendo incisiones de  $1 \text{ cm}^2 \times 0.5 \text{ cm}$  de profundidad en el mesocarpo. En cada pocillo se inocularon 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de levaduras, se colocó el tomate dentro de una cámara húmeda y se incubó a 28 °C por 3 horas, para permitir el pre-establecimiento de la levadura en el vegetal. Una vez transcurrido el tiempo, se inoculó en cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de *G. candidum*, se colocó nuevamente en la cámara húmeda y se incubó a 28 °C. La efectividad de cada tratamiento fue evaluada a las 72h mediante la medición de las lesiones, las cuales fueron cuantificadas sumando su extensión en milímetros hacia ambos lados y el inferior de cada pocillo inoculado. Los valores promedio obtenidos para cada tratamiento fueron analizados mediante la prueba de Tukey utilizando el programa SPSS versión 20.0, a un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ).

### Identificación de las levaduras

Las levaduras killer aisladas fueron identificadas mediante el sistema API 20 C AUX de bioMérieux, siguiendo las instrucciones del fabricante y sometiendo los resultados a la base de datos apiweb®.

extension in millimeters towards both sides, and the bottom of each inoculated hole. The average values obtained for each treatment were analyzed with the Tukey test using the program SPSS version 20.0, at a level of significance of ( $p < 0.05$ ).

### Identification of the yeasts

The killer yeasts were identified with the bioMérieux API 20 C AUX system, following the instructions of the manufacturer, and submitting the results to the apiweb® database.

## RESULTS AND DISCUSSION

From the ants gathered we obtained 8 yeasts, the killer activity of which was observable by the formation of a halo of inhibition, surrounded by a darker blue edge, generated by the methylene precipitated as an indicator of cell death (Figure 1).

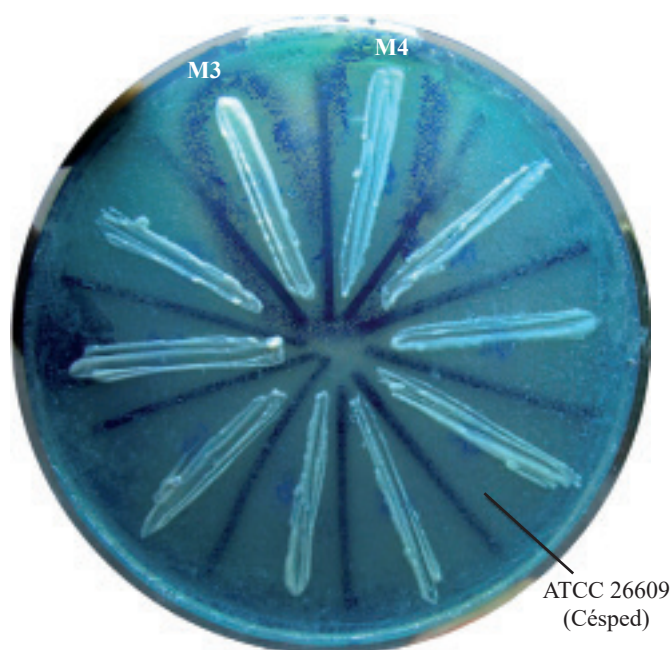
From the tomato samples, the strain of *G. candidum* named MG2 produced the most damage in the tomatoes, and was therefore chosen as the most aggressive, and it was used in the antagonism test on the fruit (Table 1 and Figure 2). The comparison of averages using the Tukey test showed that all yeasts, except M5 and M6, helped reduce the significantly higher damage in comparison to the strain of *C. albicans* and the control without yeast. Strains M1 and M2 were the ones that allowed the least total damage (mm) on the fruits, although with no significant difference in comparison with M3, M4, M7, and M8 (Table 2). The identification of the 8 killer yeasts obtained using the API 20 C AUX test indicated that they all corresponded to *Candida (Pichia) guilliermondii*, a species in which killer activity has been known for over 20 years (Polonelli *et al.*, 1987), yet it wasn't until 1991 that its use as a biocontrol agent was first

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las hormigas recolectadas, se obtuvieron 8 levaduras cuya actividad killer fue observable por la formación de un halo de inhibición rodeado de un borde azul más oscuro generado por el azul de metileno precipitado como indicador de muerte celular (Figura 1).

A partir de las muestras de tomate, la cepa de *G. candidum* denominada MG2 fue la que generó el mayor daño a los tomates, por lo que se seleccionó como la más agresiva y se empleó en los ensayos de antagonismo en el fruto (Cuadro 1 y Figura 2). La comparación de medias mediante la prueba de Tukey mostró que todas las levaduras salvo M5 y M6, permitieron una reducción del daño significa-

reported (Wisniewski *et al.*, 1991) and its activity has been reported in several occasions (Coelho *et al.*, 2009; de Lima *et al.*, 2013; Papon *et al.*, 2013). The difference between the damage in the presence of the killer yeasts and the treatments without yeast and with *C. albicans* suggest that the phenotype killer in yeasts M1 – M8 is related to its antagonism with *G. candidum*. The differences observed in the damage to the fruit allowed by each yeast could be explained by differences in the type of killer toxin secreted, which influences the affinity to the white area of the susceptible fungus and/or in differences in the expression of the toxin, since they are mostly codified in the nuclear genome (Buzzini *et al.*, 2007). On the other hand, it is possible that these strains present, not only killer toxins, but also, in a variable way, additional previously reported action mechanisms in *C. guilliermondii*, such as the direct



**Figura 1.** Determinación del fenotipo killer de levaduras aisladas a partir de hormigas del género *Atta*. El borde azul indica la muerte celular de la levadura susceptible en el “césped”.

**Figure 1.** Determination of the killer phenotype of yeasts isolated from ants of the genus *Atta*. Blue edges indicate the cellular death of vulnerable yeast in the “lawn”.



**Cuadro 1.** Selección de la cepa más agresiva de *G. candidum*, de un total de 4 repeticiones. Se enlistan los resultados obtenidos por la inoculación del fitopatógeno por picadura en los frutos.

**Table 1.** Selection of the most aggressive *G. candidum* strain, out of a total of 4 repetitions. Results obtained by the inoculation of the pythopathogen by puncturing the fruits are enlisted.

Cepa	No. de picaduras totales infectadas	Diámetro del halo de pudrición (cm)	Ablandamiento <sup>a</sup>
MG1	28	< 1	+
MG2	40	≥ 2	+++
MG3	40	< 1	+
MG4	36	< 1	+
MG5	40	≥ 2	++
MG6	40	≥ 2	++
MG7	40	≤ 2	++
MG13	40	≤ 2	+
MG15	40	≤ 2	++
MG17	12	≤ 2	+

<sup>a</sup> + bajo, ++ medio, +++ alto, determinado visualmente / <sup>a</sup> + low, ++ medium, +++ high, determined visually.

tivamente mayor en comparación a la cepa de *C. albicans* y al control sin levadura. Las cepas M1 y M2 fueron las que permitieron el menor daño neto (mm) en los frutos, aunque sin diferencia significativa en comparación con M3, M4, M7 y M8 (Cuadro 2). La identificación de las 8 levaduras

attack on hyphae and the competition for nutrients (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008; Nantawanit *et al.*, 2010; Scherm *et al.*, 2003). This diversity in mechanisms represents a diverse interval of antagonistic capabilities for the killer yeasts with plant pathogenic fungi, with the possibility



**Figura 2.** Evaluación de los daños ocasionados por diferentes cepas de *G. candidum* en tomate rojo. Se observa la presencia de micelio y ablandamiento en los frutos.

**Figure 2.** Evaluation of the damages caused by different strains of *G. candidum* on red tomatoes. The presence of mycelia and softening of fruits can be observed.

killer obtenida por la prueba API 20 C AUX indicó que todas correspondieron a *Candida (Pichia) guilliermondii*, especie en la cual la actividad killer se conoce desde hace más de 20 años (Polonelli *et al.*, 1987), aunque no fue sino hasta 1991 que se reportó por primera vez su uso como agente de biocontrol (Wisniewski *et al.*, 1991) y su actividad ha sido reportada en diversas ocasiones (Coelho *et al.*, 2009; de Lima *et al.*, 2013; Papon *et al.*, 2013). La diferencia en el daño en presencia de las levaduras killer en comparación a los tratamientos sin levadura y con *C. albicans*, sugieren que el fenotipo killer en las levaduras M1 – M8 está asociado con su antagonismo frente a *G. candidum*. Las diferencias observadas en el daño al fruto permitido por cada levadura podrían explicarse por diferencias en el tipo de toxina killer secretado, que influye en la afinidad al sitio blanco del hongo susceptible y/o en diferencias en la expresión de la toxina, ya que en su mayoría se encuentran codificadas en el genoma nuclear (Buzzini *et al.*, 2007). Por otro lado, es posible que además de las toxinas killer estas cepas presenten, de forma variable, mecanismos de acción adicionales previamente reportados en *C. guilliermondii*, tales como el ataque directo a las hifas y la competencia por nutrientes (Chanchaichaoovivat *et al.*, 2008; Nantawanit *et al.*, 2010; Scherm *et al.*, 2003). Esta diversidad en mecanismos representa un diverso intervalo de capacidades antagónicas para las levaduras killer frente a hongos fitopatógenos, con la posibilidad de que cepas con baja o nula actividad antagónica frente a un género o especie de hongos pueda mostrar una alta actividad antagónica frente a otros, lo que permite opciones amplias de estudio. El empleo de insectos como una fuente no convencional de levaduras resulta atractiva, dada la magnitud de la biodiversidad asociada a estos organismos (Rosa & Gábor, 2006) y a que al menos en algunos casos, las levaduras asociadas representan una relación en

**Cuadro 2.** Valores promedio de la extensión del daño ocasionado por *G. candidum* en los tomates, en cada tratamiento.

**Table 2.** Average values of the extension of the damage caused by *G. candidum* in tomatoes in each treatment.

Tratamiento	Extensión promedio del daño (mm) a las 72h
M1	2.0 a <sup>1</sup>
M2	0.3 a
M3	3.5 ab
M4	5.2 ab
M5	12.7 bc
M6	12.7 bc
M7	8.0 ab
M8	9.0 ab
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	18.8 c
Control sin levadura	21 c

<sup>1</sup> Cada valor representa el promedio de 6 tomates. Valores en cada fila con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) / <sup>1</sup> Each value represents the average of 6 tomatoes. Values in each row with different letters are statistically different ( $p < 0.05$ ).

that strains with little or no antagonistic activity towards a genus or species of fungi can show a high antagonistic activity towards others, which allows wide options of study. The use of insects as a non-conventional source of yeasts is attractive, given the size of the biodiversity related to these organisms (Rosa & Gábor, 2006) and the fact that, at least in some cases, associated yeasts represent a relation in which yeast protects the insect from pathogenic fungi (Rodrigues *et al.*, 2009) and with this comes the possibility that this antagonistic mechanism acts against fungi which can be important as plant pathogens.

Although it is clear that they do not represent a direct competition with the efficiency of chemical fungicides due to the speed at which they act, they are an alternative that would help reduce required doses without increasing the damage to the fruits, resulting in products with less concentrations of

la que la levadura confiere protección al insecto de hongos entomopatógenos (Rodrigues *et al.*, 2009) y con ello, la posibilidad de que este mecanismo antagonista sirva también contra hongos de importancia fitopatogénica.

Si bien es claro que no representan una competencia directa con la eficiencia de los fungicidas químicos debido a la velocidad de su acción, son una alternativa que permitiría disminuir las dosis requeridas sin aumentar el daño a los vegetales, teniendo por resultado productos con menos concentraciones de químicos y con ello una disminución a los riesgos de toxicidad para el ser humano.

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran que es posible aislar levaduras con el fenotipo killer a partir de hormigas del género *Atta* y estas levaduras exhiben un antagonismo variable frente a *G. candidum*. La sola presencia de una levadura no-killer no es suficiente para proteger al tomate del daño causado por *G. candidum*, siendo estadísticamente igual a no inocular ninguna levadura. La cuantificación del daño al fruto, mediante la medición acumulada (mm) del área afectada hacia los lados laterales y el inferior de la lesión, permiten evaluar la protección conferida por la presencia de levaduras antagonistas.

## LITERATURA CITADA

Bautista-Baños S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades de postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagonistas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 8(1):1-6. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81380101>

Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A and Visconti A. 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108(2):204-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.004>

Buzzini P, Turchetti B and Vaughan-martini AE. 2007. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the

chemicals, and therefore a reduction in the risk of toxicity for humans.

## CONCLUSIONS

Results show that it is possible to isolate yeasts with the killer phenotype from ants of the genus *Atta* and these yeasts display variable antagonism towards *G. candidum*. The mere presence of a non-killer yeast is not enough to protect the tomato from the damage caused by *G. candidum*, making it statistically equal to inoculating no yeast. Quantifying the damage to the fruit by accumulated measurement (mm) of the area affected to the sides and the bottom of the lesion help evaluate the protection conferred by the presence of antagonistic yeasts.

End of the English version

state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Research* 7(6):749-760. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00238.x>

Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci M, Bueno OC, Hebling MJ and Middelhoven WJ. 2002. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol (Praha)* 47(3):259-262. <https://dx.doi.org/10.1007/BF02817648>

Chanchaichaovivat A, Panijpan B and Ruenwongsa P. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biological Control* 47:207-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.018>

Coelho AR, Tachi M, Pagnocca FC, Andrade GM, Hoffman FL, Harada K and Hirooka EY. 2009. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives & Contaminants: Part A* 26(1):73-81. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030802227227>

de Lima JR, Gonçalves LR, Brandão LR, Rosa CA and Viana FM. 2013. Isolation, identification, and activity *in vitro* of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology* 53:590-599. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201200049>

Hernández-Montiel L, Holguín-Peña J, López-Aburto M y

- Troyo-Diéguez, E. 2011. Control poscosecha de *Geotrichum citri-aurantii* en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) mediante levaduras marinas y epífitas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792011000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792011000200008&lng=es&nrm=iso)
- Khaled A and Sivasithamparam K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*. 47:25-35. <http://dx.doi.org/10.1007/s10267-005-0268-2>
- Nantawanit N, Chanchaichaovivat A, Panijpan B and Ruenwongsa P. 2010. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biological Control* 52:145–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.011>
- Papon N, Savini V, Lanoue A, Simkin AJ, Crèche J, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M, Courdavault V and Sibirny AA. 2013. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current Genetics* 59(3):73-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-013-0391-0>
- Polonelli LG, Dettori, C and Morace G. 1987. Biotyping of mycelial fungus cultures by the killer system. *European Journal of Epidemiology* 3:237-242. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00149730>
- Ren X, Kong Q, Wang H, Yu t, Tang YJ, Zhou WW and Zheng X. 2012. Control of apple blue mold by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35(5):761-767. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-011-0656-2>
- Robledo-Leal E, Villarreal-Treviño L and González GM. 2012. Occurrence of killer yeasts in isolates of clinical origin. *Tropical Biomedicine* 29(2):297–300. Disponible en línea: [http://www.msptm.org/files/297\\_-\\_300\\_Robledo-Leal\\_E.pdf](http://www.msptm.org/files/297_-_300_Robledo-Leal_E.pdf)
- Rodrigues A, Cable RN, Mueller UG, Bacci M and Pagnocca FC. 2009. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96(3):331-342. <https://dx.doi.org/10.1007/s10482-009-9350-7>
- Rosa MM, Tauk-Tornisielo SM, Rampazzo PE and Ceccato-Antonini SR. 2010. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulasporea globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(8):1491-1502. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0324-8>
- Rosa, C and Gábor, P. 2006. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. First edition. Springer. Berlin, Germany. 580p.
- Ruiz-Martínez J, Vicente AA, Montáñez-Saenz, JC, Rodríguez-Herrera R y Aguilar González, CN. 2012. Un tesoro percedero en México: el tomate, tecnologías para prolongar su vida de anaquel. *Investigación y Ciencia* 54, 42-48. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67424408008>
- Santos A, Marquina D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* 150(Pt 8):2527-2534. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27071-0>
- Santos A, Sánchez A and Marquina D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159(4):331-338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2004.07.001>
- Scherm B, Ortu G, Muzzu A, Budroni M, Arras G and Migheli Q. 2003. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology* 85:205–213. Disponible en línea: <http://www.jstor.org/stable/41998150>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. Cierre de la producción agrícola por estado. (consulta: 28 junio 2016). Disponible en línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Torres-Mireles S. 2013. Actividad antagonista de levaduras frente a hongos en poscosecha. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. Second edition. CRC Press. Boca Raton, Fla. 486p.
- Wisniewski M, Biles C, Droby S, McLaughlin R, Wilson C and Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:245–258. [http://dx.doi.org/10.1016/0885-5765\(91\)90033-e](http://dx.doi.org/10.1016/0885-5765(91)90033-e)