

## LEVADURAS NATIVAS COMO CONTROLADORES DE ENFERMEDADES POSTCOSECHA DE FRUTAS EN URUGUAY

Garmendia, G.<sup>1</sup>; Garat, F.<sup>1</sup>; Silvera, E.<sup>2</sup>;  
de Aurrecochea, I.<sup>3</sup>; Vero, S.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Este trabajo plantea la búsqueda, selección, identificación y caracterización de levaduras nativas para el control biológico de enfermedades en postcosecha de manzanas y naranjas. En trabajos previos (Pianzola *et al.*, 2004; Wozniak, 2003) se han caracterizado y seleccionado según su agresividad y resistencia a fungicidas, cepas nativas de patógenos postcosecha de estos frutos. Contra dichas cepas es que se han realizado los ensayos de biocontrol en la búsqueda de antagonistas efectivos que disminuyan la aparición de síntomas en estrategias preventivas. Se han identificado tres cepas nativas de levaduras capaces de controlar el desarrollo de podredumbres causadas por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzanas Red Delicious en almacenamiento a 0-1°C en atmósfera normal. A su vez dos de estas cepas son capaces también de controlar el desarrollo de *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum* en naranjas Washington Navel almacenadas a 5°C. Los microorganismos antagonistas son incapaces de crecer a temperaturas mayores de 34°C y por lo tanto no sería posible que colonizaran el cuerpo humano. Se plantea que el mecanismo de acción principal sería la competencia por nutrientes o espacio ya que los tres antagonistas son muy buenos colonizadores de heridas de fruta. Sin embargo se demostró que una de las cepas produce enzimas capaces de degradar paredes de hongos.

**PALABRAS CLAVE:** control biológico, levaduras, postcosecha.

### SUMMARY

## URUGAYAN NATIVE YEASTS AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF POSTHARVEST DISEASES OF FRUITS

This work is focused to the selection, identification and characterization of native yeasts for the biological control of postharvest diseases of apples and oranges. In previous work (Pianzola *et al.*, 2004; Wozniak, 2003) native strains of pathogens were selected based on aggressiveness and fungicide resistance. Biological control assays for antagonists selection were performed against those selected pathogenic strains. Based on the selection results three native strains were identified. They were able to control postharvest rots caused by *P. expansum* and *Botrytis cinerea* in Red Delicious apples stored at 0-1°C. Two of them were also able to control the development of rots caused by *P. digitatum* and *P. italicum* in Washington Navel oranges at 5°C. The selected antagonists were not able to grow at temperatures higher than 34°C, so it would not be probable that they could colonize human body. It is supposed that nutrient or space competition is the main mechanism by which the antagonists act, since it was demonstrated that they could colonize fruit wounds effectively. However one of the antagonists was also able to produce enzymes that can hydrolyze pathogen cell walls.

**KEY WORDS:** biological control, yeast, postharvest.

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología. Facultad de Química. Universidad de la República. Gral Flores 2124.

<sup>2</sup>Unidad de Fitopatología. Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Garzón 780.

<sup>3</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Garzón 780.

## INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas son susceptibles de ser atacadas por diferentes patógenos luego de cosechadas. El control de estas enfermedades se ha basado históricamente en la aplicación de fungicidas de síntesis química. Sin embargo, en la actualidad, es muy reducido el número de principios activos efectivos autorizados para su uso en esta etapa, debido principalmente a consideraciones toxicológicas. Esto ha generado dificultades a la hora de instrumentar estrategias de manejo anti-resistencia (Brent & Hollomon, 1998). Se ha confirmado la presencia de patógenos resistentes a los fungicidas más comúnmente utilizados (Wozniak, 2003; Monteiro *et al.*, 1997; Delgado & Pérez, 1998; Eckert, 1987). A su vez se ha incrementado la conciencia pública acerca de los riesgos a la salud y al medio ambiente que puede traer consigo el uso de fungicidas. Un nuevo concepto de calidad ha surgido. Los consumidores ya no consideran solamente la estética del producto, sino que exigen que el mismo esté libre de residuos tóxicos y que haya sido producido siguiendo prácticas sustentables y respetuosas del medio ambiente. Para poder dar respuesta a estas demandas se desarrollaron en diferentes países programas de Producción Integrada (PI) y de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Estos Programas, mediante la integración de los agricultores con los servicios de extensión y los centros de investigación, implementan la producción comercial de frutas y hortalizas de alta calidad minimizando el uso de plaguicidas y sus efectos secundarios (Mondino, 2003; Núñez *et al.*, 2003; Giantini 2003). En este contexto, el control biológico de enfermedades de postcosecha ha demostrado ser una alternativa promisoriosa factible de ser incorporada en Sistemas de Manejo Integrado.

En la actualidad existen por lo menos dos formulaciones comerciales a base de levaduras utilizadas para el control biológico de enfermedades en postcosecha de frutas. Ellas son Aspire basado en *Candida oleophila* producida en Estados Unidos y Yield Plus basado en *Cryptococcus albidus* producida en Sudáfrica. Sin embargo, el desarrollo de una formulación nacional basada en cepas autóctonas seleccionadas por su capacidad de controlar patógenos nativos altamente agresivos sería importante. La misma estaría basada en recursos genéticos propios y podría ser desarrollada por industrias nacionales, disminuyendo la dependencia tecnológica en este tipo de insumos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fruta

Se utilizaron manzanas variedad Red Deliciosos y naranjas Washington Navel sin tratamientos químicos luego de la cosecha.

### Patógenos

Para realizar los ensayos de control biológico se utilizaron cepas de patógenos previamente identificados y seleccionados por su alta agresividad y por resistencia a fungicidas (Pianzola, 2004; Wozniak, 2003).

En el caso de manzanas se utilizaron cepas nativas de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* y en el caso de naranjas, cepas nativas de *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*. Las cepas se mantuvieron en Potato Dextrose Agar (PDA) a 5°C.

### Caracterización de flora superficial de la fruta

Los antagonistas se aislaron de la superficie de frutas sanas. En el caso de las manzanas se utilizaron 20 frutos que habían estado almacenados durante 6 meses a 0°C en atmósfera convencional. En el caso de citrus se utilizaron 20 limones almacenados durante 1 mes a 5°C. Cada fruto se sumergió en suero fisiológico estéril y se agitó en agitador a 130 rpm por 10 minutos. Cien microlitros de la suspensión resultante y dos diluciones seriadas de la misma, se plaqueron en superficie en PDA con cloranfenicol (25 µg ml<sup>-1</sup>) y Trypticase Soy Agar. Las placas se incubaron a 25°C durante 5 días. Se seleccionaron las colonias con diferentes características macroscópicas y se reaislaron en PDA o TSA según correspondiera. En el caso de las manzanas, los aislamientos predominantes se identificaron a nivel de género. Para la identificación de hongos filamentosos se utilizó la clave de Pitt (1999). En el caso de levaduras y bacterias se utilizaron la clave de Kurtzman & Fell (1998) y el Manual de Bergey (Krieg & Holt, 1984), respectivamente.

### Selección de antagonistas

Se realizó una selección en dos pasos. En un primer paso se cultivaron todos los aislamientos en PDA o TSA según correspondiera a 5°C durante 15 días. Aquellos microorganismos capaces de crecer en esas condiciones

se seleccionaron para continuar el trabajo. El segundo paso de selección consistió en realizar ensayos de control biológico sobre fruto a la temperatura de almacenamiento correspondiente a cada tipo de fruto. Los microorganismos aislados de manzana fueron probados en primera instancia en manzana contra las cepas seleccionadas de *P. expansum* y *Botrytis cinerea*, mientras que los microorganismos aislados de limones se ensayaron en naranja contra las cepas seleccionadas de *P. italicum* y *P. digitatum*.

### Ensayos de biocontrol

Para la realización de los ensayos de biocontrol se utilizaron frutas sanas, recién cosechadas. Las frutas se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se realizaron 5 heridas en cada fruta en la zona ecuatorial. Cuatro heridas se inocularon con 10 µl de una suspensión de antagonistas de concentración 10<sup>7</sup> ufc mL<sup>-1</sup> y la herida restante se inoculó con agua destilada estéril. Luego de 24 horas a temperatura de incubación (0°C en el caso de las manzanas y 5°C en el caso de las naranjas) cada herida se inoculó con 10 µl de suspensión de patógenos de concentración 10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup>. La fruta se almacenó durante 1 mes a 5°C en el caso de las naranjas y durante tres meses a 0°C en el caso de las manzanas. Se realizaron 25 repeticiones por tratamiento. Una vez finalizado el período de incubación se examinaron todas las heridas en busca de síntomas de enfermedad; se midieron los diámetros de las lesiones (severidad) y se calcularon los porcentajes de incidencia y severidad, los cuales se definieron como:

$$\% \text{ incidencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ heridas con enfermedad} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ heridas totales}}$$

$$\% \text{ severidad} = \frac{\text{Promedio diámetro de lesión en heridas con antagonista} \times 100}{\text{Promedio diámetro de lesión en heridas control}}$$

Para analizar la variable severidad se consideraron sólo las heridas en las cuales se presentó la enfermedad. El análisis se realizó con el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS V 8. La variable incidencia se analizó con el procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS V 8, según un modelo lineal generalizado, considerando que la variable tiene distribución binomial. Se contrastaron los agentes biocontroladores contra el control.

Los microorganismos capaces de controlar la incidencia de enfermedad, en un 70% o más, fueron seleccionados. En segunda instancia con los aislamientos seleccionados se realizaron ensayos confirmatorios utilizando por lo menos 75 repeticiones por tratamiento.

Los microorganismos seleccionados como biocontroladores se identificaron a nivel de especie según clave de Kurtzman & Fell (1998). Su identidad fue corroborada mediante amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8SrDNA-ITS2 con posterior comparación de la secuencia con secuencias depositadas en GenBank (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando el servidor BLAST del National Centre of Biotechnology Information (NCBI). La amplificación de la región mencionada se realizó a partir del ADN de las cepas obtenido mediante purificación según protocolo de Schena *et al.* (1999). Los amplicones se obtuvieron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) sintetizados por BioSynthesis Company (Lewisville, TX). La reacción de PCR se realizó en un equipo termociclador automático Perkin Elmer, modelo 2400, utilizando el kit de amplificación Ready-to-Go (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Para desnaturalizar el ADN, la mezcla de reacción se calentó 2 minutos a 94°C, y se continuó con 35 ciclos seguidos de una etapa final de extensión de 10 minutos a 71°C. Cada ciclo consistió en las siguientes etapas: desnaturalización de 40 segundos a 95°C, hibridación de 1 minuto a 54°C y extensión de 2 minutos a 72°C. La secuencia de los productos de PCR purificados fueron realizadas por la Compañía MacroGen Inc. (Corea).

### Identificación de las cepas seleccionadas

Para cada una de las cepas seleccionadas se determinó la temperatura óptima de crecimiento. Para ello se realizaron curvas de crecimiento a diferentes temperaturas (5°C, 25°C, 30°C y 37°C) en medio YNB + 2% glucosa con agitación constante (150 rpm) con un inóculo inicial de 1x10<sup>5</sup> ufc /mL. A partir de cada curva de crecimiento se determinó la velocidad de crecimiento de la fase exponencial y se graficaron las diferentes velocidades en función de la temperatura, para cada antagonista. Se determinó temperatura óptima y máxima de crecimiento, definidas como la temperatura a la cual la velocidad de crecimiento (µ) es máxima y la temperatura por encima de la cual no se observa crecimiento.

### Caracterización de las cepas seleccionadas

Se determinó la sensibilidad de los microorganismos a los fungicidas utilizados comercialmente para evaluar la posibilidad de combinarlos con cantidades reducidas de los fungicidas dentro de un esquema de Producción Integrada. Para ello se determinó la concentración inhibitoria

mínima (CIM) de cada fungicida para cada antagonista. El ensayo se realizó utilizando placas de PDA con concentraciones crecientes de los fungicidas. En cada placa se inocularon en forma puntual, 10  $\mu$ L de suspensiones de  $10^6$  conidias/ml de los antagonistas seleccionados. Se incubaron a 25°C durante 72 horas y se observó si había crecimiento macroscópico. La CIM se definió como la mínima concentración de fungicida capaz de inhibir el crecimiento de los antagonistas. Las concentraciones de fungicida ensayadas fueron las siguientes: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 ppm de imazalil; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 ppm de iprodione y 8, 16, 128, 256 y 512 ppm de tiabendazol. Las concentraciones fueron seleccionadas basándose en los resultados obtenidos con las cepas nativas de los diferentes patógenos aislados previamente (Pianzola *et al.*, 2005; Wozniak, 2003). Se determinó la sensibilidad a quitosano de los antagonistas seleccionados. Para ello se determinó la CIM de quitosano capaz de inhibir a los antagonistas. El ensayo se realizó en medio líquido, en tubos conteniendo 5 mL de YNB + 2% de glucosa con concentraciones crecientes de cloruro de quitosano (0.25 %, 0.5 %, 1 %, 2 %). Cada tubo se inoculó con 10  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^7$  ufc / ml de cada antagonista. Los tubos se incubaron a 25°C durante 3 días. Se evaluó crecimiento como aparición de turbidez.

### Mecanismos de acción. Cultivos duales

Para estudiar la producción de metabolitos antifúngicos difusibles por parte de las cepas antagonistas, se realizaron cultivos duales de los antagonistas y los patógenos en PDA y en Agar Jugo de Manzana (Vero *et al.*, 2002).

Se colocó un disco de micelio de cada hongo patógeno en el centro de la placa y luego se sembró por estría a 3 cm de distancia, la cepa antagonista. Como control se utilizaron placas sembradas solamente con los patógenos. Se comparó visualmente y se determinó inhibición del crecimiento de los patógenos por parte de los antagonistas comparado con las placas control.

### Inhibición de la germinación

Se estudió si los microorganismos antagonistas producían algún efecto en la germinación de las conidias de las cepas nativas de patógenos en estudio. El ensayo se realizó en tubos conteniendo 5 mL de jugo de manzana estéril los cuales fueron inoculados con 100  $\mu$ l de suspensión de la cepa antagonista en suero fisiológico a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufcml<sup>-1</sup> y 100  $\mu$ l de suspensión de conidias del patógeno a la misma concentración.

Como control se empleó medio estéril inoculado solamente con la suspensión de conidias. Los tubos se incu-

baron entre 12-18 horas a 25° C. Las conidias se observaron microscópicamente, y se evaluó el porcentaje de germinación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### Colonización de heridas

Se estudió la capacidad de los antagonistas seleccionados de crecer y sobrevivir en el sitio de infección (heridas) en determinadas condiciones de temperatura y tiempo. Para ello se realizaron heridas en frutas sanas del modo ya descrito en los ensayos de biocontrol. Cada herida fue inoculada con 10  $\mu$ l de una suspensión del antagonista de  $1 \times 10^7$  ufc / mL.

La fruta se almacenó en cámara fría a 1° C durante 3 meses. El porcentaje de humedad se mantuvo elevado por el agregado continuo de agua sobre el piso de la bandeja. Se utilizaron 5 manzanas por tratamiento, cada manzana presentaba 6 heridas y cada tratamiento tenía 3 repeticiones. A lo largo del tiempo se tomaron muestras de las heridas. Para cada tiempo se extrajeron 3 heridas de 3 manzanas diferentes. Las heridas se retiraron del tejido circundante con bisturí, se colocaron en tubos con suero fisiológico estéril por 5 ml, y se homogeneizaron en Vortex durante 1 minuto. Se realizaron las diluciones correspondientes y se plaquearon en PDA, incubándose por 48 horas a 25° C.

Se determinó el número de microorganismos viables como unidades formadoras de colonia (ufc) por herida, construyéndose curvas de crecimiento para cada antagonista. En cada caso, se determinó la curva de mejor ajuste con sus respectivos errores (intervalo de confianza 95 %), para todos los puntos menos el inicial. Cada curva se trazó utilizando los promedios de cada repetición. El tiempo cero representa la cantidad de microorganismos con la cual se inoculó cada herida.

### Producción de enzimas líticas

Se estudió la producción de enzimas (quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas) capaces de hidrolizar las paredes de los hongos patógenos. Los microorganismos seleccionados se hicieron crecer en YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco) suplementado con paredes (1mg/mL) de *Penicillium expansum* como única fuente de carbono. Se incubaron a 25° C durante 15 días. El sobrenadante obtenido se filtró por filtro de 0,22  $\mu$ m. En el filtrado se ensayaron las actividades enzimáticas.

Las paredes de hongo para suplementar el medio se prepararon según técnica de Rey (1998). La determinación de la actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa se realizó utilizando laminarina (Sigma, St. Louis, MO) como sustrato según técnica de Castoria *et al.* (1997), determinándose luego la cantidad de azúcares reductores liberados por el método de

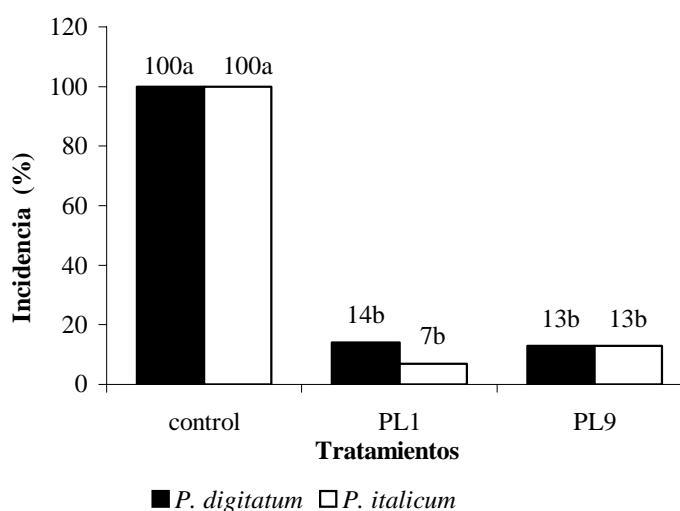
Nelson y Somogyi (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). Se definió una unidad de enzima como los micromoles de azúcares reductores liberados por ml por minuto. La actividad exoquitinasa se determinó utilizando p-nitrofenil-N-Acetil  $\beta$ -D-glucosamina (Sigma, St. Louis, MO) como sustrato siguiendo técnica descrita por Mahadevan y Crawford (1997). Luego de la incubación de la enzima con el sustrato durante 24 horas a 25°C, se determinó por espectrofotometría la cantidad de p-nitrofenol liberado. Se definió una unidad de enzima como los micromoles de p-nitrofenol liberados por ml de muestra por minuto de reacción.

## RESULTADOS

La cantidad de microorganismos en la superficie de frutos, tanto manzanas como limones fue del orden de  $10^6$  ufc por fruto. Se recuperaron en forma predominante levaduras y bacterias, pero también hongos filamentosos de los cuales la mayoría fueron identificados dentro del género *Cladosporium*. En el caso de manzanas, la especie bacteriana ampliamente predominante fue *Enterobacter agglomerans*, mientras que la mayoría de las levaduras pertenecía a los géneros *Aureobasidium*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*.

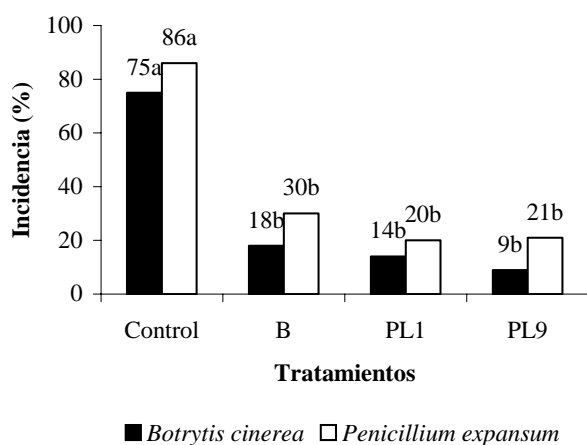
Se trabajó con 20 aislamientos en el caso de manzanas y 25 aislamientos en el caso de naranjas. En ambos casos, aproximadamente el 80% de los aislamientos fueron capaces de crecer a bajas temperaturas. De los aislamientos seleccionados en manzana solamente uno fue capaz de controlar en más de 70% la incidencia de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. En el caso de las naranjas se seleccionaron 2 aislamientos. Los tres aislamientos selec-

cionados resultaron levaduras. El aislamiento seleccionado en manzana (cepa B) fue identificado como *Aureobasidium pullulans* y su identidad fue corroborada por comparación de secuencias encontrándose un 100% de similitud con secuencias de cepas pertenecientes a esa especie depositadas en el Genbank. Los aislamientos seleccionados en limones (cepas PL9 y PL1) fueron identificados como *Leucosporidium scottii* y *Cystofilobasidium infirmominiatum*. Las secuencias de la región ITS1-ITS2 presentaron un 100% y un 99% de similitud con secuencias de cepas pertenecientes a esas especies depositadas en el Genbank. La Figura 1 muestra los resultados del ensayo de biocontrol, utilizando 75 repeticiones, realizado en naranjas utilizando como agentes biocontroladores las cepas PL1 y PL9. Las cepas PL1 y PL9 resultaron también efectivas como agentes de biocontrol de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzana. Sin embargo la cepa B seleccionada en manzana no resultó buen antagonista de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en naranja. La Figura 2 muestra el resultado del ensayo de biocontrol en manzana utilizando como antagonistas dichas cepas y la cepa B aislada de manzana. Se puede observar que las cepas aisladas de limones lograron proteger también las heridas de manzana del ataque de patógenos poscosecha, resultando tan eficientes como la cepa aislada de manzana. La Figura 3 muestra la severidad de la enfermedad en las heridas de manzana protegidas por los diferentes antagonistas en comparación con el control, registradas en el mismo ensayo. Se puede ver que en todos los casos la severidad de los síntomas causados por ambos patógenos fue significativamente menor en las heridas protegidas por los antagonistas.



**Figura 1.** Incidencia de podredumbre causada por *P. digitatum* o *P. italicum* en heridas de naranja control y protegidas por las cepas antagonistas PL1 y PL9. Letras diferentes indican diferencias significativas con el control ( $P=0.05$ ).

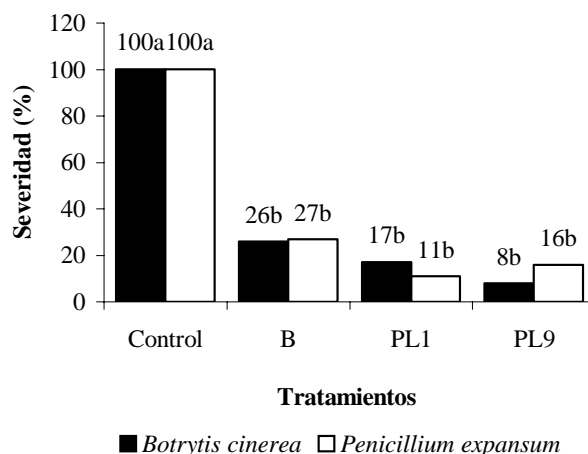




**Figura 2.** Incidencia de podredumbre causada por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en heridas de manzana control y protegidas por las cepas antagonistas B, PL1 y PL9. Letras diferentes indican diferencias significativas con el control ( $P=0.05$ ).

### Caracterización de antagonistas

La temperatura óptima de crecimiento de todos los antagonistas seleccionados fue de 25°C, mientras que la temperatura máxima de crecimiento en los tres casos fue de aproximadamente 34°C. Por lo tanto ninguno de los tres antagonistas crece a temperaturas mayores de 34°C, observándose muerte microbiana cuando fueron incubados a 37°C. Los tres antagonistas fueron capaces de crecer en presencia de 512 ppm de tiabendazol e iprodione. Con respecto al imazalil la cepa B mostró una concentración inhibitoria mínima de 1ppm, mientras que los otros dos antagonistas (cepas PL1 y PL9) fueron capaces de crecer en presencia de la concentración máxima ensayada de



**Figura 3.** Severidad de la podredumbre ocasionada por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en heridas de manzana control y protegidas por las cepas antagonistas B, PL1 y PL9. Letras diferentes indican diferencias significativas con el control ( $P=0.05$ ).

imazalil: 2ppm. Estas dos cepas a su vez no crecieron en presencia de quitosano, mientras que la cepa B presentó una CIM a quitosano de 2 %.

### Mecanismos de acción

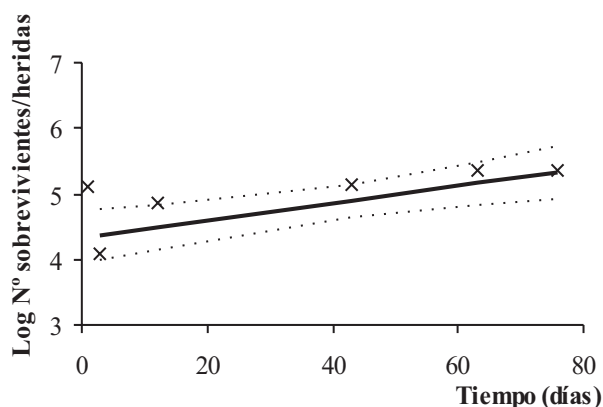
Ninguna de las cepas de antagonistas seleccionadas presentó inhibición de los patógenos en cultivos duales, por lo tanto no se constató la producción de metabolitos antifúngicos difusibles para ninguna de las cepas, en las condiciones del ensayo.

La cepa B (*Aureobasidium pullulans*) fue capaz de inhibir la germinación de conidias de *P.expansum*. El cuadro 1 muestra el porcentaje de conidias germinadas en el control y en presencia de la cepa antagonista.

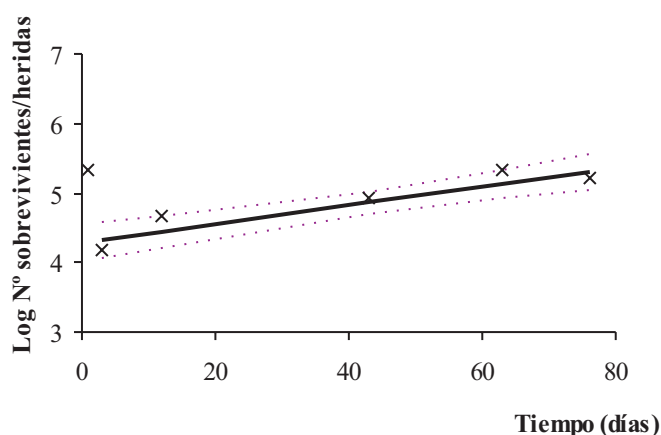
**Cuadro 1.** Porcentaje de conidias germinadas en presencia y ausencia (control) de la cepa antagonista B

Tratamiento	% conidias germinadas (promedio)
Control	71 %
Ensayo 1	30 %
Ensayo 2	25 %
Ensayo 3	25 %

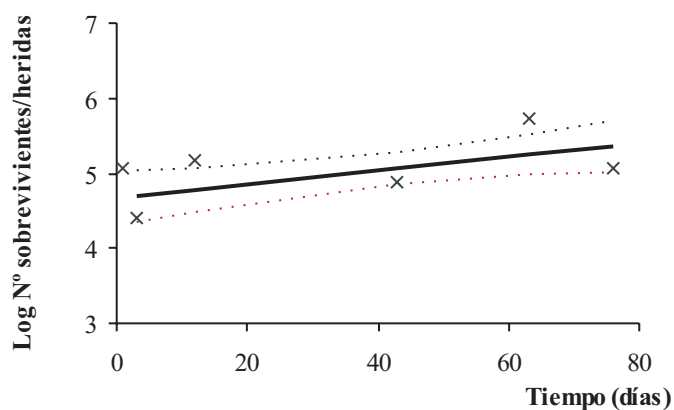
Las tres cepas antagonistas seleccionadas fueron capaces de colonizar heridas de manzana, manteniéndose viables durante el período del ensayo (3 meses) en condiciones de almacenamiento (0°C-1°C). Las Figuras 4, 5 y 6 muestran la variación de la población de cada uno de los antagonistas en las heridas de manzanas. En los tres casos la población se mantiene viable dentro del orden de inoculación. Se demostró que la cepa B (*Aureobasidium pullulans*) es capaz de crecer en presencia de paredes del patógeno (*P. expansum*) como única fuente de carbono y de producir enzimas (quitinasas y glucanasas) que degradan paredes fúngicas. Se pudo detectar la producción de 0,47UE de exoquitinasa y 63 UE de  $\beta$ -1,3 glucanasa. Los otros dos antagonistas seleccionados no crecieron en las condiciones del ensayo.



**Figura 4.** Curva de crecimiento del antagonista PL1 en heridas de manzana a 1°C.



**Figura 5.** Curva de crecimiento del antagonista B en heridas de manzana a 1°C.



**Figura 6.** Curva de crecimiento del antagonista PL9 en heridas de manzana a 1°C

## DISCUSIÓN

El método de selección de antagonistas resultó efectivo. La primera selección por frío redujo el número de aislamientos a probar en ensayos de control biológico. Esta estrategia facilitó el trabajo, ya que en cada ensayo de biocontrol se deben realizar por lo menos 20 repeticiones para tener resultados analizables estadísticamente.

Se seleccionaron tres cepas autóctonas capaces de controlar la aparición de síntomas en heridas de manzana inoculadas con cepas agresivas de *P. expansum* y *Botrytis cinerea*. Dos de las cepas seleccionadas resultaron también buenos antagonistas de *P. digitatum* y *P. italicum* en heridas de naranja, llegándose a niveles de protección mayores o iguales al 80%. Cepas de *Aureobasidium*

*pullulans* ya han sido identificadas como agentes de control biológico en postcosecha de frutas (Ippolito & Nigro, 2000). Sin embargo no existen antecedentes de cepas de *Leucosporidium scotii* y *Cystofilobasidium infirmominiatum* como controladores biológicos. Cepas de estas especies han sido aisladas de ambientes fríos como el suelo de la Antártida y no se han descrito como patógenos humanos (Kurtzman & Fell, 1998). Por otra parte, es importante destacar que los tres antagonistas seleccionados son incapaces de crecer a temperaturas mayores de 34°C por lo cual serían incapaces de colonizar el cuerpo humano.

Las tres cepas seleccionadas fueron capaces de crecer en presencia de tres de los fungicidas más utilizados en nuestro país para el tratamiento postcosecha de citrus y manzanas. Los niveles de sensibilidad de las cepas fue-

ron iguales al de las cepas de patógenos que resultaron resistentes a los fungicidas en tratamiento sobre fruta (Wozniak, 2003). De acuerdo a estos resultados sería posible combinar el uso de los antagonistas con menores dosis de fungicidas en estrategias de manejo integrado. La cepa de *Aureobasidium pullulans* fue capaz de crecer en presencia de quitosano al 1%. Esto haría factible una aplicación conjunta de dicha cepa con quitosano de forma de potenciar la acción controladora.

Los estudios de los mecanismos de acción demostraron que las tres cepas eran capaces de colonizar las heridas de manzanas manteniéndose los niveles de la población inicial durante tres meses. Estos resultados sugieren que las heridas estarían protegidas por lo menos durante ese período de tiempo, ya que el número de antagonistas presentes es el necesario como para que ocurra el biocontrol. En los tres casos se observa una disminución inicial en el número de microorganismos inoculados en las heridas. Esta disminución es muy marcada en la cepa B y menos en las otras dos cepas antagonistas. Esto puede deberse según Castoria *et al.* (2003) a la presencia de especies reactivas del oxígeno (peróxido e ion superóxido) generadas como reacción del fruto a la aparición de una herida. El diferente comportamiento de las distintas cepas inoculadas podría estar en relación con su tolerancia al estrés oxidativo.

La acción biocontroladora de la cepa de *Aureobasidium pullulans* podría deberse además a su capacidad de producir enzimas capaces de hidrolizar paredes de hongos. Esta cepa además, inhibió la germinación de conidias de *P. expansum* en jugo de manzana. Ninguno de los antagonistas seleccionados produjo sustancias antifúngicas capaces de difundir e inhibir el crecimiento de los patógenos en cultivo dual, en ninguno de los medios ensayados. Las sustancias antifúngicas son metabolitos secundarios por lo que su producción es muy dependiente de las condiciones en que se encuentre creciendo el organismo productor. La no producción de dichas sustancias en PDA o Agar Jugo de Manzana no asegura que las mismas no se produzcan en las heridas de fruta.

Para continuar este trabajo las cepas antagonistas serán combinadas con otros tipos de medidas de control que lleven a una disminución del uso de fungicidas de síntesis química. Es el primer paso hacia una formulación que podría ser desarrollada completamente en nuestro país.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por Lindbergh Foundation (USA), International Foundation for Science (Suecia) y CSIC (Uruguay).

## BIBLIOGRAFÍA

- BRENT, K.J. & HOLLOMON, D.W. 1998. Fungicide resistance: The assesment of risk. FRAC Monograph N° 2. GCPF. Brussels
- CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G. & DE CICCIO, V. 1997.  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 12: 293-300.
- CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; DE CURTIS, F. & DE CICCIO, V. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible mechanism of action. *Phytopathology*. 93: 564- 572.
- DELGADO, R. & PÉREZ, G. 1998. Caracterización biológica de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Penicillium ulaiense* en postcosecha de citrus. Tesis de grado, Universidad de la República, Facultad de Agronomía. T2615.
- ECKERT, J.W. 1987. *Penicillium digitatum* bitypes with reduced sensitivity to imazalil. *Phytopathology*. 77: 1728.
- GIANTINI, M.A. 2003. Visión mundial de las frutas con calidad diferenciada: Producción Integrada y Orgánica. *Fruticultura Profesional* N° 136 Especial:7-20.
- IPPOLITO, A. & NIGRO, F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19:715-723.
- KRIEG, N.R & HOLT, J.G. (eds.). 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- KURTZMAN, P. & FELL, J. (eds.). 1999. *The yeast: A Taxonomy study*. 4 th. Ed. Elsevier, Amsterdam.
- MAHADEVAN, B. & CRAWFORD, D.L. 1996. Purification of chitinase from the biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 489-493.
- MONDINO, P. 2003 Reducción del uso de plaguicidas: un elemento clave en la producción integrada. Pag 175- 182. En: "Producción Integrada en Uruguay. Claves de un sistema amigable con el medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad". ISBN - 9974-7794-0-5. Montevideo 258p.
- MONTEIRO, C.; REBELLATO, L. & DÍAZ, L. 1997. Servicio de detección de resistencia a fungicidas en *Penicillium* spp en plantas de empaque de citrus de Uruguay. Período 1984 - 1996. En Congreso Latinoamericano de Fitopatología 1997, Montevideo, Uruguay. p 110.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. 153: 375-381.



- NUÑEZ, S.; LEONI, C.; DE LUCCA, R.; MERINO, N.; BUSCHIAZZO, M.; CARBONE, F.; SCATONI, B. & MONDINO, P. 2003. Programa de Producción Integrada Frutícola, Directivas Zona Sur-Uruguay.
- PIANZZOLA, M.J., MOSCATELLI, M. & VERO, S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease* 88: 23-28.
- PITT, J.I. & HOCKING A.D. 1999. *Fungi and food spoilage*. Aspen Publishers, Inc., Maryland, USA.
- SCHENA, L.; FINETTI SIALER, M. & GALLITELLI, D. 2001. Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease* 86:54-60.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry*. 195:19-23.
- REY, M. 1998. Mejoramiento de cepas de *Trichoderma* para su utilización como agentes de control biológico. Tesis Doctoral. Sevilla. España.
- VERO, S.; MONDINO, P.; BURGUEÑO, J.; SOUBES, M. & WISNIEWSKI, M. 2002. Characterization of Biocontrol Activity of Two Yeast Strains from Uruguay Against Blue Mold of Apple. *Postharvest Biology and Technology*. 26, 91-98.
- WOZNIAK, A. 2003. Caracterización de los patógenos postcosecha de citrus y perspectivas para el control biológico de los mismos. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de la República, Facultad de Ciencias.