



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Selección de levaduras nativas de uva con capacidad antagónica frente a *Botrytis cinerea*

Valentina Martín Russo

Tutor: MSc. Karina Medina
Cotutor: Dr. Francisco Carrau

Tribunal:
Dra. Carina Gaggero
Dra. Silvana Vero

Lugar de Realización: Sección Enología
Departamento de Alimentos
Facultad de Química

Mayo 2011

Índice

Resumen	4
Introducción	5
Situación vitivinícola nacional	5
Enfermedades de la vid	7
Podredumbre gris	7
Mecanismos utilizados actualmente para el control de enfermedades	8
Control de <i>Botrytis cinerea</i>	9
Funguicidas más utilizados y momentos de aplicación	10
Control biológico	12
Agentes antagonistas	13
Mecanismos de acción de los antagonistas	17
Comercialización de productos biocontroladores	18
Origen de las levaduras de la uva	19
Compatibilidad de levaduras antagonistas en el proceso de vinificación	21
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Materiales y Métodos	23
Aislamiento de levaduras nativas	23
Diferenciación de los microorganismos	24
Preparación de levaduras para el test de antagonismo in vitro	25
Preparación del inóculo de esporas de <i>Botrytis cinerea</i> .	25
Determinación de capacidad antagónica in vitro	25
Compatibilidad de las cepas antagónicas seleccionadas con el proceso de vinificación de uvas	26
Actividad β -glucosidasa	27
Resultados	28
Aislamiento y diferenciación de los microorganismos	28
Compatibilidad de las cepas antagónicas seleccionadas para el proceso de vinificación de uvas	30
Capacidad Fermentativa	30
Análisis Sensorial	31
Actividad β -glucosidasa	32
Determinación de capacidad antagónica in vitro	33
Selección de levaduras	35

Discusión	38
Conclusión	42
Bibliografía	43

Resumen

El fitopatógeno *Botrytis cinerea* es el hongo filamentoso, causante de la enfermedad podredumbre gris o *Botrytis*. Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas en la cantidad y calidad de la uva y puede afectar todos los órganos de la vid.

Para evitar las distintas enfermedades que generan diversos hongos, se ha recurrido a prácticas culturales en el campo y a cuidadosas prácticas de manejo de los frutos en la cosecha. Sin embargo, estas medidas no han sido suficientes para combatir enfermedades debido al modo de dispersión que presentan las esporas de los fitopatógenos. Debido a esto, se ha recurrido al uso de fungicidas sintéticos (benzimidazoles y dicarboximidias), que ciertamente han disminuido la incidencia de las enfermedades, pero a su vez, como consecuencia de su uso se han seleccionado cepas de patógenos resistentes a fungicidas.

El uso de estos fungicidas también es cuestionable por razones toxicológicas ya que la mayoría de los compuestos son oncogénicos. También, estos fungicidas pueden interferir en la calidad del vino si no se controla su aplicación.

Por todo esto, surge el control biológico como alternativa al manejo de las enfermedades.

Este trabajo de pasantía consistió en el aislamiento de levaduras de uvas de distintas variedades de *Vitis viníferas*, en la vendimia 2009; y el estudio *in vitro* de la capacidad antagónica de esas levaduras, junto con otras pertenecientes a la colección de la Sección Enología, frente al hongo patógeno *Botrytis cinerea*.

Introducción

Situación vitivinícola nacional

En lo que refiere específicamente a la producción vitivinícola nacional, nos encontramos con una superficie actual de 8001 hectáreas de viñedos las cuales representan aproximadamente el 48% de la producción frutícola nacional comprendida por un estimado de 16800 hectáreas. La producción anual ronda los 100.000 toneladas de uvas; provenientes de unos 2000 productores en su mayoría medianos y pequeños (INAVI, comunicación personal 2010). El sector frutícola nuclea aproximadamente un 78% de productores familiares de pequeña a mediana escala, predominando los predios menores a 5 hectáreas (Censo Frutícola – MGAP, 2005).

La cadena vitivinícola ha tenido un notable desarrollo en los últimos años y es altamente demandante de tecnología fundamentalmente por quienes se dedican a la producción de vinos finos.

Tanto en Uruguay como en el resto del mundo, las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos son causantes de las mayores pérdidas de frutas tanto en el campo como en la poscosecha.

La producción vitícola uruguaya en particular, se ve muy afectada por el moho gris, ocasionado por *Botrytis cinerea*, que constituye una de las enfermedades fúngicas más importantes de la vid junto con Mildew o Peronospora, causada por el hongo *Plasmopara viticola* enfermedad capaz de atacar todos los órganos verdes de la vid.

Botrytis cinerea causa pérdidas tanto en la cantidad como en la calidad de la uva.

El desarrollo de la misma se ve favorecido en nuestro territorio debido a las condiciones de humedad y temperatura, sobre todo en época de vendimia donde las mismas alcanzan niveles óptimos para el crecimiento del fitopatógeno de la vid así como de otros cultivos. En efecto, en Uruguay año tras año se observa en menor o mayor medida la incidencia de la enfermedad podredumbre gris, llegando en años lluviosos a afectar hasta al 50% de la producción de un viñedo (Coniberti et al., 2009).

Para el control de las enfermedades se realizan prácticas culturales en el campo, cuando el fruto todavía está en la planta se le quita el exceso de hojas a la misma para que los racimos queden aireados y expuestos al sol y de esa manera no se condense humedad. Los racimos se manejan con cuidado para prevenir la aparición de heridas, debido a que éstas son la principal vía de entrada para los patógenos. De todas maneras sólo con estas medidas no se logra un control efectivo de las enfermedades por lo que se recurre al uso de fungicidas. Es fundamentalmente, debido al modo de reproducción que poseen los hongos, que el control de estos fitopatógenos se vuelve muy complicado, ya que la gran mayoría utiliza mecanismos de producción de esporas resistentes, que al ser transportadas por aves, insectos o el viento, infectan cultivos vecinos con gran efectividad. Las esporas de estos hongos pueden permanecer en el medio por mucho tiempo, esperando las condiciones nutricionales, de humedad y temperatura adecuadas para germinar y dar inicio a un nuevo ciclo de infección. Solo con las prácticas habituales de manejo agronómico, no se logra reducir los niveles de la enfermedad. Primeramente se recurrió al uso de fungicidas sintéticos. Hay varias familias de químicos sintéticos para el control de *B. cinerea*, entre ellos hay botryticidas específicos como las dicarboximidias. Por más de 25 años, los más utilizados en las principales regiones vitícolas fueron dicarboximidias, iprodiona, procymidona, clozolinato y vinclozolin, este último dejó de utilizarse por razones toxicológicas (Gabriolotto, 2009). El uso repetido de esta clase de fungicidas seleccionó el desarrollo de cepas de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidias (Gabriolotto, 2009). Un mecanismo utilizado para prevenir el desarrollo de resistencia por parte del fitopatógeno, es realizar tratamientos combinando fungicidas con distintos mecanismos de acción. Así, cada vez que se hace una aplicación, antes de la cosecha, se utiliza un fungicida distinto. De esta manera se trata de minimizar la aparición de resistencia a los tratamientos por parte de *B. cinerea*. Wilson and Wisiniewski en 1989 reportaban que en un estudio realizado en 1987 por la National Academy of Science se encontró que 9 compuestos oncogénicos abarcaban el 90 % de todas las ventas de fungicidas. Al mismo tiempo fue reportado en ese mismo informe que los fungicidas abarcan el 60 % del riesgo de contraer cáncer de todos los pesticidas usados en los alimentos (Wilson & Wisiniewski, 1992). (Vero & Mondino, 1999)

También se ha demostrado mediante un estudio realizado por la Escuela de Burdeos, que los residuos de pesticidas, ejercen efecto durante el transcurso de la fermentación maloláctica, pudiendo inhibir la acción de las bacterias responsables de la misma ya sea de manera bacteriostática (inhibiendo el crecimiento de las bacterias) como también bactericida (matando la población bacteriana presente, según las dosis de pesticidas presentes (Suarez & Iñigo, 1990a).

Estos inconvenientes, llevan a la búsqueda de soluciones para el manejo de éstas situaciones, donde el control biológico surge como alternativa.

Enfermedades de la vid

Son varias las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos que afectan las vides a nivel global. No todas se desarrollan en las mismas regiones geográficas, ya que las condiciones ambientales influyen mucho sobre su desarrollo.

En el caso de Uruguay la enfermedad que genera mayores, pérdidas es la ocasionada por el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

Podredumbre gris

El fitopatógeno responsable es el hongo *Botrytis cinerea*. Los granos son los órganos más sensibles a ser atacados, pero todos los órganos de la vid (tallos, hojas, racimos y granos) son susceptibles a la enfermedad

La contaminación puede producirse directamente por penetración de los filamentos germinativos procedentes de conidios o de micelios. También puede darse por heridas producidas por gusanos en el racimo, el granizo o cualquier causa que altere la piel.

La presencia de esta enfermedad en la vid se puede detectar por la aparición de moho gris en la superficie de racimos y granos con piel resbaladiza. Bajo condiciones húmedas, es capaz de crecer en hojas jóvenes y producir un área morena en forma de V, donde el tejido se encuentra necrosado pudiendo el ataque traducirse en una necrosis total de la lámina foliar, y luego del pecíolo, provocando

la caída prematura del follaje. Por lo general, pasa el invierno en uvas momificadas, tejidos muertos de uva u otros desechos orgánicos dentro o alrededor de los cultivos. También puede permanecer como esclerotos o esclerocios (estructura de resistencia consistente en masas de hifas compactadas). En primavera el hongo germina de los esclerotos, produciendo conidias que dispersan la enfermedad, ya sea mediante el viento, agua o por medios mecánicos. La podredumbre se manifiesta a mediados de la estación cálida como pequeñas manchas circulares en la superficie del fruto. La piel donde se encuentran las manchas se rompe dejando expuesta la pulpa en el caso de las uvas.

Luego las bayas se ablandan y se tornan marrones. Luego de la lluvia se generan masas de esporas de color gris, sobre las lesiones del fruto esparciéndose después a toda la superficie del mismo. En racimos muy agregados la podredumbre se expande muy rápidamente de fruto a fruto, pudriendo racimos enteros.

Las variedades de uva más vulnerables son las de grano de piel fina, cuya sensibilidad aumenta con la humedad, facilitando la penetración de sus filamentos en el grano de uva provocando su podredumbre. (Agrios, 2005)

Es importante destacar que la calidad del vino elaborado con uvas afectadas por la podredumbre gris, se ve muy disminuida. Esto es debido a que secreta enzimas (pectinmetil esterasas, poligalacturonasas y lacasas) que facilitan la degradación del tejido de los granos, afectando los nutrientes y consecuentemente los compuestos aromáticos producidos por las levaduras durante la fermentación (Donéche, B.J., 1993). Los principales efectos sobre la industria vitivinícola serían: pérdidas en producción, pérdidas en volumen de mosto, daños en el aroma y color propio de la variedad, contenidos de mosto, infecciones secundarias, problemas de fermentación, problemas con la filtración y clarificación y defectos en las propiedades sensoriales.

Mecanismos utilizados actualmente para el control de enfermedades

Los mecanismos más comúnmente utilizados hasta ahora para el control de enfermedades en los viñedos es una combinación entre prácticas culturales de manejo de las cosechas en el campo y la aplicación de fungicidas.

Las prácticas culturales de manejo de las cosechas implican desde la elección de las variedades de uvas a plantar, así como también el portainjerto a utilizar, otros factores a tener en cuenta es la distancia entre las plantas, el tipo de conducción, la orientación de las filas, la fertilización. También se intenta minimizar la generación de heridas en las uvas, ya sea durante la manipulación de los racimos o las que se producen a consecuencia de condiciones climáticas desfavorables (por ej. granizo) o debido a la presencia de insectos ya que las heridas son la principal vía de entrada de gran parte de los patógenos. Con la finalidad de impedir que se generen las condiciones propicias para el desarrollo de podredumbres se reduce el vigor y compacidad de la canopia, se busca la obtención de racimos pequeños, bien distribuidos y poco compactos, lo que tendrá como consecuencia una mayor penetración de la luz y ventilación, lo que facilita un mejor manejo de la humedad en la superficie de la planta ayudando a que la misma se mantenga seca, impidiendo de esta manera, el desarrollo de esporas. Estas prácticas son importantes ya que las condiciones climáticas de Uruguay son ideales para el desarrollo de podredumbres dadas sus características de temperatura y humedad, a su vez la zona con mayor concentración de viñedos en nuestro territorio se caracteriza por tener suelos fértiles y de escaso drenaje interno, lo cual posibilita el alto vigor y desarrollo de las vides en detrimento de la obtención de plantas equilibradas y de canopias abiertas.

A su vez, algunas de estas medidas no son aplicables a todos los viñedos o al menos no en la misma medida, ya que en las variedades blancas, las cuales son más sensibles al ataque de *Botrytis cinerea*, el deshojado no es recomendado ya que la sobreexposición al sol de estos racimos puede tener como consecuencia la oxidación de las uvas y por consiguiente la de su composición aromática (Carrau Magariños, 2005; Lee and Jaworsky, 1988; Coniberti et al., 2009).

En la mayoría de los casos no basta sólo con estas medidas para prevenir un ataque de podredumbre en los viñedos, por lo cual se recurre también al uso de fungicidas químicos.

Control de *Botrytis cinerea*

Para el control de *Botrytis cinerea* se deben elegir variedades cuya compacidad de racimos sea débil. Se debe evitar una vegetación demasiado densa para que no se

pueda generar un microclima alrededor de los racimos con alta humedad, esto se obtiene mediante el abonado equilibrado y poda que permita la aireación de los racimos. Es conveniente realizar tratamientos preventivos contra los gusanos del racimo, responsables de las heridas en las bayas.

Para el control químico de la podredumbre del racimo se recomienda durante la floración usar fungicidas con principios activos como Benomilo, Carbendazima o Metil-tiofanato y para su control durante el envero, se sugieren productos de contacto, como Diclofuanida, Folpet, Iprodiona, siempre respetando los plazos de seguridad y los límites máximos de residuos (LMR)

Fungicidas más utilizados y momentos de aplicación

Los fungicidas son sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento o para matar los hongos perjudiciales para las plantas, los animales o el hombre.

Los fungicidas además pueden prevenir la germinación de esporas, pueden reducir la expansión micelial o reducir la producción de esporas. Por lo cual también son fungistáticos, es decir capaces de detener el desarrollo fúngico.

Hay varios grupos de fungicidas utilizados a la hora de minimizar los problemas ocasionados por las podredumbres en los viñedos. Estos se clasifican según su clase o modo de acción.

La mayor parte de los fungicidas se encuentra dentro de los conocidos como protectores. Estos son aplicados en las plantas antes del advenimiento de una infección, esto permitirá que se genere una barrera entre la planta y el agente infeccioso. Otro grupo de fungicidas son los curativos, estos actúan de forma tal que interrumpen una infección que ya comenzó pero que todavía no desarrolla síntomas visibles en la planta. También están los llamados erradicantes los cuales irrumpen el desarrollo posterior de una infección ya establecida que presenta síntomas visibles en la planta hospedera. Los anti-esporulantes pueden prevenir o disminuir la producción de esporas, sin interferir con el crecimiento vegetativo del hongo (Figura 1). También se pueden clasificar teniendo en cuenta el sitio específico donde actúan. Están por un lado los de contacto, que actúan en la superficie donde se los aplica y los sistémicos que penetran en la en los tejidos de la planta y se diseminan a través de ella. Pueden actuar de manera local

(moviéndose de célula a célula) o pueden moverse a través de la planta mediante su sistema vascular (xilema y floema) (McGrath, 2004).

A partir de esta clasificación se infiere que va a depender de la etapa de desarrollo en que se encuentre una infección el determinar que fungicida se va a utilizar.

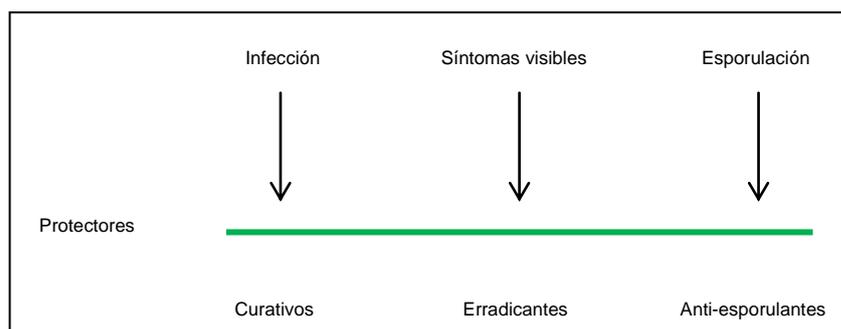


Figura 1. Grafico donde se ve que tipo de fungicida debe utilizarse dependiendo de la etapa de desarrollo en que se encuentra una infección.

Como se mencionó anteriormente, es debido fundamentalmente al modo de dispersión que presentan las esporas, que el control de este fitopatógeno se vuelve muy complicado. Solo con las prácticas habituales de manejo agronómico, no se logra reducir los niveles de la enfermedad. Primeramente se recurrió al uso de fungicidas sintéticos (benzimidazoles, dicarboximidas, captan). Tradicionalmente estas aplicaciones se realizan en los períodos de floración, cierre del racimo, envero y precosecha. En poscosecha, para uvas de consumo fresco (no para vinificación), se recurre además al uso de generadores de azufre, bisulfito y/o nieve carbónica

En la actualidad, es muy reducido el número de principios activos efectivos autorizados para su uso, debido principalmente a consideraciones toxicológicas. Esto ha generado dificultades a la hora de instrumentar estrategias de manejo anti-resistencia, las que se basan en la alternancia o rotación de principios activos de diferente modo de acción. Como consecuencia, en la práctica se ha confirmado la presencia de poblaciones de patógenos resistentes a los fungicidas más comúnmente utilizados como lo son los benzimidazoles y dicarboximidas (Beresford, 1994; Vero et al., 1998; Leroux, 2007)

Control biológico

En la bibliografía hay varias definiciones de control biológico:

- Control biológico se refiere al uso de organismos naturales, organismos genéticamente modificados o productos génicos, para eliminar los efectos de organismos indeseables en favor de organismos que son beneficiosos para los seres humanos, incluidos los cultivos, árboles, animales y microorganismos benéficos (Yang et al., 2009; Viterbo et al., 2002).

- Control biológico es el uso de agentes vivos para el control de plagas o patógenos de plantas (Bleve. et al., 2006).

- Control biológico es la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas (Baker & Cook, 1974).

Pero en general cuando se habla de control biológico se hace referencia a la utilización de microorganismos beneficiosos con el fin de reducir los efectos indeseables de los patógenos de plantas (Vero & Mondino, 2006).

El control biológico describe el estado normal de relaciones en un ecosistema natural no perturbado, donde poblaciones de organismos existen en un equilibrio dinámico y especies o individuos incapaces de competir o de hallar un nicho ecológico son reemplazados por aquéllos que se adaptan mejor. Con suficiente conocimiento es posible manipular este equilibrio para favorecer ciertos organismos sobre otros. Es así como comenzó la agricultura, silvicultura, jardinería y otras actividades similares que favorecen unas pocas especies de plantas o animales, o subconjunto de especies (cultivares, variedades, cepas), que de otra manera no podrían haber tenido éxito y hasta podrían haberse extinguido (Cook, 2004).

El llevar a cabo un exitoso control biológico sobre una infección dada va a depender del conocimiento previo que se tenga de las interacciones biológicas en el ecosistema y entre los organismos, tanto a nivel celular como molecular. A menudo es más complicado de manejar en comparación con los métodos físicos

(dentro de estos están las prácticas culturales de manejo de cosechas) y químicos, ya que, al usar como controlador un organismo viviente se agregan otras variables a la ecuación, que no es tan sencilla de controlar como sería la aplicación de un producto químico.

Es probable que el control biológico sea menos espectacular que la mayoría de los controles físicos o químicos, pero suele ser también más estable y de mayor duración (Baker and Cook, 1974).

La utilización de antagonistas va desde compuestos derivados de plantas y animales hasta microorganismos antagónicos. Bacterias, levaduras y hongos filamentosos han sido ampliamente reconocidos como buenos agentes de biocontrol (Baker & Cook, 1974; Flores et al., 1997; Piano et al., 1997; Droby et al., 1998; Barka et al., 2002; Cook, 2002; Santos & Marquina, 2004; Carrau Magariños, 2005; Long et al., 2005; Bleve et al., 2006; Rabosto et al., 2006; Vero & Mondino, 2006; Batta, 2007; Chanchaichaovivat et al., 2007; Elad & Stewart, 2007; Magnin-Robert et al., 2007; Stotz et al., 2007; Zhang et al., 2007; Sharma et al., 2009; Ge et al., 2010).

El control biológico se puede dar de manera natural o puede estar mediado por la acción del hombre. En los casos que se da naturalmente es porque el ecosistema ya posee los microorganismos necesarios para controlar una determinada infección o se realizan prácticas culturales para cambiar el ecosistema promoviendo así el desarrollo de los biocontroladores naturales. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos (Cook & Baker, 1983). Cuando hay intervención del hombre, este debe realizar grandes aplicaciones del microorganismo que se va a utilizar como agente de control, modificando de esta manera la comunidad de microorganismos presentes, buscando impedir o minimizar el desarrollo de un agente patógeno dado.

Agentes antagonistas

Como se nombró anteriormente los antagonistas más utilizados son:

1. Bacterias, utilizadas en enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en partes aéreas como en la raíz de la planta hospedadora. También son utilizadas para el control de enfermedades poscosecha.

Para que un antagonista sea considerado como tal, debe ser capaz de impedir que un patógeno pueda colonizar un determinado ambiente, impidiendo así también, el inicio de la infección. En su defecto este debería poder destruir al patógeno ya instalado impidiendo que se desarrolle la infección.

Las bacterias han sido reportadas como agentes de control biológico tanto para hongos como para otras bacterias. Estas, poseen la habilidad de producir antibióticos, sideróforos, amoníaco, cianuro y enzimas hidrolíticas.

Las bacterias también pueden proveer protección a la planta a través de la inducción de mecanismos de defensa o competencia por nutrientes. Muchos microorganismos que se encuentran naturalmente en la superficie de las hojas de las plantas han sido reportados como productores de metabolitos o antibióticos tóxicos hacia otros microorganismos. Dentro de este grupo de bacterias las que se encuentran más comúnmente son las pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas* o *Bacillus*. A su vez, estas bacterias están dentro de las más estudiadas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB). Las PGPB tiene la cualidad de que al asociarse con plantas pueden promover el crecimiento de las mismas. El promover el crecimiento de una planta puede ser debido a que pueden actuar como biofertilizantes, favoreciendo así la absorción de nutrientes por parte la planta (ej. bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de fosfato), como fitoestimuladores, produciendo hormonas vegetales o como controladores biológicos impidiendo el desarrollo de enfermedades causadas por fitopatógenos, favoreciendo así el óptimo crecimiento de la planta (Vero & Mondino, 2006). Un ejemplo es el del trabajo de Barka et al., 2002, donde se observó que una cepa de *Pseudomonas sp.* PaJN, promovía el crecimiento de plantines de vid inhibiendo a su vez el crecimiento de *Botrytis cinerea* tanto en estudios *in vitro* en cultivo dual como en ensayos a nivel de campo sobre la planta.

2. La utilización de levaduras como biocontroladores podría ser más aceptada entre los consumidores por el hecho de que éstas ya están íntimamente relacionadas con varios alimentos y bebidas ampliamente consumidos. Además, la actividad de las levaduras como biocontroladores está asociada a mecanismos de acción más que

nada competitivos, ya sea por espacio o por nutrientes, producción de hidrolasas extracelulares, habilidad de mantener metabolismo normal a altos potenciales osmóticos y la introducción de respuestas de resistencia en el tejido del hospedero. Ninguno de estos mecanismos implica la producción o liberación de ningún antibiótico o metabolito potencialmente tóxico para los consumidores (Piano et al., 1997).

La gran frecuencia de levaduras entre los agentes de antagonismo reportados para patógenos poscosecha puede estar relacionada al hecho de que algunas levaduras son tolerantes a extremas condiciones de almacenamiento (temperaturas alrededor de los 0°C, alta humedad relativa, etc.), además de que están adaptadas a elevadas concentraciones de azúcar, alta presión osmótica y también son tolerantes a bajos pH. Sumado a lo anterior, las levaduras, pueden colonizar rápidamente y sobrevivir en la superficie de frutas por largos períodos bajo diferentes condiciones (Droby et al., 1999).

Hay muchas levaduras reportadas como agentes de biocontrol contra patógenos, sobre todo contra enfermedades que se desarrollan durante el almacenamiento poscosecha tanto de frutas como de hortalizas, como la levadura *Candida oleophila* I-182 la cual es el ingrediente activo del producto comercial Aspire registrado por Ecogen Inc (USA) en 1995. Este producto es utilizado para el control biológico de enfermedades poscosecha de manzana y citrus (Vero & Mondino, 2006). También *Cryptococcus albidus* fue descrita como capaz de controlar el desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en heridas de manzana (Fan & Tian 2001). También hay registro de la acción de la levadura *Candida sake* como agente controlador de patógeno poscosecha en heridas de manzana *Golden Delicious*. La actividad de esta levadura se mantenía a los 20°C así como también a 1°C llegando a tener valores de eficiencia de hasta un 100% (Teixido et al., 1999).

En Uruguay dos cepas de levadura identificadas como *Cryptococcus laurentii* y *Candida ciferrii* son reportadas como controladoras biológicas de *Penicillium expansum* en manzanas. Se demostró que estas cepas no producen antibióticos y que compiten por los nutrientes en las heridas de los frutos impidiendo la colonización de las mismas por parte del patógeno. En ensayos posteriores se logró determinar que el principal mecanismo de acción involucraba la competencia por la fuente de nitrógeno presente en las heridas. Cepas de *Cryptococcus laurentii* ya han sido descritas como agentes de biocontrol en postcosecha. Esta cepa en

particular es incapaz de crecer a 37°C lo cual aumenta su potencial bioseguridad como agente de biocontrol (Vero & Mondino, 1999; Vero et al., 2002).

3. Dentro del grupo de los hongos filamentosos actuando como biocontroladores, los más estudiados son *Trichoderma*, *Gliocadium* y *Ampelomyces quisqualis*.

Ampelomyces quisqualis es un micoparásito de ocurrencia natural, capaz de parasitar oídios de varios cultivos, entre ellos la vid. Es uno de los pocos agentes microbianos de control biológico, de acción curativa. Crece sobre el fitopatógeno y cura de esa manera la infección. Este hongo es la base de un producto comercial, AQ10, indicado para varios cultivos.

El hongo más estudiado como agente de biocontrol es *Trichoderma*, el cual también es citado como promotor del crecimiento vegetal. La cepa *Trichoderma harzianum* T22 ha sido descrita como promotora de crecimiento vegetal en raíces de maíz y pepino y como se mencionó anteriormente para las bacterias, así como estos microorganismos promueven el crecimiento vegetal, también actúan como agentes de control biológico contra las enfermedades de la planta con la cual están en simbiosis (Vero & Mondino, 2006)

Esto podría explicarse mediante la teoría de la trofobiosis, donde siempre que una planta se encuentre en equilibrio nutricional, donde no enfrente ni exceso ni defecto de nutrientes, la misma estará en buenas condiciones para defenderse de ataques de plagas y enfermedades (Vero & Mondino, 2006).

Para poder utilizar microorganismos como agentes biocontroladores, éstos deben reunir las siguientes características:

- Genéticamente estables.
- Efectivos a bajas concentraciones.
- Fáciles de cultivar en medios sencillos y económicos.
- Efectivos frente a un amplio rango de patógenos, pero sin provocar efectos adversos en la flora benéfica.
- Compatibles con otros métodos de control.
- No deben ser tóxicos para humanos ni animales.
- No deben producir metabolitos tóxicos en el sitio de acción.
- No deben ser fitotóxicos.

Mecanismos de acción de los antagonistas

Los antagonistas pueden actuar mediante varios mecanismos de acción (Vero & Mondino, 2006):

- 1- Competencia con el patógeno, por nutrientes o espacio en el sitio de la infección.
- 2- Producción de sustancias tóxicas en el sitio de acción, provocando inhibición o destrucción del patógeno.
- 3- Inducción de respuestas de resistencia en la planta.

Competencia: Es el uso diferencial de recursos por parte de dos o más organismos. Cuando estos organismos comparten un requerimiento y uno de ellos lo utiliza de forma tal que reduce la disponibilidad a los demás, es cuando se evidencia la competencia. Por lo que pasa a haber escasez del recurso. Los hongos *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son un buen ejemplo de microorganismos dependientes de nutrientes (Carrau Magariños, 2005).

Este es un mecanismo de acción indirecto, donde no hay una acción directa sobre el patógeno.

Producción de sustancias tóxicas:

- Antibióticos: algunos microorganismos producen y liberan sustancias tóxicas para la supervivencia de otros, inhibiendo su desarrollo o provocando la muerte del microorganismo patógeno. Estos pueden actuar en bajas concentraciones. Son productos del metabolismo secundario.
- Toxinas Killer: son sustancias de naturaleza proteica secretadas por algunas levaduras, estas toxinas tienen el potencial de afectar otras levaduras que sean sensibles. Estas pueden pertenecer o no a la misma especie de la levadura productora. Sin embargo la levadura productora es inmune a su propia toxina. Esta propiedad es utilizada en la industria de las bebidas fermentadas para evitar que ocurran fermentaciones no deseadas. La especie *Saccharomyces cerevisiae* posee esta propiedad. Al mismo tiempo se ha descubierto la existencia de levaduras productoras de toxinas killer capaces de atacar hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solanii*, *Fusarium equiseti* y *Phytophthora infestans* (Vero & Mondino 2006).
- Enzimas capaces de degradar paredes de hongos patógenos: La pared de los hongos, compuesta por quitina, glucanos y proteínas es fundamental para la

supervivencia de los hongos. Por este motivo el que haya microorganismos capaces de degradar dicha pared, hidrolizando los compuestos que la forman, convierte esta propiedad en un mecanismo viable para el control biológico de éstos patógenos de plantas. Un ejemplo fue encontrado para el hongo *Botrytis cinerea*, donde un preparado de células de la levadura *Pichia anomala* en suspensión aumentaban la producción de β 1-3 glucanasa frente al agregado al medio de paredes celulares del patógeno y aumentaba la protección contra *Botrytis* en heridas de manzana (Vero & Mondino, 2006).

Inducción de respuestas de resistencia en la planta:

La resistencia es la capacidad de un organismo de sobreponerse total o parcialmente a la acción de un determinado patógeno. Esta puede ser constitutiva (propia del organismo y se expresa en todo momento) o inducida (se expresa bajo determinados estímulos). La resistencia inducida va a ser la que participe en el control biológico de un patógeno, en donde un microorganismo antagonista será el responsable de la inducción de la misma. Se ha demostrado que levaduras utilizadas en el control de patógenos en la poscosecha además de competir por espacio y nutrientes, son capaces de inducir resistencia en la planta. Como se ha descrito para *Pichia guillermondii* (US-7) capaz de generar la producción de fitoalexinas en frutos cítricos (Vero y Mondino, 1999).

El control biológico de patógenos, ya sea que ocurra por uno u otro de los mecanismos descritos, tiene la ventaja frente al control químico de no dejar residuos tóxicos en las cosechas, potencialmente nocivos para el consumidor así como también de proteger el medio ambiente de productos químicos probablemente contaminantes.

Comercialización de productos biocontroladores

La implementación y comercialización de un producto en base a un organismo antagonista, implica un estudio exhaustivo del agente de biocontrol. En general se realizan los siguientes estudios:

- Estudio del patosistema.
- Aislamiento y selección de cepas locales del patógeno.
- Aislamiento de posibles agentes de biocontrol.

- Selección de los agentes de biocontrol.
- Identificación de los agentes de biocontrol seleccionados.
- Caracterización de la cepa seleccionada.
- Determinación de los mecanismos de acción.
- Optimización de las condiciones de producción.
- Desarrollo de una formulación.
- Registro de la formulación.

Actualmente se encuentran disponibles para su comercialización, varios productos basados en microorganismos antagonistas diferentes según el patógeno.

Algunos ejemplos son:

Yield plus (Anchor Yeast, Sud África), este producto tiene como principio activo a la levadura *Cryptococcus albidus*. Este producto ha sido desarrollado para el control de enfermedades poscosecha (Vero & Mondino 2006).

Mediante el uso de la bacteria *Bacillus subtilis* como agente controlador, se comercializa el producto, Serenade® (Agro Quest Inc, USA) el cual es un biofungicida preventivo de amplio espectro para el control de Botrytis, Oídio y Pudrición Ácida en Vides y en Manzano (Sharma et al., 2009).

También hay productos que utilizan hongos filamentosos como agente de biocontrol, tal es el caso de AQ-10 biofungicida®. El hongo filamentoso utilizado es *Ampelomyces quisqualis* y es uno de los pocos biocontroladores con acción curativa. Es utilizado para tratar la enfermedad oidio en varios cultivos incluyendo la vid (Sharma et al., 2009; Vero & Mondino, 2006).

Origen de las levaduras de la uva

En el ecosistema de los viñedos se encuentra una gran biodiversidad de levaduras y bacterias que conviven desde la floración en los frutos y al mismo tiempo también se encuentran en el suelo. En momentos previos a la cosecha la población aproximada de levaduras en las bayas es de entre 10^3 y 10^5 (Ribereau – Gayon et al., 1998).

En invierno se encuentran en la capa superficial de la tierra. En verano mediante insectos y el polvo que se levanta, son transportados a la uva.

Por lo general en todos los viñedos, de cualquier parte del mundo se pueden encontrar las mismas especies de levaduras. Pueden presentarse diferencias a causa de las características climáticas de cada región.

En el ecosistema del viñedo predominan las levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* (condiciones aerobias) (Figura 2). Estas también pueden estar presentes en la fermentación pero por poco tiempo, dado que las condiciones que se generan no les son favorables (falta de aire, aumento del volumen de alcohol o de gas carbónico, bajo pH). En regiones de vides antiguas (como sucede en Francia) se pueden encontrar más levaduras representantes del género *Saccharomyces* que en viñedos nuevos, pero nunca van a exceder el 1% del total de levaduras presentes. Dentro de las levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces* las más abundantes son *Hanseniaspora uvarum* y *Kloeckera apiculata*, las cuales representan el 50% del total. (Peynaud, 1996) Sin embargo, no se obtendrán en todas las vendimias las mismas levaduras ni en las mismas proporciones, ya que ésto también va a depender de varios factores como lluvias, temperatura, el grado de madurez de la uva al momento de cosecharse, el uso de fungicidas, la ocurrencia de ataque por hongos y la variedad de la uva.

En cambio, en el ecosistema de la bodega pasan a predominar las levaduras del género *Saccharomyces*, y son las que terminan dominando en las fermentaciones por estar mejor adaptadas a sobrevivir en las condiciones características de un mosto en fermentación.

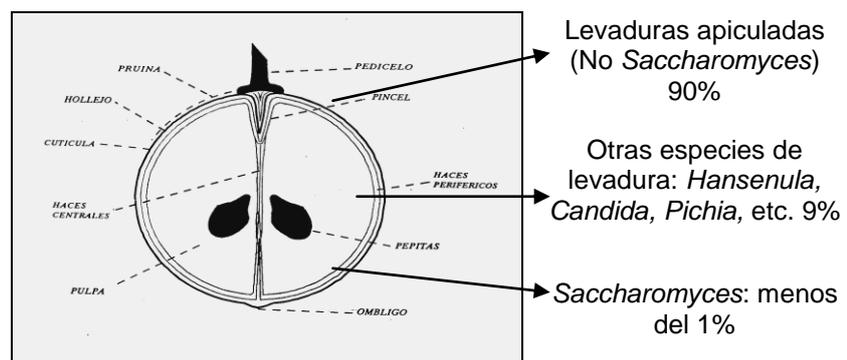


Figura 2. Representación del corte de un grano de uva, donde se describen las distintas partes que lo constituyen. Descripción de la flora nativa de levaduras presentes en el mismo. Imagen tomada de Carrau Magariños, 2005.

En Uruguay, en un estudio con el objetivo de conocer las características de esta flora nativa de las uvas y su posible aplicación en la vinificación, se comprobó que varias de estas levaduras que no pertenecían al género *Saccharomyces* y algunas bacterias del suelo presentaban características antifúngicas contra diversos hongos (Rabosto et al., 2006). Estos resultados, y la meta de aplicar técnicas de mínima intervención a lo largo del proceso desde el viñedo hasta la copa, basados en el mejor manejo de la microbiología en el proceso de vinificación (Carrau Magariños, 2005) (Medina et al., 2007), llevaron a incluir la temática de control biológico como un factor a tener en cuenta en el estudio del manejo de *B. cinerea* por parte de la Sección Enología de Facultad de Química.

Las levaduras nativas de la uva presentan la ventaja de lograr una rápida adaptación al lugar donde se espera que ocurra el biocontrol al momento de su aplicación. Si se aplican levaduras foráneas, se corre el riesgo de que no logren adaptarse y de que impacten negativamente en la biodiversidad del lugar.

Además, si se utilizara algún producto desarrollado en base a estas levaduras, podría tener más aceptación por parte de los consumidores ya que el tratamiento de vides con levaduras nativas, implicaría que no se tuviese que añadir ningún componente ajeno a las propias vides, sino que es un microorganismo que naturalmente se encontraría presente.

Compatibilidad de levaduras antagonistas en el proceso de vinificación

El objetivo final a largo plazo de este trabajo es el de obtener levaduras con capacidad antagónica suficiente contra el patógeno *B. cinerea* para en un futuro, poder desarrollar un producto biocontrolador para aplicar en la viña. Estas uvas tratadas serían luego utilizadas para vinificar, y es de esperar que cuando las uvas sean cosechadas y lleguen a las instalaciones de bodega para el proceso de vinificación aún mantengan la levadura con la que fueron tratadas. Por este motivo resulta fundamental conocer previamente el bioimpacto de las mismas sobre la fermentación alcohólica y sobre los aromas del vino terminado. Una vez estudiado estos efectos se podrá discutir su utilización como biocontrolador en el viñedo.

La actividad de la enzima β -glucosidasa es importante en la industria vitícola. La misma puede influir en el color y composición aromática de los vinos. El aroma del vino es el resultado de la interacción de componentes propios de la uva y de aquellos que se producen durante el transcurso de la fermentación. Por esto es que los aromas de un vino pueden clasificarse en cuatro grupos dependiendo del origen del que provengan. Dentro de ellos están los aromas varietales, provenientes de la uva y que en su mayor parte se encuentran en forma de precursores. Los aromas prefermentativos, que se forman en la etapa que va desde la cosecha hasta el inicio de la fermentación. También hay aromas que se generan durante el proceso de fermentación gracias a la acción de las levaduras actuantes, a éstos se los conoce como aromas fermentativos. Y por último están los aromas posfermentativos, que se forman durante la conservación del vino.

Los aromas varietales, propios de la uva se pueden encontrar bajo dos formas, libres o volátiles, los cuales son parte constituyente del aroma del vino y conjugados a azúcares (glicósidos), los cuales al no ser volátiles ni estar libres no pueden ser parte constituyente del aroma del vino en forma directa (Pérez, 2008). Una levadura que posea actividad β -glucosidasa, tiene la facultad de intervenir en la liberación de la molécula aromática (aglicona) que esté unida al azúcar, formando el glicósido. Rompiendo el enlace mediante el cual la aglicona se mantiene unida al azúcar (Pérez, 2008). En el caso del color el efecto de la actividad β -glucosidasa sería desfavorable, ya que los compuestos responsables del color (antocianos) se encuentran de manera más estable en el vino cuando están unidos a otras moléculas entre ellas azúcares, mediante el enlace β -glucosídico el cual es el blanco donde actúa la enzima β -glucosidasa, haciendo inestable el antociano y provocando pérdida de color en el vino. Por lo que la acción de la enzima en este caso es desfavorable. Por lo tanto es un factor importante a tener en cuenta a la hora de utilización de levaduras que puedan intervenir en la vinificación.

Objetivos

Objetivo general

- Selección de levaduras de distintas variedades de uva con capacidad antagónica frente a *B. cinerea*.

Objetivos específicos

- Aislamiento y caracterización de levaduras nativas de la piel de las bayas de diferentes variedades de uvas, provenientes de la región de Canelones.
- Caracterizar los aislamientos obtenidos en cuanto: capacidad fermentativa, capacidad aromática y actividad β -glucosidasa.
- Determinación de la capacidad antagónica de los microorganismos aislados y de los pertenecientes a la colección de la Sección Enología, frente a *B. cinerea*, *in vitro* expresada como Índice de efectividad (IE).

Materiales y Métodos

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, utilizado para los ensayos de antagonismo fue suministrado por la cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, y se repicó en placas de Petri con medio PDA (extracto de papa, 4g/L; glucosa, 20 g/L; agar, 15g/L). Las placas se incubaron a 20 °C durante 7 días (Samson et al., 1995) y posteriormente se conservaron en heladera a 4° C hasta el momento de su uso.

Aislamiento de levaduras nativas

Los aislamientos se realizaron a partir de molienda manual de bayas. Para esto se colocaron los granos de uva en un mortero estéril, donde se machacaron hasta obtener el jugo. El mosto así obtenido quedo en contacto con las pieles de las bayas por un tiempo de 5 minutos.

Con la mezcla obtenida se realizaron las diluciones seriadas correspondientes para obtener un número de colonias entre 30 y 100 por placa. El medio de cultivo

utilizado fue el medio diferencial WLN, (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar), (Pallmann et al., 2001; Cavazza et al., 1992), y el tipo de siembra realizada fue siembra en superficie. Las placas se cultivaron a 25 °C durante 48 horas.

Diferenciación de los microorganismos

El medio WLN, ha sido desarrollado como diferencial para la industria, ya que permite encontrar rápidamente diferencias entre especies por la morfología de las colonias de acuerdo a color, forma, tamaño, textura, brillo y consistencia. El principio diferencial de este medio de cultivo, se basa en el reactivo verde de bromocresol, que actúa como colorante diferencial.

En función de esto, se seleccionaron colonias aisladas de acuerdo a los criterios morfológicos antes mencionados (Figuras 3 y 4).

La clasificación de las levaduras como pertenecientes o no al género *Saccharomyces* se determinó finalmente mediante el sembrado en medio Agar Lisina (Oxoid). Este medio de cultivo es selectivo para levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces*, ya que el medio posee como única fuente de nitrógeno a la lisina y las levaduras del género *Saccharomyces* no pueden crecer teniendo a la lisina como único aporte de nitrógeno.

Las levaduras se incubaron en medio Agar Lisina a 25 °C durante 4 días. Para mayor seguridad el procedimiento se realizó dos veces consecutivas ya que las *Saccharomyces* en algunos casos pueden crecer en el primer repique dado que podrían tener reservas de aminoácidos. Se consideran no *Saccharomyces* a aquellas cepas que crecen en este medio luego de dos repiques consecutivos (figura 5) (Carrau Magariños, 2005).

También se realizaron observaciones al microscopio, donde fue posible diferenciar a las cepas del género *Saccharomyces* de las cepas apiculadas no *Saccharomyces* (Pallman et al., 2001).

Las levaduras *Saccharomyces* aisladas fueron conservadas en medio YEPD (extracto de levadura, 10g/L; peptonas, 10g/L; dextrosa, 20g/L; agar, 20g/L; buffer pH4,5: 9mL Na₂HPO₄ (0,2 M), 11mL Ácido cítrico (0,1 M); y las levaduras no *Saccharomyces* en medio Agar Lisina. En ambos casos se guardan en heladera a 5 °C hasta el momento de su uso.

Preparación de levaduras para el test de antagonismo in vitro

Para el ensayo de antagonismo se partió de un inóculo inicial de levaduras de 1×10^8 cel /mL. Para esto se realizó un pre inóculo en Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 20 mL de YEPD líquido, con agitación en shaker a 100 RPM a 25 °C durante 24 horas.

Luego de la incubación, las células se separan del medio por centrifugación a 400g durante 15 minutos.

El pellet resultante de las levaduras se resuspendió en suero fisiológico y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, de manera de asegurar que no quedaran restos de medio YEPD. Si esto pasara, estas levaduras estarían en condiciones nutricionales diferentes que el hongo *B. cinerea*.

El segundo pellet obtenido se resuspendió por segunda vez en suero fisiológico y se hicieron recuentos en cámara de Neubauer. En función del recuento microbiológico obtenido, se realizaron las diluciones necesarias para obtener un inóculo de 1×10^8 cél/mL para la realización del ensayo (Carrau Magariños, 2005).

Preparación del inóculo de esporas de Botrytis cinerea.

Se partió de cultivos puros de *B. cinerea* de 7 días en medio PDA. Se separaron las esporas de *B. cinerea* y se usaron en el ensayo de antagonismo. Para desagregar las esporas del micelio del hongo se trató el cultivo de *B. cinerea* con agua destilada estéril con el agregado de 0,1% de Tween, y se raspó suavemente el cultivo con un anza estéril.

Luego se filtró la suspensión de conidios a través de 2 capas de gasa estéril.

Lo obtenido del filtrado se centrifugó en suero fisiológico estéril a 400g, durante 15 minutos para eliminar restos del medio donde estaba.

Finalmente se resuspendió en agua destilada estéril y se ajustó a la concentración deseada de 1×10^6 conidios/mL mediante diluciones (Carrau Magariños, 2005).

Determinación de capacidad antagónica in vitro

Se analizaron un total de 30 cepas de levaduras (11 correspondientes a la vendimia 2009 y 19 pertenecientes a la colección de la Sección Enología).

Para la realización de esta determinación se prepararon las suspensiones de esporas y levaduras de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se realizaron hoyos de 7mm de diámetro por 5 mm de profundidad en el centro de las placas con medio similar jugo de uva con agregado de agar. (Glucosa 50 g/L; Fructosa 60g/L ; tartrato ácido de potasio 2,5 g/L; ácido L- Málico 3 g/L; ácido cítrico 0,2 g/L; fosfato de amonio 0,5 g/L; ergosterol 10 mg/L) (Carrau, 2003).

El fondo del hoyo se selló con agar agua, de manera de asegurar que los inóculos no se fueran hacia la parte de abajo del medio y crecieran hacia fuera del hoyo.

Luego se inocularon dentro del hoyo, 50 µL de suspensión de levaduras a partir de una población de 1×10^8 CFU /mL del microorganismo a testear potencialmente antagónico. Luego de transcurridos 30 minutos, se inocularon 50 µL de suspensión de esporas del hongo *B. cinerea* partiendo de una población de 1×10^6 conidias/mL.

Se incluyeron 3 controles: a) placa sembradas con la levadura a testear (control de crecimiento de la levadura), b) placa sembrada con las esporas del patógeno (control de crecimiento del patógeno), y c) placa con la levadura M26 (*Metschinokowia pulcherrima*) perteneciente a la colección de la sección Enología, de la cual ya se conoce su capacidad 100% antagonista frente al fitopatógeno *B. cinerea* por ensayos previos realizados en el laboratorio de la sección Enología. Cada ensayo, incluidos los controles fueron realizados por duplicado.

Las placas con los inóculos se incubaron durante 7 días a una temperatura de entre 20-24°C. Los resultados del antagonismo de las levaduras frente al hongo se expresaran como Índice de efectividad (IE) del crecimiento del hongo. Dicho índice se calcula de la siguiente manera:

$$\% I = \frac{DCF - DCE}{DCF} \times 100$$

DCF: Diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en placa control.

DCE: Diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en placa del ensayo.

Compatibilidad de las cepas antagónicas seleccionadas con el proceso de vinificación de uvas

Para el estudio del impacto fermentativo y aromático de las levaduras sobre los vinos, se realizaron microfermentaciones a escala de laboratorio.

Para esto se utilizó jugo de uva estéril mediante filtración, de la variedad Trebbiano. Se realizó un pre inóculo con 10 mL de jugo de uva, con agitación a 100 RPM, durante 24 horas a 25°C.

Se contaron las levaduras en cámara de Neubauer. Con la concentración de levaduras obtenidas se realizó el cálculo ($C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$) para definir el volumen inicial (V_i) que se debía inocular de cada levadura para obtener una concentración final (C_f) de 1×10^5 cel/mL en 35 mL de volumen final (V_f) del mismo jugo de uva. Este ensayo se realizó en Erlenmeyer de 125 mL de capacidad, por duplicado. Los cultivos se mantuvieron en estufa a 20 °C.

A las 24 horas de iniciado el ensayo se sustituyó el tapón de algodón de los Erlenmeyer por válvulas de Muller (conteniendo ácido sulfúrico, el cual capta el vapor de agua liberado durante la fermentación), las cuales permitieron realizar el seguimiento de la fermentación por controles diarios de pérdida de peso (debida al desprendimiento de CO_2 como producto de la fermentación). La fermentación se consideró finalizada cuando cesó la pérdida de peso (Suarez & Iñigo, 1990b).

Una vez concluida la fermentación se hicieron controles de pureza de las levaduras ensayadas, en placas en WLN. Mediante la siembra en superficie de 1 mL de cada microfermentación.

Finalmente, se realizó un análisis sensorial descriptivo de los vinos obtenidos. Para esto se realizaron degustaciones con el panel interno entrenado de la Sección Enología (Medina, 2006), con el fin de describir los aromas propios de la fermentación de cada levadura.

Actividad β -glucosidasa

Se midió la actividad de la enzima de forma semicuantitativa en el medio Agar Esculina con glicerol según (Eberhart *et al.*, 1964; Pérez, 2008). El medio se realizó a dos pH distintos, pH 6 y pH 4, ya que la actividad de la enzima es óptima a pH 6, disminuye a pH menores a éste y pH 4 es similar al del mosto de uva.

Se sembraron las levaduras mediante estrías de 1cm de largo aproximadamente, dispuestas de forma radial y con un total de 8 levaduras por placa (Figura 9). Las

placas fueron incubadas durante 6 días a 25°C. En este medio las levaduras productoras de enzima β -glucosidasa hidrolizan la esculina transformándola en glucosa y esculetina, esta última reacciona con la sal férrica que contiene el medio y se produce un precipitado marrón alrededor de la levadura. La intensidad y diámetro de los halos de precipitado que se formaron en torno a las levaduras sembradas, permitieron discriminar entre tres grupos diferentes de producción enzimática: alto, medio y bajo (Pérez, 2008).

Resultados

Aislamiento y diferenciación de los microorganismos

Se lograron aislar un total de 12 cepas de levadura.

Las mismas se aislaron a partir de las siguientes variedades de uvas provenientes del departamento de Canelones: Merlot, Cabernet Sauvignon, Petit Manseng, Chaveñasco, Petit Verdot y Arinarnoa (Tabla 1, Figura 3). Las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon fueron las que dieron las mayores diversidades de levaduras, y en ambos casos se obtuvieron 4 cepas de levaduras para cada variedad.

Luego del análisis microscópico y de los dos crecimientos sucesivos en el medio Agar Lisina (Tabla 2), se confirmó que las 12 cepas resultaron no pertenecer al género *Saccharomyces* (Figura 5). Como se observa en la Tabla 2, 7 levaduras son de forma redondeada ovalada y las otras 5 de forma apiculadas.

Tabla1. Aislamientos de vendimia 2009

Fecha de cosecha	Región	Viñedo	Codificación de la cepa
19/02/2009	Canelones	Vilasar	AR09/07G
11/02/2009	Canelones	Vilasar	CS09/08G
19/02/2009	Canelones	Vilasar	CHV09/12G
11/02/2009	Canelones	Vilasar	CS09/11G
11/02/2009	Canelones	Vilasar	CS09/18G
19/02/2009	Canelones	Vilasar	AR09/10G
10/02/2009	Canelones	Vilasar	ME09/15G
10/02/2009	Canelones	Vilasar	ME09/17G
10/02/2009	Canelones	Vilasar	ME09/13G
10/02/2009	Canelones	Vilasar	ME09/14G
19/02/2009	Canelones	Vilasar	CHV09/09G
11/02/2009	Canelones	Vilasar	CS09/16G
11/02/2009	Canelones	Vilasar	CS09/18G

Tabla2. Levaduras obtenidas de los aislamientos. Características microscópicas y clasificación según género

Código	Observaciones microscópicas	Crecimiento en 1° repique	Crecimiento en 2° repique	Genero
AR09/07G	Apiculadas,	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
CS09/08G	Apiculadas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
CHV09/12G	Redondeadas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
CS09/11G	Redondeadas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
CS09/18G	Ovaladas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
AR09/10G	Apiculadas chicas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
ME09/15G	Mayoría redondeadas otras con forma apiculadas y otras con forma de bastón	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
ME09/17G	hay apiculadas y redondeadas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
ME09/13G	Redondeadas chicas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
ME09/14G	Redondeadas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
CHV09/09G	chicas, la mayoría redondeadas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
CS09/16G	chicas la mayoría redondeadas, algunas con forma de espinas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>
CS09/18G	Redondeadas	Si	Si	no <i>Saccharomyces</i>

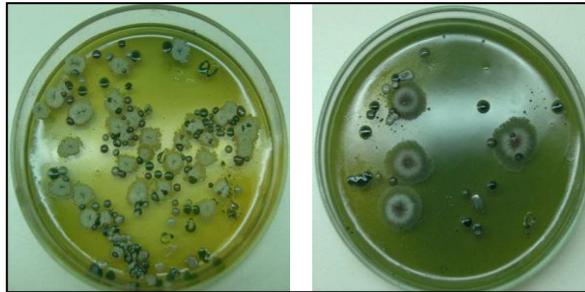


Figura 3. Microorganismos aislados en placas con medio WLN. Se observan colonias con diferencias morfológicas y cambios en el color del medio provocado por los diferentes aislamientos

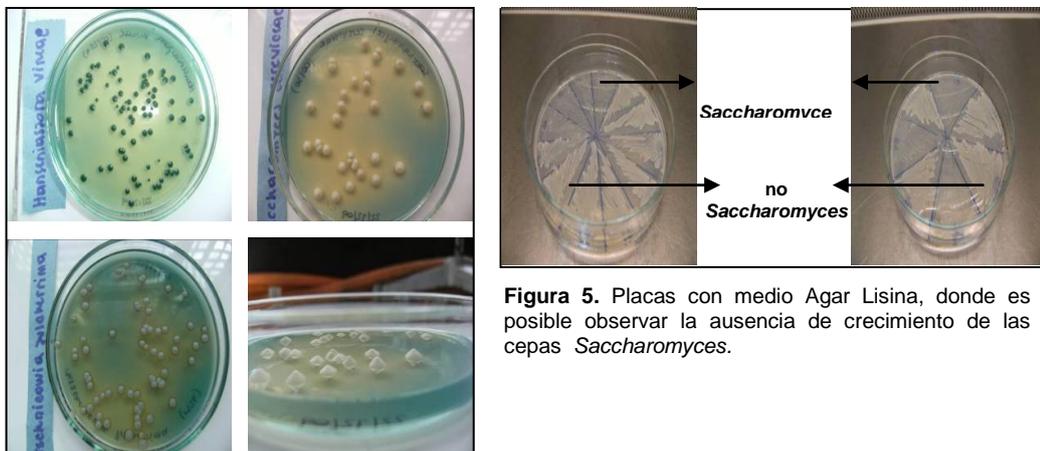


Figura 4. Placas de referencia donde se ven las diferencias morfológicas de colonias de distintas levaduras en medio WLN. a- *Hanseniaspora vineae*. b- *Mestchnikowia pulcherrima*. c, d- *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 5. Placas con medio Agar Lisina, donde es posible observar la ausencia de crecimiento de las cepas *Saccharomyces*.

Compatibilidad de las cepas antagónicas seleccionadas para el proceso de vinificación de uvas

En esta tesis se realizó el estudio de la capacidad fermentativa, análisis sensorial y actividad β -glucosidasa, de las levaduras aisladas en la vendimia 2009. El resto de las levaduras mencionadas en este trabajo de tesis fueron estudiadas anteriormente por la Sección Enología (Medina, 2006; Pérez, 2008).

Sin embargo, el ensayo de capacidad antagónica de las levaduras si fue realizado en este trabajo para el total de las cepas (levaduras aisladas en la vendimia 2009 y levaduras de la colección de la Sección Enología).

Capacidad Fermentativa

Luego del seguimiento de la fermentación se graficaron los datos de la misma, haciendo las diferencias diarias de pérdida de peso con respecto al día cero de fermentación para cada levadura. La pérdida de peso se debe a la liberación de CO₂ como producto de la fermentación. Debido a esto, se considera que cuanto mayor sea la pérdida de peso que sufra una fermentación mayor será la capacidad fermentativa de una levadura (Suarez e Iñigo, 1990b) (Figura 6). En la gráfica de la Figura 6, se puede ver la evolución del proceso de fermentación que siguió cada levadura, donde, como era de esperarse, al tratarse de levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* la mayoría no se destaca por un gran rendimiento en su fermentación. Se pudo diferenciar a las levaduras según 3 niveles de capacidad de fermentación:

- grupo a: muy buenas fermentadoras
- grupo b: buenas fermentadoras
- grupo c: malas fermentadoras

Se obtuvo una levadura no perteneciente al género *Saccharomyces*, con una gran capacidad de fermentación (perteneciente al grupo a). La misma ha sido codificada como AR09/07G. También se encontró un grupo de levaduras con capacidad media de fermentación (pertenecientes al grupo b). En este grupo a su vez se observan 3 levaduras que se aproximan bastante al rango de la levadura AR09/07G, (muy buena fermentadora) y una cuarta próxima al grupo de las malas fermentadoras (CHV09/12G) En el grupo c (malas fermentadoras), encontramos más de la mitad de las levaduras (Tabla 4).

Análisis Sensorial

Luego de finalizada la fermentación alcohólica, el panel entrenado de la Sección Enología, evaluó los aromas liberados por cada levadura. De un total de 12 levaduras iniciales con las que se trabajó, finalmente fueron evaluadas 11, dado que la levadura ME09/13G no se pudo mantener. De las 11 levaduras evaluadas, 7 dieron aromas buenos o aceptables. En la Tabla 3 se pueden ver algunos de los descriptores aromáticos que se pudieron obtener de las levaduras, entre los que se encuentran aromas frutales, cítricos, florales y microbiológicos.

No se pudo realizar una correlación en cuanto a capacidad fermentativa y aromática, ya que las malas fermentadoras dieron aromas aceptables mientras que las buenas fermentadoras dieron aromas no aceptables (Tabla 4).

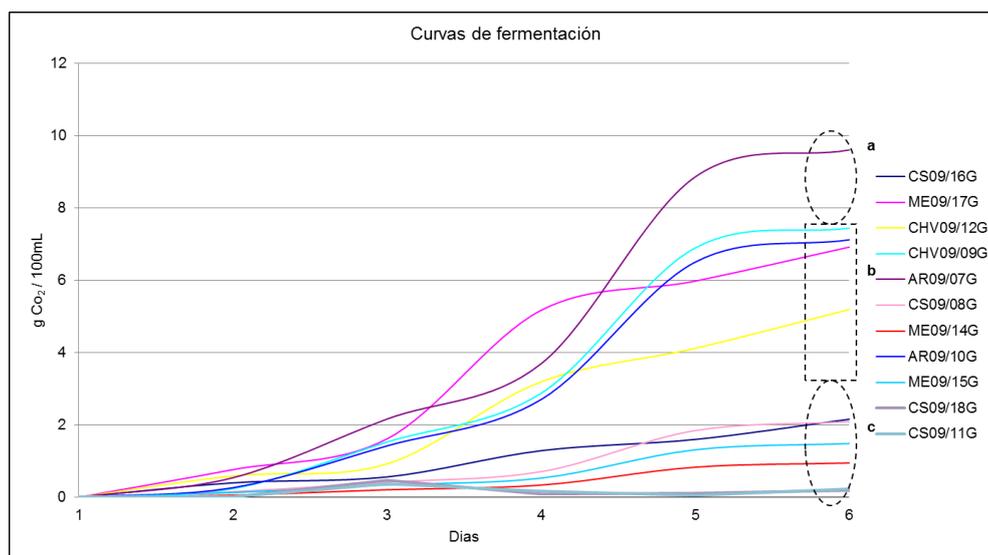


Figura 6. Curvas de fermentación. Se pueden distinguir tres grupos distintos según la capacidad de fermentar de cada microorganismo: a- muy buena fermentadora b- buenas fermentadoras c- malas fermentadoras

Actividad β -glucosidasa

A los aislamientos obtenidos en la vendimia 2009 se les realizó el ensayo de actividad β -glucosidasa (Figura 8), tal como se describió en Materiales y Métodos. El resto de las levaduras pertenecientes a la colección de la Sección fueron previamente estudiadas con este fin (Pérez, 2008). Además del análisis cualitativo de capacidad β -glucosidasa, también se cuantificó esa capacidad, ya que dependiendo del diámetro y de la intensidad del halo generado por la levadura en el medio, se pudieron definir 3 niveles de actividad: alto, con un diámetro correspondiente entre 23 y 27 mm (+++), medio con un diámetro entre 18 y 24 mm (++) y bajo cuyo diámetro oscilaba entre 14 y 17mm (+) (Tabla 3, Figura 7) (Pérez 2008).

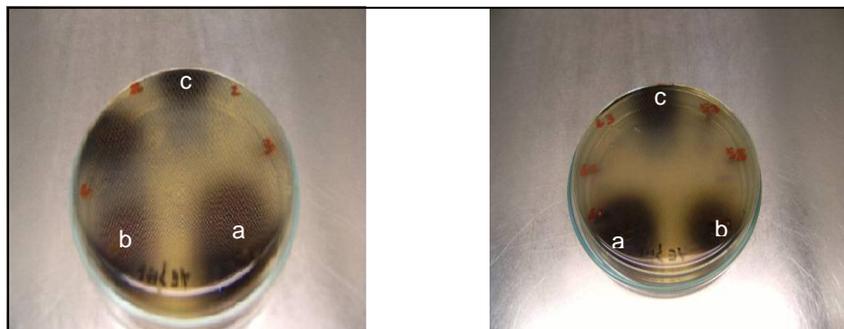


Figura 7. Determinación de actividad β -glucosidasa. Placa con agar esculina donde se aprecian diferentes halos de actividad β -glucosidasa. Cuanto mayor sea el diámetro del halo, mayor será la actividad β -glucosidasa que tiene ese microorganismo. En este caso se dividió en 3 categorías: alta, entre 23 y 27 mm +++(a), media, entre 18 y 22 mm ++ (b) y baja, entre 14 y 17 mm + (c)

Determinación de capacidad antagónica in vitro

De acuerdo a los resultados obtenidos fue posible clasificar a las levaduras en tres grupos, según el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del patógeno, expresado como Índice de Efectividad (IE):

a) El primer grupo tiene un rango de IE entre 0 - 10 % y comprende a las levaduras con acción nula o casi nula frente al patógeno. En este grupo se encuentran las levaduras: CHV09/09G, AR09/10G, CS09/11G, CS09/18G, AR09/07G, 00/05 y ME09/14G; y representan al 23% del total de levaduras.

b) Un segundo grupo que comprende a las levaduras cuyo IE se encuentra en un rango entre 11 - 50 %. Estas levaduras tienen una acción frente al patógeno que va de baja a moderada.

En este grupo se encuentran las levaduras CS09/08G y ME09/15G y representan el 7% de las levaduras totales.

c) Por último queda el grupo de levaduras comprendidas en los valores de IE de entre 51 y 100 %, por lo que su actividad frente al patógeno es altamente considerable. Aquí se encuentran las levaduras 02/19A, 02/25A, 02/5A, 00/09, 00/19, 00/23, 00-3, 00/8, 00-21, 00-25, 00/22, 00/07, 00/17, 00/13, 00/30, 00/35, 00/15, 00/12, CHV09/12G, CS09/16G Y ME09/17G. Este es el grupo más numeroso de levaduras y representa el 70% del total de levaduras analizadas. En

este grupo solo se encuentran 3 cepas aisladas en la vendimia 2009 (Figuras 8 y 9).

Tabla 3. Resultados de los análisis de actividad β -glucosidasa a pH4 y pH6. Cada nivel de actividad se distingue según el número de cruces asignado: 3 cruces nivel alto, 2 cruces nivel medio y 1 cruz nivel bajo.

Código	Especie- <u>Género</u>	Actividad β -glucosidasa	
		pH4	pH6
02/19A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	(-)	(+++)
02/25A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	(-)	(+++)
02/5A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	(-)	(+++)
00/09	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	(-)	(+)
00/19	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	(-)	(++)
00/23	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	(-)	(+++)
00-3	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	(-)	(++)
00/8	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	(-)	(+)
00-21	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	(-)	(+++)
00-25	<i>Metschnikowia aff. fruticola</i>	(-)	(+++)
00/22	<i>Candida railenensis</i>	(-)	(+)
00/07	<i>Cryptococcus flavescens</i>	(-)	(+)
00/05	<i>Rhodotorula graminis</i>	(-)	(+)
00/17	<i>Saccharomyces spp.</i>	(-)	(+)
00/13	<i>Saccharomyces spp.</i>	(-)	(+)
00/30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(-)	(++)
00/35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(-)	(+++)
00/15	<i>Saccharomyces spp.</i>	(-)	(++)
00/12	<i>Saccharomyces spp.</i>	(-)	(+)
AR09/07G	No Saccharomyces	(-)	(++) 24hs
CS09/08G	No Saccharomyces	No determinada	
CHV09/09G	No Saccharomyces	(-)	(++) 24hs
AR09/10G	No Saccharomyces	(-)	(++) 24hs
CS09/11G	No Saccharomyces	(++) 5días	(++) 48hs
CHV09/12G	No Saccharomyces	(-)	(++) 24hs
ME09/14G	No Saccharomyces	(-)	(++) 24hs
ME09/15G	No Saccharomyces	No determinada	
CS09/16G	No Saccharomyces	(-)	(-)
ME09/17G	No Saccharomyces	(-)	(+) 48hs
CS09/18G	No Saccharomyces	(++) 5días	(++) 24hs



Figura 8. Ensayos de inhibición. Fotos tomadas luego de 7 días de incubación a 25°C: a) se ve el crecimiento del patógeno junto con una levadura con un IE = 40% b) No se aprecia el crecimiento del patógeno ya que se incubo con una levadura con un IE = 100%

Selección de levaduras

Finalmente, en base a los resultados obtenidos en los ensayos realizados a las levaduras (Tabla 7) y realizando un análisis sobre qué características son más interesantes en el proceso de vinificación (actividad antagónica, capacidad fermentativa, aromática y actividad β -glucosidasa), fueron seleccionadas 2 levaduras de las aisladas en la vendimia 2009 para una posterior identificación molecular (esta actividad no estuvo contemplada en el marco del trabajo de esta tesis) e incorporación al cepario de la Sección Enología. Esta selección se realizó según determinadas características presentadas por los diferentes microorganismos, consideradas de interés (Tabla 5).

Siguiendo los criterios ya explicado en la Introducción sobre la compatibilidad deseada con el proceso de vinificación que deben tener estas levaduras para su posterior utilización.

En relación a las levaduras que ya pertenecían a la Sección Enología fueron seleccionadas 14 de las 19 analizadas por pertenecer al grupo con IE comprendido entre el rango de 51 a 100% (Tabla 6), además de ser generadoras de buenos aromas luego de la fermentación. Sin embargo no todas tienen buena capacidad fermentativa, pero fueron seleccionadas de todas maneras debido a que si no son buenas fermentadoras tampoco van a tener efecto negativo en una vinificación

dado que las fermentaciones siempre se terminan mediante la acción de levaduras *Saccharomyces*.

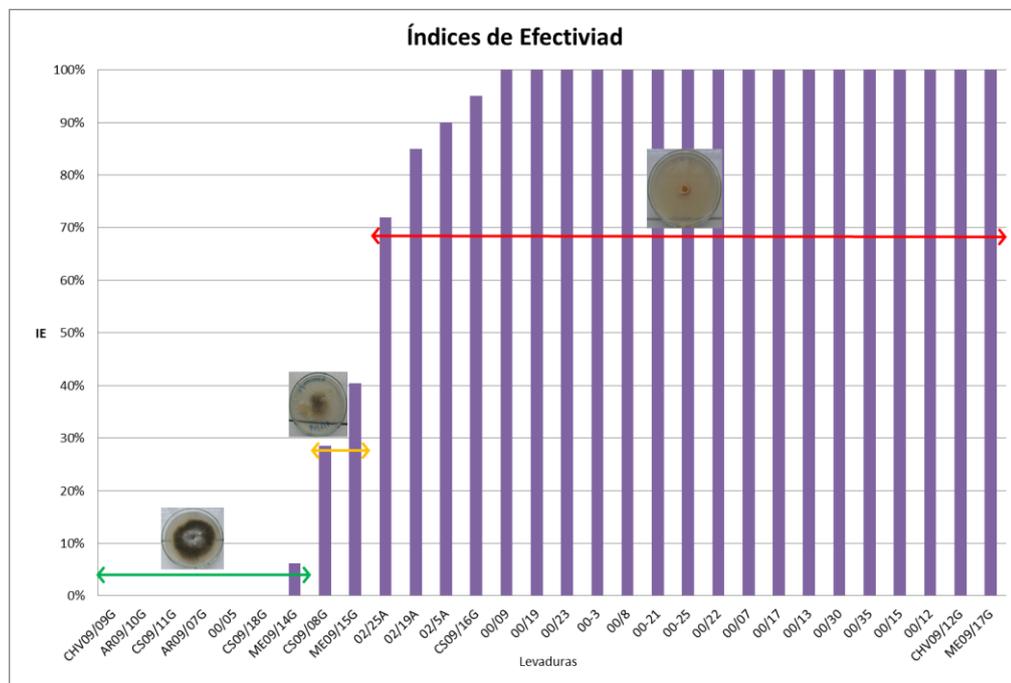


Figura 9. Índices de efectividad de las distintas levaduras. a) levaduras con rango de IE entre 0 y 10 % b) levaduras con IE entre 11 y 50 % c) levaduras con IE entre 51 y 100%.

Tabla 5. Cepas de la vendimia 2009 con las características por las cuales fueron seleccionadas.

Cepa	Características Enológicas
CS09/16G	Mala fermentadora Aromas aceptables (frutales) IE = 95 % Actividad β -glucosidasa: nula
ME09/17G	Buena fermentadora Aromas aceptables (verde, herbáceo, algo acético) IE = 100% Actividad β -glucosidasa: baja a pH 6

Tabla 4. Capacidad fermentativa y aromática de cada levadura, tanto de las levaduras pertenecientes a la colección de la sección Enología (a) como de las aisladas en la vendimia 2009 (b). Algunas de las levaduras pertenecientes a la colección de la Sección Enología tiene los descriptores aromáticos sin determinar (Nd).

Código	Especie- Género	Capacidad fermentativa	Análisis Sensorial	Descriptores Aromáticos
02/19A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Muy buena fermentadora	Aceptable	Almendra, frutal, compota
02/25A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Muy buena fermentadora	Aceptable	Frambuesa, frutilla
02/5A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	Muy buena fermentadora	Aceptable	Ananá en almíbar, frutilla, frambuesa
00/09	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mala fermentadora	Aceptable	Nd
00/19	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mala fermentadora	No aceptable	Nd
00/23	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mala fermentadora	Aceptable	Frutos verdes, levadura, licoroso
00-3	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mala fermentadora	No aceptable	Nd
00/8	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mala fermentadora	No aceptable	Nd
00-21	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Mala fermentadora	No aceptable	Nd
00-25	<i>Metschnikowia aff. fruticola</i>	Mala fermentadora	Bueno	Miel
00/22	<i>Candida railenensis</i>	Mala fermentadora	Bueno	Verde, cítrico, manzana
00/07	<i>Cryptococcus flavecens</i>	Mala fermentadora	Bueno	Fruta seca
00/05	<i>Rhodotorula graminis</i>	Mala fermentadora	No determinado	Nd
00/17	<i>Saccharomyces spp.</i>	Buena fermentadora	Aceptable	Nd
00/13	<i>Saccharomyces spp.</i>	Buena fermentadora	Aceptable	Nd
00/30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Buena fermentadora	Bueno	Miel, floral
00/35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Buena fermentadora	Bueno	Poco floral, frutal, manzana y banana
00/15	<i>Saccharomyces spp.</i>	Buena fermentadora	Bueno	Nd
00/12	<i>Saccharomyces spp.</i>	Buena fermentadora	Aceptable	Nd
AR09/07G	no <i>Saccharomyces</i>	Muy buena fermentadora	No aceptable	Acético
CS09/08G	no <i>Saccharomyces</i>	Mala fermentadora	Aceptable	Frutado, cítrico
CHV09/09G	no <i>Saccharomyces</i>	Buena fermentadora	No aceptable	Acético
AR09/10G	no <i>Saccharomyces</i>	Buena fermentadora	No aceptable	Acetato de etilo
CS09/11G	no <i>Saccharomyces</i>	Mala fermentadora	Aceptables	Humedad
CHV09/12G	no <i>Saccharomyces</i>	Buena fermentadora	No aceptable	Acetona
ME09/14G	no <i>Saccharomyces</i>	Mala fermentadora	Bueno	Miel, almíbar
ME09/15G	no <i>Saccharomyces</i>	Mala fermentadora	Bueno	Frutos secos
CS09/16G	no <i>Saccharomyces</i>	Mala fermentadora	Aceptable	Frutal
ME09/17G	no <i>Saccharomyces</i>	Buena fermentadora	Aceptable	Verde, herbáceo, algo acético
ME09/18G	no <i>Saccharomyces</i>	Mala fermentadora	Aceptables	Humedad

Discusión

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de levaduras, con actividad antagónica contra el fitopatógeno de la vid, *B. cinerea*, a su vez se buscó que éstas levaduras cumplieran con determinadas características que las hicieran compatibles con el proceso de vinificación, que no aporten características negativas al producto final. De las 30 levaduras analizadas, todas procedentes de uvas de distintas vendimias, el 70% posee actividad antagónica con IE entre 51 y 100%. A partir de éstos resultados se puede inferir, como en los trabajos de Carrau Magariños, 2005 y Rabosto et al., 2006, que los racimos de uvas constituyen un nicho muy interesante para el aislamiento de microorganismos con actividad biocontroladora frente al fitopatógeno *B. cinerea*. Estos resultados también coinciden con lo expuesto por Chalutz & Wilson, 1990 los cuales encontraron que al sembrar en placas un concentrado del lavado de la superficie de frutas cítricas, solo crecían levaduras y bacterias. Sin embargo al diluir el concentrado y sembrándolo en placas se puede apreciar la aparición de crecimiento fúngico. Esto sugiere que las bacterias y levaduras que se encontraban en la fruta podrían suprimir o impedir el crecimiento del fitopatógeno que estaba presente y solo pudo crecer cuando baja la carga de bacterias y levaduras nativas de la fruta mediante la dilución del agua de lavado. Este resultado estaría indicando que cuando frutas y vegetales son lavados previo a su almacenamiento son más susceptibles a desarrollar enfermedades. Debido a que se eliminan los antagonistas frente a patógenos que naturalmente se encuentran en frutas y vegetales.

Tabla 6. Cepas pertenecientes a la colección de la Sección Enología con las características por las cuales fueron seleccionadas.

Cepa	Características Enológicas
02/19A	Muy buena fermentadora Aromas aceptables (almendra, frutal, compota) IE = 85 % Actividad β -glucosidasa: alta a pH 6
02/25A	Muy buena fermentadora Aromas aceptables (frambuesa, frutilla) IE = 72% Actividad β -glucosidasa: a pH 6
02/5A	Muy buena fermentadora Aromas aceptables (ananá en almíbar, frutilla, frambuesa) IE = 90% Actividad β -glucosidasa: alta a pH 6
00/09	Mala fermentadora Aromas aceptables IE = 100% Actividad β -glucosidasa: baja a pH 6
00/23	Mala fermentadora Aromas aceptables Actividad β -glucosidasa: alta a pH 6
00/25	Muy buena fermentadora Aromas aceptables (ananá en almíbar, frutilla, frambuesa) IE = 90% Actividad β -glucosidasa: alta a pH 6
00/22	Mala fermentadora Aromas buenos IE = 100% Actividad β -glucosidasa: baja a pH 6
00/07	Mala fermentadora Aromas buenos IE = 100% Actividad β -glucosidasa: baja a pH 6
00/17	Buena fermentadora Aromas aceptables IE = 100% Actividad β -glucosidasa: baja a pH 6
00/13	Buena fermentadora Aromas aceptables IE = 100% Actividad β -glucosidasa: baja a pH 6
00/30	Buena fermentadora Aromas buenos IE = 100% Actividad β -glucosidasa: media a pH 6
00/35	Buena fermentadora Aromas buenos IE = 100% Actividad β -glucosidasa: alta a pH 6
00/15	Buena fermentadora Aromas buenos IE = 100% Actividad β -glucosidasa: media a pH 6
00/12	Buena fermentadora Aromas aceptables IE = 100% Actividad β -glucosidasa: baja a pH 6

Para futuros ensayos a nivel de campo con levaduras estudiadas en este trabajo, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos en el laboratorio no tienen que ser los mismos que se obtendrán después en las condiciones de un viñedo, dado que son muchas las variables que pueden influir en la actuación de la levadura sobre la vid (factores climáticos y nutricionales) (Teixido et.al., 1999). También hay que tener en cuenta que cuando se inocula un microorganismo en un ambiente nuevo este debe pasar por una etapa de adaptación. Lo que se busca al aislar microorganismos nativos del lugar donde se los va a inocular después, es disminuir al mínimo ese período de adaptación (Vero & Mondino, 2006), dado que ya reconoce las condiciones en las cuales se tiene que reproducir. De aquí se desprende que la viabilidad y por lo tanto la efectividad del agente de biocontrol a nivel de campo está sujeta a factores climáticos, como por ejemplo la humedad, y la temperatura y a los nutrientes disponibles. (Guetsky et.al., 2001). Sin embargo, como se comentó anteriormente, los microorganismos utilizados en este trabajo al ser aislados de la superficie de la uva ya estarían adaptados a las condiciones nutricionales y climáticas del viñedo, por lo tanto tendrían grandes probabilidades de sobrevivir en el campo, así como tampoco deberían de presentarse mayores problemas de adaptación al viñedo.

En cuanto a la selección de levaduras analizadas, solo 10 levaduras de las 21 con buena capacidad antagónica, dieron buenos resultados para capacidad fermentativa, producción de buenos aromas y actividad β -glucosidasa (Tabla 7). Para las 11 levaduras restantes se hizo una evaluación sobre cual atributo (capacidad fermentativa o producción de aromas) tiene mayor impacto en un futuro proceso de vinificación.

Si se compara entre la capacidad fermentativa y aromática en una vinificación, podría ser más relevante la capacidad aromática ya que si una levadura no es buena fermentadora, se puede hacer una fermentación mixta junto a una *Saccharomyces cerevisiae* pudiendo de todas formas aportar los buenos aromas que genera. En cambio sí es muy buena fermentadora pero sus aromas no son aceptables, podrá ser capaz de lograr una buena fermentación en detrimento del producto final en cuanto a su calidad aromática. Por lo que la capacidad aromática sería la característica más importante a tener en cuenta y más aún cuando se trata de cepas no *Saccharomyces* que en general no son buenas fermentadoras.

En los resultados obtenidos se puede observar que la mayoría de las levaduras con actividad antagónica poseen actividad β -glucosidasa. No es posible realizar alguna correlación partiendo de estos resultados, debido al bajo número de levaduras analizadas. Pero si deja abierta una interrogante para un posible estudio más exhaustivo al respecto, con mayor número de levaduras para así obtener resultados estadísticamente representativos.

Tabla 7. Resultados de los ensayos de identificación genética, IE, Capacidad fermentativa, Evaluación sensorial y actividad β glucosidasa de todas las levaduras analizadas.

Código	Género-especie	IE(%)	Capacidad fermentativa	Evaluación Sensorial	Actividad β glucosidasa	
					pH4	pH6
02/19A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	85	Muy buenas fermentadoras	Aceptables	(-)	(+++)
02/25A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	72	Muy buenas fermentadoras	Aceptables	(-)	(+++)
02/5A	<i>Hanseniaspora vineae</i>	90	Muy buenas fermentadoras	Aceptables	(-)	(+++)
00/09	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	100	Mala fermentadora	Aceptables pero...	(-)	(+)
00/19	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	100	Mala fermentadora	No aceptables	(-)	(++)
00/23	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	100	Mala fermentadora	Aceptables	(-)	(+++)
00-3	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	100	Mala fermentadora	No aceptables	(-)	(++)
00/8	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	100	Mala fermentadora	No aceptables	(-)	(+)
00-21	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	100	Mala fermentadora	No aceptables	(-)	(+++)
00-25	<i>Metschnikowia aff. fruticola</i>	100	Mala fermentadora	Buenos	(-)	(+++)
00/22	<i>Candida railenensis</i>	100	Mala fermentadora	Buenos	(-)	(+)
00/07	<i>Cryptococcus flavescens</i>	100	Mala fermentadora	Buenos	(-)	(+)
00/05	<i>Rhodotorula graminis</i>	0	Mala fermentadora	-----	(-)	(+)
00/17	<i>Saccharomyces spp.</i>	100	Buena fermentadora	Aceptables	(-)	(+)
00/13	<i>Saccharomyces spp.</i>	100	Buena fermentadora	Aceptables	(-)	(+)
00/30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	Buena fermentadora	Buenos	(-)	(++)
00/35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	Buena fermentadora	Buenos	(-)	(+++)
00/15	<i>Saccharomyces spp.</i>	100	Buena fermentadora	Buenos	(-)	(++)
00/12	<i>Saccharomyces spp.</i>	100	Buena fermentadora	Aceptables	(-)	(+)
AR09/07G	No Saccharomyces	0	Muy buena fermentadora	No aceptables	(-)	(++) 24hs
CS09/08G	No Saccharomyces	29	Mala fermentadora	Aceptables	-----	
CHV09/09G	No Saccharomyces	0	Buena fermentadora	No aceptables	(-)	(++) 24hs
AR09/10G	No Saccharomyces	0	Buena fermentadora	No aceptables	(-)	(++) 24hs
CS09/11G	No Saccharomyces	0	Mala fermentadora	-----	(++) 5días	(++) 48hs
CHV09/12G	No Saccharomyces	100	Buena fermentadora	No aceptables	(-)	(++) 24hs
ME09/14G	No Saccharomyces	6	Mala fermentadora	Buenos	(-)	(++) 24hs
ME09/15G	No Saccharomyces	41	mala fermentadora	Buenos	-----	
CS09/16G	No Saccharomyces	95	Mala fermentadora	Aceptables	(-)	(-)
ME09/17G	No Saccharomyces	100	Buena fermentadora	Aceptables	(-)	(+) 48hs
CS09/18G	No Saccharomyces	0	Mala fermentadora	-----	(++) 5días	(++)24hs

Conclusión

Las conclusiones de este trabajo de tesis se pueden resumir de la siguiente manera:

- 1- El viñedo presenta un buen ecosistema para el aislamiento de posibles microorganismos antagónicos frente al principal fitopatógeno de la vid, *Botrytis cinerea*.
- 2- Se pudieron obtener levaduras con excelente capacidad antagónica, buenas fermentadoras y con características aromáticas deseables.
- 3- Los puntos anteriormente mencionados posibilitan aplicaciones futuras exitosas a nivel de campo.
- 4- Se pudo observar que de la mayoría de las levaduras que tiene buena capacidad antagónica frente a *B. cinerea*, poseen también actividad β -glucosidasa.

Estas conclusiones plantean la necesidad de seguir avanzando con la investigación a fin de poder inferir el o los mecanismos de acción utilizados por las levaduras como microorganismos antagónicos de *B. cinerea*.

Bibliografía

- Agrios, G. N. (2005). Dreilx Ibis, D. **Plant Pathology**. Fifth Edition. University of Florida, Gainesville, U.S.A. Elsevier
- Baker, R. & Cook, R. (1974). **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco. Ed W. H. Freeman.
- Barka, E. A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.-C., & Belarbi, A. (2002). **Inhibitory effect of endophyte bacteria on Botrytis cinerea and its influence to promote the grapevine growth**. Biological Control, 24(2), 135-142.
- Batta, Y. A. (2007). **Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai**. Postharvest Biology and Technology. 43(1), 143-150.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., & Visconti, A. (2006). **Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* on grape**. International journal of food microbiology, 108(2), 204-9.
- Beresford R. (1994) **Fungicide resistance**. The Orchardist 67(9), 24.
- Carrau F. (2003) **Caracterización de levaduras en relación a su habilidad para utilizar el nitrógeno. Estudios de compuestos aromáticos en vinos**. Tesis de Doctorado en Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Carrau Magariños, M. (2005). **Evaluación de la capacidad antagónica de microorganismos aislados de la uva frente a hongos patógenos: *Botrytis* spp., *Plasmopara viticola*, *Penicillium* spp.y *Monilinia* spp.** Informe de Pasantía. Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

- Cavazza, A.; Grando, M. S.; Zini, C. (1992). **Rilevazioni della flora microbica di mosti e vini**. Vignevivi. 9, 17-20.
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., & Panijpan, B. (2007). **Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*)**. Biological Control, 42(3), 326-335.
- Chalutz, E., Wilson, C.L. (1990). **Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii***. Plant Disease 74, 134–137.
- Coniberti, A.; Disegna, E.; Casco, N.; Fariña, L.; Carrau, F.; Dellacassa, E.; Medina, K.; Boido, E. (2009). **Deshojados en combinación con aplicación de caolinita (Sorround®) Una herramienta de manejo del viñedo, para la obtención de vinos Sauvignon Blanc L. de alta tipicidad e inocuidad en clima subtropical-humedo**. Revista Enología. N° 1, año VI.
- Cook, J.R. & Baker, K.F. 1983. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul, Minnesota. APS Press 539p
- Cook, D. W. M. (2002). **Effect of formulated yeast in suppressing the liberation of *Botrytis cinerea* conidia**. Plant disease, 86(11), 1265–1270.
- Cook, R. J. (2004). **Biological control and holistic plant-health care in agriculture**. American Journal of Alternative Agriculture.
http://eap.mcgill.ca/MagRack/AJAA/AJAA_11.htm
- Donéche, B.J. (1993). **Botrytized Wines**. Chapter 11, pag. 327-351. Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers.
- Droby, S.; Cohen, L.; Daus, A.; Weiss, B.; Horev, B.; Chalutz, E.; Katz, H.; Keren-Tzur, M. and Shachnai, A. (1998). **Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus**. Biological Control, 12(2), 97-101.

- Droby, S.; Lischinsky, S.; Cohen, L.; Weiss, B.; Daus, A.; Chand-Goyal, T.; Eckert, J.W.; Manuliss, S. (1999). **Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum***. *Biological Control*. 16, 27-34.
- Eberhart, B.; Cross, D. F.; Chase, L. R. (1964). **β -glucosidase system of *Neurospora crassa***. *J. Bacteriol.* 87, 761-770.
- Elad, Y., & Stewart, A. (2007). **Microbial control of *Botrytis spp.*** Chapter 13, 223-241. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer.
- Fan, Q.; & Tian, S.P. (2001). **Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner**. *Postharvest Biology and Technology* 21 (3), 341–350.
- Flores, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A. (1997). **Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1***. *Current genetics*, 31(1), 30-7.
- Gabriolotto, C.; Monchiero, M.; Nègre, M.; Spadaro, D.; Gullino, M. L. (2009). **Effectiveness of control strategies against *Botrytis cinerea* in vineyard and evaluation of the residual fungicide concentrations**. *Journal of Environmental Science and Health, Part B.*, 44:4(July 2010), 389 — 396.
- Ge, L., Zhang, H., Chen, K., Ma, L., & Xu, Z. (2010). **Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved**. *Food Chemistry*, 120(2), 490-495.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y. and Dinooor A. (2001). **Combinig biocontrol agents to reduce the variability of biological control**. *Phytopathology*. Vol. 91, No. 7, 621-627.
- Lee, C. Y.; Jaworski A. W. (1998) **Phenolics and browning potencial of white grapes grown in New Coek**. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39 (4), 337-340.

- Leroux, P. (2007). **Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides**. Chapter 12, 195-222. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer.
- Long, C.-A., Wu, Z., & Deng, B.-X. (2005). **Biological control of *Penicillium italicum* of Citrus and *Botrytis cinerea* of Grape by Strain 34–9 of *Kloeckera apiculata***. *European Food Research and Technology*, 221(1-2), 197-201.
- Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S., & Aziz, A. (2007). **Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions**. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 43-57.
- McGrath, M. T. (2004). **What are Fungicides?** APS Education Center Introductory Topics. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/Fungicides.aspx>
- Medina K. (2006). **Selección de levaduras para vinos tintos. Efecto de las mismas sobre la composición polifenólica de la variedad Tannat**. Tesis de Maestría en Química, Universidad de la República, Uruguay.
- Medina, K., Ferreri, L., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., Gaggero, C.; Carrau, F. (2007). **Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación**. *Revista Enología*, 4, 1-6.
- Pallman C.L.; Brown J.A.; Olineka T.L.; Cocolin L.; Mills D.A. y Bisson L.F. (2001). **Use of WL Medium to profile native flora fermentations**. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52 198 – 203
- Pérez, G. (2008). **Selección de levaduras con actividad β -glucosidasa y capacidad de modificar el índice Glicosil-Glucosa en vinos**. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay.

- Peynaud, E. (1996). **Enología Práctica, Conocimiento y elaboración del vino. Tercera edición.** (E. Mundi-Rensa, Ed.). Madrid-Barcelona-Mexico.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., & Gullino, M. L. (1997). **Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple.** *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 131-140.
- Rabosto X., Carrau M., Paz A., Boido E., Dellacassa, E. y Carrau F, M. (2006) **Grapes and Vineyard Soils as Sources of Microorganisms for Biological Control of *Botrytis cinerea*.** *American Journal of Enology and Viticulture*. 57(3), 332-338.
- Ribereau - Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Doneche, B.; Lonvaud, A. *Traité D'Oenologie. 1.* (1998). **Microbiologie du vin. Vinifications.** Ed. Dunoud. Paris, France. p158.
- Samson R.A.; Hockstra E.S.; Frisvad J.C.; Filtenborg O. (1995) **Introduction to food-borne fungi.** Four Edition. Wageningen. The Netherlands.
- 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 (Reading, England)*, 150(Pt 8), 2527-34.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review.** *Biological Control*, 50(3), 205-221.
- Stotz, H. U., Elad, Y., Powell, A. L. T., & Labavitch, M, J. (2007). **Innovative Biological Approaches to *Botrytis* suppression.** Chapter 20, 369-386. *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* Springer.
- Suarez, J. A. & Iñigo, B. 1990 a. **Desacidificación a cargo de bacterias: la fermentación maloláctica.** *Microbiología enológica. Fundamentos de la vinificación.* (Ediciones Mundi Prensa). Madrid, España. pp. 305 - 327.

- Suarez, J. A. & Iñigo, B. 1990 b. **Las levaduras vínicas y el proceso fermentativo.** *Microbiología enológica. Fundamentos de la vinificación.* (Ediciones Mundi Prensa). Madrid, España. pp 157 - 286.
- Teixido, N., Usall, J., & Viñas, I. (1999). **Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage.** *International Journal of Food Microbiology*, 50(3), 203-210.
- 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(1), 91-98.
- Vero, S. & Mondino, P. (2006). **Control biológico de patógenos de plantas.** Ed. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Uruguay.
- Vero, S & Mondino, P. (1999). **Medidas para conservar fruta y hortalizas. Control biológico poscosecha.** *Horticultura Internacional*, 26, 29-36.
- Vero S., A. Paolillo, P. Mondino & J. Burgueño (1998). **Control biológico de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzanas.** Cátedra de Microbiología. Cátedra de Fitopatología. Unidad de Estadística y Cómputos. Facultad de Agronomía. Montevideo. Uruguay.
- Viterbo, A.; Ramot, O.; Chernin, I.; Chet, I. 2002. **Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens.** *Antonie van Leeuwenhoek*. 81, 549-556.
- Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1989). **Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: An Emerging Technology.** *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 425-441.
- Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E. (1992). **Futures alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases.** *Biological Control of Plant Diseases*. p. 133-138.

Yang, H.-H., Yang, S. L., Peng, K.-C., Lo, C.-T., & Liu, S.-Y. (2009). **Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea***. *Mycological research*, 113(Pt 9), 924-32.

Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Cao, J., & Meng, R. (2007). **Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis***. *Biological Control*, 40, 287-292.