CONTROL BIOLOGICO DE PATOGENOS DE PLANTAS

Facultad de Agronomía - Unidad de Educación Permanente

Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino
Dra. Q. F. Silvana Vero

COMISIÓN SECTORIAL DE EDUCACIÓN PERMANENTE

EDUCACION PERMANENTE
Universidad de la República

UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA

ÁREA AGRARIA

AG

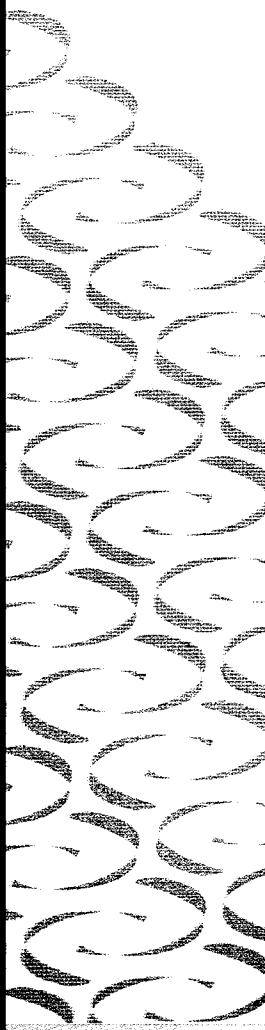
Rector de la Universidad de la República:	Dr. Rodrigo Arocena
Decano de la Facultad de Agronomía:	Ing. Agr. PhD. Fernando García Préchac
Director de la Unidad Central de Educación Permanente:	Ing. Agr. Mario Jaso
Director de la Unidad de Educación Permanente de la Facultad de Agronomía:	Ing. Agr. Roberto Malfatti
Editor Técnico de la Facultad de Agronomía:	Ing. Agr. Gustavo Uriarte
Producción	Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino Dra. Q.F. Silvana Vero
Diagramación y procesamiento de fotos	Silvia Duarte y Miramar Freitas
Imprenta	Departamento de Publicaciones Facultad de Agronomía. Av E. Garzón 780. 12.900 Montevideo, URUGUAY
Fecha de impresión	Noviembre de 2006
Cantidad de ejemplares	300
Depósito legal	330.119/06
ISBN	9974-0-0359-8

Esta publicación fue financiada por la Comisión Sectorial de Educación Permanente

Control Biológico de Patógenos de Plantas

Facultad de Agronomía - Unidad de Educación Permanente

Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino
Dra. Q. F. Silvana Vero



1. Unidad de Fitopatología. Departamento de Protección vegetal. Facultad de Agronomía. UdelaR.
2. Catedra de Microbiología. Departamento de Biociencias. Facultad de Química. UdelaR.

CONTENIDO

	PRESENTACIÓN	5
	INTRODUCCIÓN	7
Capítulo 1	LAS ENFERMEDADES DE PLANTAS Y SU MANEJO	11
1.1	Concepto de enfermedad	11
1.2	Ciclo de la enfermedad	12
1.3	La enfermedad en el cultivo	17
1.4	El control biológico y los sistemas de Manejo Integrado de enfermedades de plantas	20
Capítulo 2	CONTROL BIOLÓGICO	21
2.1	Introducción	21
2.2	Biocontrol en la naturaleza	22
2.3	Las prácticas agrícolas y el biocontrol	23
2.4	Definiciones	25
Capítulo 3	ANTAGONISTAS MICROBIANOS COMO AGENTES DE BIOCONTROL	27
3.1	Introducción	27
3.1.1	Biocontrol natural	28
3.1.2	Biocontrol mediado por el hombre	29
3.2	Antagonistas microbianos como agentes de biocontrol	29
3.2.1	Bacterias como controladores biológicos	30
3.2.2	Virus como controladores biológicos	36
3.2.3	Levaduras como agentes de control biológico	38
3.2.4	Hongos filamentosos como controladores biológicos	41
3.3	Características ideales de un agente microbiano de biocontrol	45
3.4	Pasos a seguir en el desarrollo de agentes de control biológico	45
Capítulo 4	MECANISMOS DE BIOCONTROL	49
4.1	Introducción	49
4.2	Interacción patógeno antagonista	50
4.2.1	Amensalismo	50
4.2.2	Reducción de la virulencia del patógeno	61
4.2.3	Competencia	65
4.2.4	Micoparasitismo	70
4.3	Interacción Agente Huésped	74
4.3.1	Inducción de resistencia	74
Capítulo 5	AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO	79
5.1	Introducción	79

82 5.2 **Aislamiento**
83 5.3 **Selección ABC**
83 5.3.1 Selección "in vitro"
84 5.3.2 Selección "in vivo"
86 5.3.3 Selección combinada
87 5.3.4 Selección de ACB según características especiales

91 **Capítulo 6 APLICACIÓN DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO**

97 **Capítulo 7 CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES DE POSCOSECHA**
97 7.1 **Poscosecha: Características y problemas**
99 7.2 **Control biológico en poscosecha**
102 7.3 **Mecanismos de acción**
105 7.4 **Métodos de selección**
107 7.5 Potenciación del biocontrol en poscosecha
108 7.5.1 Manipulación del ambiente
109 7.5.2 Uso de mezclas de antagonistas
109 7.5.3 Control Integrado
113 7.6 **Conclusiones**

115 **Capítulo 8 CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS DEL TRIGO**
115 8.1 **Introducción**
117 8.2 **Estrategia**
118 8.3 **Aislamiento, identificación y selección del patógeno**
118 8.3.1 Identificación
119 8.3.2 Selección del patógeno
119 8.4 **Aislamiento, identificación, caracterización y selección de posibles antagonistas de rastrojo de trigo**
120 8.4.1 Identificación
120 8.4.2 Selección de la o las cepas antagonistas
121 8.4.3 Actividad enzimática
122 8.4.4 Ensayos de antagonismo *Trichoderma* vs. *Fusarium*
126 8.5 **Aislamiento, identificación, caracterización y selección de posibles antagonistas de flores de trigo**

127 **Capítulo 9 CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS CON *CLONOSTACHYS ROSEA***

133 **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

Hoy día los objetivos de la producción agrícola son el brindar a los consumidores productos de calidad e inocuidad asegurada, producidos mediante métodos conservacionistas de los recursos naturales, respetuosos del medio ambiente y de la salud de los trabajadores y consumidores.

Esto ha llevado al desarrollo de 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. De esta forma el control de enfermedades se realiza integrando diferentes métodos de control, complementando la racionalización del control químico, con métodos naturales que satisfagan a la vez exigencias económicas, ecológicas y toxicológicas. Dentro de este contexto el control biológico ha demostrado ser una herramienta útil en el manejo integrado de los patógenos de plantas.

En Uruguay desde hace varios años se llevan a cabo estudios tendientes a desarrollar métodos de control biológico de patógenos de plantas. La investigación desarrollada en varios ámbitos nacionales, se ha basado principalmente en la búsqueda de microorganismos nativos capaces de controlar el desarrollo de enfermedades causadas por cepas locales de patógenos. En la actualidad se está poniendo énfasis en la producción y desarrollo de formulaciones, así como en el estudio de medidas de control integrado que involucren el uso del control biológico.

La experiencia acumulada durante estos años ha permitido consolidar el Curso de Educación Permanente sobre *Control Biológico de Patógenos de Plantas*. Dicho curso se lleva a cabo en forma coordinada entre docentes de la Facultad de Agronomía y de Facultad de Química con la participación de investigadores de Facultad de Ciencias, INIA e Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Con el objetivo de disponer de una publicación que reuniese los principales conceptos desarrollados en dicho curso y que a su vez permitiese la difusión del conocimiento generado hasta el momento se decidió la publicación del presente libro.

Los autores agradecen a: Ingeniera Alimentaria Gabriela Garmendia, Ingeniera Alimentaria Mónica Cabrera y Magíster Elisa Silvera por su colaboración escribiendo los capítulos referentes al Control Biológico en poscosecha,

Control Biológico de la fusariosis del trigo y Control Biológico del moho gris con *Clonostachys rosea* respectivamente.

Los autores también agradecen muy especialmente a la Comisión Sectorial de Educación Permanente el haber podido concretar esta tarea.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha incrementado la conciencia acerca de la necesidad de preservar los recursos naturales y el medio ambiente tanto para las generaciones actuales como para las futuras. En este contexto, hoy día los objetivos de la producción agrícola son el brindar a los consumidores productos de calidad e inocuidad asegurada, producidos mediante métodos conservacionistas de los recursos naturales, respetuosos del medio ambien

En relación a las frutas y hortalizas, el concepto de "calidad" ha sufrido una fuerte evolución de modo que ya no se refiere a la mera estética del producto (forma, tamaño, color) sino que incluye, aspectos relacionados al proceso de producción y comercialización. La preservación de los recursos naturales durante su producción, la preservación del medio ambiente, el cuidado de la salud de trabajadores y consumidores forman parte ahora, de ese nuevo concepto de calidad.

El manejo tradicional de las enfermedades de plantas en la producción convencional, basado en aplicaciones periódicas de funguicidas, es ahora seriamente cuestionado. La aplicación de funguicidas en la producción de frutas y hortalizas provoca los más altos índices de impacto, superando a los insecticidas y herbicidas utilizados para controlar plagas y malezas.

Para dar respuestas a las exigencias actuales de la Sociedad, agricultores y técnicos deben implementar complejos sistemas de Manejo Integrado (MI) de las enfermedades, en los que se trata de minimizar el uso de funguicidas recurriendo a técnicas y productos de bajo impacto ambiental, respetando la salud de trabajadores y consumidores. Se parte del supuesto, de que no es posible destruir ni eliminar a las poblaciones de patógenos de plantas, sino que es necesario convivir con ellas manejándolas de tal modo que su interferencia en los cultivos sea menor permitiendo producir en forma comercial.

El control biológico (CB) de las enfermedades de plantas aparece como una herramienta indispensable al momento de diseñar y poner en práctica Sistemas de Manejo Integrado. El CB surge de la observación, estudio y conocimiento de la naturaleza misma. El estudio de las relaciones o interacciones de los microorganismos entre sí, de los microorganismos con las plantas y de la influencia del medio ambiente sobre ellas, ha permitido su manejo de manera de propiciar el desarrollo de las plantas e interferir el desarrollo de las enfermedades.

Para poner en práctica estrategias de CB de las enfermedades de las plantas, es necesario conocer en profundidad el ciclo biológico del patógeno, el ciclo de la enfermedad, la biología de la planta huésped así como las características epidemiológicas de la enfermedad. Estos conocimientos son los que permiten definir los momentos, sitios y estrategias más oportunos de intervención, con el objetivo de minimizar los daños ocasionados por la enfermedad. Una de las limitantes mayores que tiene el CB es las carencias de estos conocimientos por lo que, en la mayoría de los casos, es necesario comenzar por estudiar el patosistema antes de iniciar cualquier proceso de desarrollo de una herramienta biológica.

Por tratarse de interacciones entre seres vivos, las que son influenciadas por el ambiente, las herramientas de control biológico no siempre son aplicables en forma universal. Por el contrario los desarrollos locales brindan la posibilidad de disponer de técnicas o métodos mejor adaptados a cada situación de producción.

Los trabajos tendientes a desarrollar productos biológicos con la finalidad de controlar las enfermedades que atacan los cultivos comienzan con la búsqueda de posibles antagonistas entre los cuales se seleccionan los más efectivos, los que seguirán un largo proceso de desarrollo hasta disponer de una formulación aplicable a nivel comercial.

La elección de las estrategias de aislamiento, selección y aplicación de agentes de CB deben ser cuidadosamente estudiadas y diseñadas si se pretende tener resultados positivos. El estudio de los mecanismos de acción de los agentes de biocontrol nos permitirá comprender como funciona el control biológico en determinado patosistema y permitirá idear mecanismos de potenciación de los mismos. Deberá asegurarse la inocuidad del antagonista tanto para el ser humano como para otros cultivos, flora y fauna nativas. Luego deberán idearse y ajustarse formas de producción masiva del agente de control biológico. Se buscarán métodos de producción sencillos de bajo costo. Luego es necesario formular el microorganismo en una forma que sea de fácil aplicación, que permita mantener la viabilidad del ACB por un tiempo prudente y en lo posible que favorezca su efectividad.

En este libro se presentan algunos conceptos básicos que deben servir de guía para comprender la esencia del control biológico de las enfermedades de plantas.

Como el Control Biológico de las enfermedades de plantas requiere de un profundo conocimiento del patosistema se inicia con un capítulo refe-

rente a la enfermedad, su ciclo así como aspectos epidemiológicos que deben ser consideradosa a la hora de razonar métodos y estrategias de control a seguir.

Posteriormente se define el Control Biológico a la vez que se explicitan algunas de sus principales características. A continuación se hace referencia a los distintos tipos de agentes microbianos utilizados para el CB. Para comprender como es que los antagonistas ejercen su acción biocontroladora se presenta una profunda revisión acerca de los mecanismos de acción de los diferentes agentes de Control Biológico. Luego se analizan las diferentes estrategias posibles a la hora de realizar una búsqueda, aislamiento y selección de posibles Agentes de Biocontrol. Luego se discuten algunos elementos básicos a tener en cuenta al momento de definir la aplicación de un agente de control biológico. Finalmente se presentan 3 ejemplos de desarrollos de métodos de control biológico, en enfermedades de poscosecha, de la fusariosis de la espiga de trigo y del Moho gris ocasionado por *Botrytis cinerea*.

CAPÍTULO 1

Las enfermedades de plantas y su manejo

Pedro Mondino[1]

1.1. Concepto de enfermedad

Las enfermedades de las plantas son objeto de estudio de la Fitopatología y pueden encontrarse numerosas definiciones de enfermedad en cualquier libro básico de esta disciplina. Agrios define a la Enfermedad como el mal funcionamiento de células y tejidos de la planta huésped, que resulta de su continua irritación por un agente patogénico o factor ambiental, y que conduce al desarrollo de síntomas. Posteriormente agrega, que la enfermedad es una condición que involucra cambios anormales en la forma, fisiología, integridad o comportamiento de la planta. Cambios estos, que pueden resultar en un daño parcial o muerte de la planta o de alguna de sus partes (Agrios, 1995).

Es necesario destacar que la enfermedad de una planta es un *proceso dinámico* de interacción entre ésta y el patógeno en su medio ambiente. Esto indica que no se trata de algo estático, sino que evoluciona con el tiempo.

Para que ocurra la enfermedad deben coincidir en el tiempo y en el espacio la presencia de la planta en estado susceptible, el patógeno en estado virulento y el ambiente favorable para el desarrollo de la misma. Para facilitar el estudio de estas interacciones se ha representado a la enfermedad mediante un triángulo, cuyos vértices ocupan la planta, el patógeno y el ambiente y sus lados están formados por flechas en ambos sentidos, que representan las diferentes interacciones posibles. Como el Hombre es capaz de influir sobre el desarrollo de la enfermedad, afectando tanto a la planta, al patógeno como al ambiente, su influencia es también objeto de estudio y se ha colocado en un nuevo vértice transformando al triangulo de la enfermedad en un tetraedro.

Desde un tiempo a esta parte se comenzó a dar importancia a los microorganismos, que en forma abundante, viven en contacto con las plantas, tanto en el suelo (rizosfera y rizoplano), epifíticamente sobre hojas, flo-

[1] Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal.
Facultad de Agronomía. UdelaR.

res, frutos y semillas como endofíticamente (dentro de los propios tejidos del vegetal) (Droby *et al.*, 1999; Lindow y Brandl, 2003). Debido a que varios de estos microorganismos son capaces de interferir en el proceso de desarrollo de la enfermedad, se han transformado en objeto de estudio ocupando un nuevo vértice en la representación esquemática de la enfermedad que se transformó ahora en una pirámide (Figura 1).

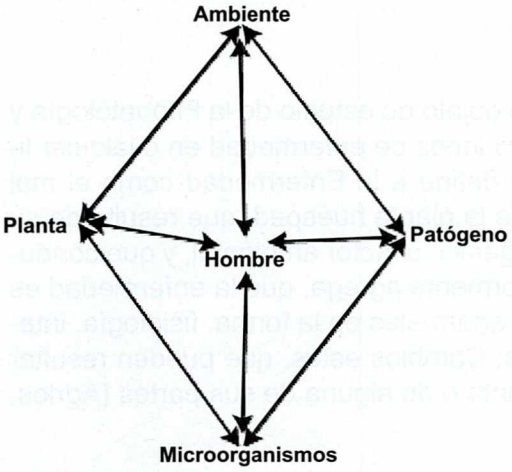


Figura 1. Representación piramidal de las enfermedades de plantas. El control biológico de las enfermedades de plantas ha colocado a los microorganismos que están en contacto con las plantas como especial objeto de estudio. Estos microorganismos interaccionan con la planta, el patógeno, el ambiente y son influenciados por las practicas agrícolas que realiza el Hombre en un lugar y tiempo determinado incidiendo directamente sobre el desarrollo de la enfermedad.

1.2.- Ciclo de la enfermedad

Las enfermedades de plantas pueden ser causadas por agentes bióticos y abióticos. Dentro de los agentes bióticos los más importantes son los hongos, bacterias y virus. A su vez, condiciones adversas del ambiente, como por ejemplo deficiencias de oxígeno, temperaturas por encima o debajo del rango de sobrevivencia, carencias de luz o agua, excesos o deficiencias de nutrientes entre otros, pueden desencadenar procesos de enfermedad.

El desarrollo de las enfermedades bióticas se caracteriza por la ocurrencia de una serie de eventos sucesivos y ordenados (Figura 2). Estos eventos son la sobrevivencia del patógeno, su diseminación, la infección, la colonización de los tejidos, la aparición de los síntomas y finalmente la reproducción del patógeno.

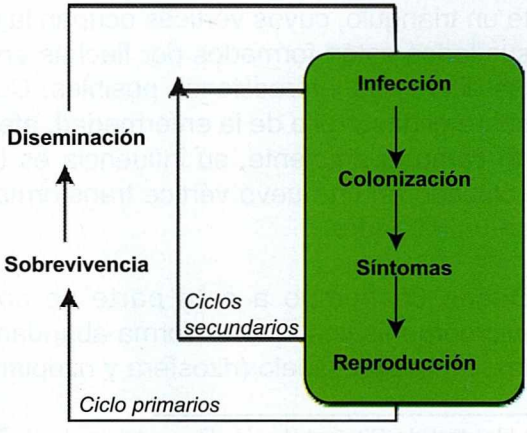


Figura 2. Esquema del ciclo de las enfermedades de plantas.

Sobrevivencia

Los patógenos de plantas han desarrollado diferentes capacidades de sobrevivir en ausencia del huésped. Ciertos hongos, producen estructuras de sobrevivencia como esclerotos o camidosporas (figuras. 3,4 y 5). Por ejemplo: *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal de la podredumbre blanda de las hortalizas, diferentes especies de los géneros *Sclerotium* y *Botrytis* producen esclerotos mientras que diferentes especies dentro de los géneros *Fusarium, Mucor o Rizopus* tienen la capacidad de formar clamidosporas. En

Figura 3. Repollo atacado por la podredumbre blanda de las hortalizas. Esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* sobrevivirán en el suelo hasta la siguiente temporada.

el caso de la *Rhizoctonia* de la papa los esclerotos pueden permanecer en el suelo o pueden quedar adheridos a la superficie de los tubérculos (figura 8). Otros hongos sobreviven como micelio, cuerpos fructíferos o esporas. Por ejemplo *Uncinula necator*, agente causal del Oidio de la Vid, tiene la capacidad de sobrevivir como micelio entre las escamas de las yemas de la planta Vid. Las ascosporas de *Taphrina*

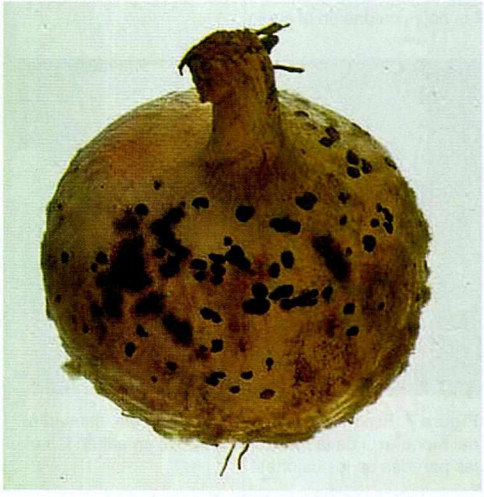


Figura 4. Esclerotos de *Botrytis squamosa* adheridos a un bulbo de cebolla.

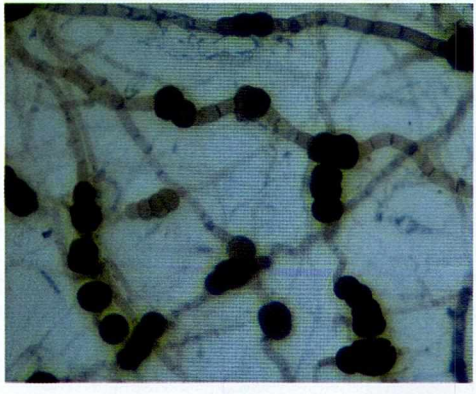


Figura 5. Clamidosporas como estructura de resistencia y sobrevivencia de algunos hongos.

deformans agente causal del torque del duraznero, sobreviven de una temporada a la siguiente sobre la corteza de las ramas de árboles afectados. Los conidios de *Penicillium expansum* sobreviven adheridos a los bins utilizados para guardar la fruta (figura 7).

Algunos patógenos han desarrollado la capacidad de sobrevivir en forma saprofítica. Tal es el caso de hongos y

bacterias. Por ejemplo *Botrytis cinerea* agente causal del Moho gris en numerosos huéspedes tiene una alta capacidad saprofítica que le permite colonizar y reproducirse en restos de vegetales muertos. *Venturia inaequalis*, agente causal de la sarna del manzano también sobrevive en forma saprofítica en el suelo (figura 6), en las hojas caídas en el otoño. Las bacterias patógenas de plantas, en su gran mayoría, tienen capacidad de sobrevivir saprofíticamente sobre la planta, en el suelo o en los rastrojos de cultivos afectados. Por ejemplo *Erwinia carotovora*, causante de la podredumbre blanda de la papa, es habitante normal de la superficie de los tubérculos de papa utilizados para propagar el cultivo.

Figura 6. Durante el invierno *Venturia inaequalis*, agente causal de la sarna del manzano, sobrevive en las hojas caídas en el suelo

Figura 7. Esporas de *Penicillium expansum*, causante del Moho azul de la manzana, sobreviven adheridas a las paredes de los cajones.

En el caso de patógenos obligados, el desarrollo en huéspedes alternativos es una manera común de sobrevivencia. Por ejemplo el TSWV, virus que ocasiona la peste negra del tomate sobrevive sobre diferentes cultivos o malezas susceptibles.

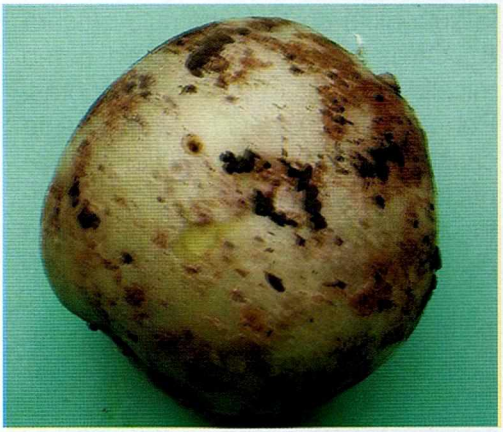


Figura 8. Esclerotos de *Rizoctonia solani* (se parecen a la tierra adherida al tubérculo) se diseminan adheridos al tubérculo usado como semilla.

Diseminación

La diseminación del inóculo es la responsable del incremento de enfermedad en un cultivo e incluye 3 subprocesos: Liberación del inóculo, dispersión y deposición.

La liberación de inóculo puede ser activa o pasiva. La liberación de ascosporas de hongos como *Sclerotinia sclerotiorun* o *Monilinia fructicola* se realiza en for-

ma activa, desde los apotecios (figuras 9 y 10). Otros patógenos como por ejemplo *Penicillium* spp. que provocan podredumbres en citrus y manzanas producen conidios en cadenas que se liberan en forma pasiva arrastrados por las corrientes de aire (figura 11).

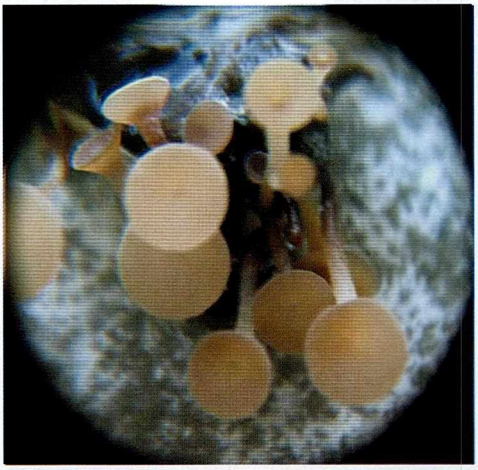


Figura 9. Apotecios de *Sclerotinia sclerotiorum* liberan activamente las ascosporas al aire.

Los agentes o vehículos de diseminación de patógenos pueden ser el aire, agua, semilla (semilla botánica u otro tipo de propágulos de plantas como tubérculos, bulbos, estacas entre otros), sustratos o suelos infestados, insectos, maquinaria, herramientas, botas o ropas infestadas. (Figura 8).

Figura 10. Ascosporas de *Monilinia fructicola* contenidas en ascas. Listas para ser liberadas del apotecio.

La mayoría de los hongos producen esporas lo suficientemente livianas como para poder ser transportadas por corrientes de aire desde su fuente hasta otra planta. Otros hongos en cambio, producen esporas en masas pastosas como por ejemplo *Fusicoccum* spp. o *Colletototrichum* spp. que sólo pueden ser dispersadas por el salpicado de gotas de agua (figuras 12 y 13). Las bacterias producen como signo zoogleas que también necesitan del agua como vehículo de dispersión (figura 14).

Figura 11. Conidios de *Penicillium italicum* se desprenden fácilmente y son arrastrados por las corrientes de aire.

Los virus de plantas se propagan en forma 100% efectiva mediante la siembra de propágulos vegetativos infectados. Por ejemplo en cultivos como la vid que se propaga vegetativamente, el uso de estacas provenientes de una planta infectada por virus como el Grape leaf roll virus (GLRV) o el Grape fan leaf virus (GFLV) es garantía de propagación de estos virus a las nuevas plantas.

Bacterias como *Clavibacter michiganensis* causante del cancro

bacteriano del tomate o *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* causante de la mancha foliar de las cucurbitáceas se propagan adheridas a las semillas.

Esclerotos de *Sclerotioum rolfsii* o de *Sclerotium cepivorum* pueden propagarse de un suelo a otro viajando en la tierra adherida a las ruedas del tractor, herramientas o botas de los trabajadores.

Figura 12. *Fusicoccum amygdali* exuda cirros de conidios los que son dispersados por el agua.

Figura 13. *Colletotrichum* spp. produce sus conidios en masas pastosas y anaranjadas que se dispersan mediante salpicaduras de agua.

Algunos patógenos se valen de los insectos para diseminarse de un lugar a otro. Un ejemplo típico es el de virus que son transmitidos por insectos. Pulgones, trips y cochinillas pueden ser transmisores de virus al alimentarse en una planta enferma y luego de una sana. Pero también pueden transportar esporas de hongos, tal es el caso de los conidios de *Botrytis cinerea* o *Monilinia* spp. que pueden ser transportados desde un fruto enfermo a otros sano adheridos a las patas de algunos insectos.

Figura 14. La zooglea bacteriana, de consistencia mucosa, es dispersada por el salpicado de aguas de riego o lluvia.

Infección

Una vez que el inóculo toma contacto con la planta deben ocurrir determinadas condiciones para que el patógeno pueda penetrar al tejido vegetal, y producir la infección. La penetración al vegetal puede ser activa o

pasiva. Hongos y nematodos pueden penetrar directamente los tejidos vegetales. Algunos hongos y las bacterias lo hacen en forma pasiva ingresando por aberturas naturales o heridas. Los virus ingresan mayoritariamente por heridas realizadas por sus vectores. También algunos órganos especiales de las plantas como nectarios, anteras, estigma pueden ser lugar de ingreso de hongos o bacterias.

Las medidas de control preventivas se aplican antes de la ocurrencia de la infección. Luego que esta ocurrió las posibilidades de manejar la enfermedad se reducen. La aplicación de medidas curativas implica que estas tengan la capacidad de eliminar al patógeno dentro de la planta sin afectar a ésta.

El proceso de desarrollo de la enfermedad prosigue con la colonización de los tejidos del vegetal. La colonización puede darse intercelularmente o intracelularmente. Con posterioridad a la infección sobreviene el periodo de incubación hasta la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Sobre los síntomas es común observar la presencia de signos del patógeno. Generalmente los patógenos producen sus propágulos exteriormente de forma de facilitar su desprendimiento, liberación y diseminación. En otros casos se producen estructuras de resistencia para poder sobrevivir hasta la temporada siguiente. Es común observar sobre los síntomas, estructuras reproductivas (esporas de hongos, exudados bacterianos).

1.3 .- La enfermedad en el cultivo

Cuando nos referimos al control de enfermedades de plantas no estamos pensando un una única planta sino en un cultivo (numerosas plantas). En los cultivos se enfrentan poblaciones de plantas a poblaciones de patógenos. La evolución de las enfermedades en los cultivos es objeto de estudio de una rama de la fitopatología denominada epidemiología.

El conocimiento de algunas características epidemiológicas de la enfermedad es clave al momento de definir estrategias de control.

Para controlar el desarrollo de una epidemia es posible actuar sobre diferentes parámetros epidemiológicos como el inóculo inicial (X_0), la tasa de desarrollo de la enfermedad (r) o el tiempo (t). Sin embargo la eficiencia en el control que puede lograrse actuando sobre estos diferentes parámetros varía según las características epidemiológicas de cada enfermedad.

En las enfermedades monocíclicas ocurre un único ciclo de infección por temporada, la planta enferma no es capaz de contagiar a otras dentro de la misma temporada y se limitará a producir inóculo para atacar nuevas plantas

sanas en el próximo ciclo. En este tipo de epidemias, la cantidad de enfermedad en el cultivo está directamente relacionada a la cantidad de inóculo primario proveniente de la temporada anterior, no existiendo, o siendo irrelevante, el contagio entre plantas enfermas. Por esta razón si tomamos una medida de control que baje a la mitad la cantidad de inóculo primario obtendremos una reducción también de un 50% en el número de plantas enfermas. Así es, que para controlar el desarrollo de enfermedades monocíclicas, resultan muy eficientes aquellas medidas tendientes a disminuir el inóculo inicial. (Gráfico 1)

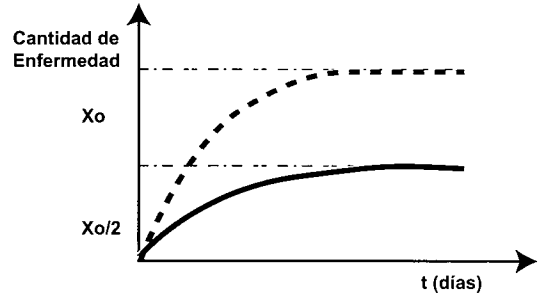


Grafico 1. La cantidad de plantas enfermas por una enfermedad monocíclica está en directa relación con el inóculo inicial Las gráficas muestran el efecto de una medida de control que reduce a la mitad el inóculo inicial (X_0). Como resultado la cantidad de enfermedad será reducida también a la mitad (gráfico azul).

Por otro lado, en las enfermedades que producen epidemias denominadas policíclicas, cada planta enferma es capaz de contagiar a otras durante el ciclo del cultivo produciéndose un avance exponencial de la enfermedad. En este tipo de epidemias, las medidas que apuntan a reducir el inóculo inicial suelen ser inefectivas. Esto es debido, a que una baja proporción de enfermedad en los inicios del cultivo puede, por contagio entre plantas, alcanzar niveles muy altos o totales de destrucción del cultivo.

Para el control de epidemias del tipo policíclicas, resultan más efectivas aquellas medidas de control tendientes a disminuir la tasa de desarrollo de la enfermedad. (Gráfico 2)

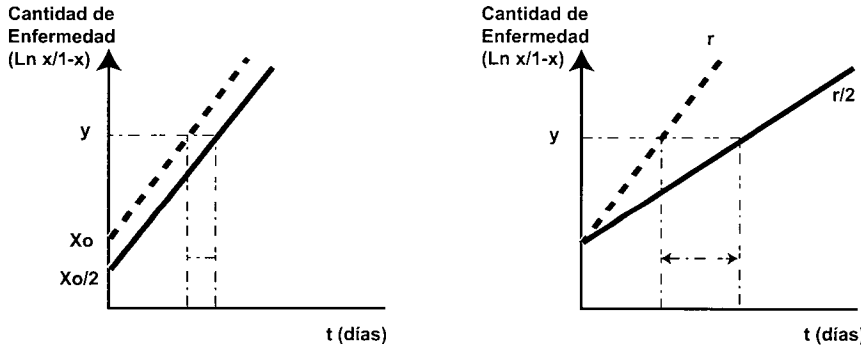


Gráfico 2. Una transformación logarítmica de la gráfica de desarrollo de una enfermedad policíclica nos permite visualizar comparativamente el efecto de reducir el inóculo inicial (X_0) o la tasa de desarrollo (r) en una enfermedad policíclica. La gráfica muestra que la reducción a la mitad del inóculo inicial solamente provoca un mínimo retraso en el desarrollo de la enfermedad, mientras que reducir en la misma proporción la tasa de desarrollo logra un efecto superior.

Es posible visualizar esto al graficar la cantidad de enfermedad en función del tiempo.

A modo de ejemplo, la aplicación de esporas de *Athelia bombacina,* un antagonista que compite con *Venturia inaequalis* en las hojas caídas en el suelo es una medida que apunta a disminuir el inóculo inicial de la enfermedad. La sarna del manzano ocasionada por *V. inequalis* es una enfermedad policíclica y por lo tanto esta estrategia no será apropiada, a menos que se logre una efectividad tan alta que permita bajar el inóculo inicial a valores casi despreciables.

Un segundo ejemplo es la aplicación de un formulado a base a *Trichoderma* spp. al suelo con el fin de destruir los esclerotos de *Sclerotium rolfsii* agente causal de la podredumbre blanca de hortalizas. Esta medida también apunta a disminuir el inóculo inicial. En este caso como estamos frente a una enfermedad típicamente monocíclica, la reducción del número de esclerocios viables redundará en una reducción proporcional de la enfermedad en esa temporada, por lo que será una medida potencialmente efectiva.

Como tercer ejemplo citaremos la aplicación en baños de poscosecha de un formulado biológico en base a levaduras que colonizan las heridas de la manzana compitiendo por espacio y nutrientes con cepas patógenas de *Penicillium*. Este ejemplo muestra un caso de aplicación de una medida de control efectiva, basada en el conocimiento de las características del ciclo de la enfermedad: se trata de un patógeno que necesita de heridas para penetrar al huésped y que necesita alimentarse de nutrientes presentes en esas heridas para poder producir la infección. Se utilizan levaduras que colonizan las heridas con mayor habilidad que el patógeno y que además le consumen los nutrientes evitando así que se produzca la infección. Si lo analizamos desde el punto de vista de las características epidemiológicas de la enfermedad veremos que también constituye una estrategia apropiada ya que el moho azul ocasionado por *Penicillium* spp. produce una epidemia del tipo policíclica y esta medida apunta a reducir la tasa de infección.

Con estos ejemplos se pretende demostrar la importancia de conocer el ciclo y las características epidemiológicas de la enfermedad, para poder diseñar estrategias de uso de medidas de control biológico. Al momento de poner en práctica una medida de control se debe analizar que posibilidades de éxito tiene esa medida en base al conocimiento profundo del patosistema. Lamentablemente existen carencias importantes en el conocimiento de los patosistemas lo que dificulta el desarrollo e implementación de medidas de CB. En la mayoría de los casos es necesario generar estos conocimientos estudiando el patosistema como primera etapa en el desarrollo de métodos de Control Biológico.

1.4. El control biológico y los sistemas de Manejo Integrado de enfermedades de plantas

De acuerdo a la evolución que ha tenido el control de las enfermedades de plantas hoy día es necesario que las medidas o técnicas de control sean utilizadas en forma coordinada formando parte de sistemas de Manejo Integrado.

El Manejo Integrado (MI) implica una concepción filosófica diferente de la protección vegetal. Concepción que parte de la base de que las poblaciones de patógenos, insectos plaga o malas hierbas no son "enemigas a destruir" sino que se trata de "componentes del agro-ecosistema" y por tanto la producción debe convivir con ellas. Esta concepción también incorpora la necesidad de proteger al ambiente y a los recursos naturales, considerando a su vez, el contexto socioeconómico en que se desarrolla la producción. Finalmente en los últimos años se explicita, como objetivo del MI, la necesidad de reducir el uso de pesticidas como forma de minimizar sus efectos secundarios negativos sobre el ambiente y la salud humana (Mondino, 2004).

Se representa el Manejo Integrado de las enfermedades de plantas como una pirámide conformada por capas o estratos en los que se ubican los diferentes tipos de control a aplicar. En la base de esa pirámide se ubican medidas de manejo comprendidas dentro de las llamadas prácticas culturales, luego se integran métodos físicos o mecánicos, posteriormente se coloca un nuevo estrato o capa en el que se ubica al Control Biológico de las enfermedades de tal forma que el control químico queda reducido a la mínima expresión confinado al pequeño vértice superior (figura 15)

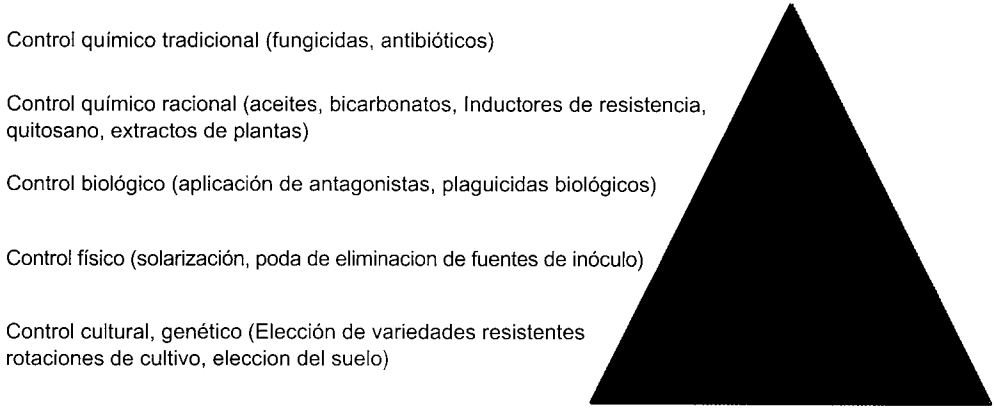


Figura 15. Representación gráfica de la construcción de Sistemas de Manejo Integrado de enfermedades de plantas. La Base del sistema se construye en base a la implementación de medidas preventivas, métodos culturales, uso de resistencia genética ymétodos físicos de control. Si se quiere reducir el uso del control quimico a la mínima expresión es imprescindible integrar métodos de control biológico. Finalmente dentro del control químico es posible priorizar el uso de biopesticidas de origen natural como los aceites, quitosano, carbonatos, vinagres, entre otros.

CAPÍTULO 2

Control Biológico.

Pedro Mondino

2.1.- Introducción.

En la naturaleza las plantas viven en permanente interacción con poblaciones de microorganismos. Estos microorganismos (m.o.) (hongos filamentosos, levaduras y bacterias) viven en la cercanía de las plantas y en contacto con ellas, sobre la superficie de las hojas, flores y frutos (microflora filosférica), alrededor de las raíces (microflora rizosférica), sobre las semillas (microflora espermoférica) o incluso en el interior de la planta (microorganismos endófitos). A modo de ejemplo, se citan poblaciones del orden de $4,5x10^6$ microorganismos en un gramo de suelo rizosférico y de $1x10^6$ microorganismos en el agua de lavado de una manzana y 10^6 a 10^7 células viviendo epifíticamente por gramo de hoja (Lindow y Brandl, 2003).

A pesar de que las condiciones ambientales que se dan sobre las plantas no parecen *a priori* favorables para el desarrollo de m.o. (se producen grandes oscilaciones de temperatura, vientos, exposición a la luz ultravioleta disponibilidad de agua limitada e intermitente) su presencia es una constante sobre la superficie vegetal. Esto se explica porque el origen y desarrollo evolutivo de las plantas superiores ha ocurrido en un medio ambiente que estuvo siempre colonizado por m.o., de donde ha resultado una coevolución de un amplio rango de asociaciones planta-microrganismo.

Los nutrientes para el crecimiento de los m.o. sobre las superficies vegetales son generados de manera habitual dentro de la planta y en forma de exudados difunden o son excretados a la superficie. Estos exudados contienen una gran variedad de materiales orgánicos que incluyen azúcares simples, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y hormonas de crecimiento de la planta, que pueden ser empleados más o menos eficientemente como sustratos por los distintos micoorganismos.

Las poblaciones de m.o. interactúan entre sí y con la planta. Estas interacciones pueden ser beneficiosas para la planta, neutras o perjudiciales. Como es sabido, los patógenos interactúan negativamente con la planta produciendo enfermedad. Por el contrario, otros microorganismos interactúan en forma positiva.

Algunos ejemplos de acciones benéficas para la planta son: la solubilización de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la producción de sustancias promotoras

del crecimiento vegetal y la inducción de resistencia frente a fitopatógenos. Indirectamente, las plantas también se ven favorecidas cuando estos microorganismos establecen relaciones de antagonismo con los patógenos.

Solamente una mínima proporción de los microorganismos que pueden tomar contacto con las plantas resulta ser patógena. En la naturaleza lo normal es que las plantas estén sanas y esto es debido a una estabilidad natural existente entre los seres vivos dada por la presencia de mecanismos de autorregulación. A esta autorregulación de las poblaciones de seres vivos se la denomina *Control Biológico.*

2.2- Biocontrol en la naturaleza.

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; es decir, existe un Control Biológico (CB) que funciona naturalmente.

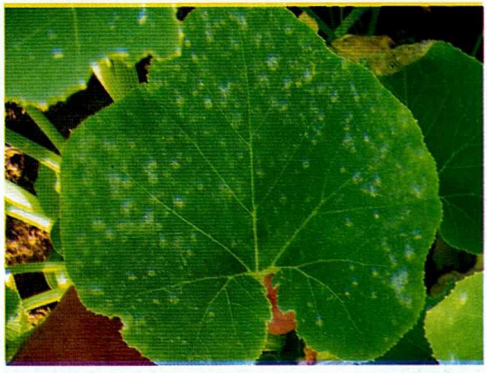


Figura 1. Colonias de Oidio sobre hojas de zapallito de tronco.

Evidencias del control natural de patógenos de plantas se pueden observar con facilidad (Mondino, 2003b). Por ejemplo, si sobre el final del verano recorremos cultivos de cucurbitaceas es común observar que las colonias de Oidios (hongo patógenos ectopa-rásitos) que normalmente se presentan de color blanco están recubiertas de color gris (figuras 1 y 2). Ese otro hongo gris que crece sobre las colonias de Oidio es *Ampelomyces quisqualis*, un hongo micoparásito que crece alimentandose de los oidios. Existen, en otros paises, varias formulaciones comerciales registradas para el biocontrol de oidios en base a este hongo antagonista (figura 3).

Figura 2. Colonias de Oidio naturalmente colonizadas por *Ampelomices quisquialis*

Es común encontrarse con esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* causante de la podredumbre blanda de las hor-

talizas naturalmente colonizados por cepas *Trichoderma* spp. También es posible utilizar a los propios esclerotos del patógeno como cebo para capturar antagonistas que viven naturalmente en el suelo y que son capaces de destruir los esclerotos (Silveira *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2001) (figuras 4 y 5).

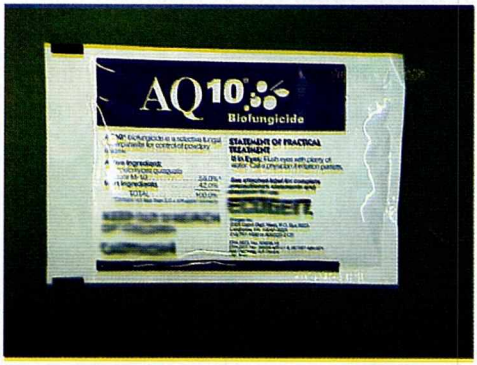


Figura 3. Producto comercial en base a *A. quisqualis.*

Un ejemplo comúnmente citado en la bibliografía es la existencia de suelos supresivos, en los que, coincidiendo la presencia de inóculo del patógeno, huésped sensible y ambiente favorable, determinada enfermedad no se desarrolla. Esos suelos denominados supresivos del desarrollo de la enfermedad pierden esa característica cuando son esterilizados, lo que indica la existencia de un factor biótico responsable de la supresividad. En esos suelos es común encontrar cepas de *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp.

Figura 4. Esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* colonizados por cepas de *Trichoderma* spp del suelo.

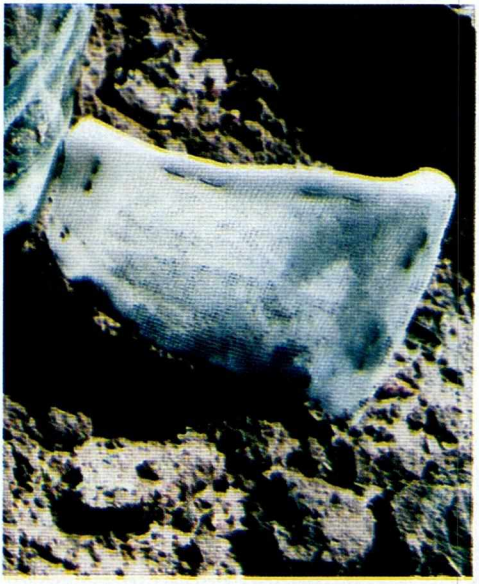


Figura 5. Captura de antagonistas descomponedores de esclerotos utilizando esclerotos de *S. Sclerotiorum* como cebo. Los esclerotos son colocados dentro de mallas y enterrados en el suelo.

entre otras especies de micro-organismos antagonistas (Martinez *et al.*, 2002; Kloepper *et al.*, 1980).

2.3 Las prácticas agrícolas y el biocontrol.

Desde hace un tiempo a esta parte comenzó a tomarse conciencia de que la agricultura afecta el equilibrio existente en la naturaleza. De los varios desequilibros causados por la agricultura, el desequilibrio microbiano había pasado por mucho tiempo desapercibido (Sigler y Turco, 2002).

Chalutz y Wilson (1990) observaron que las frutas cítricas que habían sido bañadas o lavadas en la entrada a la planta de empaque sufrían mayor proporción de podredumbres. Estos investigadores pudieron comprobar como, al sembrar el agua de lavado de la fruta, crecían solamente bacterias y levaduras epifíticas. Sin embargo cuando se hicieron diluciones de esa misma agua de lavado y se sembraban en medio de cultivo comenzaron a crecer colonias de los principales hongos patógenos.

Así es que estos investigadores iniciaron un proceso de búsqueda y selección de cepas antagónicas de los patógenos comunes de poscosecha de citrus llegando a desarrollar productos comerciales en base a cepas de levaduras y bacterias epifíticas (Droby *et al.*, 1999; Droby *et al.*, 1998; Janisiewicz y Jeffers, 1997)

Recientes trabajos realizados en Brasil demostraron que las poblaciones endofíticas de levaduras y hongos filamentosos en frutos de manzana eran diferentes según se tratase de manzanas provenientes de producción convencional, integrada u orgánica (Camatti *et al.*, 2005; Camatti *et al.*, 2001). Hasta el momento no se había reparado en los desequilibrios a escala microbiana que se producen como consecuencia de las prácticas agrícolas ni en como éstos pueden estar favoreciendo el desarrollo de las enfermedades de las plantas.

Conociendo las interacciones existentes entre los microorganismos y de éstos con las plantas es posible idear maneras de manipular esas interacciones de forma de frenar o controlar el desarrollo de las enfermedades. Manejando la microflora existente en contacto con las plantas es posible controlar a los patógenos de plantas (Janisiewicz y Marchi, 1992; Kerry, 2000). Es posible sacar ventaja de las interacciones benéficas para la planta favoreciendo su crecimiento y resistencia a patógenos. También es posible utilizar las interacciones antagónicas de forma de eliminar a los patógenos o impedir que estos puedan atacar a la planta y desarrollar la enfermedad. A esto se le ha denominado Control biológico.

Seleccionando microorganismos por su habilidad para antagonizar o controlar a los patógenos de plantas se ha logrado obtener cepas eficientes con las que se ha logrado desarrollar formulados comerciales. Existen formulados comerciales cuyo ingrediente activo son hongos, levaduras o bacterias. Estos productos son definidos como biopesticidas o funguicidas biológicos. Una lista de los biopesticidas registrados en los EEUU puede consultarse en el sitio Web de la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) en la dirección: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists/index.htm.

2.4.- Definiciones.

Se define **control biológico** como la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas" (Baker y Cook, 1974)

Por su parte la Academia Nacional de Ciencia de Estados Unidos, en 1987 define al control biológico como la utilización de microorganismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo a los organismos útiles para el hombre (NAS 1987).

Esta definición de CB instaura la polémica al incluir a los microorganismos genéticamente modificados como parte integrante del CB y ha recibido fuertes cuestionamientos (García *et al.*, 1988).

Más recientemente, Wilson y Wisniewski (1994), se refieren al CB como toda forma de control que no involucre el uso de plaguicidas de síntesis química. Luego explicitan que existen 3 métodos para llevarlo a cabo: Uso de microorganismos antagonistas; uso de sustancias naturales (por ejemplo: extractos de plantas) o modificación de la resistencia del huésped.

Se trata de una definición sumamente amplia que excluye solamente al uso de plaguicidas de síntesis química. Todo otro método de control, incluso el manejo mediante la resistencia genética (uso de variedades resistentes a los patógenos) es considerado CB.

A los efectos de esta publicación utilizaremos una definición restringida según la cual el Control Biológico es la introducción artificial de organismos antagonistas (agentes de control biológico) en el patosistema, para controlar el patógeno y favorecer a la planta, reduciendo el inóculo del patógeno y/o la intensidad de los síntomas posteriores a la infección.

Hablaremos de Control Biológico en referencia a la utilización de microorganismos beneficiosos para reducir los efectos indeseables de los patógenos sobre las plantas. Estos microorganismos benéficos existen naturalmente y pueden ser seleccionados y reaplicados en concentraciones mayores y en momentos oportunos para que ejerzan su acción antagónica. También pueden ser potenciadas las poblaciones naturales de microorganismos

benéficos mediante un apropiado manejo de los cultivos. Por ejemplo: mediante la incorporación de compost a los suelos estamos incrementando la cantidad y biodiversidad microbiana y de ese modo dificultando el desarrollo de los patógenos. Por último, existe la posibilidad de explotar la variación genética natural de las plantas seleccionando aquellos fenotipos que favorecen poblaciones epifíticas de microorganismos benéficos (Dunn *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1999, Jaques *et al.*, 1995).

CAPÍTULO 3

Antagonistas microbianos como agentes de biocontrol

Silvana Vero[1]

3.1.- Introducción.

En general cuando hablamos de Control Biológico hacemos referencia a la utilización de microorganismos beneficiosos con el fin de reducir los efectos indeseables de los patógenos de plantas. Estos microorganismos benéficos existen naturalmente, ocupando diferentes nichos.

Para que ocurra una enfermedad un patógeno debe competir con otros microorganismos para asegurarse un sitio adecuado en la planta susceptible. Un buen antagonista debería ser capaz de impedir que el patógeno colonizara ese lugar y comenzará la infección o en última instancia, debería poder destruir al patógeno en el sitio de infección impidiendo que la enfermedad se desarrollara. Esto se puede lograr mediante varios mecanismos entre los que se encuentran la competencia con el patógeno, por nutrientes o espacio en el sitio de infección, la inhibición o destrucción del patógeno por producción de sustancias tóxicas en el sitio de acción, o la inducción de respuestas de resistencia en la planta.

Existen varias formas de lograr un control biológico efectivo. En algunas circunstancias, el control biológico ocurre naturalmente, sin intervención humana. En otros casos, el hombre debe influir en mayor o menor grado, introduciendo cambios en el patosistema, de forma de poder lograrlo. Esta intervención puede implicar el uso de prácticas culturales tales como la rotación de cultivos, la solarización, o el ajuste de las condiciones de almacenamiento en poscosecha, de modo de favorecer a los antagonistas naturales y desfavorecer al patógeno en el sitio de acción. O puede tratarse de una intervención más drástica, consistente en realizar aplicaciones masivas de microorganismos antagonistas previamente seleccionados. En esos casos, se busca que estos antagonistas, no sean microorganismos foráneos, sino que formen parte de la microflora normalmente presente en esos lugares. Es por ello que se prefiere utilizar como controladores biológicos, cepas nativas que hayan sido aisladas de sitios semejantes al de aplicación. Esto asegura

[1] Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias.
Facultad de Química. UdelaR.

una rápida adaptación al lugar donde se espera que ocurra el biocontrol. Esta última es una práctica muy utilizada y para la cual se han desarrollado las formulaciones comerciales de biocontrol.

3.1.1- Biocontrol natural

Los llamados suelos supresivos, son ejemplos de control biológico natural. Dichos suelos se caracterizan por una baja incidencia de una determinada enfermedad, aún cuando estén presentas cepas virulentas del patógeno y plantas susceptibles a esa enfermedad. Por ejemplo Nishiyama y colaboradores (1999), encontraron y caracterizaron suelos supresivos que impedían el desarrollo de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* en tomate. También se encontraron suelos supresivos que impedían el desarrollo de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. en trigo o de la podredumbre de raíz en manzano causada por *Rhizoctonia solani* (Mazzola, 1999).

Tanto factores bióticos como abióticos influyen en la capacidad supresiva de los suelos. Sin embargo, Weller y colaboradores (2002) afirman que en muchos casos la capacidad de supresión es trasmisible de un suelo a otro, confirmando la teoría de que los microorganismos antagonistas son la razón fundamental de la capacidad supresiva. Por ejemplo, se ha demostrado el importante rol de cepas de *Pseudomonas* fluorescentes y *Fusarium* spp. no patógenos en la supresión de las enfermedades vasculares causadas por cepas patógenas de *Fusarium* (Mazzola, 2002). Irikiin y colaboradores (2006) afirman que es necesario estudiar como un todo, la comunidad microbiana de los suelos supresivos para entender su funcionamiento y poder de esa forma influir en ella. En ese sentido trabajos como el de Toyota y colaboradores (2000) estudian la relación entre las características fisiológicas de la comunidad y la capacidad supresiva de un suelo. A su vez, Mazzola y colaboradores (2004) demostraron la posibilidad de incidir en la aparición de suelos supresivos mediante prácticas culturales. En su trabajo demostraron que suelos en los cuales se había plantado trigo durante varios años, resultaban supresivos para el desarrollo de la podredumbre de raíz causada por *Rhizoctonia solani* en manzano cuando se sustituía el trigo por manzanos.

Otro ejemplo de control biológico que ocurre naturalmente es el control del cancro del castaño causado por el hongo *Cryphonectria parasitica*. En el año 1951, mientras que la enfermedad se extendía por Europa y EEUU, los castaños del norte de Italia parecían recuperarse. Los aislamientos de *Cryphonectria* obtenidos de estos árboles, presentaban una morfología anormal en cultivo y a la vez eran hipovirulentos, es decir los síntomas desarrollados en árboles infectados artificialmente, eran de baja severidad. Desde entonces, se han en-

contrado cepas hipovirulentas en otras localidades de Europa y en áreas donde se introdujeron cepas hipovirulentas se lograron recuperar plantaciones de castaño afectadas (Escoda, 2000). Se demostró luego, que estas cepas, poseían micovirus en forma de ARN de doble cadena, los cuales eran los causantes de la disminución de virulencia y que los mismos podían ser transmitidos a cepas virulentas por anastomosis de las hifas de ambas cepas.

3.1.2.- Biocontrol mediado por el hombre

Los casos comentados anteriormente muestran ejemplos en los que el control biológico se ha dado naturalmente o en los cuales se han introducido cambios en el ecosistema (mediante prácticas culturales, por ejemplo) para promover el desarrollo de los agentes naturales de biocontrol. Sin embargo, en otros casos, es necesario aplicar en forma masiva, los microorganismos biocontroladores al ecosistema. De esta forma se introduce un cambio en la comunidad presente que busca impedir o minimizar el desarrollo de un agente patógeno. Basado en esta estrategia se han desarrollado formulaciones comerciales, utilizando microorganismos biocontroladores como principio activo. En la actualidad se están desarrollando formulaciones utilizando potenciadores de los agentes microbianos de biocontrol, tales como enzimas o sustancias naturales categorizadas como biopesticidas.

3.2.- Antagonistas microbianos como agentes de biocontrol

Varios tipos de microorganismos se han estudiado y caracterizado como agentes de biocontrol de patógenos de plantas.

Tanto bacterias, como hongos filamentosos, levaduras y virus han demostrado ser efectivos biocontroladores de ciertas enfermedades en determinados patosistemas.

En general, la interacción entre el antagonista, el patógeno y la planta hospedera es muy específica. Esto implica una ventaja del control biológico frente a otros métodos de control, ya que cuanto más específica sea esta relación, menor probabilidad habrá de que el antagonista actúe en forma inhibitoria sobre organismos diferentes al organismo blanco (patógeno). Sin embargo, esta característica también puede ser considerada como una desventaja a la hora de desarrollar un producto comercial, ya que habrá que diseñar un producto para cada patosistema.

A continuación se presentarán ejemplos de diferentes microorganismos utilizados como controladores biológicos de patógenos de plantas, y se mencio-

narán los casos en los que se han desarrollado formulaciones comerciales que utilicen dichos microorganismos como principio activo.

3.2.1.- Bacterias como controladores biológicos

Las bacterias han sido utilizadas como agentes de control biológico de enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en partes aéreas, como en la raíz de las plantas hospederas. Incluso se han utilizado para el control biológico de enfermedades que aparecen en la etapa de almacenamiento poscosecha.

A continuación, se resumirán algunos ejemplos del uso de bacterias en estrategias de control biológico. Por ser uno de los primeros casos estudiados y de las primeras formulaciones comerciales desarrolladas, por los problemas surgidos luego de su uso y los estudios que llevaron a alcanzar las soluciones, estudiaremos en primer lugar y con algo de detenimiento el caso de bacterias biocontroladoras de agalla de corona. Se comentarán, luego, ejemplos de control biológico que involucren bacterias promotoras del crecimiento vegetal y por último se discutirán ejemplos de bacterias bicontroladoras de patógenos poscosecha.

3.2.1.1 Bacterias controladoras de la agalla de corona

Uno de los primeros casos estudiados, de bacterias antagonistas de fitopatógenos, fue el implicado en el biocontrol de la agalla de corona producida por *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria patógena produce tumores en el tallo al nivel del suelo (Deacon, 2002) en un amplio rango de dicotiledóneas tales como manzana, pera, durazno, almendras, rosas. La bacteria actúa transfiriendo a la planta la información genética necesaria para producir citoquininas y ácido indol acético (hormonas vegetales), que inducen un crecimiento celular excesivo el cual lleva a la formación de los tumores en la planta. Esa información está codificada en el ADN contenido en un plásmido (llamado plásmido Ti) que lleva la bacteria patógena. Cuando entran en contacto la bacteria y la planta se transfiere solamente una parte del ADN que lleva el plásmido bacteriano. A este ADN se le llama T-DNA por ser el ADN de transferencia. El T-DNA lleva además la información necesaria para que las células vegetales afectadas sean capaces de producir y liberar al medio, metabolitos antes no producidos por la planta. Estos metabolitos son agrocinopinas y opinas que pueden ser utilizados por la bacteria patógena como única fuente de carbono y energía. Es decir, la bacteria transfiere a la planta la información necesaria para que la misma produzca los nutrientes necesarios para su multiplicación. Como la utilización de estos metabolitos no es una característica común para otras rizobacterias, la liberación de los

mismos, en las inmediaciones de la planta, hace que se produzca en esa zona, un enriquecimiento selectivo de los patógenos.

Diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* contienen diferentes tipos de plámidos Ti, los cuales codifican para la producción de diferentes tipos de opinas y agrocinopinas. Uno de los tipos más comunes codifica para la producción de nopalina y agrocinopina A. Otro tipo de plásmido aislado, codifica para la síntesis de octopina y agropina. La parte del plásmido que permanece en la célula bacteriana codifica a su vez para la producción de las permeasas y las enzimas necesarias para el uso de estas sustancias como nutrientes bacterianos.

En 1970, Allan Kerr, en Australia, descubrió una forma de controlar biológicamente esta enfermedad. De raíces de plantas sanas, aisló cepas de otra especie bacteriana muy relacionada a la bacteria patógena. Estas cepas identificadas como de la especie *Agrobacterium radiobacter* eran capaces de disminuir los síntomas de la enfermedad cuando se coinoculaban con bacterias patógenas. Una cepa en especial, denominada *Agrobacterium radiobacter* K84 inhibía totalmete la enfermedad cuando se inoculaba en proporciones iguales con bacterias patógenas en heridas de raíz. Se comprobó más adelante, que esta cepa llevaba un plásmido denominado pAgK84, que codificaba para la producción de un antibiótico al cual se llamó Agrocin 84. Sin embargo, este antibiótico no era capaz de inhibir cualquier cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, sino solamente aquellas capaces de utilizar la nopalina y las agrocinopinas A y B como fuente de carbono y energía. Dichas cepas patógenas presentan en sus plásmidos Ti la información necesaria para la producción de la permeasa que permite la entrada de la agrocinopina A y B. Se determinó que a través de dicha permeasa, también entraba a la célula bacteriana, el Agrocin 84 (Kim y Farrand, 1997). De esta forma, el antibiótico no era efectivo en bacterias que no tuvieran esa permeasa.

A su vez, la cepa biocontroladora contenía otro plámido (plásmido NOC) con la información necesaria para permitir la entrada y la utilización de la nopalina, producida por las células de las plantas afectadas por el patógeno. Esta propiedad permitía que las bacterias antagonistas crecieran selectivamente junto a las patógenas en la superficie de las raíces afectadas. Por ello se postuló, que además del efecto tóxico causado por el Agrocin 84 a la cepa patógena, la competencia por nopalina, podría ser otro mecanismo implicado en el biocontrol (López *et al.*, 1989).

Más adelante se descubrió también que la cepa *Agrobacterium radiobacter* K84 producía además otro antibiótico denominado Agrocin 434 codificado en otro plásmido y además un sideróforo del tipo hidroxamato denominado ALS84 codificado en el ADN cromosomal, producido solamente en baja concentra-

ción de hierro (Penyalver y López, 1999). Estos metabolitos eran también capaces de inhibir ciertas cepas patógenas de *Agrobacterium tumefaciens* y podrían contribuir también a los mecanismos de biocontrol en la planta (Mc Clure *et al.*, 1998; Peñalver *et al.*, 1994).

El descubrimiento de Kerr, dio lugar a la preparación de formulaciones comerciales cuyo ingrediente activo era la bacteria *Agrobacterium radiobacter* K84 (Agrogall-30, Galltroll, Norbac). Sin embargo con el tiempo de uso comenzaron a aparecer cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que a pesar de presentar la permeasa para el Agrocin 84 resultaban resistentes al antibiótico. Esto se debía a que el plásmido pAgK84 que codifica para la producción de Agrocin 84, y que además es el responsable de la inmunidad al antibiótico de las cepas que lo contienen, había sido transferido de las cepas biocontroladoras a las cepas patógenas por conjugación. El plásmido pAgK84 no es un plásmido conjugativo, pero sí lo es el plásmido NOC, que también está presente en las cepas biocontroladoras productoras de Agrocin 84. Al movilizar el plásmido NOC, también se moviliza el plásmido pAgK84, que lleva la información para la inmunidad (Penyalver *et al.*, 2000). Se pensó en un primer momento que el Agrocin 84 actuaba sobre la síntesis de ADN pero luego se demostró que su verdadera acción era la inhibición de la leucil-tRNA sintetasa, enzima vital, en el patógeno (Kim *et al.*, 2006). La inmunidad conferida por el plásmido pAgK84 se debe a que dicho plásmido codifica para la síntesis de otra sintetasa inmune al antibiótico (Reader *et al.*, 2005).

Para evitar la transferencia del plásmido y concomitantemente de la inmunidad a cepas patógenas, se construyó por ingeniería genética una nueva cepa denominada *Agrobacterium radiobacter* K1026 incapaz de realizar la transferencia (Ryder y Jones, 1991). Utilizando dicha cepa como ingrediente activo, se formuló un nuevo producto comercial denominado No Gall. La cepa K1026 se convirtió así en el primer microorganismo genéticamente modificado liberado para su uso en el medioambiente.

Este caso ha sido el primer ejemplo de un patógeno capaz de adquirir resistencia a un agente de biocontrol.

3.2.1.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Se denomina como PGPB (plant growth promoting bacteria) a aquellas bacterias asociadas a las plantas que promueven el crecimiento de las mismas. Dentro de estas bacterias las más estudiadas son la denominadas PGPR o sea rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Kloepper *et al.*, 1991). Pueden actuar como biofertilizantes favoreciendo la adquisición de nutrientes por parte del vegetal (por 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 (Bloemberg y Lugtenberg, 2001).

De acuerdo a la teoría de la trofobiosis, siempre que una planta se encuentre en equilibrio nutricional, es decir siempre que no tenga ni exceso ni defecto de nutrientes, la misma dispondrá de excelentes herramientas para defenderse del ataque de plagas y enfermedades. Según esta teoría, cualquiera sea el modo de acción de las PGPR, se podría afirmar que las mismas contribuyen a que no haya enfermedad.

En general el modo de acción de las PGPR involucra más de uno de los métodos mencionados. Por ejemplo en el trabajo de Garat y colaboradores (2000) se seleccionó una cepa de *Pseudomonas fluorescens* capaz de promover el crecimiento de plantines de tomate en condiciones controladas. La misma cepa a su vez, era capaz de producir sustancias antifúngicas capaces de inhibir *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. La Figura 1 muestra el ensayo de promoción de crecimiento mostrando los plantines sometidos a diferentes tratamientos. La figura 2 muestra el cultivo dual de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* contra *Fusarium oxysporum*.

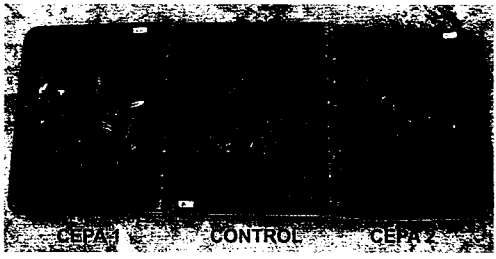


Figura 1. Ensayo de promoción de crecimiento de plantines. Cepa 1 promovió el crecimiento. Cepa 2 perjudicó el crecimiento

A su vez Barka y colaboradores (2002), demostraron que la cepa de *Pseudomonas* sp. PsJN, era capaz de promover el crecimiento de plantines de vid y a su vez inhibía el crecimiento de *Botrytis cinerea* en cultivo dual y sobre la planta. Ya que en los ensayos, la bacteria biocontroladora se aplicaba a la raíz y el patógeno en forma foliar, se propuso en el trabajo, que la cepa de *Pseudomonas* sp. PsJN podría además ser inductora de resistencia en la planta hospedera (Ver Capítulo 4 Mecanismos de Acción).

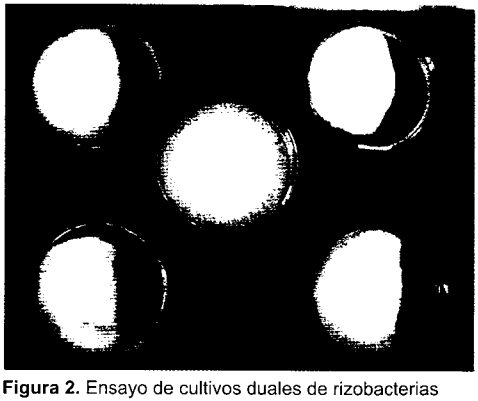


Figura 2. Ensayo de cultivos duales de rizobacterias aisladas de tomate contra *Fusarium oxysporum*

Las PGPR han sido aisladas de rizosfera, de rizoplano y también vez se han encontrado como endófitas en diferentes vegetales. Según Cumbs y colaboradores (2004), el uso de antagonistas endófitos con habilidad intrínseca para colonizar tejidos inter-

nos de la planta, aumenta la estabilidad de los mismos a las posibles variaciones ambientales y por lo tanto prolonga su utilidad como controladores biológicos.

Existen numerosos ejemplos de rizobacterias asociadas al control biológico de patógenos de plantas. La protección lograda con las rizobacterias no se limita al control de patógenos radiculares sino también a patógenos de las parte aéreas, debido a mecanismos de inducción de resistencia sistémica lograda por la presencia de determinadas rizobacterias asociadas a la raíz, especialmente en el caso de bacterias endófitas (Benhamou y Nicole, 1999). Algunos de los géneros bacterianos más estudiados como PGPR y asociados al control biológico de fitopatógenos son *Bacillus* (Bai *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002), *Pseudomonas* (Siddiqui y Shaukat, 2003; Dowling y O´Gara, 1994; Bagnasco *et al.*, 1998; Haas y Defago, 2005), y *Streptomyces* (Sabaratnam y Trauqair, 2002; Cao *et al.,* 2004). Algunos ejemplos de formulaciones comerciales de control biológico, cuyos principios activos son bacterias pertenecientes a los géneros anteriormente mencionados, son los siguientes:

- Actinovate, (principio activo: *Streptomyces lydicus*). Está recomendado para su uso contra patógenos de suelo;
- Kodiac (principio activo: *Bacillus subtilis*). Está recomendado para evitar el camping-off causado por *Rhizoctonia solani* entre otros.
- BioJect Spot-Less (principio activo: *Pseudomonas aureofaciens*). Está recomendado para evitar mancha del dólar y antracnosis en césped.

También se pueden encontrar ejemplos de bacterias biocontroladoras no asociadas a las raíces de plantas. Por ejemplo Khan *et al.* (2001) encontraron bacterias del género *Bacillus* asociadas al control biológico de *Gibberella zeae* en trigo. Dichas bacterias resultaron buenas colonizadoras de las anteras de las flores de trigo impidiendo la infección por parte del patógeno. De la misma forma Zhang y colaboradores (2005) encontraron dos cepas bacterianas identificadas como *Brevibacillus br*evis ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116, capaces de controlar *Gibberella zeae* en espigas de cebada. Por su parte, Anderson y colaboradores (2004), describen a la bacteria *Pseudomonas fluorescens* A506 como biocontroladora del fuego bacteriano causado por *Erwinia amylovora* en peras y manzanas. Se demostró que la bacteria antagonista actuaba por competencia, excluyendo al patógeno de las flores, lugar de entrada de la infección. A su vez El-Hendawy y colaboradores (2005) encontraron que mediante aplicaciones foliares de la bacteria *Rahnella aquatilis* se podían controlar los síntomas ocasionados por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en hojas de tomate.

3.2.1.3. Bacterias como controladoras de enfermedades poscosecha

Diversas bacterias han sido utilizadas con éxito como controladores de enfermedades en poscosecha. Trabajos pioneros en el tema como los de Gueldner y colaboradores (1988) y de Janisiewicz y Roitman (1988) demostraron la utilidad de la cepa *Bacillus sultilis B-3* contra la podredumbre morena del durazno, y de la cepa *Pseudomonas cepacia* LT-4-12W contra el moho azul y moho gris en manzanas y peras, respectivamente. Ambas bacterias controlaban la aparición de síntomas debidos al ataque de los frutos por los hongos patógenos mencionados, en las condiciones de almacenamiento en poscosecha. La cepa *Pseudomonas cepacia* LT-4-12W también resultó efectiva contra la podredumbre morena en duraznos tal como lo demuestra el trabajo de Smilanick y colaboradores (1993). Se demostró que ambas cepas biocontroladoras producían antibióticos (iturina y pirrolnitrina, respectivamente), por lo cual se supuso que estos antibióticos estaban implicados en el biocontrol. Además la aplicación de los antibióticos purificados también controlaba el desarrollo de los patógenos. Sin embargo, la cepa *Pseudomonas cepacia* LT-4-12W también tuvo la capacidad de controlar una cepa patógena de *Penicillium italicum* resistente a la pirrolnitrina (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Ejemplos más recientes del uso de bacterias como controladores biológicos de enfermedades poscosecha se pueden encontrar en los trabajos de Viñas y colaboradores (1998) y Nunes y colaboradores (2001), basados en los estudios de la cepa *Pantoea agglomerans* CPA-2 como controladora biológica de patógenos en poscosecha de manzana y pera respectivamente. La efectividad de la cepa permitía controlar el desarrollo de *Penicillium expansum* en heridas de peras inoculadas artificialmente, almacenadas 60 días a 1°C, en porcentajes mayores del 90%. Otra cepa de *Pantoea agglomerans* ha sido utilizada con éxito en el biocontrol de *Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer* en fruta de carozo (Bonaterra *et al.*, 2003). Los ensayos en fruta inoculada y almacenada a 20°C mostraron niveles de efectividad de hasta 100% en la inhibición de *Monilinia laxa* en algunas variedades de durazno.

En la actualidad existen formulaciones comerciales basadas en bacterias biocontroladoras para su uso en tratamientos preventivos de enfermedades poscosecha. Un ejemplo es BioSave 1000 producido por EcoScience Corp.(USA), cuyo principio activo es la cepa *Pseudomonas syringae* ESC 10, cuya efectividad fue demostrada por los trabajos de Janisiewicz y Marchi (1992) y de Janisiewicz y Jeffers (1997). La bacteria ha demostrado su efectividad contra el moho azul y moho gris en manzanas y contra patógenos poscosecha de citrus.

Otro producto desarrollado comercialmente es el Avogreen, cuyo ingrediente activo lo constituye una cepa de *Bacillus sultilis* capaz de biocontrolar *Cercospora* y antracnosis en palta. El producto ha sido registrado en Sud Africa y es de aplicación precosecha (Janisiewicz y Korsten, 2000).

3.2.2.- Virus como controladores biológicos

Se describirá a continuación, el uso de virus bacterianos y fúngicos para el biocontrol de bacterias y hongos fitopatógenos.

3.2.2.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o simplemente fagos, son virus que parasitan bacterias. Existen distintos tipos de bacteriófagos. Algunos de ellos penetran a la bacteria hospedera, manejando la maquinaria celular de forma de reproducirse e inducir la lisis celular, con la concomitante liberación de la progenie. Este comportamiento se conoce como ciclo lítico. Otros pueden permanecer en un estado conocido como lisogenia, dentro de la célula bacteriana, incorporando en algunos casos su material genético al ADN celular. En presencia de determinados estímulos se puede inducir, en estos casos, el ciclo lítico que lleva a la muerte bacteriana y a la diseminación de numerosas partículas virales. A su vez se han encontrado otro tipo de fagos, que se reproducen dentro de la bacteria hospedera y son expulsados al ambiente sin ruptura de la célula bacteriana. Un ejemplo de estos virus, es el virus filamentoso Lf que infecta *Xanthomonas campestris* pv. campestris (Lin *et al.*, 1999).

El proceso de infección vírica comienza con el reconocimiento entre la bacteria hospedera y el bacteriófago. Este reconocimiento es muy específico, en general a nivel de subespecie. Es así que la capacidad de ser infectada por determinados bacteriófagos es una característica taxonómica a nivel de subespecie, en bacterias.

Se han encontrado bacteriófagos capaces de infectar y provocar la lisis a varias bacterias fitopatógenas. Por ejemplo, se detectaron virus capaces de provocar la lisis de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* (Randhawa y Civerolo, 1986), de *Xanthomonas campestris* pv *pelargonii* causante de la marchitez bacteriana del geranio (Flaherty, 2001), de *Xanthomonas campestris* pv *versicatoria* causante de la mancha bacteriana en tomate y morrón (Flaherty, 2000) y de *Erwinia amylovora* causante del fuego bacteriano en manzanas y peras (Schnabel y Jones, 2001; Gill *et al.*, 2003).

Según Gill y Abedon (2003) para que el uso de bacteriófagos para el control de fitopatógenos sea efectivo se tienen que tener en cuenta cier-

tas variables que influyen en el proceso. Se debe considerar el nicho que ocupan las bacterias que se busca atacar y preguntarse si el mismo es accesible para los bacteriófagos. A su vez, es necesario determinar si existe un medio acuoso que facilite la difusión de los fagos para alcanzar las bacterias blanco. Otro factor a considerar es la presencia de biofilms bacterianos en el sitio de acción, lo cual dificultaría el acceso del fago a la superficie de la bacteria y por lo tanto, el reconocimiento entre fago y bacteria. Es importante también considerar la capacidad de sobreviviencia del fago en el ambiente antes de que llegue a darse la infección bacteriana.

En la actualidad, a partir de diciembre de 2005, se ha aceptado el registro en EEUU de Agriphage, una formulación comercial cuyo principio activo es una mezcla de fagos activos contra *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria y contra *Pseudomonas syringae* pv. tomato, para ser utilizados en tomate y morrón. El registro afirma que los fagos, base de la formulación, se encuentran normalmente en el agua, suelo y sobre las plantas a tratar y que su supervivencia en el ambiente, si no encuentran una bacteria hospedera, es de tan sólo 48 horas (EPA, 2006a).

3.2.2.2. Micovirus

Los micovirus son virus que parasitan hongos. La mayoría de los micovirus caracterizados hasta el momento, tiene un genoma de ARN de doble cadena, el cual puede estar encapsidado en partículas isométricas (Vilches y Castillo, 1997), o aparecer como elementos no encapsidados asociados a vesículas membranosas en el citoplasma o dentro de las mitocondrias (Lakshman *et al.*, 1998). A su vez se han encontrado micovirus con otra morfología tales como los encontrados por Howitt y colaboradores (2001) en *Botrytis cinerea* con forma de bastones flexibles o rígidos.

A diferencia de los bacteriófagos, los micovirus no tienen etapas de vida fuera del hongo parasitado y en ningún caso conocido provocan la lisis del hongo parasitado. Para ser transmitidos de un hongo a otro es necesario que haya contacto citoplasmático entre la cepa que lo transmite y la cepa que lo recibe. Esto implica que para que ocurra la transferencia debe haber anastomosis entre las hifas de las cepas involucradas, por lo cual ambas cepas deben pertenecer al mismo grupo de compatibilidad vegetativa.

La presencia de micovirus en los hongos puede tener efectos detectables fenotípicamente. Sin embargo existen casos en los que no se detectan cambios apreciables. En varios casos la presencia de los micovirus se ha asocia-

do con aparición de hipovirulencia en el hongo parasitado. El caso más conocido vincula la presencia de micovirus a la hipovirulencia del hongo *Cryphonectria parasitica* que causa el cancro del castaño. En este caso la transmisión de los micovirus de cepas hipovirulentas a cepas virulentas logró controlar naturalmente la enfermedad. También se han encontrado cepas hipovirulentas de *Botrytis cinerea* (Vilches y Castillo, 1997), *Sclerotinia sclerotiorum* (Xie *et al.*, 2006) *y Rhizoctonia solani* (Dilip *et al.*,1998) debido a la presencia de micovirus.

Según lo comentado anteriormente, podríamos decir que a pesar de que la hipovirulencia es provocada por la presencia de micovirus, los verdaderos agentes de control biológico, o sea aquellos que deberían ser incorporados en un patosistema para controlar la enfermedad, serían las cepas fúngicas hipovirulentas que llevan los mencionados virus. La anastomosis de las hifas de esos hongos con hifas de hongos virulentos provocaría la transferencia de los micovirus y la concomitante aparición de hipovirulencia.

3.2.3.- Levaduras como agentes de control biológico

3.2.3.1. Levaduras como ACB de patógenos de poscosecha

En general las levaduras han sido muy estudiadas como controladores biológicos de enfermedades desarrolladas durante el almacenamiento poscosecha de frutas y hortalizas. Ya en 1995, la cepa *Candida oleophila* I-182 fue registrada como el ingrediente activo del producto Aspire por Ecogen Inc. (USA) para el control biológico de enfermedades poscosecha de manzana y citrus (Droby *et al.*, 1998; Chand- Goyal *et al.*, 1999). En la actualidad existe otra formulación comercial basada en levaduras para el control biológico en poscosecha desarrollada por Anchor Yeast (Sud Africa). Esta formulación se denomina Yield Plus y el principio activo es la levadura *Cryptococcus albidus* (Bar-Shimon *et al.*, 2004). Otras cepas pertenecientes a esta especies han sido descritas como buenos antagonistas de patógenos poscosecha de fruta. Por ejemplo, Lima y colaboradores (1996) a su vez han desarrollado trabajos utilizando otra cepa de *Candida oleophila* (cepa L66) junto con otra levadura, *Aureobasidium pullulans* L47 para el control de *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea* en frutillas, logrando buenos resultados en aplicaciones pre y poscosecha. A su vez, Fan y Tian (2001) demostraron la capacidad de una cepa de *Cryptococcus albidus* de controlar el desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en heridas de manzana.

Otras especies dentro de los géneros *Candida* y *Cryptococcus* también han demostrado ser eficaces controladores de patógenos poscosecha. Los tra-

bajos de Viñas y colaboradores (1999) y Usall y colaboradores (2000), muestran la eficiencia de una cepa de *Candida sake* en controlar patógenos poscosecha en heridas de manzanas Golden Delicious. La eficacia se daba tanto a 20°C como a 1°C, alcanzándose valores de protección del 100%. A su vez, se ha demostrado la eficiencia biocontroladora obtenida utilizando cepas de *Cryptococcus laurentii* en poscosecha. Son ejemplos de ello los trabajos de protección de manzanas contra *P. expansum* (Roberts, 1990; Vero *et al.*, 2002), de protección de uvas contra *Botrytis cinerea* (Lima *et al.*, 1998) y de peras contra *Botrytis cinerea* (Zhang *et al.*, 2005).

Figura 3. Aspire producto comercial registrado en EEUU basado en levaduras para el control biológico de enfermedades poscosecha.

Cepas de levaduras pertenecientes al género *Metschnikowia* también han encontrado su utilidad como agentes de control biológico de enfermedades poscosecha en manzanas, y uvas (Janisiewicz *et al.*, 2001). Cepas de *Metschnikowia pulcherrima*, se han aislado de la superficie de manzanas sanas determinándose que las diferentes cepas provenientes de la misma huerta, tenían diferente capacidad biocontroladora. Este hecho ya había sido descrito por Schena y colaboradores (1999) para cepas de *Aureobasidium pullulans*. La actividad biocontroladora de las diferentes cepas contra *Botrytis cinerea* en manzana resultaba diferente, detectándose además una diversidad genética determinada por perfiles RAPD. Estos ejemplos demuestran que la capacidad biocontroladora se da a nivel de cepa. Por lo tanto, contar con un aislamiento perteneciente a una especie a la que pertenezcan cepas con reconocida capacidad biocontroladora, no asegura que el aislamiento sea un buen antagonista.

Existen otros ejemplos del uso de cepas de *Aureobasidium pullulans* para control biológico de patógenos poscosecha. Trabajos como el de Ippolito *et al.* (2000) muestran su eficacia en el control de *Botryitis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzanas, llegándose a obtener protecciones del orden del 89 y 67% respectivamente, en heridas inoculadas luego de almacenamiento a 24°C por 14 días. El trabajo de Garmendia y colaboradores (2005) muestra también, la eficiencia de biocontrol lograda con una cepa nativa de

Aureobasidium pullulans sobre *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzanas Red Delicious durante tres meses de almacenamiento poscosecha a 1°C. Los niveles de protección alcanzados llegaron a 82 y 70% respectivamente. La Figura 4 muestra el resultado de un ensayo de biocontrol de moho azul en manzanas utilizando como antagonista la cepa *Aureobasidium pullulans* B21. Se pueden observar las heridas protegidas y no protegidas en una misma manzana. Para realizar el ensayo se hicieron heridas artificiales en la zona ecuatorial de la fruta, las cuales se inocularon con el antagonista y el patógeno. En cada fruta se dejó una herida control que sólo se inoculó con el patógeno. En la Figura 4 se observa la herida control mostrando los síntomas de la pudrición causada por *P. expansum*, y las heridas protegidas por el biocontrolador que no desarrollaron síntomas.

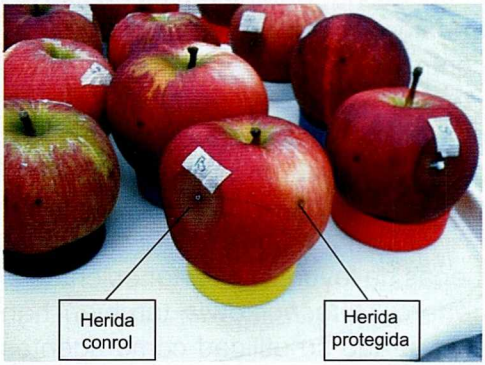


Figura 4. Ensayo de control biológico de *P. expansum* en heridas de manzana, por acción de levaduras nativas. Ver explicación en el texto

Muchos de los trabajos mencionados en este capítulo, han estudiado los mecanismos implicados en el biocontrol, llegando al conclusión de que en la mayoría de los casos, se trata de de inhibición del patógeno por competencia por nutrientes (Garmendia *et al.*, 2005). También hay trabajos que involucran antagonistas productores de enzimas capaces de degradar paredes del patógeno o incluso de micoparasitismo, (Bar-Shimon *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2005) o capaces de inducir respuestas de resistencia en el hospedero (Ippolito *et al.*, 2002).

La producción de sustancias tóxicas que inhiban al patógeno no es uno de los mecanismos más encotrados en las interacciones levadura antagonista-patógeno. Sin embargo se debe considerar que las cepas de *Aureobasidium pullulans* pueden ser productoras de antibióticos conocidos como aureobasidinas (Castoria *et al.*, 2001) y que se está trabajando actualmente con levaduras productoras de micocinas capaces de inhibir hongos filamentosos (Santos y Marquina, 2004).

En general todos los trabajos muestran niveles de protección elevados cuando los antagonistas se inoculan en forma previa o conjunta al patógeno, pero nunca cuando la inoculación del antagonista es posterior a la del patógeno. Estos resultados muestran claramente el carácter preventivo, pero nunca curativo del tratamiento.

3.2.3.2. Levaduras como ACB de hongos en el almacenamiento de granos

Petersson y colaboradores (1999) y Druvefors y colaboradores (2002) demostraron la utilidad de una cepa de *Pichia anomala* J121 como controladora biológica del desarrollo de *Penicillium roqueforti* en granos de trigo almacenados durante períodos de hasta 14 meses en silos con diferentes cantidades de aire. El almacenamiento de granos inoculados con dicha cepa biocontroladora impidió el desarrollo del patógeno (inoculado en concentraciones de 10^2 ufc/g de trigo). Sin embargo en silos no tratados con la levadura antagonista, la concentración del patógeno llegó a valores de 10^5 ufc/g de trigo.

3.2.3.3.Levaduras como controladores biológicos de partes aéreas

Saligkarias y colaboradores (2002) encontraron que cepas de levadura eran capaces de controlar el desarrollo de *Botrytis cinerea* en plantas de tomate, en ensayos *in vitro* sobre tallos y en ensayos en planta inoculados sobre hoja. Las levaduras que resultaron mejores antagonistas fueron las cepas *Candida guilliermondii* 101 y US7.

Por su parte Khan y colaboradores (2003) encontraron que dos cepas de levadura *Cryptococcus nodaensis* OH182.9 y *Cryptococcus sp.* OH 181.1 eran capaces de controlar el ataque de *Fusarium* durante la floración del trigo. Los niveles de protección alcanzados utilizando aspersiones de estos antagonistas durante la floración llegaban hasta un 60%.

3.2.4. Hongos filamentosos como controladores biológicos

Existen muchos trabajos que involucran hongos filamentosos en el control biológico de enfermedades de plantas. Entre ellos se pueden citar *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces quisqualis*. Ejemplos de control biológico utilizando *Gliocladium* spp. serán desarrollados en el Capítulo 9, por lo cual se comentarán aquí los usos de *Trichoderma* spp. y *Ampelomyces quisqualis* como agentes de biocontrol.

3.2.4.1. *Ampelomyces quisqualis*

El hongo *Ampelomyces quisqualis* es un micoparásito de ocurrencia natural, capaz de parasitar oidios de varios cultivos como por ejemplo la vid. Es uno de los pocos agentes microbianos de control biológico, de acción curativa. Crece por encima del hongo patógeno y cura la infección. Existe una formulación comercial denominada AQ10, registrada en 1994 en EEUU, cuyo prin-

cipio activo es una cepa de dicho controlador biológico. Su uso está recomendado para varios cultivos (EPA, 2006b)

3.2.4.2. *Trichoderma* spp.

Existen numerosos estudios utilizando hongos del género *Trichoderma* como controladores biológicos de hongos fitopatógenos y como promotores del crecimiento vegetal.

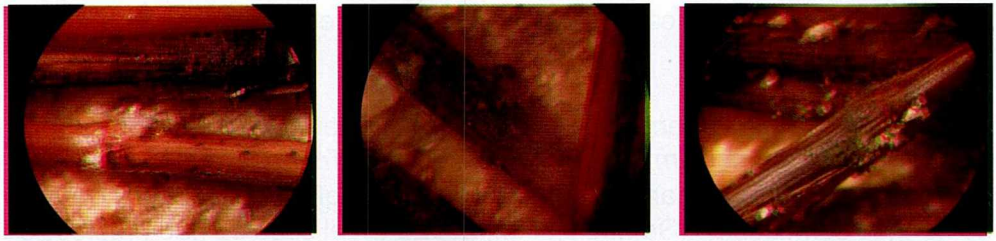
Harman y colaboradores (2004) describen a la cepa *Trichoderma harzianum* T22 como un efectivo promotor del crecimiento de raíces de maíz y pepino. Mencionan además, que este hongo es capaz de colonizar la raíz de las plantas actuando en la promoción del crecimiento y en la defensa contra fitopatógenos radiculares. Afirman también que es activo contra fitopatógenos de las partes áreas ya que mediante la colonización radicular, induce la resistencia sistémica contra ataques en otras partes de la planta. Otros trabajos como el de Yedidia y colaboradores (2003) avalan el uso de cepas de *Trichoderma* como inductores de la resistencia sistémica. Este trabajo demuestra que la aplicación de la cepa *Trichoderma asperellum* T-203 en las raíces de las plantas de pepino, lleva a un aumento localizado en la planta, de las enzimas vinculadas con la resistencia a patógenos, el cual desaparece luego de dos días. Sin embargo si pasado ese período las hojas de las plantas tratadas, son inoculadas con la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, ocurre la expresión de los mecanismos de resistencia y la infección no se produce.

Otros autores han caracterizado a los hongos del género *Trichoderma*, como controladores biológicos de patógenos de suelo tanto en asociación con la planta como a distancia por ser capaces de parasitar y destruir formas de resistencia y propagación de hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo. Es así que se han encontrado cepas de *Trichoderma* spp. capaces de colonizar y dejar inviables esclerotos de diferentes hongos. Clarkson y colaboradores (2002) relatan el aislamiento y selección de dos cepas de *Trichoderma viride* por su capacidad de degradar esclerotos de *Sclerotium cepivorum* en suelo. En asociación con la planta se han utilizado cepas de *Trichoderma* spp. para impedir enfermedades de emergencia de plantines. En estos casos, el agente biocontrolador ha sido aplicado como recubrimiento de semillas. De esta forma si la cepa de *Trichoderma* utilizada es buena colonizadora, se logra una protección desde el inicio de la germinación (Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman y Björkman, 1998). Las cepas de diferentes especies de este género, han demostrado habilidad para colonizar efectivamente la rizosfera, rizoplano y en algunos casos llegar al interior de las

raíces de plantas, logrando así un efectivo control de patógenos radiculares (Avila Miranda *et al.* 2006).

A su vez, existen ejemplos que muestran hongos del género *Trichoderma* como efectivos controladores de patógenos que atacan las partes aéreas de las plantas. Por ejemplo el trabajo de Eden y Stewart (1996) demuestra la capacidad de cepas de *Trichoderma* sp. de proteger tallos de tomate de la infección con *Botrytis cinerea*. A su vez, Harman y colaboradores (1996) demuestran la efectividad de cepas de *Trichoderma harzianum* en el control de *Botryits cinerea* en uva. Por su parte, Elad (2000) demuestra la efectividad de la cepa *Trichoderma harzianum* T39 (principio activo de la formulación comercial Trichodex) como controladora de *Botrytis cinerea* en vid y de *Cladosporium fulvum* en hoja de tomate, entre otros.

También se han utilizado cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de fusariosis de espiga en trigo (Pereyra *et al.*, 2005). Las cepas de *Trichoderma* spp. fueron aplicadas a los rastrojos de trigo infectados con *Gibberella zeae* de forma de impedir que se produjeran los peritecios del patógeno, cuyas ascosporas sirven de inóculo primario para el desarrollo de la enfermedad. La capacidad de colonizar los rastrojos de trigo evidenciada por algunas de las cepas de *Trichoderma* utilizadas en el ensayo, redujo el número de peritecios formados en los rastojos tratados (ver Capítulo 8). La figura 5 muestra los rastrojos colonizados por *Gibberella zeae* (control) y los rastrojos colonizados por *Trichoderma* donde no se observa formación de peritecios. A su vez se muestra un caso, en el que la cepa de *Trichoderma* utilizada no fue efectiva en controlar la colonización por *Gibberella zeae* y la formación de peritecios. El ensayo se realizó sobre rastrojos esterilizados por autoclave, dispensados sobre arena estéril en placas de Petri. Se inocularon los rastrojos con una suspensión conjunta de conidias de *Gibberella zeae* y de *Trichoderma* y se incubaron con ciclos de luz y sombra de 12 horas a temperatura ambiente. Los controles se realizaron inoculando solamente con *Gibberella zeae*.



Control | ***Trichoderma* no controlador** | ***Trichoderma* biocontrolador**

Figura 5. Ensayo de control de colonización de rastrojos y formación de peritecios de *Gibberella zeae*, por acción de distintas cepas nativas de *Trichoderma*.

En general y según Harman y Björkman (1998), los hongos del género *Trichoderma* ejercen el control de fitopatógenos por medio de los siguientes mecanismos:

- Micoparasitismo
- Antibiosis
- Competencia por nutrientes y espacio
- Inducción de resistencia

Debido a su capacidad micoparasítica, los hongos del género *Trichoderma* pueden tener efectos no deseados sobre hongos benéficos, por lo cual es necesario un estudio exhaustivo de estos efectos antes de liberar una cepa biocontroladora al ambiente.

Se ha determinado que ciertas cepas de *Trichoderma* pueden tener efectos inhibitorios en la formación de micorrizas. El trabajo de Martínez y colaboradores (2004) así lo demuestra. En dicho trabajo, se estudió la interacción entre 5 cepas de *Trichoderma pseudokoningii* y los hongos micorríticos *Glomus mosseae* y *Gigaspora rosea*, *in vitro* y en invernáculo. Sus resultados evidenciaron que cuatro de las cepas inhibían la germinación de los hongos micorríticos. Wyss y colaboradores (1992) observaron también una inhibición de la formación de micorrizas por la interacción de una cepa de *Trichoderma harzianum* con *Glomus mosseae* en la rizosfera de plantas de soja. Sin embargo otros trabajos demuestran que no existen problemas de interacción y en algunos casos se corroboró que el hongo micorrítico inhibía a la cepa de *Trichoderma* (Green *et al.*,1999). Por lo tanto es de suma importancia evaluar en cada caso las interacciones entre ambos tipos de hongos.

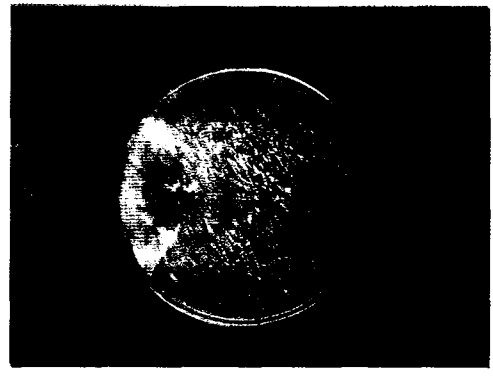


Figura 6. Cultivo dual de *Trichoderma* y *Gibberella zeae*

Se ha demostrado, además que las cepas pertenecientes a los grupos *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (Th4) y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Th2) se caracterizan por una alta agresividad contra cultivos de hongos comestibles (Samuels *et al.*, 2002). En el caso de haber seleccionado cepas de esas especies sería necesario valorar el riesgo-beneficio de su aplicación, especialmente si se trata de aplicaciones masivas.

En la actualidad existen formulaciones comerciales que utilizan como principio activo cepas de *Trichoderma* para el control biológico de varios patógenos de plantas. Algunas de ellas son : Trichodex, Trieco y Trichopel, cuyos principios activos son cepas de *Trichoderma harzianum, Trichoderma viride* y una mezcla de *Trichoderma harzianum* y *T. viride.* Cada una de ellas es recomendada para su uso en varios cultivos y contra varios patógenos.

3.3.- Características ideales de un agente microbiano de biocontrol

En general, los microorganismos utilizados como agentes de control biológico deben cumplir con una serie de requisitos, entre los cuales se pueden mencionar:

- deben ser 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 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.

La búsqueda de microorganismos que reúnan estas características debe guiar la selección de un agente microbiano de biocontrol.

En la actualidad existen muchas formulaciones comerciales que contienen microorganismos antagonistas para uso en control biológico de enfermedades de plantas. Algunas de ellas han sido mencionadas a lo largo de este capítulo.

Para conocer las formulaciones registradas en EEUU, sus principios activos, los patógenos contra los cuales son activos y los vegetales en los cuales se recomienda su aplicación, así como sus posibles efectos tóxicos y recomendaciones de uso se recomienda visitar el sitio web de la EPA (Environmental Protection Agency) de EEUU, destinado a la información sobre los llamados biopesticidas (EPA, 2006c)

3.4.- Pasos a seguir en el desarrollo de agentes de control biológico

Los pasos a seguir en la selección de un agente de biocontrol para un determinado patosistema, requieren bastantes estudios y en general el trabajo de un equipo multidisciplinario que incluya, por lo menos, microbiólogos, fitopatólogos, biólogos moleculares, bioquímicos y químicos.

En general se siguen los siguientes pasos, aunque el orden de la secuencia aquí planteada, puede ser diferente, en algunas ocasiones.

- Estudio del patositema
  En primer lugar se debe caracterizar el patosistema sobre el que se pretende actuar. Es fundamental conocer el patógeno que se quiere controlar y el sitio donde se espera que ocurra el biocontrol.
- Aislamiento y selección de cepas locales del patógeno
  Es necesario aislar y caracterizar las cepas patógenas locales en busca de aquellas cepas que muestren mayor agresividad para utilizarlas como patógenos en los ensayos de biocontrol.
- Aislamiento de posibles agentes de biocontrol
  Las tácticas y estrategias utilizadas para el aislamiento se discuten en el capítulo 5.
- Selección de los agentes de biocontrol
  Las técnicas de selección también son discutidas en el capítulo 5
- Identificación de los agentes de biocontrol seleccionados.
  La identificación precisa de los microorganismos seleccionados es fundamental. Se debe llegar a una identificación a nivel de especie o en algunos casos a nivel de subespecie. De esta forma, se descartarán aquellas cepas que pertenezcan a especies que hayan sido caracterizadas como patógenos humanos, animales o vegetales o con conocida acción antagónica sobre otros micoorganismos benéficos.
  La identificación puede realizarse en el propio laboratorio mediante pruebas fenotípicas siguiendo claves, utilizando kits comerciales o enviando la cepa a algún organismo acreditado para que realice la identificación. En la actualidad utilizan métodos de biología molecular, basados por ejemplo en la secuenciación de determinadas regiones del genoma y posterior comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en bancos de datos de libre acceso, pudiendo de esa forma asignar una especie a esa secuencia. Los métodos de biología molecular permiten caracterizar aún más la cepa seleccionada, llegando en algunos casos a conseguir marcadores moleculares que permiten distinguir esa cepa de otras de la misma especie. Esto permite seguir el destino de la cepa biocotroladora en aplicaciones de uso y a su vez, es de fundamental importancia a la hora de patentar la cepa.
- Caracterización de la cepa seleccionada
  Dentro de las pruebas de caracterización se pueden mencionar la determinación de la temperatura óptima de crecimiento, la compatibilidad con

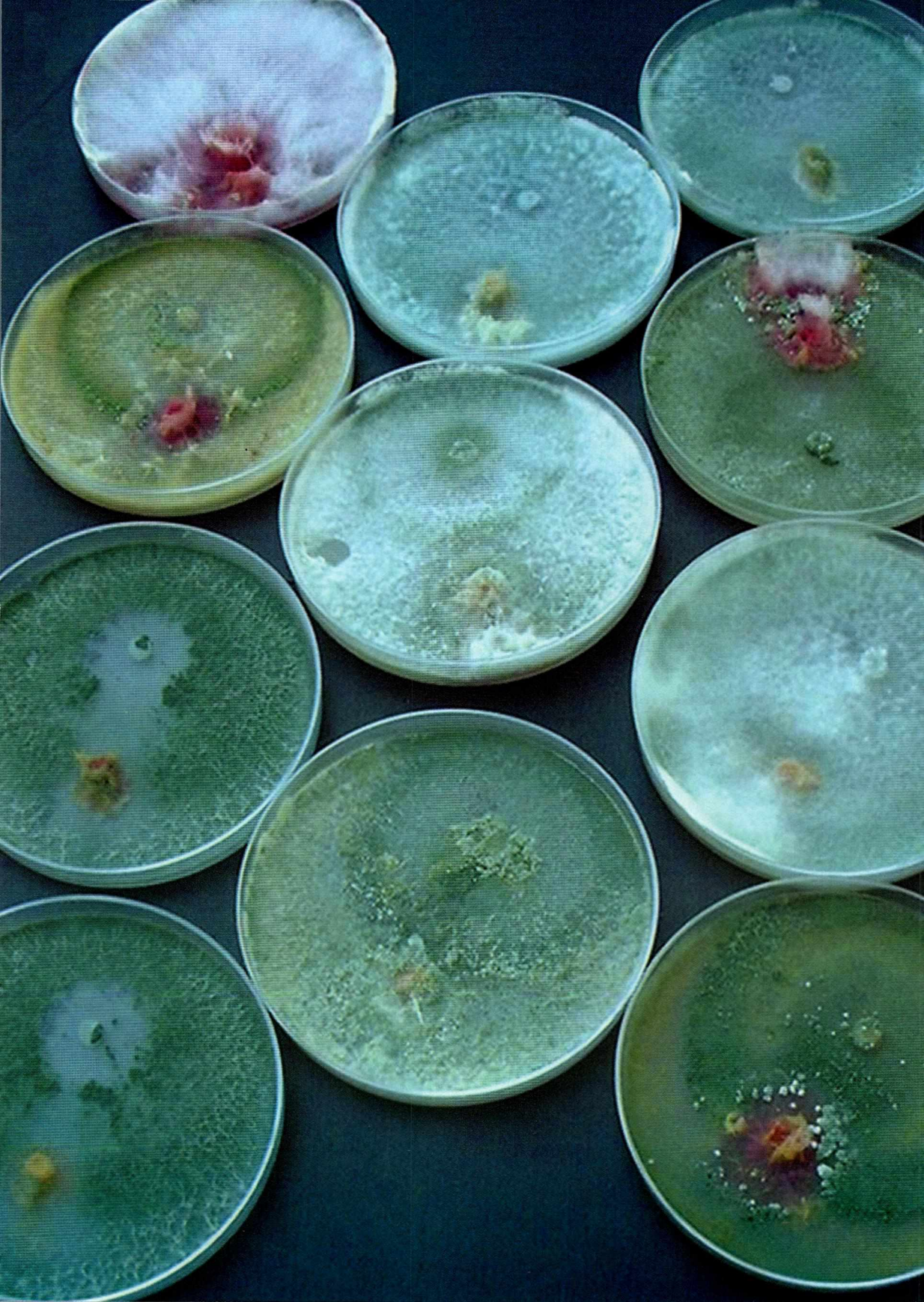
otros métodos de control, la compatibilidad con flora benéfica asociada al cultivo y el perfil nutricional.

- Determinación de los mecanismos de acción
  Es necesario conocer los mecanismos por los cuales el microorganismo antagonista ejerce el biocontrol. De esta manera se podrán realizar estudios para potenciar la acción del biocontrolador.

- Optimización de las condiciones de producción
  Se deben establecer las condiciones óptimas de producción del agente de biocontrol en condiciones económicamente rentables. Esto implica el uso de sustratos baratos para la producción, tales como excedentes de otras industrias, por ejemplo la melaza de caña o suero de leche. Implica además la optimización de las condiciones de incubación de forma de optimizar el rendimiento y disminuir el tiempo de cultivo.

- Desarrollo de una formulación
  Es importante llegar a una formulación de fácil aplicación y de estabilidad asegurada en condiciones de almacenamiento no exigentes.

- Registro de la formulación
  La formulación debe ser registrada previo a su uso masivo. Los requerimientos para los registros varían según los distintos países pero en general se necesitan pruebas de efectividad, de toxicidad, de identificación y caracterización de la cepa utilizada, datos sobre los mecanismos de acción involucrados, de permanencia en el ambiente, y efecto sobre otro tipo de organismos diferentes al organismo blanco.



CAPÍTULO 4

Mecanismos de biocontrol

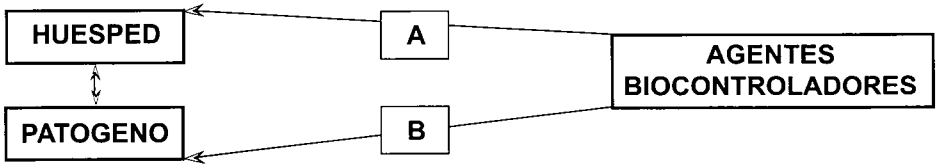
Silvana Vero

4.1.- Introducción.

Los microorganismos antagonistas pueden ejercer su control sobre el patógeno por varios mecanismos de acción, interactuando con el huésped o directamente con el patógeno (Figura 1). En la mayoría de los casos la protección dada por un antagonista involucra más de un mecanismo. Por otra parte es deseable que así ocurra para disminuir los riesgos de aparición de cepas resistentes.

Baker (1991) define varios mecanismos posibles de acción entre los que se encuentran la producción de antibióticos, la competencia por nutrientes o espacio, el parasitismo y la inducción de resistencia del huésped. A su vez clasifica estos mecanismos según la acción se ejerza directamente sobre el patógeno o sobre la planta hospedera.

En el contexto de este libro se ha decido ampliar la clasificación de Baker, incluyendo los mecanismos por los cuales el antagonista causa la reducción de virulencia del patógeno, sin afectar su viabilidad. Este tipo de mecanismos se incluye dentro de los mecanismos de acción que involucran una interacción directa patógeno antagonista. A su vez se ha incluido el término amensalismo que involucra la producción por parte del antagonista, de antibióticos y otro tipo de sustancias que afectan directamente la viabilidad o la capacidad de crecimiento del patógeno (Figura 1)



A. Interacción patógeno-antagonista
1. Amensalismo
2. Reducción de la virulencia del patógeno
3. Competencia
4. Parasitismo

B. Interacción antagonista-hospedero
1. Inducción de resistencia

Figura 1. Mecanismos Involucrados en el Control Biológico de patógenos. (Adaptado de Baker, 1991)

4.2.- Interacción patógeno antagonista

4.2.1.- Amensalismo

Amensalismo se define como la producción por parte de un organismo (antagonista) de sustancias inhibitorias o tóxicas para otro tipo de organismo. Estas sustancias son de variada naturaleza y tienen diferentes blancos de acción.

Dentro de este tipo de sustancias se pueden mencionar los antibióticos, las toxinas killer y enzimas capaces de degradar paredes de hongos patógenos.

4.2.1.1.- Antibióticos

Son productos del metabolismo secundario de los microorganismos antagonistas capaces de inhibir el desarrollo o provocar la muerte del microorganismo patógeno. Como es característico de los metabolitos secundarios, su producción depende en gran medida del medio y del ambiente donde se está desarrollando el microorganismo productor. Son sustancias de bajo peso molecular, activos a muy bajas concentraciones. Puede tratarse de sustancias solubles o volátiles. En general actúan sobre el patógeno atacando un sitio blanco específico, por lo cual la aparición de cepas resistentes no es difícil.

El uso de microorganismos productores de antibióticos para el control biológico es muy discutido. Algunos autores afirman que se corren los mismos riesgos que al aplicar fungicidas sintéticos. Por un lado, se hacen necesarios estudios toxicológicos que demuestren que dichas sustancias antibióticas son inocuas para organismos diferentes del organismo blanco, incluido el hombre. Por otra parte las poblaciones de microorganismos patógenos se pueden tornar resistentes al efecto del antibiótico como sucede con los fungicidas químicos. El antecedente más notorio ha sido el caso de la aparición de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, patógeno causante de la agalla de corona, resistentes al Agrocin 84, un antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* que lograba controlar al patógeno a través de dicho antibiótico (Campbell, 1989).

Sin embargo, quienes defienden el uso de microorganismos productores de antibióticos basan su fundamentación en el hecho de que las cantidades de antibióticos producidas a escala microbiana no pueden ser comparadas a la aplicación de cantidades masivas de productos químicos realizada en la agricultura.

4.2.1.1.1.- Antibióticos de origen bacteriano

Se han identificado varios compuestos antibióticos, tanto solubles como volátiles, de origen bacteriano implicados en el biocontrol de patógenos fúngicos. Ejemplos de ellos son los antibióticos producidos por microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas,* tales como 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazina, pioluteorina pirrolnitrina y algunos polipéptidos cíclicos (Raaijmakers *et al.*, 2002). De la Fuente y colaboradores (2004) estudiaron los mecanismos implicados en el biocontrol ejercido por la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* UP61, la cual era capaz de controlar varios patógenos tales como *Pythium ultimum* en *Lotus corniculatus*, *Sclerotium rolfsii* en porotos y *Rhizoctonia solani* en tomate. Demostraron que la cepa biocontroladora producía tres antibióticos: 2,4-diacetilfloroglucinol, pyrrolnitrina y pyoluteorina. El mismo grupo de investigadores encontró que la cepa *Pseudomonas fluorescens* UP148 también era capaz de proteger la leguminosa forrajera *Lotus corniculatus* del damping off causado por *Rhizoctonia solani*, mediante la producción de un antibiótico derivado de la fenazina no descrito hasta ese momento (Bajsa, 2003). Dilantha y colaboradores (2005) demostraron a su vez, que varias cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de rizosfera de canola y soja producían antibóticos volátiles capaces de inhibir la germinación de esclerotos y ascosporas de *Scelerotinia sclerotiorum, in vitro* y sobre suelo. La sustancias antifúngicas fueron identificados como ciclohexanol, decanal, 2-etil 1-hexanol y nonanal.

Asimismo, se ha elucidado la estructura de otros antibióticos producidos por bacterias pertenecientes a otros géneros como *Bacillus*, *Streptomyces* y *Stenotrophomonas* y se ha asociado su producción al biocontrol de patógenos vegetales. (Hashidoko *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Leclère *et al.*, 2005). También existen ejemplos de microorganismos productores de antibióticos capaces de controlar patógenos poscosecha. Janisiewicz y Roitman (1988) aislaron una cepa de *Burkhordelia cepacia* , capaz de proteger peras y manzanas contra el ataque de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* . Dicha cepa producía *in vitro* un potente antifungico, llamado pirrolnitrina, el cual inhibía el crecimiento en medio de cultivo de los patógenos mencionados, a concentraciones menores de 1 mg/ml (Droby y Chalutz, 1994). La pirrolnitrina purificada aplicada sobre fruta en concentraciones diez veces mayores controlaba también la aparición de enfermedad debida a los mencionados patógenos. Se concluyó que este antifúngico no era la única razón por la cual la bacteria biocontroladora era capaz de proteger la fruta cosechada del ataque de los patógenos.

Se ha planteado recientemente que la producción de estas sustancias antibióticas está regulada por señales de sensores de quórum (Miller y Bassler, 2001). Como ejemplo se puede citar la producción de fenazina por la cepa

Pseudomonas aureofaciens 30-84. Se ha demostrado que la producción de este antibiótico es de fundamental importancia para el control del *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en trigo y que la producción del mismo está mediada por sensores de quórum (Wood *et al.*, 1997).

Para demostrar el rol de los antibióticos en el control biológico de enfermedades de plantas, se han utilizado cepas mutantes con pérdida de la capacidad de producir el antibiótico, o mutantes sobreproductoras (Bonsal *et al.*, 1997; Chin-A-Woeng *et al.*, 1998; Nowak-Thompson *et al.*, 1999). Es muy importante además demostrar la capacidad de colonización y la producción del antibiótico en el sitio de acción. Según Mavrodi y colaboradores (2006) las *Pseudomonas* fluorescentes productoras de 2,4- diacetilfloroglucinol son muy efectivas como biocotroladoras de patógenos de suelo. Sin embargo difieren en su habilidad para colonizar raíces de diferentes cultivos, lo cual las hace más o menos aptas para su uso como biocontroladores. Se han encontrado fenotipos capaces de colonizar y mantener una alta población activa en raíces aún cuando de inoculen en densidades tan bajas como 10 a 100 ufc/g de suelo (Landa *et al.*, 2002). A su vez, existen trabajos que demuestran la producción de los antibióticos en el sitio de acción. Por ejemplo, Raaijmakers y colaboradores (1999) demostraron que el antibiótico 2,4- diacetilfloroglucinol se producía en la rizosfera de trigo cuando la misma se inoculaba con cepas de *Pseudomonas* fluorescentes productoras del antibiótico.

4.2.1.1.2.- Antibióticos de origen fúngico

No sólo se han encontrado antibióticos de origen bacteriano vinculados al control biológico de hongos fitopatógenos. Existen múltiples trabajos que identifican sustancias antibióticas producidos por hongos biocontroladores. La mayoría de los estudios se han enfocado en hongos de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium.*

Son muchos los trabajos demostrando la capacidad de *Trichoderma* spp. de producir diferentes antibióticos activos contra fitopatógenos fúngicos. Entre ellos se pueden citar gliotoxina, gliovirina, viridina, pironas y antibióticos de naturaleza peptídica como alameticina y suzukamicina. (Vey *et al.*, 2001; Rey, 1998). Dentro de los antibióticos peptídicos se destaca un grupo de péptidos (peptaibols) de síntesis no ribosómica (Chutrakul y Peberdy, 2005) con alto contenido en el aminoácido alfa aminobutírico, un amino alcohol terminal en el extremo COOH y un aminoácido acetilado en el extremo N-terminal (Landreau *et al.*, 2002). La acción de estos compuestos se basa, principalmente, en alterar la permeabilidad iónica de la membrana celular del patógeno. En la actualidad se han identificado más de 180 antibióticos de

este tipo producidos por hongos del género *Trichoderma*. Para algunos de estos antibióticos se ha demostrado actividad contra patógenos fúngicos y bacterianos, como en el caso de las tricokininas producidas por cepas de *Trichoderma koningii* (Xiao-Yan *et al.*, 2006). Las tricokininas demostraron un amplio espectro de acción, ya que se detectó actividad *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli, Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* entre otros patógenos fúngicos, pero además también fueron activos contra bacterias Gram positivas como *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis.*

En general, la producción de antibióticos, se puede detectar fácilmente en el laboratorio por ensayos de inhibición del desarrollo del patógeno *in vitro* (Figura 2). Sin embargo la detección de actividad inhibitoria en medios de cultivo, no garantiza que los microorganismos antagonistas sean capaces de producir algún efecto de ese tipo en el verdadero sitio de acción. Esto se debe a que, como se mencionó anteriormente, la producción de estas sustancias inhibitorias dependen en gran medida de las condiciones de crecimiento del antagonista.

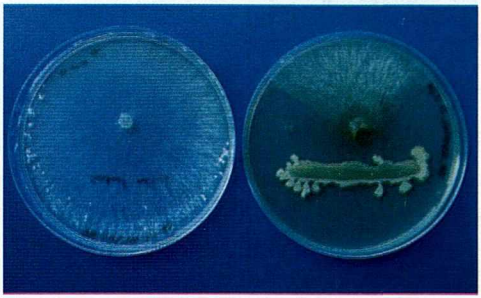


Figura 2. Cultivo dual de *Bacillus subtilis* y *Sclerotium rolfsii*. (derecha). Placa control (izquierda) de *Sclerotium rolfsii*

4.2.1.1.3- Ensayos para la determinación de actividad antimicrobiana

Los ensayos para el estudio de producción de metabolitos antimicrobianos son sencillos de realizar en el laboratorio. Consisten en ensayos de inhibición del crecimiento en condiciones de laboratorio, del patógeno a controlar. En general, se trata de determinar si un microorganismo es capaz de producir sustancias solubles o volátiles que inhiban el desarrollo de un determinado patógeno en medio de cultivo.

Cultivos duales

Consisten en sembrar el microorganismo cuya actividad antibiótica se quiere ensayar, en un medio de cultivo y determinar si es capaz de inhibir el desarrollo del patógeno a controlar.

Para el estudio de microorganismos productores de sustancias solubles y capaces de difundir en el agar, se siembran ambos microorganismos (biocontrolador y patógeno) en una misma placa y se determina si el crecimiento del antagonista inhibe el crecimiento del patógeno. Siempre es nece-

sario sembrar una placa del mismo medio solamente con el patógeno de forma de corroborar su crecimiento en las condiciones del ensayo. En general la siembra de los microorganismos (biocontrolador y patógeno) se hace en superficie, colocando un inóculo de ambos a una distancia determinada uno del otro. Cuando se trata de patógenos fúngicos, el patógeno se siembra en forma de disco de micelio en crecimiento o colocando un pequeño volumen de una suspensión de conidias o esporas del patógeno sobre el medio de cultivo en el cual se realizará el ensayo. Enfrentado a éste, se siembra el microorganismo antagonista. Si el mismo se trata de un hongo filamentoso se realiza la siembra de igual forma, si se trata de un antagonista bacteriano o levaduriforme, en general se siembra en forma de estría. La Figura 2 muestra un cultivo dual entre una bacteria (*Bacillus subtilis*) y un hongo fitopatógeno (*Sclerotium rolfsii*). A su vez se aprecia un cultivo de *Sclerotium rolfsii* en forma asilada, incubado en el mismo medio y en las mismas condiciones que el cultivo dual. Se puede ver que la presencia de la bacteria en la placa de cultivo dual inhibe a distancia el crecimiento del hongo. Esto se debe a la producción de sustancias antifúngicas capaces de difundir en ese medio de cultivo. La Figura 4 muestra cultivos duales entre diferentes bacterias aisladas de la rizosfera de tomate y un aislamiento del hongo fitopatógeno *Sclerotinia scleotiorum*. Las cepas C1 y T3 fueron identificadas como *Pseudomonas* spp. y las B1 y T23 como *Bacillus* spp.

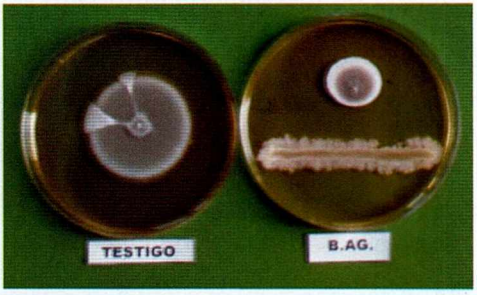


Figura 3. Cultivo dual de *Bacillus pumillus* y *Penicillium expansum* (derecha). Placa control (izquierda) de *Penicillium expansum*

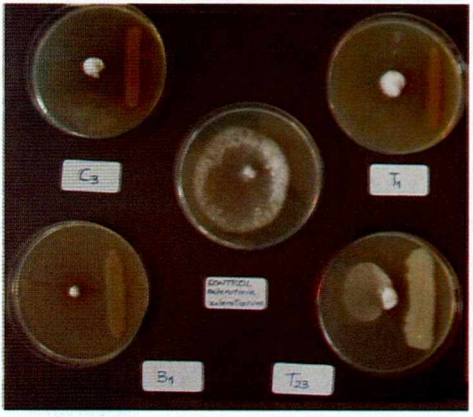


Figura 4. Cultivos duales de bacterias aisladas de la rizosfera de tomate y el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*

La siembra del patógeno también puede realizarse en forma incorporada en el medio de cultivo. Para ello se dispensa en la base de una placa de Petri estéril, un volumen de no más de 2ml de una suspensión de determinada concentración de células (o esporas en el caso de hongos filamentosos) de forma de lograr un crecimiento confluente en la placa. Se colocan entonces aproximadamente 15 ml de medio de cultivo fundido, moviendo suavemente la placa de forma de incorporar el inóculo en el medio. Se deja solidificar el

medio y se siembra el antagonista en la superficie de la placa en forma puntual o de estría. Se incuba y se determina si hubo inhibición del crecimiento del patógeno alrededor de la colonias del antagonista (Figura 5)

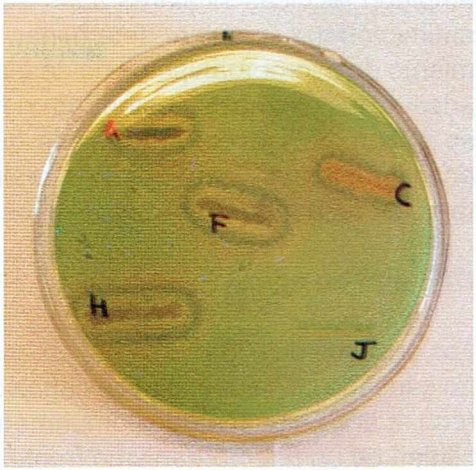


Figura 5. Ensayo de producción de toxinas killer. Las levaduras productoras de toxina se sembraron en superficie en forma de estría, la levadura blanco (sensible) se incorporó al medio. La levadura incorporada creció en forma confluente, salvo alrededor de las levaduras productoras de micocinas.

Para el estudio de producción de sustancias antimicrobianas volátiles, se deben enfrentar antagonista y patógeno en medios separados, pero de forma que las sustancias volátiles emitidas por el antagonista lleguen directamente al medio donde está creciendo el patógeno. De esta forma, se siembra en la superficie de medio de cultivo contenido en la base de placas de Petri, el antagonista y el patógeno, cada uno en una placa diferente. Luego se quitan las tapas de las dos placas y se enfrentan las dos bases que contienen el medio inoculado. La unión de ambas bases se sella con Parafilm. Se incuban las placas enfrentadas y se determina si hay inhibición del crecimiento del patógeno comparado con un control sin antagonista. La Figura 6 muestra un ensayo de inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* por metabolitos volátiles de hongos del género *Trichoderma*. Nótese que el diámetro de la colonia del control es mucho mayor que la del patógeno enfrentado al antagonista

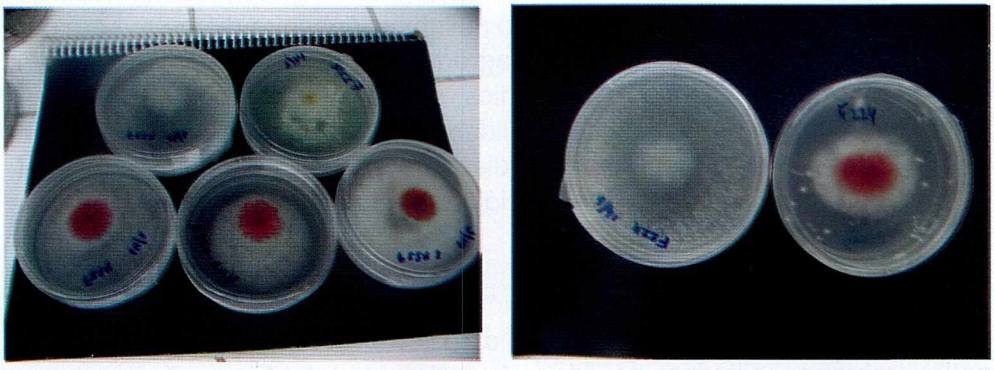


Figura 6. Ensayo de producción de sustancias antifúngicas volátiles. En las 5 placas de la derecha se observan cultivos de *Trichoderma* spp.(sembrados en la parte de abajo de la placa) inhibiendo a *Fusarium graminearum* (sembrado en la parte superior).En la foto de la izquierda se ve el tamaño de la colonia de *Fusarium graminearum* sembrado en una placa control

Actividad antimicrobiana de soluciones

Para determinar la actividad antimicrobiana de metabolitos en solución se emplean técnicas similares a las anteriores. Las soluciones cuya actividad antimicrobana se quiere determinar, deben ser estériles, para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados en el ensayo. Por lo tanto, previo al ensayo, las mismas se esterilizan generalmente por filtración. De esta forma se evitan tratamientos térmicos que pudieran afectar a los compuestos antimicrobianos. En general se realizan ensayos de difusión en agar pero también se podrían realizar ensayos en medio líquido.

Difusión en agar

Los ensayos de difusión se basan en la inhibición del crecimiento del patógeno causado por un antibiótico capaz de difundir en un medio de cultivo sólido (con agar). Es un método comúnmente utilizado para determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico.

A grandes rasgos, se prepara una placa de Petri conteniendo un medio de cultivo adecuado para el desarrollo del microorganismo que se desea inhibir. Luego se prepara un inóculo estandarizado de dicho microorganismo y se inocula el medio de cultivo hisopando la superficie entera de la placa. Se sumergen, entonces, discos de papel de filtro de tamaño estandarizado, en las soluciones cuya actividad antibiótica se pretende determinar y se colocan los mismos en la superficie del medio de cultivo inoculado, a una distancia de 1,5 cm entre sí y del borde de la placa. Luego se incuban las placas a temperatura adecuada durante 18-20 horas. Durante la incubación el antibiótico difunde desde el papel de filtro hacia toda la placa. A una determinada distancia del disco, ocurrirá una inhibición del crecimiento del microorganismo, visualizándose una zona o halo de inhibición, cuyo diámetro será proporcional a la cantidad de antibiótico agregado al disco de papel de filtro. En los laboratorios de Microbiología Clínica, se usa este método para realizar los antibiogramas (perfiles de sensibilidad a distintos antibióticos) de las cepas patógenas humanas, utilizando discos de papel adquiridos comercialmente que contienen una concentración estandarizada de los antibióticos a ensayar.

Se pueden realizar ensayos de difusión utilizando otros métodos de inoculación (siembra incorporada) y otro tipo de reservorio para los antimicrobianos (cilindros de vidrio, de metal, etc.). La Figura 7 muestra un ensayo de actividad antimicrobiana contra el hongo *Penicillium digitatum* (patógeno poscosecha de citrus), de filtrados obtenidos del cultivo en me-

dio líquido de cepas de *Bacillus* spp. El método de inoculación usado fue siembra incorporada y se utilizaron cilindros estériles de metal como reservorios para las soluciones a ensayar.

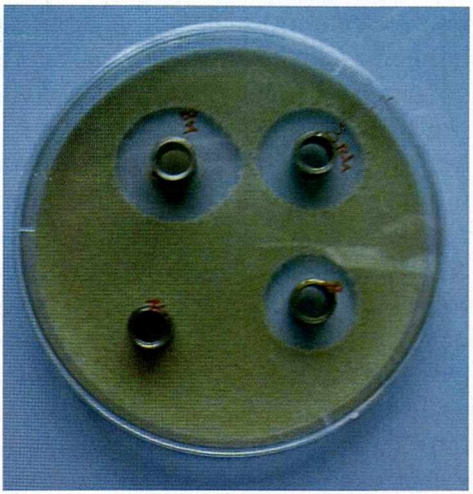


Figura7. Ensayo de actividad antimicrobiana de filtrados obtenidos de cultivos líquidos de cepas antagonistas de *Bacillus* spp.

La reproducibilidad de este método está afectada por varios factores como la constante de difusión del agente, la velocidad de crecimiento del microorganismo patógeno y el espesor del medio de cultivo. Es importante tener en cuenta que es imposible comparar la actividad de dos compuestos diferentes por medida de la inhibición del crecimiento de un patógeno por este ensayo. Un antibiótico con mayor capacidad de difusión puede provocar halos de inhibición mayores a pesar de tener menor actividad.

Ensayo en medio líquido

El ensayo en medio líquido permite determinar si la adición de la solución a ensayar inhibe el crecimiento del microorganismo blanco. Se preparan tubos conteniendo un medio líquido nutriente y se agrega la solución a ensayar. Los tubos son inoculados con una suspensión estandarizada del m.o. en estudio e incubados a la temperatura adecuada durante un período predeterminado. Luego de la incubación los tubos son examinados en base a la aparición o no de evidencia macroscópica de crecimiento visualizada por la presencia de turbidez, velo o sedimento. Este tipo de ensayo está afectado por varios factores como son la naturaleza del m.o. utilizado, el tamaño del inóculo, la composición del caldo de cultivo, el tiempo y condiciones de incubación. Por lo tanto para comparar diferentes antibióticos con el fin de determinar cual es el más efectivo contra un determinado m.o. o para evaluar la susceptibilidad de varios m.o. ante a un determinado antibiótico, es indispensable estandarizar estrictamente las condiciones del ensayo.

Bioautografía

Mediante este método se puede determinar cuál de los compuestos de una solución separados por una cromatografía en capa fina es el responsable de la actividad antimicrobiana. Luego de realizada la cromatografía se coloca la

placa cromatográfica en la base de una placa de Petri estéril. Se vierte sobre ella un volumen determinado de medio de cultivo fundido y termostatizado, el cual ha sido previamente inoculado con una cantidad predeterminada de células, esporas o conidias, del patógeno que se busca inhibir. La placa cromatográfica queda entonces cubierta por una capa de medio de cultivo inoculado. La placa de Petri se tapa y se incuba a temperatura y tiempo predeterminado. El resultado se puede observar en la Figura 8 . El ensayo mostrado por figura corresponde a la cromatografía de filtrados obtenidos del medio de cultivo en fase estacionaria de cepas de *Bacillus spp*. capaces de inhibir al *Penicillium expansum* (patógeno poscosecha de manzanas) en cultivo dual. Se aprecia un crecimiento confluente del patógeno (*Penicillium expansum*), salvo en las zonas donde se encuentra el compuesto antimicrobiano.

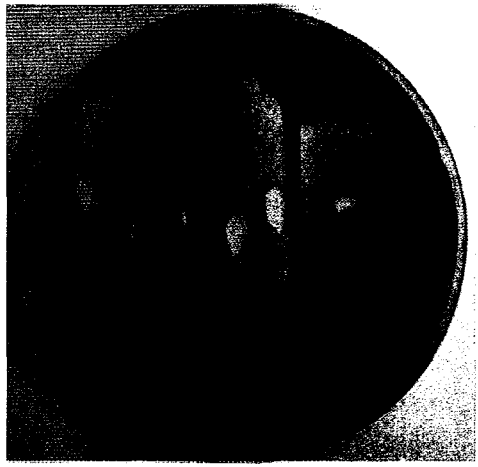


Figura 8. Bioautografía de filtrados de cultivo de cepas antagonistas de *Bacillus* spp.. Las zonas blancas indican la presencia de un compuesto antifúngico.

4.2.1.2.- Toxinas killer

Algunas levaduras son capaces de secretar toxinas de naturaleza proteica, letales para otras levaduras sensibles pertenecientes a la misma o diferente especie. A este tipo de toxinas se les conoce como micocinas o toxinas killer. A su vez, las levaduras productoras de estas toxinas son inmunes a las mismas. Esta propiedad fue descubierta en la especie *Saccharomyces cerevisiae*, y ha sido muy utilizada en la industria de bebidas fermentadas. Es así que se seleccionan como inóculo para estas fermentaciones levaduras productoras de toxinas killer de forma de evitar fermentaciones no deseadas. En la actualidad se conocen levaduras pertenecientes a otros géneros capaces de producir este tipo de toxinas, por ejemplo *Kluyveromyces* (Ciani y Fatichenti, 2001), *Pichia* (Santos y Marquina 2004), *Schwanniomyces* (Chen *et al.*, 2000) y *Williopsis* (Walker *et al*., 1995).

A su vez, se han encontrado levaduras capaces de producir toxinas killer con actividad contra hongos filamentosos fitopatógenos. Walker y colaboradores (1995) fueron pioneros en este tipo de trabajo. Estudiaron la capacidad de cepas killer de distintas especies de levaduras de controlar diferentes hongos fitopatógenos tales como *Botrytis cinerea, Rhizoctonia solanii, Fusarium*

equiseti y *Phytophtora infestans*. Santos y Marquina (2004) han descrito el rol de una toxina killer producida por una cepa de *Pichia membranifaciens* en el control del crecimiento de *Botrytis cinera in vitro* y sobre plantas de vid. Weiler y Schmitt por su parte demuestran la acción *in vitro* de la zygocina, una toxina killer producida por una cepa de levadura de la especie *Zygosaccharomyces bailii* contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum graminicola*.

La base genética para la expresión del fenotipo killer es diversa. En algunos casos la información para la producción de la toxina se encuentra codificada en virus de ARN doble cadena de localización citoplasmática como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces bailii*, en otros casos la información está en plásmidos lineales de ADN como en el caso de *Kluyveromyces lactis* (Schmitt y Breinig, 2002). Sin embargo, en levaduras como *Williopsis californica* y *Hasenula mrakii* la localización de la información está a nivel cromosomal. En general la acción de estas toxinas killer se da a nivel de la pared del patógeno fúngico por lo cual no tienen acción sobre bacterias ya que las mismas tienen otro tipo de pared.

4.2.1.3.- Enzimas capaces de degradar paredes de hongos patógenos

Los microorganismos pertenecientes al Reino Hongos se caracterizan por presentar pared celular formada por quitina, glucanos y proteínas. Algunos hongos, como por ejemplo los pertenecientes al Phylum *Zygomycota*, también contienen quitosano en la pared celular. El 80-90% de dicha pared está formada por polisacáridos y tiene una estructura multilaminar. Estas láminas formadas por polímeros fibrosos se encuentran embebidas en una matriz de polímeros tipo gel. La Tabla 1 muestra los tipos de polímeros presentes en la pared de los diferentes grupos taxonómicos dentro del Reino Hongos. Todos los grupos pertenecientes a este Reino, presentan quitina y distintos tipos de glucanos en la pared. En la Tabla 1 se muestra además, resaltado en color rojo, el grupo *Oomycota*. Este grupo, al cual pertenecen algunos fitopatógenos (por ej., *Pythium* spp. y *Phytophtora* spp.), reúne microorganismos de crecimiento filamentoso que no pertenecen al Reino Hongos. Anteriormente estos organismos eran clasificados como hongos, pero estudios filogenéticos han determinado que ya no pertenezcan más a este Reino. Una de las características fenotípicas que los diferencia es la presencia de celulosa y no de quitina en la pared celular.

La pared celular es de vital importancia para los hongos. Por esta razón, la producción de enzimas capaces de hidrolizar los compuestos que forman la

pared celular, es una estrategia factible para controlar el desarrollo de hongos fitopatógenos.

Pared fúngica

Grupo taxonómico	Polímeros fibrosos	Polímeros tipo gel
Basidiomycota	quitina β(1-3)β(1-6)glucano	Xilomanoproteína α(1-3)glucano
Ascomycota	Quitina β(1-3)β(1-6)glucano	Galactomanoproteína α(1-3)glucano
Zygomycota	Quitina Quitosano	Ác. Poliglucurónico Glucuromanoproteína Polifosfatos
Chytridiomycota	Quitina Glucano	Glucano
Oomycota	β(1-3)β(1-6)glucano celulosa	glucano

Tabla 1.- Composición de la pared de los diferentes grupos de hongos. Modificada de Deacon (1997).

Se han descrito numerosos ejemplos de microorganismos productores de quitinasas, glucanasas y proteasas capaces de hidrolizar las paredes celulares de hongos fitopatógenos. Muchas veces se ha visto la producción asociada al micoparasitismo, pero existen casos en que la producción se da aún en ausencia de una manifiesta interacción directa entre patógeno y antagonista. Por ejemplo, Castoria y colaboradores (2001) describieron una cepa de *Aureobasidium pullulans* (LS-30) capaz de controlar los daños postcosecha causados por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzana y por *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger* en uvas de mesa. En su trabajo demostraron que dicha cepa producía quitinasa y β 1-3 glucanasa *in vitro* y sobre las heridas de la fruta, sin interactuar físicamente con los patógenos, por lo cual postularon que el micoparasitismo no estaba involucrado en esa interacción. Por su parte, Jijakli y Lepoivre (1998) encontraron que la adición de paredes celulares de *Botrytis cinerea* a una suspensión de *Pichia anomala* (levadura antagonista) potenciaba la producción de β 1-3 glucanasa por este antagonista y aumentaba la protección contra *Botrytis* en heridas de manzana. De esta manera se demostraba que la acción de esta enzima estaba implicada en el mecanismo de biocontrol.

También se han encontrado bacterias involucradas en el biocontrol de patógenos fúngicos, capaces de producir estas enzimas. Por ejemplo, se ha

descrito que la quitinasa producida por *Serratia plymuthica* C48 inhibía la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* (Frakowski *et al.*, 2001) y que la capacidad de producir quitinasa extracelular es fundamental para explicar la actividad biocontroladora de una cepa de *Serratia marcescens* contra *Sclerotium rolfsii* (Ordentlich *et al.*, 1987). A su vez se han descrito enzimas quitinolíticas producidas por cepas de *Bacillus cereus* y *Pantoea agglomerans*, implicadas en el control biológico de *Rhizoctonia* en algodón (Pleban *et al.*, 1997). Whipps (2001) describe que el rol de dichas enzimas se confirma ya que mutantes de *Pantoea agglomerans* deficientes en la producción de la misma, resultaron incapaces de proteger a los plantines de algodón del ataque del patógeno.

También se han descrito hongos del género *Trichoderma* y *Gliocladium* como productores de este tipo de enzimas. Numerosos trabajos demuestran que hongos de estos géneros son capaces de producir quitinasas, glucanasas y proteasas, cuya actividad antifúngica se ve potenciada por la producción de sustancias antibióticas (Schirmböck *et al.*, 1994). Se ha demostrado que estas enzimas son inducibles en presencia de los sustratos de cada enzima y que además pueden ser inducidas en presencia de paredes fúngicas como única fuente de carbono y energía. A su vez, la producción de las mismas es reprimida en presencia de glucosa. Por eso para determinar si un microorganismo es capaz de producir enzimas capaces de degradar paredes fúngicas, se cultiva el microorganismo en un medio que tenga paredes del patógeno a controlar como única fuente de carbono (Rey, 1998) y se estudian los niveles enzimáticos a lo largo de la fase de crecimiento.

Se debe considerar que existen ciertos patógenos vegetales que anteriormente eran clasificados como hongos pero actualmente pertenecen al reino Chromista. Entre ellos se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Phytophtora* y *Pythium*. Una característica de éstos es que no presentan quitina en su pared, sino celulosa. En este caso la búsqueda de biocontroladores se debe dirigir hacia aquellos microorganismos productores de celulasas y no de quitinasas.

4.2.2.- Reducción de la virulencia del patógeno

Se describen dos métodos por los cuales microorganismos antagonistas pueden reducir la virulencia de los patógenos:

a) Producción de enzimas capaces de degradar señales de quórum que gobiernan la expresión de los factores de virulencia del patógeno
b) Transmisión de hipovirulencia a cepas virulentas

4.2.2.1.- Enzimas degradadoras de sensores de quórum (quórum sensing)

Se denomina quórum sensing a la regulación de la expresión génica de un organismo en respuesta a las fluctuaciones en la densidad de la población. Las bacterias capaces de sensar el quórum producen y liberan señales químicas llamados autoinductores cuya concentración en el medio aumenta cuando aumenta la densidad celular. La detección por parte de las bacterias productoras, de un umbral mínimo del autoinductor hace que los genes gobernados por señales de quórum se expresen. En resumen, las células producen y detectan "moléculas señal" mediante las cuales se dispara una acción concertada de toda la población. Esta acción comienza sólo cuando se alcanza una concentración crítica de la "molécula señal" (que corresponde a una concentración dada de células).

Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas usan señales de quórum para regular la expresión de diversas actividades fisiológicas, tales como simbiosis, producción de antibióticos, producción de sideróforos, producción de factores de virulencia. En general las bacterias Gram negativas utilizan N-acyl homoserina lactonas como autoinductores mientras que en el caso de las Gram positivas los autoinductotores son oligopéptidos (Miller y Bassler, 2001).

En el caso de la bacteria *Erwinia carotovora* se ha demostrado que la producción de factores de virulencia tales como enzimas que degradan paredes vegetales, está mediada por sensores de quórum (Pirhonen *et al.*, 1993; Andersson *et al.*, 2000). La dependencia de las señales de quórum para la expresión de factores de virulencia también se ha demostrado en otras bacterias fitopatógenas tales como *Agrobacterium tumefaciens* (Fuqua y Winans, 1994), *Ralstonia solanacearum* (Flavier *et al.*, 1997), y *Pantoea stewartii* (Bek von Bodman *et al.*, 1995)

Recientemente se ha demostrado que existen bacterias biocontroladoras capaces de degradar las moléculas autoniductoras, bloqueando de esa forma la expresión de genes mediada por sensores de quórum. De esta forma se puede impedir la expresión de factores de virulencia de los patógenos que controlan. Ya que la mayoría de los patógenos bacterianos depende de estos autoinductores para la expresión de factores de virulencia claves en la infección, el descubrimiento de estos antagonistas tiene gran potencial biocontrolador aún en estrategias curativas es decir, después de establecida la infección.

Molina y colaboradores (2003) describen en su trabajo la cepa de *Bacillus sp.* A24 productora de una enzima capaz de degradar las N-acyl hoserina lactonas que actúan como autoinductores en la expresión de factores de virulencia de *Erwinia carotovora* en papa. Demuestran además, que la información para la producción de la enzima está codificada en un plásmido. Esos investigadores lograron además, transferir ese plásmido a una cepa de *Pseudomonas fluorescens* no controladora, la cual logra controlar la enfermedad luego de la transferencia. Esta cepa de *Pseudomonas fluorescens* transformada logra también controlar en tomate la agalla de corona producida por *Agrobacterium tumefaciens*.

La investigación acerca de sensores de quórum en hongos está comenzando. Se ha determinado que la levadura *Candida albicans* utiliza farnesol como autoinductor y que el mismo está involucrado en la formación de pseudomicelio y biofilms (Nickerson *et al.*, 2006). Aún no hay datos sobre sensores de quórum en hongos filamentosos

4.2.2.2.- Transmisión de hipovirulencia a cepas virulentas

Se denomina hipovirulencia a la reducción en la capacidad para infectar, colonizar, matar y/o reproducirse sobre determinado hospedero que presentan determinados aislamientos dentro de una población de patógenos (Boland, 2004). Se debe, en general, a la reducción o pérdida de expresión de factores de patogenicidad o virulencia del patógeno, por ejemplo una disminución en la producción de enzimas capaces de degradar paredes celulares del hospedero vegetal. Este fenómeno a menudo se ha visto asociado la presencia de micovirus de ARN de doble cadena. Sin embargo existen casos de hipovirulencia asociados a mutaciones nucleares, mutaciones mitocondriales o presencia de plásmidos (Monteiro-Vitorello *et al.*, 1995, Monteiro-Vitorello *et al.*, 2000). Por otra parte, la presencia de micovirus no necesariamente implica la aparición de un fenotipo hipovirulento. En *Monilinia fruticola*, se han detectado ARN de doble cadena, de localización citoplasmática, de diferentes tamaños. Tsai y colaboradores (2004) comprobaron la presencia de estos elementos en 36 de 49 aislamientos provenientes de duraznos de Nueva Zelanda. Sin embargo la presencia de estos micovirus no estaba asociado a fenómenos de hipovirulencia.

Se ha demostrado que es posible utilizar cepas hipovirulentas de un patógeno para controlar enfermedades causadas por cepas virulentas de la misma especie. En otras palabras, es posible utilizar una cepa de patógeno con virulencia disminuida como agente de biocontrol. Para obtener un biocontrol efectivo, las cepas hipovirulentas deben conservar su capacidad de coloni-

zar el sitio de infección pero sin causar daño a la planta hospedera. A su vez deben ser capaces de transferir efectivamente a cepas virulentas que se encuentren en el mismo habitat, los elementos genéticos que confieren la hipovirulencia.

La aparición de este tipo de cepas hipovirulentas y su vinculación con el control biológico de enfermedades vegetales, ha sido estudiado en varias especies de patógenos fúngicos tales como *Cryphonectria parasitica, Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia homoeocarpa* y *Botrytis cinerea*.

El fenómeno se descubrió en 1951, en el hongo *Cryphonectria parasitica*, agente causal del cancro del castaño. Mientras que la enfermedad se extendía por Europa y EEUU, los castaños del norte de Italia parecían recuperase. Los aislamientos obtenidos de estos árboles, presentaban una morfología anormal en cultivo y a la vez eran hipovirulentas, es decir los síntomas desarrollados en árboles infectados artificialmente, eran de baja severidad. Desde entonces, se han encontrado cepas hipovirulentas en otras localidades de Europa y en áreas donde se introdujeron cepas hipovirulentas se lograron recuperara plantaciones de castaño afectadas (Bisseger *et al.*, 1997).

Desde hace tiempo se conoce que la causa de la hipovirulencia en esta especie fúngica, es la presencia de virus pertenecientes al género *Hypovirus*. Este virus es de localización citoplasmática y se trasmite cuando ocurre anastomosis de las hifas, es decir puede ocurrir en cepas que pertenezcan al mismo grupo de compatibilidad vegetativa. No todas las cepas de *Cryphonectria parasitica* pueden anastomosarse e intercambiar contenido citoplasmático, lo cual limita en parte, la trasmisión del virus. Se ha demostrado que la presencia de este virus inhibe la producción de ciertas enzimas vinculadas a la virulencia en el hongo tales como la celulasa (Wang y Nuss, 1995).

También existen trabajos que demuestran la existencia de cepas hipovirulentas en hongos del género *Sclerotinia*. Boland (2004) menciona ejemplos de casos en *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *S. homoeocarpa*. En el caso de *S. sclerotiorum*, se pudo asociar el fenómeno de hipovirluencia a la presencia de ARN de doble cadena no encapsidado perteneciente al género *Hypovirus*. En el caso de *S. homoeocarpa* se detectó la presencia de virus del género *Mitovirus* como los presentes en hongos del género *Ophiostoma*. Se trata de ARN de doble cadena de localización mitocondrial. Los mecanismos por los cuales la presencia de estos micovirus causan hipovirulencia en cepas de estas especies no han sido elucidados aún. Según Zhou y Boland (1998)

cepas hipovirulentas de S. *sclerotiorum* producen menores cantidades de ácido oxálico que las cepas virulentas. En el caso de *S. minor*, Savard y colaboradores (2003) describen la producción de un compuesto denominado sclerominol por parte de cepas hipovirulentas del patógeno, el cual no es producido por cepas virulentas. El rol de este compuesto en la fisiología de las cepas hipovirulentas no se ha demostrado, sin embargo se ha determinado que dicho compuesto también es producido por cepas hipovirulentas de S. *sclerotiorum* (Boland, 2004).

Los estudios de cepas hipovirulentas de género *Sclerotinia* como controladores biológicos, se han centrado en las especies *S. minor* y *S. homoeocarpa*. Esto se debe a que existen numerosos grupos de compatibilidad dentro de la especie *S. sclerotiorum*, lo cual dificulta el uso de cepas hipovirulentas como controladores biológicos. Se debe recordar que los micovirus causantes de la hipovirulencia sólo se tramiten a por anastomosis de hifas a cepas compatibles.

En el caso de *Sclerotinia minor*, Boland (2004) menciona trabajos sobre lechuga en los cuales la inoculación con cepas hipovirulentas del patógeno, produjo una reducción en la severidad de la enfermedad en más del 50% y una reducción de hasta un 90% en el número de esclerotos producidos. También se lograron buenos resultados utilizando cepas hipovirulentas de *S. homoeocarpa* en condiciones controladas y a campo (Zhou y Boland, 1997). Una de las cepas hipovirulentas utilizadas logró reducir en hasta un 90% la incidencia de las manchas (dollar spot) causadas por cepas virulentas del patógeno sobre césped. Estos resultados demuestran que no todas las cepas hipovirulentas tienen la misma capacidad biocontroladora, por lo cual la selección del agente de biocontrol debe siempre incluir ensayos en las condiciones de uso.

Castro y colaboradores (2003) demostraron la existencia de cepas hipovirulentas de *Botrytis cinerea* que contenían en su citoplasma micovirus isométricos de 33 nm, de cubierta proteica y cuyo genoma consistía en ARN de doble cadena de 6.8 kb. Comprobaron que dichas cepas eran hipovirulentas, producían menor cantidad de la enzima lacasa y tenían una tasa de esporulación menor que las cepas virulentas. Aún no se han realizado ensayos de biocontrol utilizando estas cepas.

4.2.3.- Competencia

Es un modo de acción indirecto, donde no hay acción directa del antagonista sobre el patógeno. En este caso ambos compiten; imponiéndose uno de ellos

por ser capaz de procurarse de manera más rápida y eficiente los nutrientes y/o el sitio necesario para desarrollarse. La competencia hace referencia al desigual comportamiento de dos o más microorganismos ante un mismo requerimiento, cuando la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para otros. Un factor esencial para que haya competencia es la escasez de algún elemento esencial para el desarrollo de alguno de los microorganismos. Si hay exceso no hay competencia.

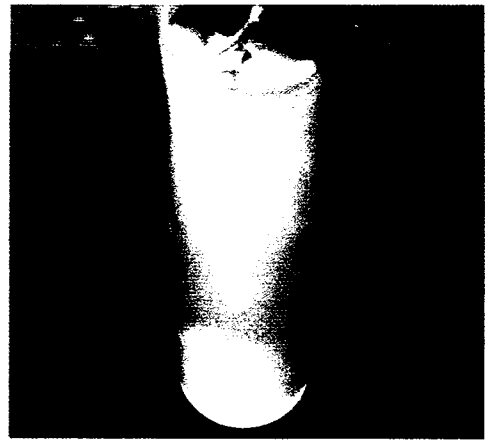


Figura 9. Ensayo de bacterizacion de raices. Se observa el crecimiento bacteriano en forma de velo alrededor de la raiz.

Droby y Chalutz (1994) mencionan que la competencia se podría entender como una demanda simultánea de los recursos por dos o más poblaciones microbianas en un determinado microambiente. Por lo tanto, para que un antagonista sea un efectivo competidor debe reunir las siguientes características: ser capaz de adaptarse mejor que el patógeno al ambiente en donde se dará la competencia, lograr una rápida colonización del sitio de acción, y poseer una alta capacidad de utilizar nutrientes a bajas concentraciones. Se debe tener en cuenta que para que un antagonista sea efectivo competidor el número de células del mismo debe alcanzar un nivel crítico activo antes de la entrada del patógeno y por supuesto, la llegada del antagonista debe ser previa o en conjunto a la del patógeno. Queda claramente establecido el carácter preventivo y no curativo de este tipo de control.

La competencia entre microorganismos puede darse por diferentes factores como ser: espacio físico, luz, oxígeno o nutrientes. Esta última ha sido la más estudiada.

4.2.3.1- Competencia en la rizosfera

La competencia por nutrientes y por un nicho específico es uno de los mecanismos fundamentales por el cual las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal protegen a las raíces de los fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005). Se plantea que a lo largo de las raíces se pueden encontrar varios nichos ricos en determinados nutrientes que atraen a diversos microorganismos entre ellos a los fitopatógenos. Por ello la capacidad de colonización de las raíces y de utilización de los exudados radiculares es fundamental para que un

determinado microorganismo sea capaz de proteger la raíz del ataque de fitopatógenos. Este debería ser un criterio importante a la hora de seleccionar microorganismos biocontroladores de patógenos de raíz. Para ello se pueden realizar ensayos de colonización *in vitro*. Los mismos consisten en poner en contacto semillas de la planta cuya raíz se pretende colonizar, con una suspensión del microorganismo a ensayar. Luego se colocan las semillas tratadas en un tubo conteniendo agar al 0.8%, de forma de tener un soporte semisólido para las semillas, que permita el crecimiento de la raíz dentro del medio (Figura 9). Si el microorganismo es capaz de colonizar las raíces se podrá ver el crecimiento microbiano como una turbidez o halo alrededor de las mismas.

4.2.3.2- Competencia en poscosecha

También en el caso de patógenos poscosecha este tipo de mecanismo de biocontrol juega un rol muy importante. En especial, para microorganismos que causan enfermedad a partir de la colonización de heridas o aberturas naturales del producto cosechado. En ese caso, para la aparición de enfermedad es necesario la germinación de los elementos de dispersión que han llegado a la herida y posterior colonización de misma, lo cual requiere del consumo de nutrientes por parte de los patógenos. De esta forma, una de las estrategias para impedir la aparición de enfermedad es controlar el desarrollo de los mencionados patógenos mediante la colonización previa de los posibles sitios invadidos, por microorganismos antagonistas. Estos antagonistas deben ser capaces de agotar el espacio o los nutrientes esenciales para el desarrollo del patógeno.

Existen numerosos ejemplos de biocontrol de patógenos colonizadores de heridas durante el almacenamiento de productos cosechados mediante competencia.

Arras *et al* (1998) demostraron que una cepa de *Pichia guillermondi* era capaz de colonizar efectivamente heridas realizadas en frutas cítircas y de esa forma protegerlas contra el ataque de *Penicillium italicum*. Roberts (1990) informó sobre cepas de *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus flavus* capaces de colonizar heridas de manzanas y peras en condiciones ambientales y de cámara (0°C), protegiéndolas contra el ataque de patógenos poscosecha. En ambos casos se planteó que la competencia por espacio estaría involucrada en el mecanismo de acción de los antagonistas.

En la Figura 10 se aprecia la colonización y permanencia en heridas de manzana, de levaduras antagonistas capaces de inhibir el desarrollo del moho

azul causado por *Penicillium expansum*. Para obtener esta gráfica se cuentan las levaduras vivas presentes en heridas de manzanas almacenadas entre 0 y 1°C a lo largo del tiempo, durante 3 meses. Para realizar el ensayo se realizan heridas artificiales en la zona ecuatorial de manzanas sanas recién cosechadas. Se inoculan dichas heridas con una suspensión del antagonista a ensayar y se almacenan las frutas en condiciones de almacenamiento comercial. Cada cierto intervalo de tiempo se extraen de la fruta las heridas inoculas y se determina la cantidad de antagonistas vivos presentes en cada herida, mediante un recuento en placa. Se puede apreciar en la gráfica que el número de levaduras vivas en cada herida es elevado y se mantienen el orden de 10^5 microorganismos por herida, a lo largo del tiempo, por lo que se presume que las heridas estarían protegidas por lo menos tres meses, ante una eventual infección con el patógeno (Garmendia *et al.*, 2005).

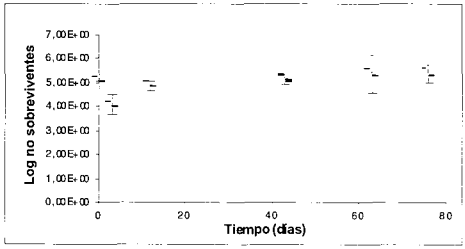


Figura 10. Curva de crecimiento de la levadura *Cystofilobasidium infirmominiatum* en heridas de manzana a 1°C. La levadura es un efectivo antagonista de *Penicillium expansum* en poscosecha de manzanas.

4.2.3.3- Competencia por nutrientes: fuentes de carbono y nitrógeno

Para demostrar la competencia por nutrientes en determinado hábitat, se realiza el ensayo de biocontrol en abundancia y en escasez del nutriente limitante. Si el biocontrol se observa en condiciones de escasez de dicho nutriente y no es apreciable cuando el nutriente está en abundancia se puede suponer que el agente biocontrolador compite efectivamente con el patógeno por el reactivo limitante. La Figura 11 muestra el porcentaje de biocontrol alcanzado por la levadura biocontroladora *Candida ciferrii* cuando se inocula en heridas de manzana junto con el hongo patógeno *Penicillium exansum*. Se puede ver que cuando el patógeno es inoculado junto con jugo de manzana, la protección se pierde. Esto hace suponer que cuando se agrega jugo de manzana, algún nutriente limitante deja de estar en escasez en las heridas, por lo cual el patógeno puede germinar a pesar de que la herida haya sido colonizada por el antagonista. Lo mismo ocurre cuando el patógeno se inocula junto con una solución de nitrato, el cual puede ser

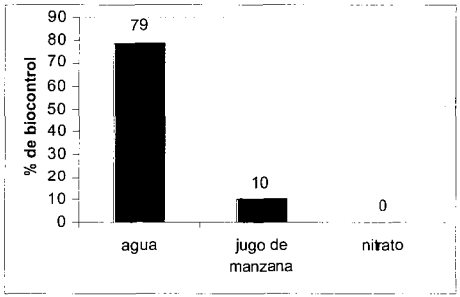


Figura 11. Porcentaje de biocontrol de *P. expansum* en manzanas utilizando la levadura *Candida ciferrii* como biocontrolador, cuando el patógeno se inocula en ausencia (agua) o presencia de diferentes nutrientes (jugo de manzana, nitrato)

utilizado como fuente de nitrógeno por el patógeno pero no por el antagonista. En ese caso, se ve nuevamente que el biocontrol desaparece, y dado que se había demostrado anteriormente que el nitrato, en la concentración utilizada, no inhibía el crecimiento del antagonista, se supone que el nitrógeno sería el nutriente limitante en esta interacción (Vero *et al.*, 2002)

4.2.3.4- Competencia por nutrientes: hierro

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento microbiano. En suelos en presencia de oxígeno y a pH neutro el hierro se encuentra como ión férrico en forma insoluble de forma poco accesible para los microorganismos. En general el hierro disponible en suelos y sobre la superficie de las plantas es escaso (Compant *et al.*, 2005). En condiciones de baja disponibilidad de hierro ciertos microorganismos pueden producir unas moléculas de bajo peso molecular, denominadas sideróforos capaces de quelar el ión férrico y transportarlo al interior celular. Los microorganismos productores de sideróforos tienen a su vez receptores de membrana y sistemas de transporte específicos, que reconocen el complejo sideróforo-hierro formado y lo ingresan de esta forma, al interior celular.

Algunos microorganismos son capaces de reconocer e incorporar sideróforos producidos por otros microorganismos, con lo cual logran una ventaja adicional en la lucha por el hierro. Por ejemplo, se ha demostrado que bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de incorporar complejos hierro-sideróforos, que contienen los sideróforos enterobactina y aerobactina, producidos por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Loper y Henkels, 1999)

Los distintos sideróforos tienen diferente afinidad por el hierro. Dicha afinidad depende del microorganismo en cuestión y en general los sideróforos de origen bacteriano tienen mayor afinidad por el hierro que los de origen fúngico. Es por ello que en situaciones de escasez de hierro ciertas bacterias son capaces de inhibir el desarrollo de patógenos fúngicos. En estos casos el biocontrol deja de ser efectivo si se adiciona hierro en el sitio de competencia.

A diferencia de los fitopatógenos, las plantas en general, no se ven afectadas por la escasez localizada de hierro a causa de los sideróforos microbianos. Las plantas requieren menores concentraciones de hierro y además en algunos casos tienen la capacidad de incorporar los complejos sideróforos-hierro de origen microbiano.

Existen numerosos ejemplos de biocontrol mediado por sideróforos producidos por bacterias del género *Pseudomonas*, las cuales logran controlar en

condiciones de escasez de hierro el desarrollo de determinados hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Manwar y colaboradores (2004) demostraron que la producción del sideróforo pioverdina estaba implicada en el biocontrol de varios hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, and *Sclerotium rolfsii*. Whipps (2001) también hace referencia al rol de este sideróforo en el biocontrol de fitopatógenos como *Pythium* spp. y *Fusarium* spp.. Menciona que la importancia del mismo en el control de hongos se ha demostrado mediante el uso de pioverdina purificada o comprobando la falta de control al utilizar bacterias cuya capacidad de sintetizar pioverdina hubiera sido eliminada por mutaciones. Se ha demostrado además que la pioverdina y el salicilato, que también actúa como sideróforo, pueden actuar a su vez como inductores de respuestas de resistencia en la planta (Leeman *et al.*, 1996). Ambrosi y colaboradores (2000) demostraron el importante rol del sideróforo pseudobactina en en biocontrol del patógeno bacteriano *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora,* por acción de la cepa *Pseudomonas* B10CA1. Comprobaron que la bacteria patógena era capaz de producir un sideróforo llamado chrysobactina, cuya afinidad por el hierro resultó menor que la de la pseudobactina, por lo cual en un ambiente con baja concentración de hierro la cepa de *Pseudomonas* B10CA1 tenía ventaja en la competencia.

En nuestros trabajos de control biológico en poscosecha hemos demostrado que una de las levaduras capaces de controlar el moho gris causado por *Botrytis cinerea* en manzanas, produce sideróforos de mayor afinidad por el hierro que los producidos por el patógeno. La Figura 12 muestra cultivos duales de la levadura antagonista y el patógeno (*Botrytis cinerea*) en medio de cultivo con diferentes concentraciones de hierro. Se puede apreciar que a concentraciones bajas del metal, ocurre inhibición del crecimiento del patógeno, la cual no se observa en medios con abundancia de hierro.

Figura 12. Cultivos duales de la levadura biocontroladora *Aureobasidium pullulans* y el patógeno *Botrytis cinerea*, en medios de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de hierro. Se puede observar que la inhibición del patógeno se da cuando al concentración de hierro es baja, y la misma se va perdiendo a medida que aumenta la concentración del metal.

4.2.4- Micoparasitismo

Se denomina micoparasitismo a la capacidad de un organismo de degradar y asimilar hongos. El organismo micoparásito debe ser capaz de colonizar

un hongo vivo, degradar sus paredes celulares, asimilar y nutrirse a partir del contenido celular del mismo.

Este mecanismo es una de las estrategias utilizadas por hongos biocontroladores tales como los pertenecientes a los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium* (Figura 13). Existen numerosos trabajos demostrando la actividad micoparásita de cepas pertenecientes a estos géneros, sobre variados hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Lu y colaboradores (2004) demostraron, mediante el uso de proteína verde fluorescente, el micoparasitismo de una cepa de *Trichoderma atroviride* sobre *Pythium ultimum* en cocultivo y sobre semillas de pepino. A su vez, Zeilinger y colaboradores (1999) utilizaron el mismo método para determinar el rol de la qutinasa en el micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizoctonia solani*. Lo y colaboradores (1998) mediante observaciones microscópicas también demostraron el rol del micoparasitismo en el control de *Rhizoctonia solani* en césped por parte de *Trichoderma harzianum*. A su vez, Harman y Björkman (1998), afirman que el micoparsitismo es uno de los mecanismos involucrados en el biocontrol ejercido por *Trichoderma* spp. o *Gliocladium* spp. sobre *Botrytis cinerea* en partes aéreas de diversos cultivos, tales como frutillas.

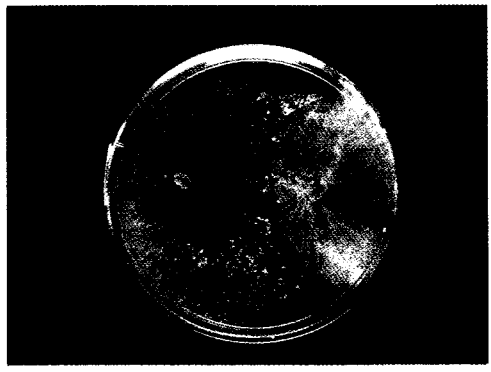


Figura 13. Cultivo dual de *Trichoderma atroviride* y *Fusarium graminearum*. Se observa el sobrecrecimiento de la de *Trichoderma* sobre el micelio de *Fusarium*, lo cual hace suponer un micoparasitismo

Sin embargo el micoparsitismo no es un mecanismo de acción exclusivo de los hongos filamentosos. Wisniewski et al. (1991), demostraron que existía una fuerte unión de la levadura antagonista *Pichia guillermondii* a hifas del patógeno *Botrytis cinerea*. Mediante microscopía electrónica de barrido, los autores pudieron observar la ruptura de la pared celular del patógeno en las zonas en las que las células del antagonista se habían unido previamente. El- Gaouth y colaboradores (1998) realizaron trabajos utilizando co-cultivos de la levadura antagonista *Candida saitoana* y el hongo patógeno *Botrytis cinerea*. En esos experimentos también se pudieron observar las levaduras asociadas al micelio del hongo, cuyas hifas mostraban daños en las paredes y degenaración del citoplasma.

A su vez, los trabajos de De Boer y colaboradores (2001 y 2004) han demostrado la existencia de bacterias micófagas, definidas como bacterias capaces de vivir y crecer a expensas de hifas fúngicas vivas. Dichas bacterias

pertenecen a un nuevo género y especie y han sido nombradas como *Collimonas fungivorans*. Se demostró que las bacterias micófagas se fijan a las paredes y crecen a expensas de hifas vivas de tres hongos filamentosos: *Chaetomium globosum, Fusarium culmorum*, y *Mucor hiemalis*. Se comprobó que la población bacteriana aumentaba en presencia de hifas vivas de estos hongos, tanto en medio de cultivo mínimo como en arena inoculada con las cepas. Los autores afirman que existen diferencias entre este tipo de bacterias y las bacterias quitinolíticas descritas hasta el momento. En el caso de las *Collimonas fungivorans* se constató adhesión de las bacterias a las hifas, además se comprobó que estas bacterias sólo atacan hifas jóvenes. Las hifas maduras o ya vacías no sirven de alimento a estas bacterias.

Proceso de micoparasitismo

El proceso de micoparasitismo ha sido extensamente estudiado para el caso hongos micoparásitos. Se ha establecido que dicho proceso involucra las siguientes etapas: quimiotropismo, reconocimiento, unión y penetración al hongo hospedero con posterior asimilación del contenido celular.

El quimiotropismo se refiere al crecimiento del antagonista en dirección al patógeno, bajo el estímulo de algún compuesto químico. En estrecha relación con la etapa anterior, ocurre luego el reconocimiento entre hospedero y micoparásito la cual está mediada por interacciones del tipo lectina-carbohidrato, entre las paredes de ambos organismos. Las lectinas son proteínas con sitios de unión específicos para determinados carbohidratos. Por ejemplo se han encontrado lectinas en las paredes de patógenos como *Rhizoctonia solani* las cuales se unen específicamente a galactosa y fucosa presentes en las paredes celulares de *Trichoderma harzianum* (Elad *et al.*, 1983). Para demostrar el rol de las lectinas en la unión del micoparásito al hospedero, Inbar y Chet (1992) diseñaron un sistema por el cual unieron covalentemente a una fibra de nylon una lectina purificada del hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*. Cuando dicha fibra de nylon se puso en contacto con una cepa de *Trichoderma harzianum* (micoparásita de *Sclerotium rolfsii)*, dicho hongo se enrolló alrededor de la fibra tal como si se tratara de una hifa de *Sclerotium rolfsii.*

Wisniewski *et al.* (1991) demostraron que la unión de la levadura antagonista *Pichia guillermondii* a hifas del hongo *Botrytis cinerea*, también estaba mediada por lectinas y que la misma era inhibida por la presencia de los carbohidratos por los cuales la lectina implicada, tenía afinidad.

Luego del reconocimiento, el micoparásito se une al hongo hospedero y ocurre la lisis de la pared celular de este último. En el caso de hongos del género *Trichoderma* se ha visto que en la etapa de unión al hongo hospedero, las hifas

del micoparásito se enrollan alrededor de las hifas del hospedero, de forma de aumentar los puntos de contacto (Ver Figura 14). Se ha demostrado que en dichos puntos de contacto, los hongos de género *Trichoderma* forma estructuras tipo gancho y similares a apresorios que penetran en el hongo hospedero (Chet *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2004). Es en ese momento, que se induce la producción de enzimas capaces de degradar la pared del hongo hospedero. Las enzimas involucradas incluyen quitinasas, glucanasas y proteasas. Steyaert *y* colaboradores (2003) sostienen que la inducción de estas enzimas, se produce en cascada. Basados en los trabajos de Inbar y Chet (1992) y Haran (1996) postulan que la primer enzima hidrolítica (en este caso una quitinasa denominada CHIT102) se produciría por la inducción provocada por el reconocimiento mediado por lectinas. La acción de esta enzima sobre polímeros de la pared celular provocaría la aparición de residuos (oligosacáridos) que actuarían a su vez como inductores de otras enzimas hidrolíticas.

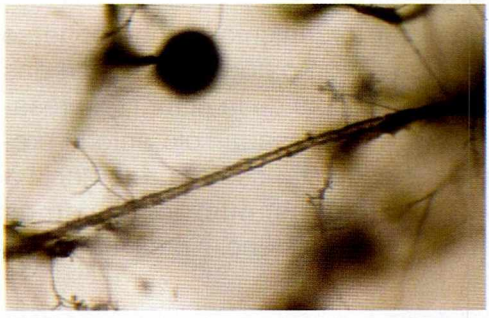


Figura 14. Fresco observado con microscopio óptico con aumento 400X. Las hifas de *Trichoderma* sp. se enrollan alrededor de una hifa de *Rhizopus* sp.

El micoparasitismo no se limita solamente a la destrucción de hifas. Existen micoparásitos capaces de colonizar y dejar inviables los esclerotos producidos por varios fitopatógenos como estructuras de resistencia. Stewart y Harrison (1989) demostraron que hongos pertenecientes a las especies *Gliocladium roseum*, *G. virens*, *Chaetomium globosum* y *Coniothyrium minitans* podían actuar como micoparásitos de esclerotos del patógeno *Sclerotium cepivorum*. Los micoparásitos colonizaban la superficie y la estructura interna de los esclerotos, impidiendo su posterior germinación.

Clarckson y colaboradores (2002) también seleccionaron micopa-rásitos capaces de destruir esclerotos de *Sclerotium cepivorum* en medio de cultivo y en suelo. Una cepa de *Trichoderma viride* seleccionada logró una destrucción del 60% de los esclerotos en el suelo y redujo la incidencia de enfermedad en plantines de cebolla. La Figura 15 muestra

Figura 15. Placa que muestra esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* colonizados por cepas de *Trichoderma* spp.

esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* colonizados por cepas de *Trichoderma* spp. Los esclerotos habían sido colocados en trampas de malla en el suelo y luego fueron dispuestos sobre papel de filtro húmedo para que germinaran. Sin embargo, lo que se obtuvo fue un crecimiento masivo de *Trichoderma* sobre la mayoría de los esclerotos.

4.3- Interacción Agente Huésped

4.3.1- Inducción de resistencia

Se denomina resistencia a la capacidad de un organismo a sobreponerse completamente o en cierto grado a la acción de un patógeno. Existen dos tipos de resistencia: la resistencia constitutiva (propia de la planta, expresada en todo momento) y la resistencia inducida (expresada sólo ante la presencia de determinados estímulos). En esta instancia, se hará referencia a los diferentes mecanismos por los cuales los microorganismos biocontroladores pueden provocar respuestas de resistencia inducida en los vegetales.

Las interacciones planta patógeno son de dos tipos: compatible, cuando ocurre enfermedad e incompatible cuando la planta resiste. De acuerdo a la teoría gen por gen (Flor,1955), en una interacción incompatible el producto de un gen de resistencia en la planta interactúa con el producto de un gen de avirulencia en el patógeno (Figura 16). De esta forma se activan mecanismos de defensa que impiden la aparición de enfermedad.

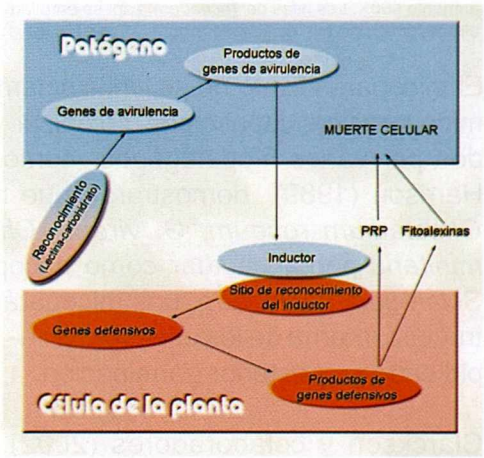


Figura 16. Esquema de la interacción de un patógeno avirulento y una planta resistente. (Dibujo: Alejandra Mondino)

Las interacciones compatibles ocurren cuando la planta no tiene o no expresa correctamente el producto del gen de resistencia y/o el patógeno no expresa su gen de avirulencia. De esta forma no se desencadenan mecanismos de resistencia y la enfermedad ocurre. En resumen, en las interacciones incompatibles, los mecanismos de defensa de la planta se activan a tiempo para impedir la enfermedad, mientras que en las interacciones compatibles, dichos mecanismos no se activan o se activan tardíamente, de forma que es imposible evitar la enfermedad.

Si los mecanismos de defensa fueran activados de alguna manera, previamente a la infección por un patógeno, entonces la enfermedad podría evitarse. Esto es lo que sucede cuando se da una respuesta de resistencia inducida, la cual ocurre cuando una planta estimulada adecuadamente activa sus mecanismos inducibles de resistencia. La resistencia inducida no debe ser vista como la creación de mecanismos de resistencia en plantas que carecen de los mismos, sino que se trata de la activación de mecanismos que se expresan sólo si son inducidos.

Los mecanismos de resistencia inducida se pueden activar por una respuesta de hipersensibilidad, por determinadas sustancias químicas y también por la interacción con microorganismos no patógenos que en ese caso actuarían como biocontroladores frente a futuras infecciones. En general las respuestas de resistencia inducida aparecen en forma sistémica y no son específicas. Esto significa que no sólo se protege el sitio donde ocurrió la inducción, sino también lugares alejados del mismo. Además, implica que la resistencia inducida protege a la planta contra el ataque de microorganismos similares o diferentes al que causó la inducción. Sin embargo existen casos donde las respuestas de resistencia aparecen solamente en zonas cercanas al sitio de inducción. En esos casos estamos frente a lo que se denomina resistencia localizada inducida, a diferencia de la resistencia sistémica inducida que ocurre a distancia.

Los mecanismos de resistencia inducida pueden dividirse en dos grandes tipos: la resistencia sistémica adquirida (SAR, systemic adquired resistance) y la resistencia sistémica inducida (ISR, induced systemic resistance). En ambos casos se trata de respuestas de resistencia inducida, que se producen en forma sistémica. Sin embargo difieren en el tipo de inductor, el tipo de respuesta y el tipo de señal que coordina la respuesta de resistencia a distancia (Hammerschmidt, 1999). En el caso de SAR, la inducción se puede dar por interacción con patógenos que causen una lesión necrótica, por respuestas de hipersensibilidad o por sustancias químicas naturales o sintéticos. Es así que sustancias inorgánicas como sales de fosfatos, o sílice (SiO_2) inducen este tipo de respuesta. Asimismo, se ha demostrado que sustancias orgánicas de origen natural tales como el quitosano (polímero de N-glucosamina), el ácido salicílico o ácidos grasos poliinsaturados también son inductores. Por otro lado, dentro de los inductores químicos de origen sintético se pueden citar el propenazol, el ácido DL-3- aminobutírico y el S- metil ester del ácido benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbotioico (BTH). Dentro de los inductores químicos de origen natural, está el harpin, proteína producida por la bacteria patógena *Erwinia amylovora* capaz de inducir una respuesta tipo SAR en plantas tratadas (EPA, 2006f). El harpin está categorizado como biopesticida por la EPA y existe en EEUU una formulación comercial denominada Messenger® que contiene la proteína harpin como principio activo.

Este tipo de resistencia es en general de muy amplio espectro. Se ha demostrado por ejemplo que en pepino una primera infección con *Colletotrichum lagenarium* el agente causal de la antracnosis, lleva a una respuesta de resistencia inducida contra patógenos fúngicos, bacterianos y virales (Sticher *et al.*, 1997).

La respuesta del SAR está asociada con la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP: pathogensis related proteins) entre las que se incluyen enzimas capaces de hidrolizar polímeros constituyentes de paredes celulares de hongos (quitinasas, proteasas y glucanasas) y con procesos de lignificación que limitan la entrada del patógeno. A su vez, el SAR es mediado via un proceso dependiente de ácido salicílico.

En el caso de ISR, en cambio, la respuesta de resistencia se induce por la presencia a nivel de raíz de rizobacterias. Se denomina rizobacterias a aquellas bacterias que se encuentran en grandes números en la superficie de la raíz, las cuales se alimentan principalmente de los exudados radiculares. Existen trabajos que demuestran que bacterias asociadas a la rizosfera benefician de alguna forma a la planta, ya sea promoviendo su crecimiento o como controladores biológicos de patógenos. Es así que, demostrados estos efectos, se las llama PGPR (plant growth promotion rhizobacteria) o sea rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Se ha demostrado que en algunos casos la presencia de estas bacterias o de bacterias endófitas, induce la resistencia a patógenos en partes alejadas de la planta, sin causar ningún daño en la planta hospedera. Se plantea que para que ocurra la activación del ISR, debe existir una interacción entre la bacteria y la planta mediada según algunos autores por sideróforos o lipopolisacáridos provenientes de las bacterias inductoras (Ramamorthy *et al.*, 2001).

También se ha demostrado que sustancias volátiles producidas por PGPR tales como cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, son capaces de activar ISR en plantines de Arabidopsis enfrentadas a la bacteria patógena *Erwinia carotovora* subespecie *carotovora* (Ryu *et al.*, 2004).

Al igual que el SAR la resistencia sistémica inducida es no específica y de amplio espectro. Por ejemplo, en el caso de pepino, la rizobacteria *Pseudomonas putida* 89B-27 fue capaz de proteger a distancia contra el ataque de *Colletotrichum orbiculare* (causante de antracnosis), contra *Erwinia tracheiphila* (patógeno foliar), contra *Fusarium oxysporum* f sp. *cucumerinum* (causante de marchitamiento vascular y que penetra por las raíces) y contra cucumber mosaic virus (van Loon *et al.*, 1998). A su vez, Alves Silva y colaboradores (2004) demostraron la inespecificidad del ISR utilizando la rizobacteria *Bacillus cereus* B101R, la cual colonizando las raíces de tomate

indujo resistencia a varios patógenos del filoplano, tales como *Alternaria solani*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Stemphillium solani* y *Oidium lycopersici*. Existen además, trabajos que demuestran la protección inducida causada por rizobacterias contra nematodos (Santhi y Sivakumar, 1995) e insectos (Zehnder, 1997).

La inducción de resistencia por rizobacterias está vinculada a mecanismos por los cuales se fortifica la pared celular del vegetal y se alteran respuestas fisiológicas y metabólicas. De esta forma se potencian las respuestas de defensa de la planta cuando la misma es atacada por un patógeno (Compant *et al.*, 2005). Por ejemplo el tratamiento se semillas de arvejas con *Pseudomonas flourescens* 63-28 tuvo como resultado la formación de barreras estructurales como deposición de calosa, y la acumulación de sustancias fenólicas en el sitio de ataque de *Pythium ultimun* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Benhamou *et al.*, 1996). Se demostró en algunos casos que los cambios bioquímicos o fisiológicos incluyen la inducción de producción de PRP tales como quitinasas y peroxidasas. Por ejemplo, la inoculación de plantas de tomate con la rizobacteria endofítica *Pseudomonas flourescens* 63-28 provocó una inducción de quitinasa, cuando la planta fue atacada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis- lycopercisi*. Sin embargo, otros autores afirman que no se detecta la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis (Van Loon *et al.*, 1998) . En esos casos se hace evidente la inducción de otras sustancias tales como las enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintetasa o polifenoloxidasa, además de la formación de fitoalexinas (Ramamoorthy *et al.*, 2001). Hay evidencia reciente que demuestra que la inducción de la enzima chalcona sintetasa, vinculada con mecanismos de defensa, pueden ser promovida por las N-acil-homoserina lactonas asociadas con los sensores de quórum e bacterias Gram negativas (Compact *et al.*, 2005).

Este tipo de resistencia inducida se diferencia del mecanismo antes definido como SAR, en que la misma se da sin acumulación de ácido salicílico en la planta. La mayoría de las rizobacterias asociadas a este mecanismo, inducen la resistencia mediante procesos independientes del ácido salicílico que involucran el etileno y jasmonato con señales (Compact *et al.*, 2005)

La inducción de resistencia tiene un tiempo limitado de acción luego del estímulo. Ramamorthy y colaboradores (2001) afirman que el tiempo de persistencia depende del inductor y de la especie vegetal. En general, los niveles de resistencia alcanzan su máximo nivel después de 4 o 5 días de ocurrida la inducción, pero luego disminuye con el tiempo. Por ejemplo Liu *et al.* (1995) demostraron que la resistencia inducida a la antracnosis, por tratamiento con

PGPR, podía perdurar hasta 5 semanas en el caso del pepino. Sin embargo el período variaba dependiendo de la rizobacteria utilizada en la inducción.

Es necesario precisar que para demostrar inducción de resistencia se tiene que probar la separación espacial entre el patógeno y el agente biocontrolador. Es decir que las bacterias inductoras deben estar ausentes del sitio de protección durante todo el experimento. En el caso de rizobacterias que protegen contra la infección de un patógeno en parte aéreas es importante corroborar que las rizobacterias no hayan sido trasladadas como endófitas desde la raíz a las zonas protegidas. Por ejemplo en los ensayos de De Meyer y Höfte (1997) de resistencia inducida en poroto contra *Botrytis cinerea*, se demostró que la rizobacteria inductora utilizada (*Pseudomonas aeruginosa* 7NSK-2) no estaba presente en extractos de tallo y hojas. En el caso de que las rizobacterias protejan contra un patógeno radicular se debe realizar ensayos en los que el sistema radicular se divide en dos partes, una parte se inocula con las rizobacterias inductoras y la otra parte se enfrenta al patógeno en cuestión, y luego se plantan en macetas separadas. La resistencia inducida se ve como una menor incidencia y severidad de la enfermedad en las plantas inoculadas con rizobacterias inductoras, en comparación con los controles no bacterizados. Un ejemplo de este tipo de ensayo con plantas de rabanito se puede encontrar en los trabajos de Leeman y colaboradores (1996) y de Van Wees y colaboradores. (1997).

Los mecanismos de resistencia inducida también se han descrito para el biocontrol de enfermedades de poscosecha. Ippolito y colaboradores (2000) describen la aparición de enzimas de resistencia (quitinasas, glucanasa y peroxidasas) en heridas inoculadas con la levadura *Aureobasidium pullulans*, la cual es capaz de controlar el desarrollo de moho azul causado por *Penicillium expansum*, en manzanas. Los autores del trabajo llaman a este fenómeno resistencia inducida, sin embargo se debe notar una diferencia con el fenómeno discutido hasta el momento en este capítulo. En los casos anteriormente descritos, la inducción de la resistencia se produce por un agente inductor, pero la misma se expresa solamente cuando el vegetal se enfrenta a un patógeno luego de la inducción. La aparición de respuestas de defensa no se da en presencia del agente inductor, como en este caso. El Gaouth y colaboradores (2003) describen otro ejemplo de resistencia inducida en manzana en poscosecha. En este caso, se realizan sobre la fruta 2 herdas separadas unos 2 cm. En una de ellas se inocula la levadura antagonista (*Candida saitoana*) y en el otro el patógeno (*Penicillium expansum*). Los autores demostraron en este caso una protección a distancia de las heridas inoculadas con el patógeno y determinaron la presencia de enzimas de defensa (quitinasas) en dichas heridas.

CAPÍTULO 5

Aislamiento y selección de Agentes de Control Biológico

Pedro Mondino

5.1.- Introducción.

Este capítulo trata acerca de la importancia que tienen el aislamiento y la selección de microorganismos Agentes de Control biológico (ACB).

Todo Programa de CB se sustenta en el apropiado aislamiento y selección de los microorganismos agentes de biocontrol de modo que esta fase determina las chances de éxito (Bettiol, 1991). Sabiendo que en la comunidad microbiana existe una gran diversidad de microorganismos, debemos preguntarnos como buscar y seleccionar al más apropiado para nuestros objetivos.

Diferentes Agentes de Control Biológico han sido aislados de suelos (Handelsman y Stabb, 1996; Bagnasco, 1997; Bagnasco *et al.*, 1998), del sustrato usado para cultivar plantines (Gravel *et al.*, 2005) sobre partes aéreas de las plantas (Bleve *et al.*, 2006; Droby *et al.*, 1999; Janisiewicz y Marchi, 1992; Vero *et al.*, 2003; Vero *et al.*, 2002); en contacto con las raíces (Idris *et al.*, 2006; Berg, *et al.*, 2001; Kerry, 2000); colonizando o hiperparasitando a patógenos (Silveira *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2001) o dentro de la planta (Pratella *et al.*, 1993).

Si bien es posible encontrar efectivos ACB en forma azarosa, podemos establecer una estrategia de búsqueda que nos permita aumentar las probabilidades de éxito y nos simplifique el largo camino a recorrer hasta disponer de un producto comercial. Así es que, se considera mayor la probabilidad de hallar antagonistas, en aquellos lugares en donde: coincidiendo la presencia del patógeno, la planta huésped y el ambiente favorable al desarrollo de la enfermedad, ésta no ocurre. Es posible que allí esté funcionando algún tipo de biocontrol natural.

Esto puede suceder naturalmente (por ejemplo en el caso ya mencionado de suelos supresivos) o podemos forzar tal situación colocando plantas o frutos en condiciones favorables al desarrollo de la enfermedad y luego aislar micoorganismos en contacto con aquellas plantas o frutos que permanecieron sanos.

La adaptación de los ACB al sitio en que deberán ejercer su acción biocontroladora es un objetivo primordial. Las chances de encontrar

microorganismos eficientes agentes de biocontrol se incrementan si buscamos en el mismo ambiente en que serán aplicados. Si aislamos un microorganismo antagonista de un lugar diferente al lugar en que deberá ejercer su acción, deberemos luego comprobar que sea capaz de adaptarse a vivir y competir en ese sitio. Por ejemplo, si un microorganismo antagonista es obtenido del suelo, no necesariamente se adaptará a vivir sobre las hojas o frutos y controlar patógenos foliares o de poscosecha. En ese caso se deberán realizar los ensayos correspondientes para verificar su adaptación a este nuevo sitio.

La probabilidad de que nuestro microorganismo antagonista se adapte al sitio de acción es mayor si lo hemos seleccionado de la flora existente allí mismo.

La búsqueda de agentes de control biológico sobre la superficie misma de las plantas se basa en el conocimiento de que allí viven poblaciones de bacterias, levaduras y hongos filamentosos entre los que se pueden encontrar antagonistas de los patógenos (Jacques *et al.*, 1995). Estas poblaciones que naturalmente viven en contacto con la planta interactúan con esta y suelen alimentarse de exudados liberados por la propia planta. Estos microorganismos ya están adaptados a vivir en contacto con la planta por lo que no será necesario ningún proceso de adaptación al lugar de acción.

Otro elemento a tener en cuenta durante la búsqueda de ACB es la aceptación de éstos por parte de los consumidores. El consumidor puede ser reacio a admitir alimentarse con frutas u hortalizas que han sido tratadas con microorganismos extraños, por ejemplo obtenidos de un compost; sin embargo es proclive a aceptar aquellos microorganismos que naturalmente viven sobre la fruta y que por lo tanto siempre ha tenido contacto con ellos.

La búsqueda de antagonistas puede realizarse en forma general (cualquier tipo de agente de control biológico), o puede estar dirigida hacia la obtención de microorganismos con alguna característica especial. Por ejemplo, si la mejor estrategia de manejo de una enfermedad es la disminución del inóculo primario consistente en esclerotos, nuestra búsqueda se podría orientar hacia aquellos microorganismos capaces de degradar esos esclerotos.

Debido a que numerosos ACB tienen capacidad de ser parásitos de los patógenos de plantas es factible realizar búsquedas de antagonistas a partir de colonias o estructuras del patógeno colonizadas. Es posible encontrar patógenos naturalmente colonizados por algún antagonista (por ej. esclerotos de *Botrytis cinerea* o *Botrytis squamosa* colonizados por *Clonostachys rosea*, o colonias de oidio co-

lonizadas por *Ampelomyces quisqualis*). También es posible utilizar al patógeno como cebo para capturar antagonistas. Por ejemplo, esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* se colocan en mallas enterrados en el suelo durante 1 mes o más y luego son retirados y sembrados en placas o colocados en cámara húmeda de donde se aíslan cepas de antagonistas. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en la búsqueda de antagonistas con capacidad de destruir esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* en Uruguay (Silveira *et al*., 2001)

El biocontrol de patógenos de poscosecha de fruta tales como *Penicillium* spp. causante de la podredumbres en pomáceas y citrus, requiere de antagonistas bacterias o levaduras capaces de competir con el patógeno en las heridas ya que éstas constituyen la principal vía de entrada del patógeno. La probabilidad de encontrar microorganismos hábiles en colonizar heridas se incrementa si se realiza la búsqueda en heridas de frutos que han permanecido sanos a pesar de estar presente el patógeno.

La búsqueda de buenos colonizadores de heridas se puede realizar sobre heridas naturales o provocadas artificialmente. La búsqueda de antagonistas de *Monilinia fructicola* a partir de heridas naturales y artificiales fue realizada con éxito en Uruguay utilizando montes de producción orgánica. Una semana antes de la cosecha (momento de máxima susceptibilidad al ataque del patógeno) frutos con heridas naturales fueron identificados y marcados sobre la planta, otros frutos sanos fueron heridos artificialmente con bisturí. Una semana después los frutos que permanecieron sanos fueron llevados al laboratorio y desde las heridas se aislaron los microorganimos allí presentes (Figura 1).

Figura 1. Heridas naturales y artificiales en frutos de durazno son utilizadas para aislar antagonistas de *Monilinia fructicola*.

Si se pretende controlar patógenos de poscosecha de frutos que se almacenan por largos periodos en cámaras frigoríficas a bajas temperaturas y alta HR es necesario disponer de microorganismos que no vean disminuida su capacidad antagónica en esas condiciones. El biocontrol de los patógenos que causan podredumbres en el almacenamiento en cámara frigorífica requiere de cepas de antagonistas adaptadas a crecer a las bajas temperaturas en que se almacena la fruta. En este caso la búsqueda de ACB se realiza sobre la superficie de frutos al momento de salida de cámara de forma de incrementar

las probabilidades de encontrar cepas adaptadas al frío. Los microorganismos allí presentes son los que han logrado sobrevivir en las condiciones de almacenamiento de la fruta. La incubación de esos microorganismos se realiza en la heladera o en la propia cámara frigorífica. De este modo solamente se trabajará con aquellos microorganismos capaces de sobrevivir al frío.

Los ejemplos anteriores muestran que existen objetivos que guían u orientan la búsqueda de ACB. Al momento de iniciar un proceso de búsqueda y selección de microorganimos antagonistas debemos tener presente esos objetivos de forma de poder diseñar una estrategia acorde al cumplimiento de los mismos.

5.2.- Aislamiento

El aislamiento de los microorganismos se realiza sembrando en medio de cultivo. Para aislar microorganismos de la superficie de frutos,flores u hojas es común colocar las mismas en agua estéril o suero fisiológico, agitar durante unos minutos de forma de extraer el biofilm microbiano en contacto con el vegetal y hacer diluciones, los que posteriormente se siembran en placas con medio de cultivo (figura 2). También es posible sembrar por impresión del material vegetal sobre el medio de cultivo presionando levemente con la hoja, piel de un fruto o parte de una raíz. Para el aislamiento de microorganismos del suelo rizosférico suele hacerse una suspensión de suelo, se hacen diluciones y se siembra por rastrillado en placa con medio de cultivo. Las placas se incuban en estufa y luego se procede a repicar para aislar las diferentes colonias que aparecen (figura 3).

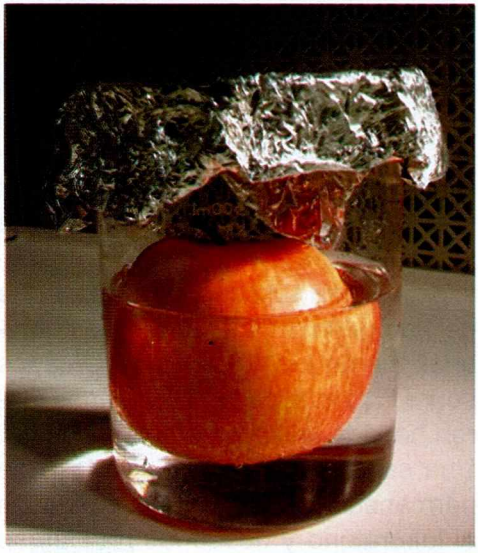


Figura 2. Extracción de micoorganismos de la superficie de un fruto de manzana por lavado con suero fisiológico.

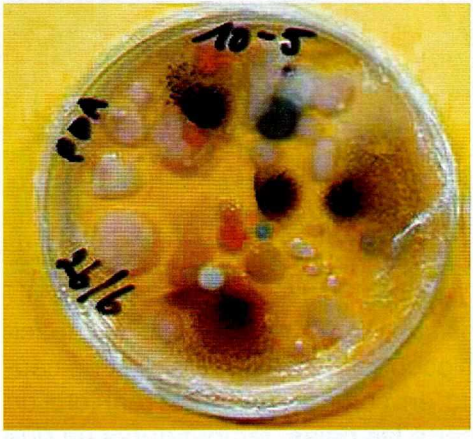


Figura 3. Colonias de microorganismos provenientes de la siembra de una suspensión de suelo. Las colonias diferentes serán repicadas hasta obtener aislamientos puros.

5.3.- Selección de ACB.

Una vez que se han aislado diferentes microorganismos es necesario proceder a seleccionar aquellos con mayor potencial biocontrolador. La selección del mejor ACB se puede realizar en el laboratorio mediante métodos "*in vitro*", utilizando plantas (metodos "*in vivo*"), o métodos intermedios que utilizan parte del vegetal, pero se realizan en el laboratorio.

5.3.1.- Selección "in vitro"

La técnica más utilizada para la selección de los ACB es la siembra de cultivos duales. Esta técnica se realiza "*in vitro*" y consiste en hacer crecer simultáneamente y enfrentados al patógeno y a sus potenciales antagonistas en una placa con medio de cultivo. Esa técnica permite detectar fácilmente interacciones directas como la inhibición del crecimiento por producción de antibióticos, la destrucción de hifas del patógenos por efecto de enzimas producidas por el antagonistas, o el parasitismo directo del patógeno por parte del antagonista. Esta técnica también permite cuantificar la inhibición midiendo por ejemplo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento, o las áreas de las colonias del patógeno en presencia o ausencia de diferentes antagonistas. Se debe realizar el ensayo con un número de repeticiones suficiente como para sacar conclusiones estadísticamente significativas.

La técnica de cultivos duales (Figuras 4, 5 y 6) tiene como ventajas la facilidad, el bajo costo y el hecho de que permite evaluar una gran número de microorganismos en un espacio reducido y en corto tiempo.

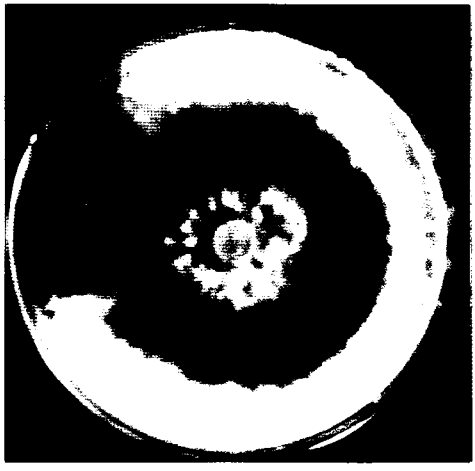


Figura 4. Cultivo dual de *Epicocum nigrum* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Una desventaja de los métodos de selección "*in vitro*" es que no todos los mecanismos de acción antagónica pueden ser detectados de esta manera. De ese modo se pueden estar perdiendo muy buenos antagonistas. Solamente permite detectar antagonistas que actúan mediante ciertos mecanismos de acción como la antibiosis o parasitismo directo, dejando de lado aquellos otros que actúan por otros mecanismos como la competencia con el patógeno en los sitios de acción o la inducción de resistencia de la planta.

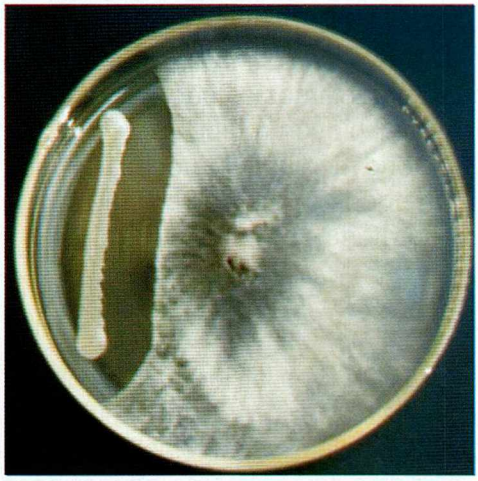


Figura 5. Cultivo dual entre *Bacillus* sp. y *Botrytis squamosa*. Se observa un fuerte halo de inhibición.

Por ejemplo, varias levaduras efectivas en el biocontrol de patógenos de poscosecha actúan compitiendo por espacio y por nutrientes en las heridas de frutos evitando la acción de patógenos como los hongos del género *Penicillium*. En una selección mediante cultivos duales estas cepas habrían sido descartadas por inefectivas.

Así es, que el hecho de que numerosos trabajos reporten la existencia de ACB cuyo principal mecanismo de acción es la antibiosis, es atribuido al uso de la técnica de cultivos duales (Campbell, 1989). Esto nos conduce a reflexionar acerca de cómo las técnicas o estrategias elegidas para realizar una investigación nos pueden estar sesgando los resultados obtenidos.

Otra desventaja de las técnicas de selección "*in vitro*" es la baja correlación entre los resultados obtenidos en el laboratorio con los resultados de campo. Un ACB puede producir amplios halos de inhibición, antagonizar en forma efectiva al patógeno cuando se lo enfrenta en una placa, y luego no evitar el desarrollo de la enfermedad cuando es aplicado sobre la planta. Es que en el campo, cuando aplicamos un microorganismo sobre las hojas de una planta o en el suelo, éste puede ver disminuida su capacidad antagónica por efecto de factores ambientales como la luz UV, baja humedad relativa, competencia con otros microorganismos, entre otros.

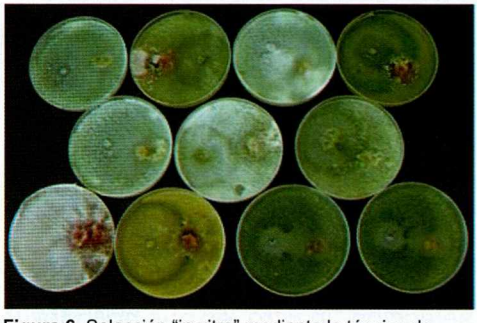


Figura 6. Selección "in vitro" mediante la técnica de cultivos duales de cepas de *Trichoderma* spp y *Fusarium graminearum*

5.3.2.- Selección "*in vivo*"

Los métodos de selección "*in vivo*" consisten en evaluar la capacidad biocontroladora de un determinado microorganismo en bioensayos con plantas (Figuras 7, 8, 9, 10 y 11). En estos ensayos, el potencial agente de control biológico es aplicado directamente sobre la planta o en el sustrato en contacto con ésta. La planta así tratada es inoculada luego con el patógeno. En

estos ensayos lo que se evalúa es la incidencia o severidad de la enfermedad en plantas con y sin aplicación del antagonistas.

El método de selección in vivo ha sido utilizado en Uruguay con el objetivo de seleccionar antagonistas con capacidad biocotroladora de patógenos de poscosecha de citrus y manzanas (Paolillo *et al.*, 1998; Vero *et al.*, 2002; Silvera *et al.*, 2001; Vero *et al.*, 2004). En estos trabajos, frutos previamente tratados con suspensiones de microorganismos (potenciales ACB), fueron inoculados con suspensiones de los patógenos más comunes y luego de un periodo de incubación se evaluó y comparó la incidencia y severidad de las podredumbres con y sin aplicación del potencial antagonista (figuras 7, 8, 9). Aquellas cepas que lograron proteger al fruto del ataque del patógeno fueron seleccionadas para trabajos posteriores.

Figura 7. Ensayo de selección "in vivo" mediante inoculación de herdidas a frutos de naranja.

Figura 8. Selección de ACB mediante ensayo de biopotrección de heridas realizado "in vivo" usando frutos. Se observa la protección en la herida de la derecha lograda por un potencial ACB.

El método de evaluación "*in vivo*" permite seleccionar potenciales agentes de control biológico con independencia del mecanismo de acción. También permiten detectar posibles efectos negativos sobre la planta. Las dificultades de los métodos *"in vivo"* es que son más caros, más trabajosos (es necesario producir plantas) requieren de mayor equipamiento (plantas, invernáculo, personal) e insumen mayor tiempo.

Figura 9. Ensayo de selección *"in vivo"* utilizando frutos de manzana. Se practican heridas las que son secuecialmente inoculadas con el posible antagonista y luego con el patógeno.

Aunque no sea posible realizar la selección "*in vivo*", la etapa de evaluar al potencial agente utilizando plantas no podrá evitarse ya que es allí donde deberá demostrar su real capacidad biocontroladora.

Figura 10. Ensayo de selección "in vivo" utilizando plantines de tomate creciendo en bandejas. Los potenciales antagonistas así como el patógeno se inoculan directamente en el sustrato en que crecen las plantas.

Figura 11. Selección de ACB mediante ensayo in vivo de bioprotección de plántulas de lechuga. Algunos microorganismos logran evitar la podredumbre blanda y muerte de la planta cuando son aplicados al sustrato.

5.3.3.- Selección combinada

Existen mecanismos que denominamos intermedios o de selección combinada, que si bien se realizan en el laboratorio utilizan partes de plantas como ser discos de hojas, trozos de tallos o de frutos. La utilización de discos de hojas de vid ha sido utilizada para seleccionar potenciales antagonistas de *Botrytis cinerea* (Whiteman y Stewart, 1998) El uso de discos de hoja de frutilla ha sido utilizado para seleccionar microorganismos con capacidad de antagonizar a *Botrytis cinere*a agente causal del Moho gris en frutillas (Sutton y Peng , 1993). Discos de hojas de lechuga también han sido usados para seleccionar bacterias supresoras de *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Fiddaman *et al*., 2000). Trozos de "tallos" de lechuga (nervadura central de la hoja) han sido usados para seleccionar cepas de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum.* En estos ensayos los trozos de tallo de lechuga son colocados en placas sobre sustrato estéril y en el centro un disco de micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* es colocado en contacto con discos similares de diferentes hongos con potencial antagonismo (figuras 12 y 13). Si el patógeno es controlado los dis-

Figura 12. Selección combinada de ACB utilizando trozos de vegetal. Este método permite superar algunas de las dificultades de la selección *"in vivo"*.

cos permanecerán intactos, de lo contrario *Sclerotinia sclerotiorum* avanza sobre los trozos del vegetal ocasionando la pudrición de los mismos (Silveira *et al.*, 2001). También es posible bañar los trozos del vegetal en una suspensión del posible antagonista.

La ventaja de este tipo de ensayos combinados es que logran simular situaciones algo más cercanas a la realidad y al utilizar trozos de material vegetal ahorran en trabajo y tiempo. En ocasiones permiten detectar efectos fitotoxicos los que serán razón de descarte del potencial biocontrolador. Sin embargo no logran sustituir los ensayos "in vivo" de modo que los ACB seleccionados de este modo deberán pasar luego por ensayos con plantas.

Figura 13. Si el potencial antagonista es efectivo el patógeno inoculado en el centro no logra colonizar los trozos de vegetal (placa izquierda) de lo contrario el patógeno los colonizará produciendo la podredumbre típica (placa de la derecha)

5.3.4.- Selección de ACB según características especiales

Si bien el objetivo principal de toda búsqueda y selección de ACB es la efectividad en el biocontrol de determinado patógeno, existen otros objetivos no menos importantes como la adaptación al sitio de acción, la ausencia de efectos fitotóxicos o dañinos sobre la planta que queremos proteger, la adaptación al ambiente en que deberá ejercer el biocontrol, la ausencia de efectos secundarios negativos sobre la salud humana o el ambiente, entre otros.

Es posible realizar la búsqueda de determinado tipo de microorganismo antagonista. Por ejemplo al ser conocida la habilidad biocontroladora de cepas de *Pseudomonas* fluorescentes sobre patógenos de suelo es factible iniciar una búsqueda selectiva de estas bacterias. Así es que en Uruguay se han realizado trabajos de búsqueda y selección de estas bacterias para el biocontrol de enfermedades de implantación de leguminosas forrajeras (Bagnasco *et al.*, 1998).

Es posible seleccionar antagonistas en base a su capacidad de producir enzimas degradadoras de las paredes de hongos patógenos. Existen para ello técnicas que permiten medir la actividad enzimática. Para seleccionar antagonistas con capacidad de degradar paredes del patógeno también es posible hacer crecer a los potenciales antagonistas en un medio con paredes

del patógeno como única fuente de carbono. En este medio sólo podrán crecer aquellos microorganismos que dispongan de las enzimas necesarias para degradar dichas paredes (Jijakli y Lepoivre, 1998).

La selección de potenciales agentes de biocontrol cuyo mecanismo de acción sea la inducción de resistencia sistémica en la planta es posible realizarla midiendo la producción de quitinasas y ß-1,3-glucanasas (moléculas indicadoras de la reacción de resistencia) en plantas tratadas con diferentes cepas potenciales ACB (Bargabus *et al.*, 2004).

Por su parte Calvente y colaboradores desarrollaron un método de siembra en placas con medio sólido que permite seleccionar levaduras con capacidad de competir por el hierro mediante la producción de sideróforos. Estas levaduras compiten eficientemente en las heridas de frutos de manzana con el *Penicillium expansum* agente causal del moho azul (Calvente *et al.*, 2001). La competencia por hierro mediante producción de sideróforos puede ser evaluada mediante siembra de cultivos duales en medios con diferentes concentraciones de hierro. También es posible seleccionar productores de sideróforos mediante siembra en medio CAS (figura 14) (Milagres *et al.*, 1999).

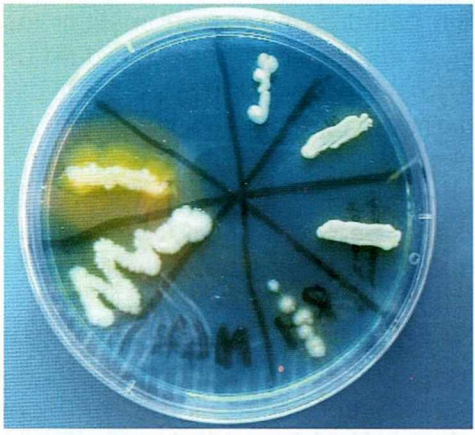


Figura 14. La siembra de diferentes microorganismos en medio CAS permite detectar la presencia de cepas productoras de sideróforos por elcambio de color del medio de azul a amarillo.

En conocimiento de que *Fusarium graminearum* coloniza las anteras de la flor de trigo y tiene escasa capacidad de utilizar al ácido tartárico como fuente de carbono, Khan y colaboradores utilizaron la estrategia de aislar potenciales ACB de las anteras de la flor del trigo seleccionando aquellos con habilidad para utilizar el ácido tartárico. El objetivo de esta selección fue disponer de ACBs que pudiesen ser formulados con incorporación de ácido tartárico como suplemento. Posteriormente estos mismos investigadores se abocaron a la búsqueda de microorganismos con capacidad de utilizar la Colina, sustancia que se produce en las anteras del trigo y que se sabe estimula la germinación de las esporas de *Giberella zeae* (Khan *et al.*, 2001).

Actualmente técnicas moleculares permiten detectar la presencia de genes responsables de características deseables en un agente de biocontrol. De

esta manera pueden servir de ayuda en la selección de microorganismos potenciales agentes de biocontrol por ejemplo, detectando la capacidad de producir un antibiótico determinado. A su vez estas técnicas permiten diferenciar entre microorganismos así como descartar aislamientos genéticamente idénticos. (Tomashow *et al.*, 1997; Schena *et al.*, 2000).

Con el objetivo de disponer de ACB con capacidad de curar infecciones ya establecidas (capacidad curativa) se han realizado trabajos de búsqueda y selección de microorganismos endófitos. Estos microorganismos que viven dentro de los tejidos vegetales tendrían la capacidad de antagonizar a patógenos dentro de la planta, es decir con posterioridad al momento de infección. La búsqueda de endofitos con capacidad biocontroladora de roya de la hoja del café ha sido realizada en Brasil (Shiomi *et al.,* 2006)

Si de antemano sabemos que nuestro antagonista deberá ser aplicado en sistemas de manejo integrado que incluyen la aplicación de fungicidas para el control de otros patógenos, podemos diseñar métodos de selección que permitan considerar esa característica como por ejemplo el crecimiento en medios enmendados con funguicida. Aquellas cepas de ACB resistentes a fungicidas serán seleccionadas.

En ocasiones puede hacerse una búsqueda tratando de evitar determinada característica como por ejemplo la producción de antibióticos. La ausencia de producción de antibióticos es una característica deseable en los antagonistas de patógenos de poscosecha. La producción de antibióticos obliga a realizar estudios que demuestren su inocuidad para el consumidor. Por otra parte es sabido que estas sustancias antibióticas tienen alto riesgo de generar resistencia en las poblaciones del patógeno. En este caso la técnica de cultivos duales sirve para descartar aquellas cepas que producen halo de inhibición.

Con el objetivo de descartar la posibilidad de que un potencial ABC sea patógeno humano se estudia su capacidad de crecimiento incubando en estufa a 37°C. Aquellas cepas capaces de crecer a 37 °C (temperatura del cuerpo humano) son descartados hasta tanto no se realicen estudios que confirmen su inocuidad.

Finalmente una característica indispensable de todo ACB es la ausencia de efectos negativos sobre la planta. En ensayos con plantas la observación de cualquier efecto negativo será causa de descarte del agente de biocontrol.

Cualquier método de selección nos dará como resultado disponer de una porción de la población de microorganismos con potencialidad antagónica.

Pero solamente podrá detectar una fracción de la microflora antagonista. El problema está en definir cuales serán aquellos métodos de selección que nos permitan encontrar los ACB con mayor capacidad de controlar al patógeno cuando sean aplicados en el lugar y ambiente en que deberán ejercer el biocontrol.

A su vez, es sabido que los ACB suelen actuar por más de un modo de acción y en ocasiones las técnicas utilizadas seleccionan por uno o pocos modos. Características como la habilidad de colonizar la rizosfera o las semillas solamente puede ser evaluada en ensayos que involucren el uso de plantas.

No existe una única estrategia de aislamiento y selección de agentes de control biológico y en cada caso debemos diseñar la que sea más apropiada a nuestros fines.

Los métodos de selección "*in vitro*" por lo general aportan información acerca de los mecanismos de acción, en cambio aquellos métodos más complejos que involucran a la planta y factores ambientales reproducen de mejor manera la situación real aunque generalmente brindan escasa la información acerca de los mecanismos de acción.

A su vez la utilización de métodos moleculares pueden servir de ayuda en esa selección indicando por ejemplo si dentro de un grupo de potenciales antagonistas seleccionados existen diferencia o se trata de individuos con características similares (Berg *et al.*, 2000).

Generalmente es necesario utilizar una combinación de métodos. Es común utilizar estrategias que combinen métodos "in vitro" con los que se realiza una pre-selección y luego se pase a una etapa de selección "in vivo".

El arte está en diseñar aquella estrategia que nos conduzcan en la forma más directa a nuestro objetivo final.

CAPÍTULO 6

Aplicación de agentes de control biológico

Pedro Mondino

De nada sirve haber seleccionado al mejor antagonista de un determinado patógeno, si luego por motivo de una mala aplicación, este no puede ejercer su acción biocontroladora. Una aplicación inoportuna y/o de mala calidad puede echar por tierra todo el trabajo de desarrollo de un biopesticida.

El éxito de un agente de biocontrol depende de que se desarrollen formulaciones y métodos de aplicación apropiados. Una de las claves de ese éxito radica en lograr que el ACB apropiado, esté en el momento oportuno, y en el lugar apropiado durante un tiempo suficiente.

Antes de decidir la aplicación de un biopesticida necesitamos responder las siguientes interrogantes: ¿dónde debemos aplicarlo?; ¿cuándo debemos aplicarlo?; ¿cómo debemos aplicarlo? y si ¿serán necesarias reaplicaciones periódicas?.

La primera pregunta puede tener diferentes respuestas, por ejemplo, un ACB puede ser aplicado directamente sobre la planta (hojas, raíces, frutos, semillas) o puede ser aplicado al suelo, o directamente sobre los rastrojos en donde permanece el inóculo del patógeno.

Las respuestas a la segunda pregunta también pueden ser variadas, por ejemplo, un ACB puede ser aplicado antes de la siembra, durante la siembra, durante las etapas de crecimiento del cultivo, previo a la cosecha, durante la cosecha o luego de cosechado.

Para la pregunta del cómo debemos aplicarlo, también hay numerosas posibles respuestas. Por ejemplo mediante aspersión, mezclado con el sustrato, pildorado de la semilla, aspersiones foliares o baño en poscosecha.

Por último la necesidad de reaplicaciones también puede tener diversas respuestas en función de la capacidad del antagonista de establecerse y mantener su población en el sitio de acción.

Las respuestas a estas preguntas dependerán del tipo de planta, del tipo de patógeno, de las características propias del ACB y del tipo de estrategia de control que estemos empleando.

Así es que el tipo de planta que queremos proteger nos determina en gran medida las posibilidades de aplicación. Por ejemplo los frutos pueden ser asperjados o bañados en la poscosecha, las raíces de mudas de tomate o cebolla podrían ser sumergidas en una suspensión del antagonista, las semillas botánicas pueden ser peleteadas, los cortes de poda pueden ser pintados o tratados con la formulación biológica. Igualmente la protección de las raíces puede resolverse mediante aplicaciones al sustrato o baño de las mudas al transplante.

El tipo de patógeno será también determinante del modo de aplicación: Por ejemplo, hongos de suelo podrán ser controlados mediante aplicaciones directamente al sustrato, baños de raíces o pildorados de semillas, Patógenos foliares serán fácilmente controlados mediante aplicaciones foliares mientras que para patógenos de poscosecha será factible bañar o asperjar la fruta con una suspensión del biopesticida.

Por otra parte el tipo de ACB y su modo de acción influirán también en la forma de aplicación. Así es que parásitos de estructuras de sobrevivencia del patógeno deberán tomar contacto con éstas para poder actuar. Por ejemplo el hongo *Athelia bombacina* debe ser aplicado directamente a las hojas de manzana caídas en el suelo para que logre interrumpir el ciclo de *Venturia inaequalis*.

Si nuestro antagonistas es un inductor de resistencia deberá tomar contacto con la planta antes que lo haga el patógeno, de forma de dar tiempo a que se desencadenen los procesos de inducción. De Cal y colaboradores (1999), encontraron que las aplicaciones de *Penicillium oxalicum* para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* eran más efectivas cuando se realizaban directamente en la almaciguera 7 días antes del transplante. Con estas aplicaciones se logró proteger a la planta durante un periodo de 60 a 100 días. Sin embargo el tratamiento a las semillas no fue efectivo y los autores lo atribuyen a que ese tratamiento no logró inducir la resistencia. Posteriormente estos mismos investigaciones demostraron que reaplicaciones de *Penicillium oxalicum* prolongaban el efecto bioprotector (De Cal y Melgarejo, 2001).

Si nuestro antagonista actúa compitiendo en las heridas con los patógenos, debemos aplicarlo de modo que tenga chances de colonizar las heridas, antes que el patógeno. Los baños en una suspensión del antagonista de la fruta antes de ingresar a la conservación frigorífica permitirá proteger las heridas que se producen en la manipulación de la fruta desde la cosecha en el campo hasta la sala de empaque. En ocasiones aplicaciones precosecha

facilitan la colonización del fruto por el antagonista anticipándose de ese modo a los posibles patógenos.

La estrategia empleada para el biocontrol de la enfermedad también determina el momento de aplicación. Una característica general de los métodos de control biológico es que, en su mayoría, carecen de capacidad curativa. Es decir que deben ser aplicados preventivamente (antes de que ocurra la infección) para que actúen eficientemente. La excepción a esto es el biocontrol de los oidios, que al tratarse de hongos ectoparásitos, es posible curar infecciones mediante aplicaciones foliares.

Los métodos de aplicación deben permitir la máxima expresión del ACB. Deben asegurar que el ACB crezca y logre el propósito de controlar al patógeno. Así es que los métodos de aplicación deben ser *pensados cultivo por cultivo* y *enfermedad por enfermedad*. No es posible idear métodos de aplicación si se desconoce el funcionamiento del patosistema y del ACB en ese patosistema.

Al diseñar métodos de aplicación debe tenerse en cuenta que el agricultor necesita familiarizarse con el método y que éste además, debe ser funcional a su estructura de trabajo en el predio. Por esta razón en general se eligen métodos similares a los que utiliza para la aplicación de plaguicidas químicos (figura 1).

Figura 1. Aplicación de una formulacion artesanal de *Clonostachys rosea* en almacigos de cebolla mediante máquina pulverizadora de mochila.

Algunos ejemplos de cómo las características del patosistema determinan los momentos de aplicación: *Botrytis cinerea* causa una podredumbre conocida como moho gris en los racimos de uva. Analizando la estrategia del patógeno descubrimos que en realidad *B. cinerea* se instala en el racimo al momento de la floración, más precisamente al final de la misma, colonizando los restos florales. En esos restos de tejidos senescentes permanece en forma latente hasta la madurez del racimo (envero) momento en que invade las bayas. De tal modo que las aplicaciones de un ACB de la *Botrytis* en uva se realizaran en la floración y antes del cierre del racimo de forma de atacar a la *Botrytis* antes de que esta invada las bayas produciendo la podredumbre.

Algo similar sucede con este patógeno en tomate y en frutillas (figuras 2 y 3). Los restos florales y otras partes senescentes de la planta son la primera vía

de ingreso. Una vez allí produce inóculo secundario que atacará luego los frutos maduros.

Aplicaciones en precosecha de productos biológicos resultaron efectivas en el control de enfermedades de poscosecha hipólito y nigro presentan una lista de investigaciones en ese sentido (Ippolito y Nigro, 2000).

Figura 2. La observación bajo lupa muestra que los restos florales de una frutilla aun verde están ya colonizados por *Botrytis cinerea*. Un efectivo antagonista debería ser capaz de competir con la *Botrytis* por esos restos florales.

La literatura refiere a métodos ingeniosos de aplicación de ACB. Así por ejemplo se cita que abejorros y abejas han sido eficientes en diseminar inóculo de *Clonostschys rosea* desde la piquera de la colmena hasta las flores del frambueso (Yu y Sutton, 1997; Kovach *et al.*, 2000).

Las heridas del corte de poda de la planta de vid son vía de entrada de *Eutypa lata*, un patógeno que es eficientemente biocontrolado por aplicaciones de *Fusarium lateritium* directamente sobre las heridas. Una ingeniosa tijera de podar a la que se le anexó un sistema que asperja directamente sobre la herida al momento de realizar el corte permitió lograr controles tan efectivos como la aplicación directa mediante pipeta sobre la herida (Ho *et al.*, 2005)

Figura 3. Los cortes de poda son vía de entrada de la *Botrytis* en tomate. Allí se instala y produce abundante inoculo secundario que afectará a flores y frutos. Es necesario proteger por lo tanto esos cortes de poda.

Figura 4. Las abejas han sido utillizadas para diseminar, llevando en sus patas esporas de antagonistas, las que son depositadas en las flores que se pretende proteger.

Aplicaciones al sustrato permiten proteger a la plántula del ataque de patógenos de suelo (figuras 5 y 6). Lewis y colaboradores pudieron controlar *Rhizoctonia* en berenjenas aplicando una formulaciones granuladas de *Gliocladium* y *Trichoderma* al suelo (Lewis *et al.*, 1995).

Figura 5. Mezcla con el sustrato de una formulacion en polvo de Trichoderma para el biocontrol de patógenos de suelo

Finalmente es necesario conocer la necesidad de reaplicaciones. A diferencia de las sustancias químicas los agentes de biocontrol son seres vivos que pueden colonizar el lugar de acción y multiplicarse de manera que en los casos de que esto suceda no serán necesarias reaplicaciones. Si por el contrario, el antagonista tiende a desaparecer en el correr de los días por efecto del ambiente y de la competencia con la microflora existente podrían ser necesarias reaplicaciones para mantener la efectividad en el biocontrol.

En este caso los objetivos del agricultor, pueden no ser coincidentes con las posibilidades de desarrollo comercial de un ACB. Así es, que una ventaja del control biológico para el agricultor, como lo es la posibilidad de que no sean necesarias reaplicaciones, puede ser visto como una desventaja desde el punto de vista del desarrollo comercial. El producto tendrá menor reventa si una vez aplicado logra mantenerse y multiplicarse en el lugar de acción siendo innecesarias reaplicaciones posteriores. Esto podría limitar su desarrollo comercial.

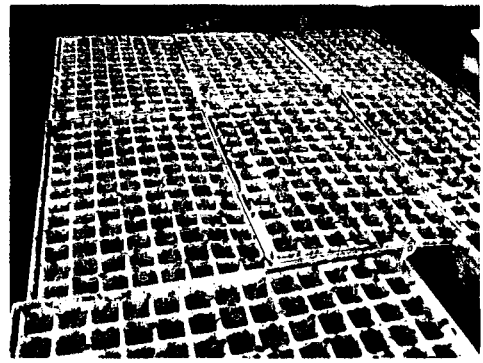


Figura 6. Lechugas creciendo en sustrato con *Trichoderma*.

Las necesidades de reaplicación dependerán de los resultados de los estudios de evolución de la población del antagonista en el lugar de acción. Así, por ejemplo, De Cal y Melgarejo encontraron que la repetición de las aplicaciones de *Penicillium oxalicum* prolongaban la eficacia del biocontrol de la fusariosis del tomate (De Cal y Melgarejo, 2001)

CAPÍTULO 7

Control Biológico de enfermedades de poscosecha.

Gabriela Garmendia[1]
Silvana Vero[1]

7.1 Poscosecha: Características y problemas

La poscosecha de productos agrícolas se concibe como un conjunto de procesos integrados y secuenciados, por los que atraviesa el producto después de la cosecha, en su camino hacia el consumidor y que se encuentra estrechamente vinculado a los sistemas de producción (Pelayo, 1992). Es el período que transcurre desde el momento en que los productos son recolectados hasta aquel en el cual son consumidos en estado fresco, preparados o transformados industrialmente. Este período es muy variable y depende de diversos factores intrínsecos (especie, variedad y características fisicoquímicas) y extrínsecos (consumo, medio de transporte y condiciones ambientales) a cada producto.

Luego de la recolección todo producto hortícola puede tomar diversos destinos. Uno de ellos es la venta directa de lo obtenido en la cosecha para consumo inmediato o para algún propósito industrial. En otros casos los productos se someten a una serie de actividades previas antes de llegar al consumidor. Estas actividades van a seguir determinada secuencia según el producto que se trate, pero a grandes rasgos son: el empaque, el almacenamiento y el transporte.

En algunos casos los productos hortícolas requieren de cierto almacenamiento con el fin de equilibrar su oferta y su demanda. En otros casos también se mantienen almacenados durante transportes prolongados, como en el caso de las exportaciones por barco a otro continente. La vida de almacenamiento potencial de un producto se encuentra predeterminada en gran medida por sus características genéticas y metabólicas. Sin embargo factores de precosecha, técnicas de manejo, momento de la cosecha, tratamientos poscosecha y condiciones de almacenamiento determinarán finalmente la capacidad real de almacenamiento del producto (Díaz, 2002)

[1]Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias.
Facultad de Química. UdelaR.

Según el manejo, algunas frutas pueden tener una vida de almacenamiento prolongada que puede ser desde algunos meses hasta un año, por ejemplo, manzanas y peras (Kuprferman, 1997). Otros productos frutícolas tienen un período muy corto de almacenamiento que va desde días hasta una semana, por ejemplo, frambuesas y frutillas. La mayoría de las restantes frutas tienen una vida de almacenamiento intermedia entre estos dos extremos. Los parámetros más importantes a tener en cuenta durante el almacenamiento son el correcto manejo de los niveles de temperatura, humedad y la atmósfera, los cuales son de suma importancia en el control de la maduración, en la posible aparición de fisiopatías y en la capacidad de desarrollo de microorganismos patógenos que pueden dañar a los frutos. También es importante una adecuada limpieza y desinfección de los lugares de almacenamiento, de forma de disminuir el riesgo de la llegada de patógenos a la fruta.

A pesar de maximizar esfuerzos para reducir la susceptibilidad de los frutos y también minimizar las fuentes posibles de entrada de patógenos antes, durante y después de la cosecha, las pérdidas en la poscosecha en muchos casos siguen siendo significativas. Se ha estimado que las pérdidas totales (debidas a factores bióticos y abióticos) en la poscosecha de frutas y vegetales pueden llegar hasta el 25% (El-Ghaouth *et al.*, 2002). Parte de estas pérdidas se deben a infecciones con patógenos fúngicos.

Las infecciones cuyos síntomas se manifiestan durante el almacenamiento poscosecha, pueden ocurrir entre la floración y la maduración del fruto o pueden adquirirse durante la cosecha y posterior acondicionamiento y almacenamiento. En el primer caso, las infecciones pueden permanecer quiescentes hasta que comience la senescencia del fruto durante el almacenamiento. En el segundo caso, los patógenos penetran a la fruta a través de heridas causadas durante la cosecha y el manejo posterior a la misma. Es muy difícil, mediante técnicas de manejo poscosecha, controlar la aparición de síntomas en el primer caso, sin embargo se pueden maximizar esfuerzos durante y después de la recolección para evitar la aparición de las podredumbres ocasionadas por patógenos de heridas. Para minimizar las pérdidas ocasionadas por este tipo de patógenos se deben tomar medidas tendientes a minimizar el número de heridas por fruto y el inóculo inicial de patógeno. Un bajo número de heridas se puede lograr con cuidadosas medidas de manejo durante y después de la cosecha, mientras que para minimizar el inóculo inicial es necesario extremar las medidas de higiene y desinfección de los envases, de las cámaras frigoríficas y de la fruta misma previo al almacenamiento.

En realidad, el control de las enfermedades de poscosecha se ha basado históricamente, en la aplicación de fungicidas de síntesis química mediante

baños, aspersión o incorporado en las ceras. 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, ya que las mismas se basan en la alternancia o rotación de principios activos de diferente modo de acción (Brent y Hollomon, 1998). Como consecuencia, se ha constatado la presencia de poblaciones de patógenos resistentes a los fungicidas más comúnmente utilizados. (Wozniak, 2003; Delgado y Pérez, 1998; El-Goorani *et al.*, 1984). Por otra parte, el uso de fungicidas, especialmente en esta etapa tan cercana al consumo, está siendo muy cuestionada por el público consumidor, el cual ha incrementado su conciencia acerca de los riesgos a la salud y al medioambiente que trae consigo el uso de fungicidas. Un nuevo concepto de calidad ha surgido. Los consumidores ya no se fijan solamente en la estética del producto, sino que exigen que esté libre de residuos tóxicos y que, además, haya sido producido siguiendo prácticas sustentables y respetuosas del medio ambiente.

7.2 Control biológico en poscosecha

Para poder dar respuesta a estas demandas se desarrollan en los 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; Giacinti 2003). El control biológico de enfermedades de poscosecha ha demostrado ser una alternativa promisoria, factible de ser incorporada en Sistemas de Manejo Integrado.

La poscosecha presenta características favorables para la utilización de técnicas de control biológico. En primer lugar, el ambiente de la poscosecha se caracteriza por ser confinado y controlado lo cual facilita la aplicación de los productos biológicos y la adaptación de estos a las condiciones ambientales. En segundo lugar el alto valor agregado de los productos cosechados justifica la implementación de medidas de control que en otras circunstancias podrían no ser rentables (Mondino y Vero, 1999). Por otra parte, en muchos de los casos se pretende sustituir los baños o aspersión de fungicidas, por baños o aspersión utilizando suspensiones de antagonistas, por lo que el cambio en los equipos e instalaciones de las plantas de tratamiento, no sería drástico ni económicamente excesivo.

Sin embargo debe tenerse en cuenta que las medidas de control de patógenos de poscosecha deben alcanzar eficiencias muy altas. Una medida de control

que alcance un 80% de eficiencia es aceptada para el control de patógenos de suelo, en cambio es inaceptable en las enfermedades de poscosecha en donde se exigen eficiencias de un 95 a un 98 % como mínimo (Spadaro y Gullino, 2003).

En general cuando hablamos de Control Biológico hacemos referencia a la utilización de microorganismos beneficiosos con el fin de reducir los efectos indeseables de los patógenos de plantas. Estos microorganismos benéficos existen naturalmente y pueden ser seleccionados y reaplicados en concentraciones mayores y en momentos oportunos para que ejerzan su acción antagónica. También pueden ser potenciadas las poblaciones naturales de microorganismos benéficos mediante un apropiado manejo.

No solamente los pesticidas microbianos son considerados herramientas de Control Biológico, también se reconocen como tales, a sustancias naturales. Es así que la EPA define como biopesticidas a sustancias de origen natural tales como quitosano y derivados, bicarbonato de sodio y ácido acético entre otros. Existen referencias del uso de bicarbonato de sodio (2-3%) o ácido acético (4-5%) usados en el primer baño de la fruta previo al almacenamiento (Palou *et al.*, 2002). La integración de los agentes de control biológico con algunas de estas sustancias ha permitido potenciar su acción (Karabulut *et al.*, 2001, Droby *et al.*, 2003).

En la actualidad existen varias formulaciones comerciales basadas en el uso de microorganismos biocontroladores para el uso en poscosecha de frutas. En EEUU se han registrado tres agentes microbianos de control biológico para su uso en poscosecha. Dos de ellos son bacterias: *Pseudomonas syringae* cepa ESC-10 y *Pseudomonas syringae* cepa ESC-11; el tercer agente microbiano registrado es una levadura: *Candida oleophila* I-182. Las bacterias están recomendadas para su uso en poscosecha de manzanas, peras y cítricos, mientras que el registro de la levadura afirma que se puede usar en varios vegetales, frutas y plantas ornamentales. Existen tres formulaciones comerciales que contienen *Pseudomonas syringae* cepa ESC-10 y dos, cuyo principio activo es *Pseudomonas syringae* cepa ESC-11, mientras que hay una sola formulación comercial que utiliza la levadura *Candida oleophila* I-182 como agente de biocontrol la cual se denomina Aspire (EPA, 2006d; EPA, 2006e). En Sud Africa existen dos formulaciones comerciales para biocontrol en poscosecha denominadas Avogreen (Körsten *et al.*, 1998) y YieldPlus. Avogreen está basada en una cepa de *Bacillus subtilis* aislado del filoplano de palta el cual se registró para su uso en el control de *Cercospora* y antracnosis en palta (Körsten *et al.*, 1998; Janisiewicz y Körsten, 2002). YieldPlus tiene como ingrediente activo una cepa de *Cryptococcus albidus* y

fue registrado en 1997 para su uso en manzanas y peras con el fin de controlar las podredumbres poscosecha causadas por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Mucor piriformis*. (ARC, 2006)

A pesar de que las formulaciones comerciales son pocas, existe mucha investigación en el control biológico de enfermedades poscosecha, en especial para el control de patógenos que penetran por heridas. La mayoría de los trabajos han encontrado bacterias y levaduras como controladores de patógenos en poscosecha. Sin embargo existen ejemplos que demuestran la capacidad de hongos del género *Trichoderma* como agentes de biocontrol en poscosecha. Por ejemplo Okigbo y Ikediugwu (2000) constataron que una cepa de *Trichoderma viride* era un efectivo agente de biocontrol para *Dioscorea* spp en mandioca. A su vez, Batta (2004) describe una formulación para la aplicación de una cepa de *Trichoderma harzianum* para el control de *Botrytis cinerea* en manzanas.

Se han descrito bacterias de varios géneros como controladoras de patógenos poscosecha. Por ejemplo, dos cepas de *Pantoea agglomerans* han sido identificadas, como buenos agentes de biocontrol. La efectividad de la cepa *Pantoea agglomerans* CPA-2 se ha demostrado en el control de *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en manzanas y peras (Nunes *et al.*, 2002a,b) y en el control de *Penicillium digitatum* en citrus (Plaza *et al.*, 2004). Por su parte, Bonaterra y colaboradores (2003) comprobaron que la cepa *Pantoea agglomerans* EPS125 actuaba como biocontrolador de las podredumbres poscosecha causadas por *Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer* en fruta de carozo. A su vez, se han encontrado cepas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacia* capaces de controlar patógenos poscosecha de manzanas (Janisiewicz y Körsten, 2002).

Como ejemplos de levaduras biocontroladoras de patógenos poscosecha se pueden citar cepas de *Aureobasidium pullulans* (Ippolito *et al.*, 2000; Garmendia *et al.*, 2005a) con demostrada efectividad sobre patógenos de manzana, cepas de *Metschnikowia pulcherrima* activa contra patógenos poscosecha de manzana (Kim *et al.*, 1997; Spadaro *et al.*, 2002) y *Metschnikowia fructicola*, capaz de biocontrolar el desarrollo de *Botrytis* en uva (Kurtzman y Droby, 2001) y cepas de *Cryptococcus laurentii* (Vero *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004) y *Candida sake* (Teixidó *et al.*, 1998), entre otras.

Como se aprecia en los ejemplos anteriores, existen estudios de diferentes grupos de investigación, que han encontrado cepas biocontroladoras pertenecientes a una misma especie, tanto en el caso de bacterias como de leva-

duras. A su vez, hay trabajos que demuestran que distintas cepas de la misma especie presentan diferente capacidad biocontroladora en un mismo patosistema. Es así que Schena y colaboradores (1999) demostraron que diferentes cepas de *Aureobasidium pullulans* tenían diferente actividad biocontroladora contra *Botrytis cinerea* en manzana. A su vez, Janisiewicz y colaboradores (2001) también encontraron diferente actividad para distintas cepas de *Metschnikowia pulcherrima*. Estos ejemplos demuestran que la capacidad biocontroladora se da a nivel de cepa. Por lo tanto, contar con un asilamiento perteneciente a una especie a la que pertenezcan cepas con reconocida capacidad biocontroladora, no asegura que el aislamiento sea un buen antagonista.

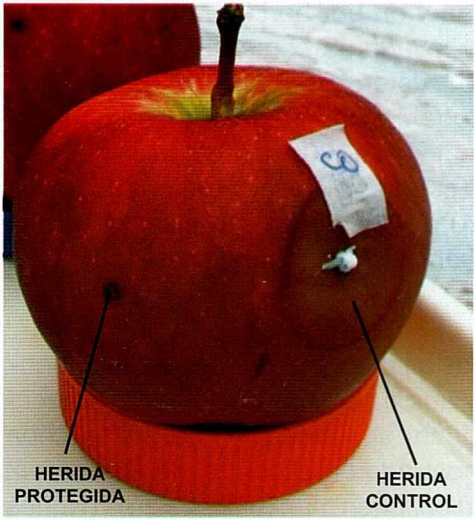


Figura 1. Manzana proveniente de un ensayo de biocontrol de *Penicillium expansum*. Para realizar el ensayo se inoculan 3 heridas con antagonista y patógeno y una herida solamente con el patógeno (herida control). El almacenamiento de la fruta tratada se realizó entre 0°C y 1°C por tres meses.

La mayoría de los trabajos mencionados trata del uso de microorganismos antagonistas para el control de patógenos poscosecha que infecten a través de heridas. En la mayoría de los casos, el porcentaje de protección es alto, llegándose casi siempre a valores mayores de 85%. Sin embargo, es importante destacar que se trata de protección en estrategias preventivas, es decir los antagonistas son capaces de impedir la infección siempre y cuando lleguen a la herida antes o al mismo tiempo que el patógeno. En varios trabajos se realizaron experimentos enfrentando sobre la fruta, a antagonistas y patógenos en diferentes momentos. Los resultados son contundentes, no hay protección si el patógeno llega antes a la herida (Fan y Tian, 2001; Okigbo y Ikediugwu, 2000; Zheng *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

7.3 Mecanismos de acción

Los microorganismos controladores de enfermedades poscosecha pueden actuar por varios mecanismos y en general, para una mismo antagonista en un mismo patosistema, son varios los mecanismos involucrados. Por ejemplo, las cepas de *Pseudomonas syringae* ESC-10 y ESC-11 son capaces de producir *in vitro* un antifúngico denominado syringomycina E, el cual en forma purificada es capaz de controlar por sí mismo la podredumbre causada

por *Penicillium digitatum* en limones. Sin embargo, no se ha podido aislar dicho antibiótico de las heridas de frutas inoculadas con las cepas biocontroladoras. Por otro lado, la capacidad de control de las mismas depende de un rápido crecimiento y colonización del sitio de acción, lo cual implicaría que la competencia es también, posiblemente, un mecanismo involucrado (Janisiewicz y Körsten, 2002).

En general los mecanismos de acción asociados con microorganismos biocontroladores en poscosecha han sido los siguientes:

- Amensalismo
- Micoparasitismo
- Competencia
- Inducción de resistencia

Sin embargo a partir de los estudios sobre hipovirulencia de *Botrytis cinerea* (Castro *et al.*, 2003) existe la posibilidad de intentar ensayos de biocontrol con cepas hipovirulentas del patógeno (Elmer y Reglinski, 2006).

Los ejemplos de amensalismo involucran antagonistas productores de sustancias antifúngicas y enzimas capaces de hidrolizar paredes de los hongos filamentosos patógenos. Como ejemplo del primer caso, se podría citar la producción de syringomycina E, descrita anteriormente, por las cepas *Pseudomonas syringae* ESC-10 y ESC-11, a pesar de que el antibiótico nunca se detectó en fruto. Otro ejemplo, es el de la cepa *Pseudomonas cepacia* LT-4-12W productora de pirrolnitrina capaz de controlar las podredumbres poscosecha causadas por *P. italicum* en citrus y el moho gris y moho azul en manzanas (Janisiewicz *et al.*, 1991; Smilanick y Denis-Arrue, 1992). A su vez, existen estudios que demuestran la producción de enzimas capaces de degradar paredes celulares de los patógenos, tales como quitinasas, glucanasas y proteasas. Se ha demostrado que cepas de *Aureobasidium pullulans* biocontroladoras son capaces de producir estas enzimas (Castoria et al., 2001; Garmendia et al., 2005a), sin haberse detectado unión de las levaduras al patógeno. Por su parte, el trabajo de Bar-Shimon y colaboradores (2004) estudió el rol de la ß1,3 glucanasa en el biocontrol ejercido por la cepa de *Candida oleophila,* base del producto comercial Aspire. En dicho trabajo se demostró que la cepa biocontroladora era capaz de producir la enzima *in vitro* en presencia de paredes del patógeno (*Penicillium digitatum*) y también en heridas de pomelo. A su vez, se comprobó que la cepa salvaje y una mutante, construida de forma que la producción de la enzima se sobreexpresara, tenían ambas, el mismo efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo del patógeno,

pero que dicho efecto era significativamente mayor que el de una mutante que no expresaba la enzima. Sin embargo, en heridas de fruta no se detectaron diferencias significativas entre la capacidad biocontroladora de la cepa salvaje y las dos mutantes cuando la concentración de los antagonistas aplicada en las heridas, fue elevada. A concentraciones más bajas, en cambio, la mutante no productora mostró menor eficiencia biocontroladora. Según los autores, estos resultados demostraron el rol de la enzima en el biocontrol, pero sugirieron que el mismo estaría vinculado a la acción de otras enzimas como quitinasa y proteasas, también producidas por la cepa y que por supuesto había involucrados otros mecanismos de acción, tales como la competencia.

Otros estudios, tales como el de Wisniewski y colaboradores (1991) demostraron una adhesión del antagonista (*Pichia guillermondii*) al patógeno (*Botrytis cinera*), lo cual estaría involucrando el micoparsitismo en el mecanismos de acción de este agente de biocontrol.

Varios trabajos postulan la competencia por nutrientes o espacio, como posible mecanismo de biocontrol en poscosecha. El trabajo de Kim y colaboradores (1997) demostró que dos cepas de *Metschnikowia pulcherrima* capaces de controlar las podredumbres ocasionadas por *Botrytis cinera* en heridas de manzana, actuaban por competencia de nutrientes. Por su parte Vero y colaboradores (2002) demostraron que dos cepas biocontroladoras identificadas como *Cryptococcus laurentii* y *Candida ciferrii* no ejercían el biocontrol cuando *Penicillium expansum* se adicionaba en las heridas de manzana junto con una fuente de nitrógeno. Esto sugería que la competencia por la fuente de nitrógeno estaba involucrada en la actividad biocontroladora. Janisiewicz y colaboradores (2000) idearon un método para verificar la competencia por nutrientes como mecanismo de biocontrol. Este método realiza cultivos utilizando una membrana de difusión para separar antagonista de patógeno. Mediante este método se demostró que la competencia por nitrógeno estaba involucrada en el biocontrol de *P. expansum* por parte de la levadura *Aureobasidium pullulans* en heridas de manzana y que el antagonista consumía los aminoácidos necesarios para la germinación de las conidias del patógeno, la cual se veía inhibida.

Se ha demostrado, además, que ciertos microorganismos antagonistas utilizados en el control de enfermedades poscosecha son capaces de inducir respuestas de resistencia en el hospedero. Por ejemplo, Ippolito y colaboradores (2000) demostraron que la cepa *Aureobasidium pullulans* L47 era capaz de inducir la producción de enzimas (quitinasas, glucanasas y peroxidasa) en heridas de manzana, donde dicha cepa era aplicada. La producción de

enzimas por parte del hospedero comenzaba 24 horas después de la aplicación del antagonista y llegaba a un máximo luego de 96 horas de aplicado. A su vez, El-Gaouth y colaboradores (2003), estudiaron la inducción de resistencia causada por la inoculación en heridas de manzana, de la levadura biocontroladora *Candida saitoana*. Al aplicar la levadura en una herida, se inducía la protección contra el patógeno (*Botryitis cinerea*) en una herida contigua, separada aproximadamente 2 cm de la tratada. La protección ocurría solamente después de 48 horas de aplicado el antagonista en la herida contigua, demostrando que era necesario un determinado lapso de tiempo para inducir la respuesta. El trabajo de Droby y colaboradores (2002) evidenció que la aplicación de la levadura *Candida oloephila* en heridas de pomelo inducía la resistencia a *Penicillium digitatum* en zonas cercanas a la herida, 24 horas después de la aplicación. Además, relacionó esta resistencia a la inducción de producción de etileno, de la enzima fenilalanina amonio liasa, de la biosíntesis de fitoalexinas y glucanasas.

7.4 Métodos de selección

Para desarrollar un método de control biológico para un patógeno poscosecha se deberían seguir los pasos ya discutidos en el capítulo 3.

Como primer paso sería necesario conocer el patosistema y de suma importancia realizar la selección de las cepas de patógenos a utilizar para los ensayos de biocontrol. Se deberían seleccionar cepas locales agresivas para realizar los ensayos. Francés y colaboradores (2006) mostraron la dependencia entre la agresividad del patógeno y la eficiencia del biocontrol de la cepa *Pantoea agglomerans* EPS 125 en diferentas frutas. Demostraron que la eficiencia de la cepa biocontroladora variaba de 7 a 25000 ufc/espora de patógeno y que la misma dependía de la agresividad del patógeno. La agresividad de los patógenos puede ser variable. Wozniak (2003) demostró que cepas nativas de *P. italicum* presentaban distintos grados de agresividad sobre fruta, pudiendo definir 4 grupos significativamente diferentes. Pianzzola y colaboradores (2004) también encontraron diferencias de agresividad en cepas de *P. expansum*, patógenos de manzana.

Para realizar el aislamiento y selección de los agentes de biocontrol se deberían seguir los criterios planteados en el capítulo 5. El método de aislamiento debería tratar de recuperar solamente los potenciales biocontroladores, de modo de minimizar la pruebas de selección sobre fruto, que son muy laboriosas e insumen muchos recursos. Es así que, se han utilizado diferentes estrategias para el aislamiento de microorganismos destinados al biocontrol en el almacenamiento poscosecha, basándose por ejemplo, en la capacidad de

los mismos de crecer en el sitio de acción (por ejemplo heridas de fruta) y ser capaces de proliferar en las condiciones de almacenamiento (0°C a 1°C para manzanas).

A partir de todos los microorganismos aislados se realiza la selección de los posibles biocontroladores. La selección final siempre depende del ensayo sobre el producto cosechado. Este ensayo es en general muy laborioso ya que se necesitan muchas repeticiones para poder asegurar un tratamiento estadístico de los resultados. Es por ello que muchas veces se recurre a selecciones primarias más sencillas de realizar. Un ejemplo sería la selección basada en la incapacidad de crecimiento a 37°C, lo cual descartaría la posibilidad de que se tratara de un microorganismo capaz de proliferar en el cuerpo humano, otro ejemplo, sería seleccionar según la capacidad de crecer en determinada atmósfera si se piensa aplicar el antagonista en un almacenamiento con atmósfera controlada, o la capacidad de desarrollarse en presencia de determinados fungicidas o asociado a otros tratamientos si se piensa en un control integrado.

A continuación se mostrará un ejemplo de aislamiento y selección realizado en nuestro laboratorio. Para buscar antagonistas capaces de inhibir el desarrollo de *P. italicum* en naranjas, se realizaron dos estrategias de aislamiento. En primer lugar se aislaron los microorganismos de la superficie de frutos sanos recién cosechados, realizando el aislamiento en medio no selectivo a 25°C. De esta forma se obtuvieron 120 aislamientos diferentes los cuales fueron seleccionados por su capacidad de crecer a 5°C (temperatura de almacenamiento de naranjas). A partir de esta selección se obtuvieron 49 aislamientos con los cuales se realizaron los ensayos de control biológico sobre fruta. Solamente 1 de los aislamientos ensayados, fue capaz de controlar la incidencia de la enfermedad en más del 80% (Wozniak, 2003). Al año siguiente se optó por una nueva técnica de aislamiento. Se aisló la microflora superficial de fruta que había estado almacenada durante 1 mes a 5°C. Para el aislamiento se utilizó un medio no selectivo, pero se utilizó la temperatura de incubación como forma de selección. Es así que las placas sembradas con el agua de lavado obtenida de la fruta, fueron incubadas a 5°C por 14 días de forma de recuperar solamente aquellos microorganismos capaces de crecer en forma más o menos rápida e la temperatura de almacenamiento de la fruta a la cual deberían proteger. De esta selección se obtuvieron solamente11 aislamientos con los cuales se realizaron ensayos de biocontrol sobre fruta, utilizando como patógeno una cepa agresiva de *P.italicum*. El almacenamiento de la fruta inoculada se realizó a 5°C durante 1 mes. La Figura 2 muestra el diámetro promedio de la podredumbre (severidad) en las heri-

das inoculadas solo con el patógeno (control) y con el patógeno y las cepas aisladas (PL1 a PL11).

Con los aislamientos que mostraron mejor capacidad biocontroladora se realizaron nuevos ensayos utilizando un número mayor de frutos, confirmándose la capacidad de las cepas PL1 y PL9 que redujeron la incidencia de ataque en mas de 85%, luego de un mes a 5ºC y 72 horas a 25ºC (Vero *et al.*, 2003). De esta forma se comprueba como un aislamiento mejor dirigido, minimiza el trabajo y aumenta la posibilidad de obtener buenos resultados.

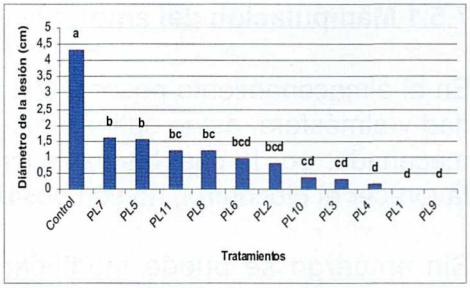


Figura 2. Severidad de enfermedad causada por *P.italicum* en heridas de naranja inoculadas según los distintos antagonistas utilizados.

Figura 3. Ensayo de biocontrol de *P.italicum* en naranjas

La Figura 3 muestra uno de las bandejas utilizadas en el ensayo de biocontrol y la Figura 4 muestra un acercamiento de una de las naranjas del ensayo.

El ensayo se realizó inoculando 4 heridas realizadas artificialmente en la zona ecuatorial de la fruta. Tres de las heridas se inocularon con antagonista y patógeno y la herida restante se utilizó como control, y fue inoculada solamente con el patógeno. En la Figura 4 se pueden apreciar una herida control y una herida protegida.

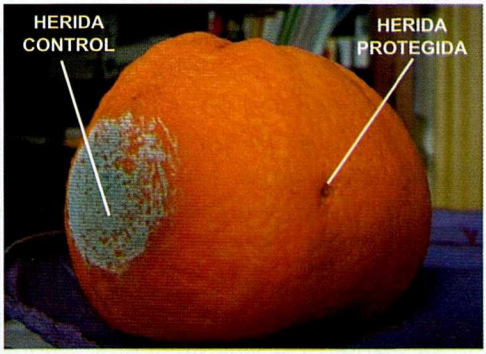


Figura 4. Acercamiento mostrando una de las naranjas del ensayo

7.5 Potenciación del biocontrol en poscosecha

Como forma de potenciar la acción de los microorganismos antagonistas aplicados para control de patógenos poscosecha, se discutirán tres métodos: la manipulación del ambiente de almacenamiento, el uso de mezclas de antagonistas y la integración con otros métodos de control.

7.5.1 Manipulación del ambiente

En el almacenamiento poscosecha las condiciones de temperatura, humedad y atmósfera, están optimizadas para mantener la calidad de la fruta almacenada, por lo cual las variaciones de estas condiciones, de forma de favorecer el biocontrol, no son posibles.

Sin embargo se puede modificar el microambiente donde se dará el biocontrol, por ejemplo, las heridas en las frutas. De esta forma, se podría agregar el agente de biocontrol con diferentes sustancias que potencien su acción. Un ejemplo de este tipo de potenciación se encuentra en el trabajo de Janisiewicz y colaboradores (1992). En dicho trabajo se demostró el agregado de ciertos aminoácidos (L-asparragina y L-prolina) potenciaban el biocontrol ejercido por *Pseudomonas syringae* sobre *Penicillium expansum* en manzanas. Ambos aminoácidos podían ser utilizados por el antagonista pero no por el patógeno. Se demostró que el crecimiento de ambos microorganismos en heridas de manzanas estaba limitado por la fuente de nitrógeno. Por lo tanto, el agregado de estos aminoácidos aumentaba la población de antagonistas, pero no la del patógeno en las heridas potenciando de esa forma el biocontrol.

Otro ejemplo se puede encontrar en el trabajo de Calvente y colaboradores (1999) donde se potenció el biocontrol de una cepa de *Rhodotorula glutinis* por el agregado de ácido rodotorulico purificado en conjunto con el antagonista. El ácido rodotorulico es un sideróforo producido por la levadura antagonista. Como todo sideróforo cuando es liberado en un medio, quela el escaso hierro del sitio de acción, formando un complejo con el mismo. Dicho complejo puede ser captado por la levadura productora, pero no por el patógeno. De esta forma, y a menos que el patógeno produzca un sideróforo con mayor afinidad por el hierro, la falta de dicho elemento impedirá el desarrollo del patógeno.

El agregado de cloruro de calcio también puede potenciar el biocontrol. Según el trabajo de Wisniewski y colaboradores (1995) concentraciones crecientes de calcio inhibían la germinación y el desarrollo de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, y también las poligalacturonasas que son factores de virulencia de estos patógenos de manzana. En su trabajo encontraron, además, que la levadura antagonista *Pichia guillermondii* era capaz de crecer en concentraciones de calcio inhibitorios para los hongos patógenos, de forma que el agregado de sales de calcio potenciaba el biocontrol ejercido por este antagonista.

7.5.2 Uso de mezclas de antagonistas

En ciertos casos se han descrito mezclas de microorganismos antagonistas compatibles cuya actividad en conjunto supera su capacidad antagónica individual. Es el caso, por ejemplo, del trabajo publicado por Janisiewicz y Bors (1995) en el cual se describe el uso de una mezcla de una cepa bacteriana y una cepa de levadura para controlar el moho azul en manzanas, ocasionado por *Penicillium expansum*. Con el uso de una mezcla 50%-50% de una cepa de *Pseudomonas syringae* (L 59-66) y una cepa de *Sporobolomyces roseus* (FS 43-238) se lograba un control significativamente mayor que con el uso de cada antagonista por separado. Los autores afirman que se trata de un aumento aditivo y lo comparan con el aumento sinérgico descrito por Limanceau y colaboradores (1992) para la mezcla de antagonistas utilizado para controlar el daño causado por *Fusarium oxysporum* en clavel. En este caso se utilizó como antagonista una mezcla de *Pseudomonas putida* y una cepa no patógena de *Fusarium oxysporum*. La bacteria de este ejemplo, producía un sideróforo (pseudobactina) que reducía el hierro disponible. Como la cepa patógena de *Fusarium* era más dependiente de la disponibilidad de hierro que la cepa no patógena, la presencia del sideróforo favorecía el desarrollo de esta última.

A su vez el trabajo de Nunes y colaboradores (2002b), muestran la integración de una levadura (*Candida sake*) y una bacteria (*Pantoea agglomerans*) en el control biológico de *P.expansum* y *B. cinerea* en peras almacenadas a 1°C durante 60 días. La mezcla 50%-50% de cada una de las cepas resultó en valores de protección significativamente mayores que los logrados por cada una por separado. Sin embargo existen ejemplos donde la actividad de la mezcla es inferior que la de uno de sus componentes. En el caso del control biológico de *P.expansum* en manzanas, el biocontrol logrado por la levadura *Candida ciferrrii* resultó significativamente mayor que el logrado por una mezcla 50%-%50% con una cepa de *Cryptococcus laurentii* con buena capacidad biocontroladora pero significativamente menor que la de la cepa de *Candida* (Vero *et al.*, 2002). Para suponer que una mezcla de antagonistas será efectiva se deberían conocer los mecanismos de acción y el perfil nutricional de los microorganismos que componen la mezcla. De esta forma se podría predecir si la presencia de ambos, en forma conjunta, sobre la fruta resultará en una potenciación o en un detrimento del biocontrol.

7.5.3 Control Integrado

Según Lewis y Papavizas (1991) el control integrado se puede definir como un control flexible, con una aplicación multidimensional, que integra distintos

tipos de control tales como el control biológico, físico y cultural junto con las estrategias necesarias de control químico para la restricción de enfermedades; manteniendo la viabilidad económica, sin dañar el agroecosistema.

Este tipo de control trata de complementar la racionalización del control químico en las técnicas de lucha dirigida, con métodos naturales que satisfagan a la vez exigencias económicas, ecológicas y toxicológicas (Nuñez, *et al.* 1998).

En el esquema de un control integrado se pueden utilizar en forma sucesiva o conjunta al control biológico, varios tipos de control, entre ellos control cultural, control físico, control genético y control químico (Vero y Mondino, 2002). Dentro de la medidas de control físico aplicables a la poscosecha se pueden citar el uso del calor y las radiaciones no ionizantes (UV).

Varios trabajos han demostrado la efectividad de la radiación UV (260-280nm) en el control de patógenos postcosecha. Por ejemplo, el trabajo de Nigro y colaboradores (1998) comprobó que después de 24 horas de un tratamiento con radiación UV sobre uvas, se lograba una protección del 50% de las mismas contra el ataque del patógeno *Botrytis cinerea*. La protección disminuía a medida que pasaba el tiempo, llegándose a valores iguales al control luego de 144 horas de haber realizado el tratamiento con UV. El patrón de protección estaba de acuerdo con una inducción de resistencia.

Si bien la radiación UV utilizada puede tener efectos letales sobre los microorganismos debidos a daños en el ADN, en realidad se plantea que la acción de protección sobre los vegetales cosechados se debe a una inducción de resistencia en los mismos y no a una acción germicida. Se debe tener en cuenta, que la radiación UV es muy poco penetrante y que la acción germicida sólo se podría dar en la superficie del fruto expuesta la radiación. Por su parte, El-Ghaouth y colaboradores (2003) demostraron que luego de tratamiento de duraznos con radiación UV se inducía la formación de las enzimas fenilalanina amonio liasa, quitinasa y glucanasa vinculadas a la resistencia en fruto. Stevens y colaboradores (1997) comprobaron que el tratamiento secuencial de radiación UV y levaduras biocontroladoras (*Debaryomyces hansenii*) potenciaba el control de *Monilinia fructicola* en duraznos, llegándose a valores de protección del 88% similares a los logrados con el uso de fungicida.

Los tratamientos a temperaturas elevadas también han resultado eficaces en el control de enfermedades poscosecha. Los métodos utilizados son el curado y el tratamiento con agua caliente. El curado consiste en almacenar

el producto cosechado durante determinado lapso de tiempo en presencia de aire caliente. En general los períodos de almacenamiento son de uno a varios días y las temperaturas utilizadas son de alrededor de 37°C . El tratamiento con agua caliente se puede realizar por inmersión o aspersión del producto cosechado durante períodos cortos, de segundos de duración, a temperaturas más altas, en el entorno de los 55°C. Las temperaturas y los períodos de tratamiento dependen del producto a proteger y en general leves aumentos en el tiempo o la temperatura pueden traer consecuencias drásticas en la calidad de la fruta. Ambos procesos han resultado exitosos como tratamiento curativo de heridas ya infectadas por patógenos poscosecha. El efecto es curativo, no preventivo y no existe efecto residual. Los trabajos de Fallik y colaboradores (1995) y Leverentz y colaboradores (2003) son ejemplos de estudios en los cuales se utilizan tratamientos térmicos para evitar las podredumbres poscosecha en manzanas Golden Delicious. A su vez, se ha utilizado con éxito el tratamiento de distintos frutos por aspersión con agua caliente combinado con el uso de cepillos (Fallik, *et al.*, 1999; Fallik, *et al.,* 2000; Porat *et al*, 2000). De esta forma se ha logrado un mayor control de las podredumbres en mango, pimientos y citrus. También se ha demostrado la inducción de respuestas de resistencia en los distintos frutos tratados, tales como la aparición de quitinasas y glucanasas luego del tratamiento y la inhibición de enzimas vinculadas a la maduración tales como las poligalacturonasa (Schirra *et al.*, 2000). Por otro lado los tratamientos térmicos tienen un efecto beneficioso sobre determinado tipos de frutos otorgándoles resistencia al daño por frío. Ferguson y colaboradores (2000) comprobaron que este efecto se da en manzanas y atribuye un papel importante a las denominadas proteínas de heat-shock, que aparecen luego del tratamiento.

Los tratamientos térmicos, también han sido utilizados con éxito en combinación con microorganismos biocontroladores en estrategias simultáneas o sucesivas (Conway *et al.*, 2004, Leverentz *et al.*, 2003). La utilización de un tratamiento secuencial con calor y microorganismos antagonistas sería una opción para lograr una curación de las heridas infectadas previo al tratamiento (calor) y una prevención de la infección en el almacenamiento (microorganismos antagonistas). Es así que Conway y colaboradores (1999) describen un tratamiento secuencial para manzanas consistente en un curado a 38°C por cuatro días con posterior tratamiento con cloruro de calcio y la bacteria antagonista *Pseudomonas syringae*. El tratamiento integrado fue significativamente mejor en el control de *Penicillium expansum,* que los tratamientos por separado.

El uso de control biológico se puede integrar también con el uso de sustancias químicas, de origen natural, escaso riesgo toxicológico. Se han realizado ex-

periencias con el uso del bicarbonato de sodio y el ácido acético como curativos para heridas de citrus infectadas con *P.italicum* (Garmendia *et al.*, 2005b). La Figura 5 muestra las heridas curadas por tratamiento con bicarbonato de sodio al 3% en agua. Las heridas se inocularon con suspensiones de esporas de *P.italicum* y *P.digitatum* y se dejaron secar a temperatura ambiente por 2 horas. Pasado ese lapso, las frutas se sumergieron en solución de bicarbonato al 3% y se almacenaron durante 1 mes a 5ºC (condiciones de almacenamiento de las naranjas). Los resultados fueron muy alentadores, sólo el 20% de las heridas tratadas mostró síntomas de podredumbre causada por *P. digitatum* y sólo el 6% se vio afectada por *P. italicum*. Smilanick y colaboradores (1999) demostraron que el uso de bicarbonato al 3% junto con la cepa *Pseudomonas syring*ae ESC-10 fue superior en el biocontrol del moho verde de los citrus que los dos tratamientos por separado.

Figura 5. Naranja con heridas inoculadas con *P. tialicum* y luego tratada por inmersión con bicarbonato de sodio al 3%

Otras sustancias naturales utilizadas en control de patógenos poscosecha son el quitosano y derivados. El quitosano es la forma desacetilada de la quitina y según el método de obtención puede presentar varios grados de desacetilación. Presenta por sí mismo actividad antifúngica y es capaz de formar sobre la fruta tratada films poco permeables al oxígeno. A su vez se ha demostrado que es un inductor de resistencia en la fruta tratada. Existen trabajos combinando el uso del quitosano con microorganismos antagonistas para el biocontrol de enfermedades poscosecha. Por ejemplo se demostró que el uso de glicolquitosano al 0.2% junto con la levadura *Candida saitoana* lograba un alto nivel de protección en citrus y manzana contra *P. digitatum* y *P.expansum* respectivamente. El control alcanzado resultaba significativamente mayor que el logrado por cada tratamiento por separado (El-Ghaouth et al., 2000).

También existen ejemplos de control integrado utilizando control biológico y control químico en dosis menores que las habituales. Por ejemplo, Chand-Goyal y Spotts (1996) encontraron que la aplicación en conjunto de las levaduras antagonistas *Cryptococcus laurentii* HRA5 y *Rhodotorula glutinis* HRB6 con bajas dosis de tiabendazol (15ppm) resultaba más efectivo para el control del moho azul en peras, que el uso del fungicida solo a concentraciones

de uso comercial (525 ppm). Por su parte, Arras y colaboradores (2002) estudiaron la aplicación de las levaduras antagonistas *Pichia guilliermondii* y *Candida oleophila* con bajas dosis de tiabendazol (0.1 a 1.2 g/l), logrando una protección significativamente mayor que al usar cada uno de los antagonistas por separado.

7.6 Conclusiones

El control biológico en poscosecha es posible, sin embargo no ha alcanzado todavía el desarrollo comercial que correspondería a la vasta investigación en el tema.

Debe recordarse que este tipo de control es factible siempre y cuando se utilice en el contexto de un manejo adecuado, integrado con otros métodos de control, y que se caracteriza por ser un control preventivo, incapaz de curar infecciones preestablecidas.

Un factor de suma importancia para el éxito de este método de control, es lograr una adecuada aplicación, para lo cual es fundamental la formulación del producto que permita a los antagonistas acceder y de esa forma colonizar los sitios de acción.

CAPÍTULO 8

Control biológico de la fusariosis del trigo.

Mónica Cabrera[1]

8.1.- Introducción.

La fusariosis de la espiga es una enfermedad que afecta principalmente al trigo y a la cebada y es provocada por distintas especies del género *Fusarium*. En trabajos anteriores, se determinó que en Uruguay, la amplia mayoría de las cepas aisladas de trigo pertenecen a la especie *Fusarium graminearum*, anamorfo de *Gibberella zeae*. Se demostró además, que todas las cepas aisladas pertenecientes a esta especie, son productoras de tricotecenos, del quimiotipo productor de deoxinivalenol (DON) (Garmendia, 2002; Pereyra *et al.*, 2005).

En los últimos años ha habido una creciente preocupación debido a la contaminación de granos y de harinas con micotoxinas, especialmente deoxinivalenol (DON), y a las pérdidas económicas que dicha contaminación ha ocasionado. Esto llevó a que en el año 2001 el Ministerio de Salud Pública estableciera un máximo permitido de DON de 1 ppm en subproductos de trigo para consumo humano (Decreto 533/01).

El ciclo de la enfermedad se esquematiza en la Figura 1. Es importante resaltar que el órgano de la planta susceptible a la penetración del patógeno es la flor (sitio de infección). Luego de que *Fusarium* germina en alguna de las florecillas es posible la colonización de flores o granos en formación adyacentes, por lo que puede llegar a afectar a toda la espiga. Esta etapa se denomina fase parasitaria, y es cuando se ven las espigas infectadas con zonas blanquecinas por lo que se habla de blanqueamiento de espigas.

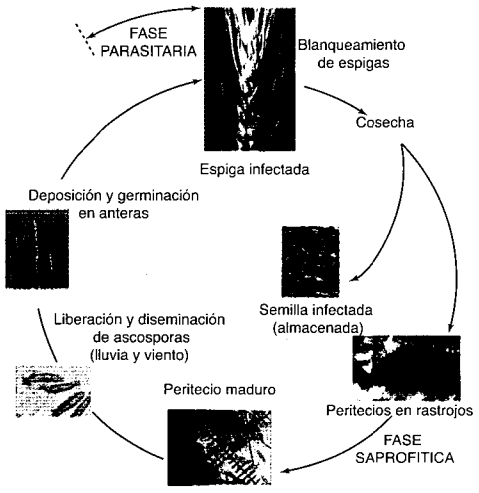


Figura 1- Ciclo de la fusariosis del trigo.

[1]Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias. Facultad de Química. UdelaR.

Las actuales prácticas agrícolas llevan a que en el momento de la cosecha se dejen en el campo los rastrojos. Éstos permiten la supervivencia de *Fusarium* en forma saprofítica observándose la formación de micelio y de peritecios que al madurar liberan ascosporas que son diseminadas por el viento y la lluvia hasta nuevos sitios de infección cerrando de esta manera el ciclo. Como se ve en la Figura 1 existe también la posibilidad de que el patógeno afecte a las raíces de las nuevas plantas provocando la pudrición de las mismas.

Los mecanismos de defensa del trigo son muy complejos lo cual ha llevado a que hasta el momento no se haya logrado obtener cultivares resistentes de calidad agrícola. Por otro lado, el uso de fungicidas convencionales no ha dado los resultados esperados en el control del *Fusarium,* lo que hace que el control biológico se presente como una alternativa interesante para complementar las prácticas tradicionales. Si bien no existe hasta el momento ningún producto comercial, el desarrollo en la investigación a nivel mundial es amplio y ha demostrado la posibilidad del uso de agentes de biocontrol para esta enfermedad.

En este sentido, se han desarrollado estrategias de control de inóculo primario en rastrojos con el uso de *Trichoderma harzianum* (Fernández, 1992) o *Microsphaeropsis sp.* (Bujold *et al.*, 2001) . Hongos de estos géneros han sido efectivos en controlar el desarrollo de peritecios sobre rastrojos infectados. Es conocida su capacidad de producir quitinasas y glucanasas capaces de provocar daños en las paredes celulares de otros hongos, y también su habilidad para producir celulasas que podrían contribuir a la degradación más rápida de los rastrojos en el campo.

Otros trabajos en control biológico han apuntado a proteger el sitio de infección. Perondi y colaboradores (1996) demostraron buenos resultados en el biocontrol de fusariosis aplicando antagonistas en plantas en estado de floración, en Brasil. En los últimos años se destacan los trabajos de Khan *et al.*(1998, 2001, 2004) y de da Luz *et al.* (2004). Estos grupos han aislado microorganismos capaces de colonizar eficientemente los sitios de infección y protegerlos frente al ataque de *Fusarium* patógenos. Se ha logrado reducir los niveles de incidencia de la enfermedad en cultivo en invernáculo del 90% al 6% utilizando una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* como biocontrolador (Khan, 2001). La experiencia ha sido exitosa también a nivel de campo (Schisler *et al.*, 2002, Khan *et al.*, 2004), lográndose en el último caso niveles de protección del orden del 50 al 60%.

También se han ensayado estrategias de manejo integrado en planta utilizando microorganismos seleccionados como biocontroladores de la enfer-

medad, junto con fungicidas (tebuconazol) (da Luz *et al.*, 2004). En este caso se logró una disminución de hasta 86% en la incidencia de la enfermedad y un aumento significativo del rendimiento de grano en comparación con un testigo sin tratamiento.

Los microorganismos utilizados como biocontroladores han sido bacterias tales como cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pantoea agglomerans* (da Luz *et al.*, 2004) y levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus* y *Candida* (Khan *et al.*, 2001). Las estrategias finales de selección se basan siempre en ensayos de protección en plantas. Sin embargo estos ensayos son muy laboriosos y necesitan de varias repeticiones, por lo cual se han llevado adelante estrategias de preselección para microorganismos controladores. Khan y colaboradores (1998) preseleccionaron microorganismos capaces de crecer en presencia de tartrato de colina o betaína como única fuente de carbono. La presencia de colina y betaína en anteras de flores de trigo fue detectada por Strange y Smith (1978), demostrando que estimulaban el crecimiento de *Gibberella zeae*.

La eficiencia de los agentes biocontroladores depende de la cepa de patógeno utilizada para los ensayos. Esto fue demostrado por Khan y colaboradores (2001) quienes trabajaron con tres cepas de *Gibberella zeae* de diferente agresividad. En su trabajo se muestra que la acción de los biocontroladores ensayados era máxima cuando se utilizaba la cepa de patógeno menos agresiva. En ese caso, la incidencia de enfermedad utilizando el mejor antagonista bajaba de 66% en el control a 3% en plantas protegidas, mientras que si se utilizaba la cepa de patógeno más agresiva, la incidencia de enfermedad disminuía de 95% en el control a 63% en plantas tratadas. Es importante, entonces, en la selección de antagonistas, realizar los ensayos de biocontrol utilizando una cepa de patógeno seleccionada por su agresividad.

8.2.- Estrategia

Conociendo el ciclo de la enfermedad y los antecedentes de trabajos de biocontrol, se plantea el aislamiento y selección de cepas nativas, adaptadas a nuestras condiciones para el control biológico de esta enfermedad en Uruguay.

Según se desprende del ciclo de la enfermedad los puntos clave donde se podría actuar con control biológico serían:

- la fase de sobrevivencia saprofítica de *Fusarium*, ya que ésta es la fuente de inóculo primario para la posterior infección de las plantas.

- el momento de la floración del trigo, que es un período de corta duración en el cual las anteras están expuestas y es el sitio de ingreso del patógeno.

En el primer caso sería necesario encontrar un agente de control biológico que permita eliminar o disminuir cuantitativamente el inóculo primario.

En el segundo, sería necesario encontrar un agente de control biológico que actúe como protector de las flores e impida el ingreso o la germinación de *Fusarium* en las flores.

Los pasos a seguir en una primera instancia, serán los siguientes:
- Aislamiento, identificación y selección de cepas del patógeno de granos de trigo
- Aislamiento, identificación, caracterización y selección de posibles antagonistas de rastrojo de trigo.
- Aislamiento, identificación, caracterización y selección de posibles antagonistas de flores de trigo.

8.3.- Aislamiento, identificación y selección del patógeno.

A partir de muestras de semillas de trigo de diferentes zonas de Uruguay, se procedió a aislar cepas de *Fusarium* para obtener una colección representativa de las cepas presentes en nuestro país. Para ello se realizó una desinfección superficial de las semillas mediante la inmersión en solución de hipoclorito, un enjuague con agua estéril y posterior incubación sobre papel de filtro húmedo en placas de Petri a 25 °C. En las semillas contaminadas se observó el crecimiento de micelio de *Fusarium,* el cual fue reaislado en PDA, realizándose finalmente cultivos monospóricos para obtener aislamientos puros.

8.3.1.-Identificación

Luego de contar con una colección de cepas se procedió a su identificación a nivel de especie, basándose en características fenotípicas y herramientas de biología molecular.

La identificación fenotípica se realizó según la clave de Nelson, y la identificación molecular se hizo mediante el uso de primers específicos para especie, además se diseñó una técnica RAPD que permitió discernir entre las distintas especies.

Del total de cepas estudiadas el 96 % pertenecía a *Fusarium graminearum*, un 2 % a *F. verticillioides*, un 1 % a *F. austroamericanum* y otro 1 % a *F. cortateriae* .

8.3.2.- Selección del patógeno

Para llegar a obtener un buen agente de control biológico es necesario realizar diversos ensayos de antagonismo contra las cepas de patógeno más agresivas, por lo que resulta imprescindible seleccionar algunas cepas del patógeno que presenten características sobresalientes sobre el resto.

En este caso especial, en el que se busca controlar la enfermedd en dos puntos del ciclo se seleccionaron dos cepas diferentes del patógeno. En el caso en que se busca controlar el crecimiento saprofítico y la formación de peritecios de *Gibberella zeae* sobre el rastrojo, se priorizó a las que presentaron una alta formación de peritecios y ascosporas *in vitro* sobre este sustrato, mientras que para las pruebas de protección del sitio de infección se tomó en cuenta principalmente su agresividad en ensayo semicontrolado sobre plantas de trigo en invernáculo para seleccionar las cepas. Otras características importantes que se tuvieron en cuenta para la selección de dichas cepas fue su capacidad de producir DON *in vitro* y la sensibilidad a distintos fungicidas de uso convencional.

Conjugando estas características se llegó a la selección de las cepas de *Fusarium graminearum* con las que se realizarían los ensayos posteriores contra los posibles antagonistas.

8.4.- Aislamiento, identificación, caracterización y selección de posibles antagonistas de *rastrojo de trigo*.

La búsqueda se orientó desde un principio hacia cepas del género *Trichoderma*, ya que se cuenta con vasta bibliografía que avala las bondades de cepas de este género como agentes de control biológico contra diversos patógenos de plantas (ver capítulo 3). Los hongos de este género tienen un conocido potencial como micoparásitos, por lo cual se pensó que podrían degradar las estructuras del patógeno presentes en los rastrojos. Los mecanismos de acción de hongos de este género se basan en la producción de enzimas capaces de degradar paredes fúngicas y en la producción de sustancias antifúngicas.

Se aislaron 16 cepas nativas de *Trichoderma spp*. de muestras de rastrojo de trigo de distintas zonas del país. Para ello se realizó un enjuague de las muestras con suero fisiológico en envase estéril con agitación, luego se sembraron las diluciones correspondientes en superficie en placas de PDA conteniendo cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias. Las colonias de *Trichoderma* se reaislaron en PDA y pos-

teriormente se realizaron cultivos monospóricos para la obtención de aislamientos puros.

8.4.1.-Identificación

Se realizó la identificación fenotípica de las cepas usando la clave de Samuels (2006). Luego se procedió a confirmar la identidad de las cepas mediante técnicas moleculares analizando la secuencia del producto de PCR obtenido por amplificación de la región ITS1-ITS4 del ADN ribosomal, comparándola con bases de datos (GENBANK).

Es de especial importancia una correcta identificación a nivel de especie ya que dentro del género *Trichoderma* han sido reportados los subgrupos Th2 y Th4 pertenecientes al grupo *T. harzianum,* causantes de grandes pérdidas en la producción de hongos comerciales en el hemisferio norte (Samuels *et al.*, 2002). Estos subgrupos, ahora denominados *T. aggressivum* f. *aggressivum* (Th4) y *T. aggressivum* f. *europaeum* (Th2), son patógenos de hongos comestibles por lo que no deberían ser usados en control biológico, especialmente cuando se piensa en una diseminación masiva en grandes extensiones, como en este caso. Debería evaluarse el riesgo de contaminación de plantas productoras cercanas al sitio de liberación del *Trichoderma* biocontrolador y la persistencia y alcance del inóculo utilizado. Los resultados de la identificación a nivel de especie se muestran en la Figura 2, la mayoría de las cepas pertenecen a *Trichoderma koningii* (cepas 1, 4, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15), seguido por *T. atroviride* (cepas 8, 12 y 16) y finalmente *T. harzianum* (cepas 4 y 6) y *T. longibrachiatum* (cepas 2 y 3). Ninguna de las cepas pertenece a los grupos Th2 o Th4.

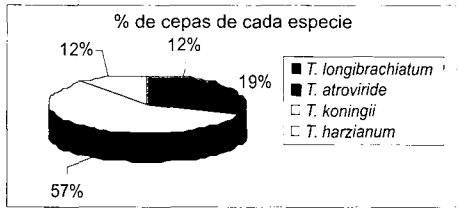


Figura 2. Distribución en las distintas especies de las 16 cepas de *Trichoderma* aisladas.

Las cepas 2 y 3 que pertenecen a la especie *T. longibrachiatum* no serán consideradas como posibles antagonistas para ser usadas en control biológico pues esta especie se caracteriza por un rápido crecimiento y esporulación a altas temperaturas (hasta 40 °C), lo que podría ser un riesgo para la salud humana, reportándose incluso cepas aisladas de individuos inmunodeprimidos (Kredics *et al.*, 2003).

8.4.2.- Selección de la o las cepas antagonistas

El ensayo que tendrá más relevancia para la selección de él o los antagonistas será la determinación de su capacidad de inhibir la producción de peritecios

de *Gibberella zeae* en el rastrojo. Debido a que este ensayo es muy laborioso, de larga duración e implica muchas repeticiones para poder concluir al respecto, fue que en primera instancia se realizaron otros ensayos para facilitar una preselección de las cepas y de esta forma descartar algunas antes de proceder al ensayo sobre rastrojos. Es de esperar que los mecanismos por los cuales el antagonista inhiba la formación de peritecios estén relacionados con su capacidad de producción de enzimas líticas, capaces de degradar paredes del patógeno, o de compuestos antifúngicos. Es por esto que se realizaron los ensayos de determinación de actividades enzimáticas, de compuestos volátiles y de difusibles al medio, pero los mismos no revelaron diferencias marcadas entre las distintas cepas para hacer una preselección de éstas. Como además se buscaba antagonistas capaces de degradar los rastrojos de forma de eliminar el sustrato para el desarrollo del *Fusarium* patógeno, e incorporar materia orgánica al suelo obtenida de la degradación de este material, se determinaron los niveles de producción de celulasas y xilanasas implicadas en la degradación de paredes vegetales.

8.4.3.- Actividad enzimática:

Se determinó la capacidad productora de enzimas *in vitro* de las distintas cepas de *Trichoderma,* midiendo la actividad enzimática de quitinasas, proteasas y ß-1,3-glucanasas, que son responsables de la degradación de paredes fúngicas (Castoria *et al*, 1997; El-Katatny *et al*, 2000). A su vez, se realizaron ensayos de xilanasas y celulasas, enzimas responsables de la capacidad saprofítica relacionada con la degradación de sustratos celulósicos (Zaldívar *et al.*, 2001; Jeffries, 1987).

Como se puede ver en la Figura 3 las cepas 13, 14, 15 y 16 presentan una alta actividad de proteasas, junto con la 3, pero a diferencia de las primeras la 3 presenta una muy baja actividad de ß-1,3-glucanasas. Las que presentan una buena actividad de las tres enzimas son las cepas 7, 10, 13, 14, 15 y 16.

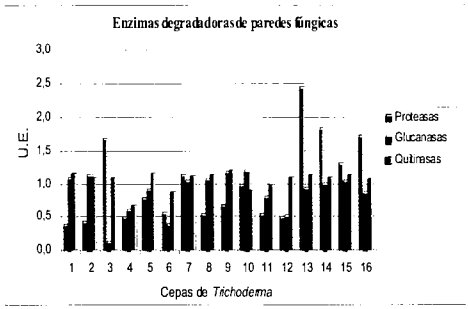


Figura 3. Actividad enzimática de las distintas cepas de *Trichoderma in vitro* cultivadas en medio conteniendo paredes de *Fusarium* como única fuente de carbono. Una U.E. se define como la cantidad de enzima capaz de provocar un aumento de 0,1 en la absorbancia medida respecto al blanco correspondiente.

Con respecto a la actividad de xilanasas (Figura 4), se vio que no hay diferencias significativas entre las distintas cepas si bien se obtuvieron valores superiores a 3 U.E. con las cepas 1, 8, 9,

10, 11, 12 y 15, siendo la 2, 3 y 13 las que presentaron menor actividad.

La determinación de las actividades enzimáticas nos proporciona un conocimiento parcial de los posibles mecanismos de acción antagonista y de la capacidad de descomposición de sustratos ligno-celulósicos, pero no resultó un ensayo concluyente respecto a cual cepa tendrá las características más apropiadas como antagonista o colonizadora del rastrojo.

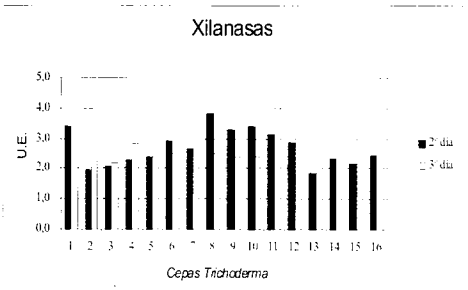


Figura 4. Actividad enzimática de xilanasas de las distintas cepas de *Trichoderma in vitro*, cultivadas en un medio con xilano como única fuente de carbono. Una U.E. se define como la cantidad de enzima capaz de provocar un aumento de 0,1 en la absorbancia medida respecto al blanco correspondiente.

8.4.4.- Ensayos de antagonismo *Trichoderma* vs. *Fusarium*:

Para determinar la capacidad antagonista de las cepas de *Trichoderma* se realizaron diferentes ensayos *in vitro*:

- Cultivos duales en placas de PDA.
- Cultivos en placas enfrentadas para determinar la acción de compuestos volátiles.
- Ensayos de crecimiento del patógeno en placas en medio YES adicionado con el sobrenadante filtrado (libre de células) de un cultivo realizado previamente de las cepas de *Trichoderma*, para determinar la inhibición por sustancias liberadas al medio de cultivo.
- Cultivo sobre rastrojo de trigo donde se inocularon en conjunto el patógeno y el posible antagonista para determinar el efecto sobre el crecimiento y la cantidad de peritecios de *Gibberella zeae* formados.

Para los ***cultivos duales*** en placas de PDA, se sembró un disco de micelio del patógeno sobre un borde de la placa, y enfrentado a él, diametralmente opuesto un disco de micelio de *Trichoderma*. Como control se sembró en una placa un disco del patógeno sólo. Se incubó en estufa a 25 °C y se comparó el crecimiento del patógeno en el cultivo dual contra la placa control. De esta manera es posible ver una zona de inhibición del crecimiento del patógeno en la región de enfrentamiento de ambos en los casos en que la cepa de *Trichoderma* provoque algún efecto que interfiera con el crecimiento de *Fusarium*.

Como se muestra en la Figura 5 algunas cepas de *Trichoderma* ocuparon toda la placa (a), colonizando incluso la zona donde en principio estaba

Fusarium, mientras que en otros (c) *Fusarium* crece incluso en la zona de superposición de ambos. En el control *Fusarium* ocupa toda la placa (b).

Este es un ensayo sencillo y de corta duración que además brinda información respecto al comportamiento antagonista, aunque en algunas ocasiones no da resultados extrapolables al comportamiento en el sitio real de acción del antagonista contra el patógeno. De este ensayo pudimos clasificar las cepas de *Trichoderma* en tres categorías, las que presentaron un alto grado de inhibición en los primeros días y luego colonizaron toda la placa por encima del micelio de *Fusarium* incluso (7, 8, 12 y 16, la primera perteneciente a *T. koningii* y las últimas a *T. atroviride*); las que lograron un grado de inhibición intermedio (1, 4, 5, 6, 9, 10, 14, 15, las cepas 4 y 6 pertenecientes a *T. harzianum* y el resto a *T. koningii*), en las cuales *Trichoderma* esporuló sobre toda la superficie de la placa, pero permaneció micelio aéreo de *Fusarium* en algunas zonas; y las que directamente no pudieron frenar el avance de *Fusarium* (2, 3, 11 y 13, las dos primeras pertenecientes a *T. longibrachiatum* las últimas a *T. koningii*).

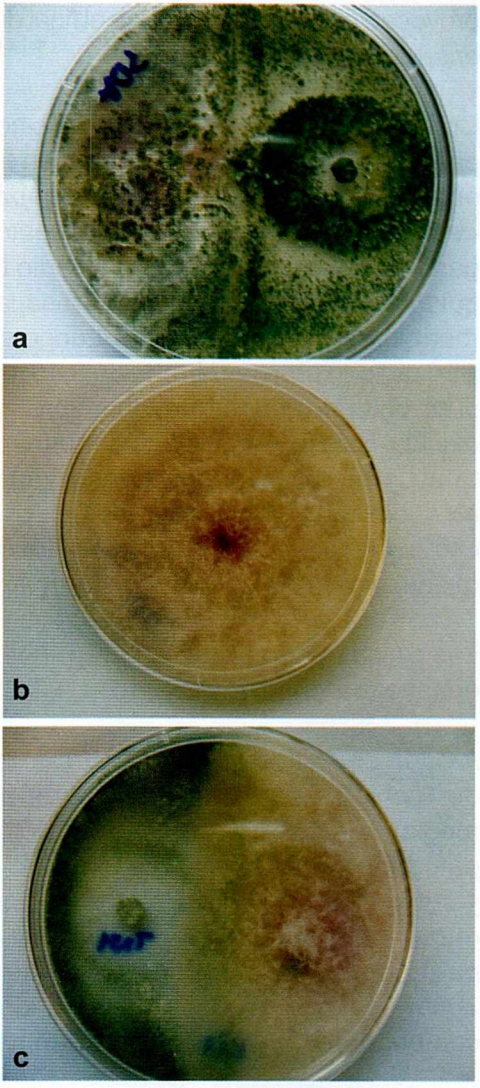


Figura 5. Cultivos duales (a y c) y control (b).

Para determinar la posible inhibición del crecimiento del patógeno por ***compuestos volátiles*** producidos por el antagonista, se sembró un disco de micelio de cada uno en dos placas de PDA independientes, y acto seguido se superpusieron ambas y se sellaron con Parafilm usando la que contenía *Fusarium* como tapa, para minimizar la posibilidad de que las conidias de *Trichoderma* invadieran la otra placa. Se incubó en estufa a 25 °C y se observó la diferencia en el crecimiento del micelio de *Fusarium* comparado con una placa control. Los resultados se muestran en la Figura 6 donde vemos que el segundo día se presentan los mayores porcentajes de inhibición (cepas 3, 5 y 8), mientras que las que

provocan una mayor inhibición al final del ensayo son las cepas 15 y 1.

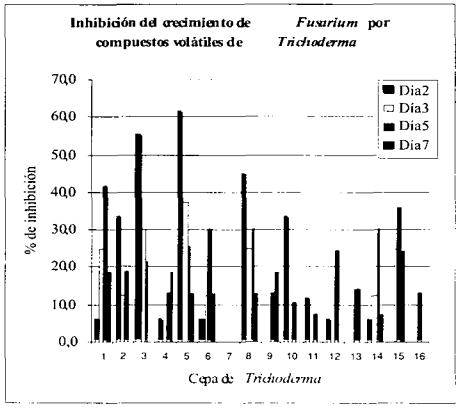


Figura 6. Inhibición del crecimiento de *Fusarium* respecto a un control por compuestos liberados por *Trichoderma*.

Con el objetivo de determinar si las cepas del posible antagonista producen en el medio ***sustancias difusibles capaces de inhibir*** el crecimiento del patógeno se realizaron cultivos en medio líquido YES (extracto de levadura-sacarosa), durante 5 días a 25 °C. Luego se filtró usando una membrana de 0,45 µm para obtener el sobrenadante libre de células. Éste fue añadido posteriormente a un medio YES conteniendo agar en doble concentración, vertido en placas e inoculado con un disco de micelio de *Fusarium*. Se comparó el crecimiento contra un control sembrado en medio YES con agar.

Las únicas cepas que lograron inhibir el crecimiento de *Fusarium* en este ensayo fueron la 11, 12 y 16.

A partir de cultivos en tubo de PDA inclinado se obtuvieron las suspensiones de conidias para los ensayos de ***antagonismo sobre rastrojo de trigo*** mediante enjuague con suero fisiológico conteniendo Tween 80, tanto del patógeno como de los antagonistas. Se prepararon suspensiones conjuntas y se inocularon los rastrojos por inmersión, se incubaron en estufa a 25 °C durante 3 semanas en oscuridad y luego se dejaron expuestos a la luz solar para permitir la formación de peritecios de *Gibberella zeae* (Bujold *et al.*, 2001). A los 90 días se contaron los peritecios formados sobre el rastrojo, comparando con un control donde se inoculó sólo *Fusarium* (Figura 7).

Este ensayo no se ha finalizado para todas las cepas, por lo que sólo se cuenta con resultados parciales. Como se ve en la Figura 8, las cepas 8 y 15 son las que presentan una mayor capacidad de inhibición en este ensayo respecto al control (alrededor de un 85 %); la cepa 11 inhibió sólo un 23 % y la 10 un 55 %. Las demás lo hicieron por encima del 74 %.

La cepa 10 y la 11 pertenecientes a la especie *T. koningii* serán descartadas por su pobre acción antagonista según se desprende de este último ensayo y los cultivos duales. Respecto al resto, es necesario esperar los resultados del ensayo sobre rastrojo para poder discernir si tienen buena capacidad antagonista.

Luego de seleccionar las cepas con mejor desempeño como antagonista, se harán algunas pruebas a escala de laboratorio para la producción de conidias en diferentes medios de cultivo, para determinar las condiciones de cultivo y los rendimientos más favorables.

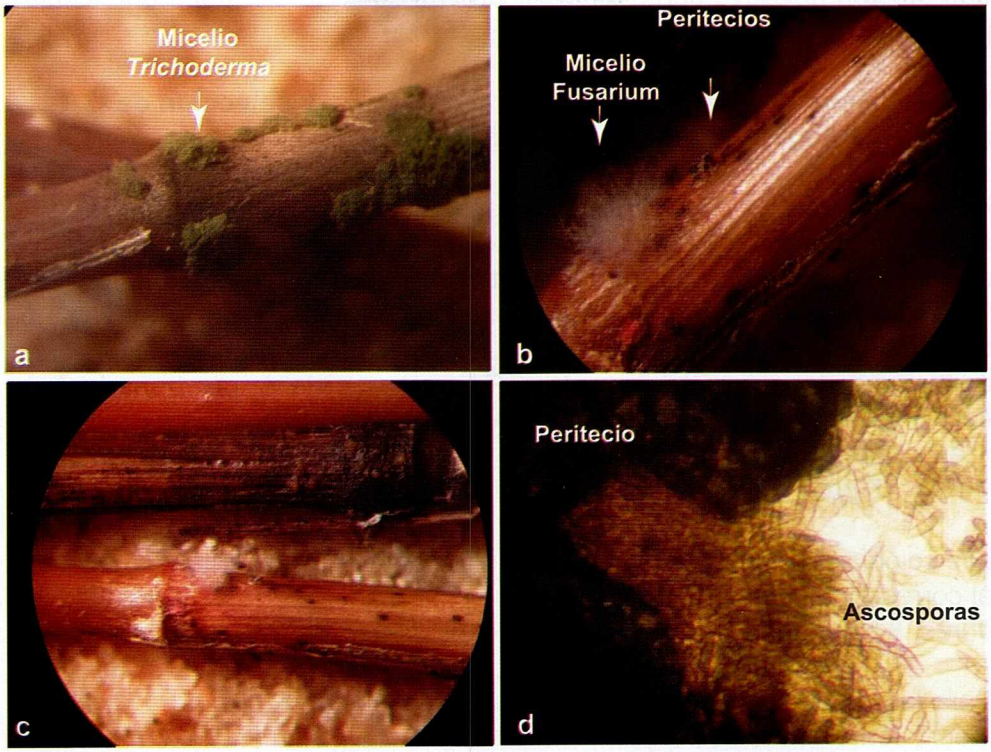


Figura 7. a)(40x) Rastrojo colonizado por *Trichoderma*. b) y c) (40x) rastrojos del control colonizados por *Fusarium graminearum*. d) (400x) Peritecio de *Gibberella zeae* liberando su contenido (ascosporas).

Como se cree que el momento oportuno para hacer la aplicación a campo del agente de control biológico sería cuando se fumiga el herbicida, también se realizarán ensayos de sensibilidad a glifosato que es el herbicida más comúnmente empleado (Pereyra *et al.*, 2005). Es de esperar que no haya interferencia entre ambos y así se propondría aplicarlos en simultáneo minimizando de esta forma los costos de aplicación.

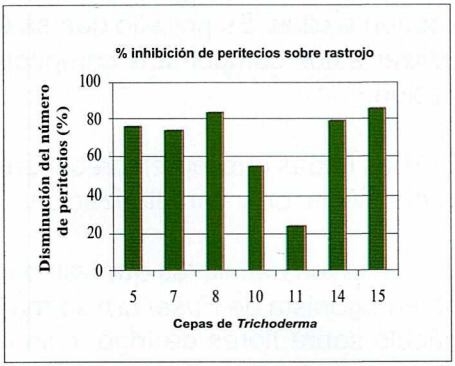


Figura 8. Porcentaje de inhibición de la formación de peritecios de *Fusarium* respecto a un control, en ensayo *in vitro* realizado sobre rastrojo de trigo. El conteo fue realizado a los 90 días de la inoculación.

Por otro lado, es importante conocer los mecanismos de acción de los an-

tagonistas para tener un conocimiento amplio que permita un uso responsable de los agentes de control biológico y de esta forma evitar efectos no deseados al utilizarlos a nivel de campo. En este sentido, se tendrá en cuenta que el o los antagonistas seleccionados no provoquen alteraciones que afecten negativamente a las micorrizas del trigo que son beneficiosas para este cultivo.

8.5.- Aislamiento, identificación, caracterización y selección de posibles antagonistas de *flores de trigo*.

Para el aislamiento de flora presente en las flores del trigo se procedió a la recolección de muestras de distintos cultivares de INIA La Estanzuela. La recolección se realizó en forma aséptica de manera de no contaminarlas. Para el aislamiento de los microorganismos presentes se procedió a sembrar distintas diluciones de un enjuague realizado con suero fisiológico con agitación de las diferentes muestras. Para lograr aislar la mayor parte de la flora presente se usaron tres medios de cultivo diferentes, PDA para hongos y levaduras, TSA (Triptosa Soya Agar) para aerobios heterótrofos en general y TSA 1/5 para microorganismos aerobios oligotrofos.

Las colonias de diferente morfología se reaislaron y se pasaron a tubos con el correspondiente medio de cultivo. De esta manera se obtuvieron 22 levaduras, 8 bacterias y 4 hongos filamentosos diferentes.

Para la preselección de los posibles antagonistas se realizarán cultivos en medio conteniendo colina y betaína por separado (Khan *et al.*, 2001). Según este autor estos compuestos están presentes en las anteras de las flores de trigo y favorecen la germinación de las ascosporas de *Gibberella zeae* que lleguen a ellas. Es por ello que se espera que microorganismos capaces de utilizar estos compuestos compitan por ellos con el patógeno en el sitio de acción.

Con las cepas que logren crecer en estos medios se realizarán ensayos para la identificación y caracterización.

Los ensayos definitivos que van a determinar si alguna de las cepas es buena antagonista de *Fusarium* se realizarán en una primera instancia en invernáculo sobre flores de trigo, coinoculando mediante aspersor una suspensión de patógeno y posible antagonista. De esta forma se podrá ver, contra un control donde sólo se inocula *Fusarium*, si hay disminución en la severidad de la enfermedad, determinando las espigas y espiguillas afectadas en cada planta.

Control biológico del moho gris con Clonostachys rosea

Elisa Silvera Pérez[1]

El Moho Gris (MG), causado por el hongo *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., anamorfo del ascomicete *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, favorecido por condiciones de alta humedad relativa (>90%), agua libre en la superficie de las plantas, temperaturas amenas (15-25 °C), baja intensidad de luz y disponibilidad de tejidos senescentes (Hausbeck & Moorman, 1996; Agrios, 2004). Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, ocurriendo en varias especies de plantas, causando pérdidas en la producción de hortalizas, ornamentales, forestales, afectando todos los estadios de desarrollo, en todas las condiciones de cultivo, pero más pronunciadamente en los sistemas protegidos (Morandi, 2001).

Los síntomas del MG consisten en tizones de inflorescencias, podredumbres de frutos, cancros y podredumbres de tallos, ahogamiento de plántulas y manchas foliares (Agrios, 2004).

El patógeno *B. cinerea* es un hongo necrotrófico que se establece y multiplica inicialmente en tejidos muertos, colonizando posteriormente los tejidos vivos adyacentes (Jarvis, 1989). El hongo sobrevive como micelio y esclerotos en restos de cultivos, principal fuente de inóculo primario. El hongo esporula abundantemente sobre los tejidos necrosados a temperaturas entre 15 y 20 °C, alta humedad relativa (>90%). La liberación de las esporas ocurre en las horas más cálidas del día, cuando existen cambios rápidos en la humedad relativa, siendo posteriormente transportados por las corrientes de aire (Jarvis, 1989).

Una vez que los conidios alcanzan la superficie de la planta, se adhieren y germinan favorecidos por agua libre, alta humedad relativa (>90%) y temperaturas entre 20-25 °C (Jarvis, 1989). El patógeno puede penetrar los tejidos a través de heridas (Braun y Sutton, 1987) o directamente por acción del apresório, mediada por la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular como las exo-endopoligalacturonasa (Rha *et al.*, 2006). La infección es favorecida por temperaturas de 15-25 °C. *Botrytis cinerea* puede producir

[1] Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía. UdelaR.

infecciones quiescentes (latentes), cuando las condiciones de ambiente o el estado fisiológico de los tejidos del hospedero son conductivas para la penetración, pero no para el crecimiento activo del patógeno (Jarvis, 1989). Estas infecciones han sido constatadas en tejidos de diferentes especies como hojas nuevas de frutilla, donde *B. cinerea* permanece latente en las células de la epidermis hasta que las hojas se tornan senescentes (Braun y Sutton, 1987), en tallos de tomate *B. cinerea* puede permanecer quiescente durante 12 semanas (Jarvis, 1989), en flores de rosa durante la poscosecha (Elad, 1988) y en las estructuras florales y bayas en la vid (Keller *et al.*, 2003).

Una vez transcurrido el período de latencia el hongo coloniza el tejido de la planta colonizando y macerando los tejidos, produciendo esporas y reiniciando un nuevo ciclo de infección (Benito *et al.*, 2000).

El manejo del MG integra prácticas en las que se incluyen la eliminación del tejido enfermo de la planta; alteración de la temperatura y humedad del ambiente; uso de fungicidas y de agentes de biocontrol (Elad, 1988; Jarvis, 1989; Elad *et al.*, 1995; Hausbeck y Moorman, 1996; Sutton *et al.*, 1997).

La aplicación de los fungicidas sintéticos ha sido la principal forma de controlar el MG (Wilson, 1997; Morandi, 2001). El uso inadecuado de los fungicidas ha conducido a la selección de cepas resistentes generando la ineficiencia del control químico. Inicialmente, fue citado el surgimiento de cepas resistentes a los benzimidazoles como carbendazim, benomil y tiabendazol (Leroux *et al.*, 1999) y a seguir las dicarboximidas, como iprodione, procimidone y vinclozolin (Latorre *et al.*, 1994).

En cultivos protegidos de ornamentales también fueron constatadas cepas de *B. cinerea* resistentes a los dos grupos de fungicidas anteriormente citados (Ghini, 1996; LaMondia y Douglas, 1997; Yourman *et al.*, 2001). La resistencia de cepas de *B. cinerea* al grupo de anilinopirimidinas fueron encontradas en los viñedos en Chile y en cultivos protegidos de pepino, porotos, tomate, zapallito, berenjena y pimienta en España (Latorre *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2004). Los inhibidores de la síntesis de ergoesterol (tebuconazol e fenethanil) también han seleccionado cepas de *B. cinerea* en localidades donde fueron mal utilizados o subdosificados (Elad, 1992). El uso frecuente e inadecuado de los fungicidas también ha constituido en un riesgo para la salud de los trabajadores y agricultores que están más expuestos a los efectos de estos productos. Además se suman las restricciones del mercado consumidor de productos agropecuarios, exigiendo ausencia o niveles mínimos de residuos. Esta situación ha generado la

necesidad de desarrollar métodos alternativos de control y el biocontrol es uno de ellos (Michereff, 2004).

El control biológico de un patógeno del filoplano es generalmente realizado por la introducción y establecimiento de los antagonistas en la superficie aérea de la planta. El antagonista aplicado, para ser exitoso, debe multiplicarse y colonizar la superficie de la planta (Bettiol, 1991).

Las estratégias para un efectivo control de las enfermedades, consisten en la colonización del filoplano por el agente de biocontrol antes de la instalación del patógeno, la disminución de la esporulación y la reducción de las estructuras de sobrevivencia (Fokkema *et al.,* 1993). Para el control del MG la estrategia se basa en la inhibición de la infección, o en la supresión de la esporulación y diseminación (Sutton *et al.*, 1997).

Varios hongos antagonistas, entre ellos *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert y W. Gams (syn. *Gliocladium roseum*), han sido citados por su eficiencia en el control del MG en diferentes patosistemas (Peng y Kevan, 1992; Zhang y Hopkin, 1996; Sutton *et al.*, 1997; Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997; Köhl *et al.*, 1998; Yu y Sutton, 1999; Sutton *et al.*, 2002; Morandi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Zamboni-Pinotti *et al.*, 2005; Nobre *et al.*, 2005).

Clonostachys rosea es un habitante del suelo en regiones templadas y tropicales con alta capacidad saprofítica (Domsch *et al.*, 1980; Papavizas, 1985; Sutton *et al.*, 1997; Schroers et al., 1999). El hongo coloniza diversos órganos de la planta sin causar enfermedad. Existen relatos de colonización endofítica del hongo en raíces, tallos y semillas de soja (Mueller y Sinclair, 1981), en los vasos xilemáticos de vid (Esseln y Weltzien, 1997), en hojas de frutilla (Sutton y Peng, 1993a; Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997), tallos de tomate (Sutton *et al.*, 2002).

Los mecanismos de control de *C. rosea* puede ser por micoparasitismo de hifas (figura 1), esporas, esclerotos y cuerpos fructíferos de diversos hongos entre ellos *B. cinerea* (Barnett y Lilly, 1962; Domsch *et al.*, 1980; Lim y Chan, 1986; Yu y Sutton, 1997; Sutton *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002). *Clonostachys rosea* también tiene la capacidad de competir por el espacio, creciendo endofiticamente en te-

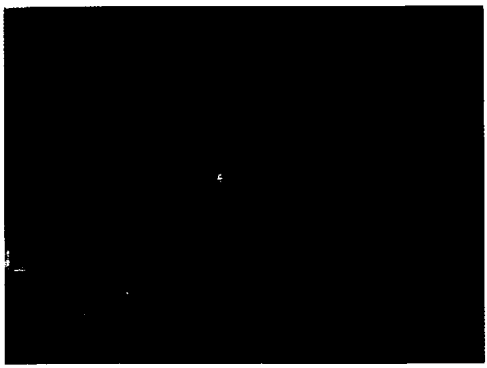


Figura 1. Colonias de *C. rosea* de aspecto blanquecino creciendo sobre *Botrytis cinerea*.

jidos inmaduros permitiendo competir con el patógeno en la colonización de los tejidos senescentes de frutilla, begonia, ciclamen, geranios, tomates, morrón, pepino, frambuesa, coníferas y esporula en hojas muertas al igual que *B. cinerea* (Sutton y Peng, 1993a; Yu y Sutton, 1997; Sutton *et al.,* 1997; Morandi *et al.*, 2001; Sutton *et al.,* 2002; Zamboni-Pinotti *et al.,* 2005; Nobre *et al.*, 2005). Además *C. rosea* tuvo la capacidad de establecerse en hojas verdes, senescentes o muertas de rosas y suprimir la esporulación del patógeno en más de 96% (Morandi *et al.*, 2001).

Aplicaciones foliares de *C. rosea* han mostrado ser efectivas en la supresión de la esporulación de *B. cinerea* en numerosos hospederos tales como frutilla (Sutton y Peng, 1993a), especies forestales (Grigoletti *et al.*, 2004) ornamentales (Sutton *et al.*, 1997; Köhl *et al.*, 1998; Morandi *et al.,* 2003; Yohalem y Kristensen, 2004).

En experimento de campo, *C. rosea*, *Trichoderma viride* Pers. ex Fries y *Penicillum* sp. redujeron la esporulación de *B. cinerea* en hojas de frutilla con igual eficiencia cuanto las aplicaciones de clorotalonil (Peng y Sutton, 1991). Aspersiones de suspensión de conidios de *C. rosea* o la diseminación de los conidios del antagonista por la abeja (*Apis mellifera* L.) en flores de frutilla redujo la incidencia de *B. cinerea* en pétalos, estambres e infrutescencias. Las abejas diseminaron eficientemente el inóculo de *C. rosea* en las flores y suprimieron el patógeno en las flores y los frutos (Peng y Kevan, 1992). El uso de abejas como diseminador de conidios de *C. rosea* también fue eficiente en la protección de los frutos de frambuesa contra la podredumbre del MG (Sutton y Peng, 1993b).

En tallos de tomate hidropónicos, *C. rosea* inhibió a *B. cinerea* tanto cuanto el fungicida iprodione (Sutton *et al.*, 2002) y en aplicaciones en el ápice de plantas de alfalfa, el hongo suprimió la pudrición de las bayas y semillas causada por *B. cinerea*, incrementando la producción de semillas (Li *et al.,* 2004).

Clonostachys rosea o *Ulocladiu atrum* Preuss, aplicado en rosales cultivados en macetas, durante el estadio vegetativo, redujeron la incidencia e inhibieron la esporulación de *B. cinerea* tanto cuanto el fungicida iprodione (Yohalem, 2004).

Suspensiones de esporas de *C. rosea*, en la concentración de 10^6 conidios.mL^{-1}, aplicadas semanalmente en plantas de frutilla cultivadas en invernáculo (Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997), y en hojas de frutilla, frambuesa y mora controlaron eficientemente el MG (Zamboni-Pinotti *et al.*, 2005).

Aislamientos de *C. rosea*, provenientes de suelos, hojas verdes o senescentes de diferentes especies de plantas de Brasil, redujeron la esporulación de *B. cinerea* en hojas de rosales (81-97,4%), frutilla (87,6-96,8%), eucaliptos (63,7-89,7%) y tomate (100%) (Nobre *et al.*, 2005).

El número de aplicaciones necesarias para el biocontrol del MG varía según el patosistema. En experimentos de cultivos comerciales de frutilla tres a cuatro aplicaciones por semana de suspensiones de conidios (10^6 o 10^7 mL^{-1}) de *C. rosea* fueron suficientes para reducir la incidencia de *B. cinerea* en las fructificaciones del cultivo (Sutton, 1994). Aplicaciones de *U. atrum* (10^6 mL^{-1}) y *C. rosea* (10^7 mL^{-1}) a cada tres o dos semanas fueron igual de efectivas a las aplicaciones de fungicidas en el control del MG en cultivo comercial de ciclamen bajo cubierta (Köhl *et al.*, 1998). Esta efectividad se confirma en las aplicaciones de suspensiones de conidios (10^6 mL^{-1}) de *C. rosea* que también fueron tan efectivas a las de fungicidas en el control del MG en plantas de fucsia cultivadas en invernáculos comerciales (Silvera-Pérez *et al.*, 2005).

En consideración a las restricciones del control químico y los trabajos precedentes el control biológico con *C. rosea* se torna en una opción eficiente para el manejo del MG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIKARAM, N.K.B., JOYCE, D.C.; TERRY, L.A. 2002. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action of *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. *Australasian Plant Pathology*. 31: 223-229

AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. 2a.ed. México, Uthea. 838p.

AGRIOS, G.N. 2004. Plant pathology. San Diego: Academic Press,. 922p.

AIT BARKA, E.; 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*. 24:135-142

AL-RAWAHI, A.K.; HANCOCK, F.G. 1998. Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Disease* 82, 1100–1106.

ALVES SILVA, H.S.; DA SILVA ROMEIRO, R.; MACAGNAN, D.; DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, B.; BARACAT PEREIRA; M.C.; MOUNTEER, A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*. 29: 288-295.

AMBROSI, C ; LEONI, L.; PUTIGNANI, L.; ORSI,N.; VISCA, P. 2000. Pseudobactin Biogenesis in the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas* Strain B10: Identification and Functional Analysis of the L-Ornithine N^5-Oxygenase (*psbA*) Gene. *Journal of Bacteriology*. 182:6233-6238.

ANDERSON, L.M.; STOCKWELL, V.O.; LOPER, J.E. 2004. An extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* a506 inactivates antibiotics of *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*. 94:1228-1234

ANDERSSON, R.A.; ERIKSSON, A.R.; HEIKINHEIMO, R.; MAE, A.; PIRHONEN, M.; KOIV, V.; HYYTIAINEN, H.; TUIKKALA, A.; PALVA, E.T. 2000. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR*(Ecc). *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13:384-393.

ARC 2006 Infruitec-Nietvoorbij Disease Management División. Disponible en http://www.arc.agric.za/institutes/infruit/main/divisions/disease/currentresearch.htm Consultado en octubre de 2006.

ARRAS, G.; SCHERM, B.; MIGHELI, Q. 2002. Improving Biocontrol Activity of *Pichia guillermondii* Against Post-harvest Decay of Oranges in Commercial Packing-houses by Reduced Concentrations of Fungicides. *Biocontrol Science and Technology*. 12: 547 – 553

ARRAS G.; DE CICCO V.; ARRU S.; LIMA G. 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of actionof an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 73:413-418

AVILA MIRANDA, M.E.; HERRERA ESTRELLA, A.; PEÑA CABRALES, J.J. 2006 (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 38:7: 1823-1830

BAGNASCO, P. 1997. Estudio de la capacidad inhibidora de una cepa nativa de *Pseudomonas* fluorescente frente al hongo patógeno *Pythium ultimum*. Tesis de maestría. Universidad de la República, Uruguay.

BAGNASCO, P., DE LA FUENTE, L., GUALTIERI, G., NOYA, F., AND ARIAS, A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1317-1322.

BAJSA, N. 2003. Aislamiento de un antibiótico peptídico de *Pseudomonas fluorescens* y su efecto sobre la ultraestructura del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (opción Microbiología). PEDECIBA. Universidad de la República. Uruguay. 70 p.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. Freeman. San Francisco, USA 442 pp.

BARGABUS, R. L.; ZIDACK, N. K.; SHERWOOD, J. W.; AND JACOBSEN, B. J. 2004. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control* 30:342-350.

BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. 1962 A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. *Mycologia* 54:1:72-77.

BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, D.A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. 2004. Characterization of extarcelullar lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila. Current Gentecis.* 45 : 140-148.

BATTA, Y.A. 2004.Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection*. 23 :19-26.

BECK VON BODMAN, S.; FARRAND, S.K. 1995. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Journal of Bacteriology*. 177:5000-5008

BENHAMOU, N.; NICOLE, M. 1999. Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemestry*. 37 : 703-719.

BENHAMOU N, N.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.1996 Induction of differential host re spons es by *Pesudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challeng e with Fusarium oxysporum f. sp. pisi and *Pythium ultimum. Phytopathology* 86:1:174-185

BENITO, E.P.; ARRANZ, M.; ESLAVA, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17:S43-S46

BERG, G.; FRITZE, A.; ROSKOT, N.; SMALLA, K., 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Applied Microbiology*. 156:75-82.

BERG, G.; BUCHNER, A.; WELLINGTON, E.H.M.; SMALLA, K. 2000. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to Verticillium wilt. *Canadian Journal of Microbiology*. 46:1128-1137.

BETTIOL W, 1991a. Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna, San Pablo, Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA) /Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura (CNPDA).

BETTIOL, W. 1991b. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: EMBRAPA/ CNPDA (Ed.). Controle biológico de doenças de plantas. Brasília:. p.59-97.

BISSEGER, M.; RIGLING, D.; HEINIGER, U. 1997. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology.* 87:50-59

BLEVE, G.; GRIECO, F.; COZZI, G.; LOGRIECO, A.; VISCONTI, A. 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of Aspergillus carbonarius and A. niger on grape. *International Journald of Food Microbiology.* 108:2:204-209.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4 : 343–350

BOLAND, G.J. 2004. Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 6-18

BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. 2003. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journald of Food Microbiology.* 84: 93-104.

BONSALL, R. F., WELLER, D. M. & THOMASHOW, L. S. 1997. Quantification of 2·4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiolgy.* 63, 951–955

BRAUN, P.G.; SUTTON, J.C. 1987. Inoculum source of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberry in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* .9:1:1-5.

BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W. 1998. Fungicide resistance: The assesment of risk. FRAC Monograph Nº 2. GCPF. Brussels.

BRYK, H.; DYKI, B.; SOBICZEWSKI, P. 1998. Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on in vitro spore germination and gum tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol,* 43:1:97-106

BUJOLD, I.; PAULITZ, T.C.; CARISSE, O. 2001 Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Diseases* 85:977-984

BULL, C.T.; STACK, J.P.; SMILANICK, J. L. 1997. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive on wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biological Control* 8:81-88.

BULL, C. T.; WADSWORTH, M. L.; SORENSEN, K. N.; TAKEMOTO, J. Y.; AUSTIN, R. K.; SMILANICK,J. L. 1998 Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biological Control* 12:89-95

CALVENTE V.; BENUZZI D.; DE TOSETTI M. I. S. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International biodeterioration and biodegradation*. 43: 167-172

CALVENTE V.; DE ORELLANO ME; SANSONE G.; BENUZZI D.; SANZ DE TOSETTI MI. 2001. A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. *Microbiological Methods*. 47:273-279

CAMATTI S.V ; SILVARIBEIRO, R.T ; SANHUEZA, R.MªV.; ECHEVERRIGARAY, S ; SILVA, S A ; AZEVEDO, J L . 2001 Levantamento de fungos endofíticos em pomares de maçã orgânica, integrada e convencional. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7, , Bento Gonçalves. Anais, 2001. p. 110-110.

CAMATTI S.V.; SILVA RIBEIRO , RT ; SANHUEZA, R.M^{a}V.; AZEVEDO, J. L. 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated and organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology,* 45:5: 397-402.

CAMPBELL, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge 218p.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. 2004. Isolation and characterization of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots *Letters Applied Microbiology* 39:425-30.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; LIMA, G.; DE CICCO, V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruit: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 7-17.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; DE CICCO, V. 1997 ß-1,3glucanase activity of two saprophytic yeasts and posible modo of action as biocontrol agents against post-harvest diseases. *Postharvest biology and technology* 12:293-300

CASTRO M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; CASTILLO, A. 2003. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea. FEMS microbiology letters* 228: 1: 87-91.

CHALUTZ, E., AND WILSON, CL .1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii. Plant Disease.* 74:22:134-137.

CHAND-GOYAL,T.; SPOTTS, R.A. 1997. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi- commercial and commercial conditions using threesoprophytic yeasts. *Biological Control.* 10:199-206.

CHAND-GOYAL,T.; SPOTTS, R.A. 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Technology.* 7:51-6

CHEN, W.B; HAN, Y.F., JONG; S.C; CHANG, S.C. 2000. Isolation, Purification, and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis Applied and Environmental Microbiology.* 66:12: 5348-5352.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. 1998 Mycoparitism and lytic enzymes. In: Harman, G.E.; Kubicek, Cp: ed. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2:Enzymes , biological controland commercial application. Taylor and Francis. pp.153-172.

CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V.; VAN DER BIJ, A.J.; VAN DER DRIFT, K.M.G.M.; SCHRIPSEMA, J.; DE BRUIJN, F.J.; THOMAS-OATES, J.E.; LUGTENBERG, B.J. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici. Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1069–1077.

CHUTRAKUL, C.; PEBERDY J.F. 2005. Isolation and characterisation of a partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperellum. FEMS Microbiology Letter*, 252:2:257-265

CIANI, M.; FATICHENTI, F. 2001. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:7:3058-3063

CLARKSON, J. P.; PAYNE, T.; MEAD A.; WHIPPS J. M. 2002. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology*. 51:735-745

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Applied *Environmental Microbiology,* 71: 4951 - 4959.

CONWAY, W.S.; JANISIEWICZ, W.J.; KLEIN, J.D.; SAMS, C.E. 1999. Strategy for combinig heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay o f Gala apples. *HortScience*. 34:700-704.

CONWAY, W.S.; LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W.J.; SAFTNER, R.A.; CAMP, M.J. 2005. Improving biocontrol using antagonist mixtures with heat and/or sodium bicarbonate to control postharvest decay of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 36:235-244

COOMBS, J.T.; MICHELSEN, P.P.; FRANCO, C.M.M. 2003. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol. Control*. 29:359-366.

DA LUZ, W.C.; STOCKWELL, C.A.; BERGSTROM, G.C. 2004. Integrated biological and chemical control of Fusarium head blight and postharvest deoxinivalenol on wheat. Development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food production systems. Sevilla. España. 24-27 March, 2004.

DE BOER, W.; KLEIN GUNNEWIEK, P.J.A.; KOWALCHUK, G.A.; VAN VEEN, J.A. 2001.Growth of chitinolytic dune soil _-Subclass *Proteobacteria* in response to invading fungal hyphae. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3358-3362.

DE BOER, W. ; LEVEAU, J.H.J.; KOWALCHUK, G.A.; KLEIN GUNNEWIEK, P.J.A.; ABELN, E.C.A. ; FIGGE, M.J.; SJOLLEMA, K.; JANSE, J.D.; VAN VEEN, J.A. 2004 *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae International. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 54: 857–864

DE CAL, A.; MELGAREJO, P. 2001. Repeated applications of *Penicillium oxalicum* prolongs biocontrol of fusarium wilt of tomato plants. *European Journal of Plant Pathology* 107:8:805-811

DE CAL, A.; GARCÍA-LEPE, R.; PASCUAL, S.; MELGAREJO, P. 1999. Effects of timing and method of application of *Penicillium oxalicumon* efficacy and duration of control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Pathology* 48:260–266

DE LA FUENTE, L; THOMASHOW, L; WELLER, D; BAJSA, N; QUAGLIOTTO, L; CHERNIN, L; ARIAS, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 671-681

DE MEYER, G.; HÖFTE M. 1997. Salicylic acid produced by rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588-593

DEACON, J. 2002. The Microbial World: Biology and control of crown gall. Institute of Cell and Molecular Biology, and Biology Teaching Organisation, Univ. of Edinburgh. http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/crown.htm.

DELGADO, R.; PÉREZ, G. 1998. Caracterización biológica *de Penicillium digitatum, Penicillium italicum* y *Penicillium ulaiense* en postcosecha de citrus. Tesis de Facultad de Agronomía.

DIAZ, M.V. 2001. Control de enfermedades en postcosecha de frutos. Alternativas al uso de plaguicidas. Trabajo especial I para la Licenciatura en bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay. 73pp.

DILANTHA F.W.G.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; SAVCHUK, S.C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 955-964

DILIP, K.; LAKSHMAN, D.K.; JIAN, J.; TAVANTZIS, S.M. 1998. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. *PNAS*.95: 6425-6429

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.-H. 1980. Compendium of soil fungi. London: Academic Press, 859pp.

DOWLING D.N.; O'GARA F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*. 12:133–141

DROBY. S.; CHALUTZ E. 1994. Mode of Action of Biocontrol Agents of Postharvest Disease/ Cap. 6.- En Biological control of postharvest diseases. 63-73. Edited for Wilson C.L. and Wisniewski M. E. CRC Press, Boca ratón.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON,C. L.; WISNIEWSKI. M. 1998. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journald Microbiolgy* 35:794-800.

DROBY, S.; LISCHINSKI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; CHAND-GOYAL, T.; ECKERT, J.W.; MANULIS, 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

DROBY, S., COHEN, L. DAUS, A., WEISS, B., HOREV, B., CHALUTZ, E., KATZ, H., KERENTZUN, M., AND SHACHNAI, A. 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decays of citrus. *Biological Control*, 12: 97-101.

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; PORAT, R. 2002. Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila. Phytopathology*. 92:393-399.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology* 27:127-135

DRUVEFORS, U.; JONSON, N.; BOYSEN, M.E.; SCHNÜRER, J. 2002. Efficay of the biocontrol *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under oxygen and carbon dioxide regimens. FEMS *Yeast research*. 2: 389-394

DUNN, A.K., KLIMOWICZ, A.K., AND HANDELSMAN, J. 2003. Use of a promoter trap to identify *Bacillus cereus* genes regulated by tomato seed exudate and a rhizosphere resident, *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied Enviromenal Microbiology*. 69: 1197-205.

ECKERT, J.W. 1987. *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensitivity to imazalil. *Phytopathology*. 77: 1728

EDEN, M.A.; HILL, R.A.; STEWART, A. 1996. Biological control of *Botrytis* stem infection of greenhouse tomatoes. *Plant Pathology*. 45:276-284.

EL-GHAOUTH, A.; SMILANICK, J.L.; WILSON, C.L. 2000. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 19:103-110.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology* 93: 344-348

EL GAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; SMILANICK, J.; KORSTEN, L. 2002. Biological Control of Postharvest Diseases of Citrus Fruits. En: Biological Control of Crop Diseases. Gnanamanickam, S.S. (Ed.) Marcel Dekker, New York.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; CALLAHAN, A.M. 2003.Induction of chitinase, ß-1,3-glucanase and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathology*. 93: 349-355

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88, 282–291

EL-HENDAWY, H.H.; OSMAN, M.E.; SOROUR, N.M. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiological Research*. 160:343-52

EL-GOORANI, M. A., EL-KASCHEIR, H.M., KABEEL, M.T. AND SHOEIB, A.A. 1984. Resistance to benzimidazole of *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* isolated from packinghouses and orchards in Egypt. *Plant Disease* 68: 100-102

EL-KATATNY, M.H.; SOMITSCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M.S.; GÜBITZ, G.M. 2000 Production of chitinase and ß-1,3glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology Biotechnology*. 38:3:173-180.

ELAD, Y. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*. 10: 499-507

ELAD, Y. 1992. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: Fenetrazole and Fenetranil. *Plant Pathology*,41:1: 47-54

ELAD, Y. 1988. Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. *Crop Protection* 7:6:361-366

ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; HENIS, Y. 1983 Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scannmg electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*. 73:85-88.

ELAD, Y.; GULLINO, M.L.; SHTIENBERG, D.; ALOIC, C. 1995. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. *Crop Protection*, 14:2:105-109.

ELMER, P. A. G; REGLINSKI, T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*. 55:155- 177

EPA. 2006a. Bacteriophages of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (006449) &Bacteriophages of *Pseudomonas syringae* pv. tomato (006521) Fact sheet. Disponible en: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006449-006521.htm. Consultado en: octubre de 2006.

EPA.2006b. *Ampelomyces quisqualis* isolate M-10 (021007) Fact Sheet. Disponible en: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_021007.htm. Consultado en octubre 2006.

EPA.2006c. Biopesticide Active Ingredient Fact Sheets. Disponible en: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/index.htm. Consultado en octubre 2006.

EPA. 2006d. *Pseudomonas syringae* strain ESC-10 (006441) *Pseudomonas syringae* strain ESC-11 (006451) Fact Sheet. Disponible en: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006441.htm. Consultado en: octubre de 2006.

EPA. 2006e. *Candida oleophila* isolate I-182 (021008) Fact Sheet. Disponible en: http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_021008.htm. Consultado en: octubre de 2006.

EPA 2006f. Harpin protein (006477) Fact Sheet http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006477.htm. Consultado en: octubre de 2006.

ESSELN, S.; WELTZIEN, H.C. 1997. Endophytic fungi in the xylem of cuttings in different rooting substrates. *Journal of Plant Diseases and Protection* 104:4:346-352.

EZZIYYANI, M.; PÉREZ SÁNCHEZ, C.; AHMED, A.S.; REQUENA, M:E.; CANDELA, M.E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophtora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) *Anales de Biología*. 26: 35-45.

FALLIK, E.; AHARONI, Y.; COPEL, A.; RODOV, R.; TUVIA-ALKALAI, S.; HOREV, B.; YEKUTIELI, O.; WISEBLUM, A.; REGEV, R. 2000. A short hot water rinse reduces postharvest losses of 'Galia' melon. *Plant Pathology*. 49: 333-338.

FALLIK , E.; GRINBERG,S.; ALKALAI,S.; YEKUTIELI,O.; WISEBLUM,A.; REGEV,R.; BERES,H.; BAR-LEV, E. 1999. A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. *Postharvest Biology and Technology*. 15:25-32

FALLIK, E.; GRINBERG,S.; GAMBOURG,M.; KLEIN,J.D.; LURIE, S. 1995. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. *Plant Pathology*. 45:92-97

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: 341-350.

FERGUSON, I.B.; BEN-YEHOSHUA, S.;MITCHMAN, E. MC DONALD, R.E.; LURIE, S. 2000. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. *Postharvest Biology and Technology*.21:1-6.

FERNÁNDEZ, M.R. 1992.The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infesting wheat and black oat straw. *Soil Biology Biochemistry* 24:1031-1034.

FIDDAMAN, P.J.; O'NEILL, T.M.; ROSSALL, S., 2000. Screening of bacteria for the suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce (*Lactuca sativa*) using leaf disc bioassays. *Annals of Applied Biolology.* 137, 223–235.

FLAHERTY, J. E.; HARBAUGH, B. K.; JONES, J. B.; SOMODI, G. C.; JACKSON, L. E. 2001. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *Hortscience* 36:98-100.

FLAHERTY, J.E.; JONES, J.B.; HARBAUGH, B.K.; SOMODI, G.C.; JACKSON, L.E. 2000. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. *Hortscience* 35:882-884.

FLAVIER, A. B.; GANOVA-RAEVA, L.M.; SCHELL, M.A.; DENNY, T.P. 1997. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *Journald of Bacteriology*. 179:7089-7097

FLOR, H.H., 1955. Host parasite interactions in flax rust - its genetics. and other implications. *Phytopathology*. 45:680-685

FOKKEMA, N.J. 1993. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. *Pesticide Science*. 37:4:411-416.

FRANCÉS, J.; BONATERRA, A.; MORENO, M.C.; CABREFIGA, J.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E. 2006. Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*. 39:299-301

FRANKOWSKI, J.; LORITO, M.; SCALA, F.; SCHMID, R.; BERG, G.; BAHL, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology*. 176:6: 421-426.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journald of Bacteriology*. 176:2796-2806

GARCIA, R.; CALTAGIRONE, L.E.; GUTIERREZ, A.P. 1988. Comments on a redefinition of biological control. *Biosciences* 38: 692-694

GARMENDIA, G.; GARAT, F.; DE AURRECOECHEA, I.; VERO, S. 2005a. Levaduras nativas como controladores de enfermedades postcosecha de frutas en Uruguay. *Agrociencias*. IX 327- 335

GARMENDIA, G.; GARAT, F.; ALANIZ, S.; SILVERA, E.; AURRECOECHEA, I.; VERO, S. 2005b. Un tratamiento alternativo para asegurar la calidad de frutas cítricas. *Carnes y Alimentos*. 16: 34-41

GENBANK Disponible en:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html

GHINI, R.E. 1996. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. *Fitopatolologia Brasileira* 21:2:285-288,

GIACINTI, M.A. 2003. Visión mundial de las frutas con calidad diferenciada: Producción integrada y Orgánica. *Fruticultura Profesional* 136: 7-20

GILL, J.J.; SVIRCEV, A.M.; SMITH, R.; CASTLE, A.J. 2003. Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied Environmental Microbiology*. 69:2133-2138.

GILL, J.J.; Abedon, S.T. 2003. Bacteriophage Ecology and Plants. APSnet Feature. Disponible en: http://www.apsnet.org/online/feature/phages/. Consultado en octubre 2006.

GRAVEL, V.; MARTINEZ, C.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. 2005. Antagonist Microorganisms with the Ability to Control *Pythium* Damping-off of Tomato Seeds in Rockwool. *BioControl* 50:5: 771-786

GREEN, H.; LARSEN, J.; OLSSON, P.A.; JENSEN, D.F.; JAKOBSEN, I. 1999. Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil. *Applied Environmental Microbiology*. 4: 1428–1434.

GRIGOLETTI, A.; MAZUR, R.; GARCIA, C. 2004. Uso de *Gliocladium roseum* no controle de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. *Fitopatologia Brasileira* 29 s.324.

GUELDNER, R.; REILLY, C.; PUSEY, P.; COSTELLO, C.; ARRENDALE, R.; COX, R.; HIMMELSBACH, D.; CRUMLEY, G.; CUTLER, H. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 36: 366-370.

HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8:1855-1869

HARAN, S.; SCHICKLER,H.; OPPENHEIM,A.; CHET,I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzi*anum chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*. 86: 980-985.

HARMAN, G.E.; BJÖRKMAN, T.. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement, p. 229-265. En: G. E. Harman and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd., London, United Kingdom.

HARMAN G.E.; LATORRE B.; AGOSIN E.; SAN MARTIN R.; RIEGEL D.G.; NIELSEN P.A.; TRONSMO A.; PEARSON R.C. 1996 Biological and Integrated Control of *Botrytis* Bunch Rot of Grape Using *Trichoderma* spp. *Biological control* 7:259-266

HAAS, D.; DEFAGO, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 307-319

HAMMERSCHMIDT, R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 77–84

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980–985

HASHIDOKO, Y.; NAKAYAMA, T.; HOMMA, Y.; TAHARA. 1999. Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. *Tetrahedron Lett.* 40:2957-2960

HAUSBECK, M.K.; MOORMAN, G.W. 1996. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. *Plant Disease* 80:11:1212-1219.

HO, M.A.; SQUIRE LM, SABEH, N.C.; GILES, D.K.; VANDERGHEYNST, J.S. 2005. Design and evaluation of a grapevine pruner for biofungicide application. *Bioresource Technology* 96 : 963–968

HOWITT, R.L:J.; BEEVER, R.; PEARSON, M.N.; FORSTER, R.L.S. 2001. Genome characterization of *Botrytis* virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like' viruses *Journal of General Virology*. 82: 67-78.

IDRIS, H.A., LABUSCHAGNE, N., KORSTEN, L., 2006. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*, 2006. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.07.017

INBAR, J.; CHET, I. 1992. Biomimics of fungal cell – cell recognition by used of lectin-coated nylon fibers. *Journal of Bacteriology*.174: 1055-1059.

IPPOLITO, A., A. EI GHAOUTH, C.L. WILSON, AND M. WISNIEWSKI. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Techonlogy*. 19: 265-272.

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

IRIKIIN Y.; NISHIYAMA, M.; OTSUKA, S.; SENOO, K. 2006. Rhizobacterial community-level, sole carbon source utilization pattern affects the delay in the bacterial wilt of tomato grown in rhizobacterial community model system *Applied Soil Ecology* 34:27-32

JACQUES, M.-A., L. L. KINKEL, AND C. E. MORRIS. 1995. Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Applied Environmental Microbiology*. 61:899-906

JANISIEWICZ. W. J ; BORS. B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied Enviromental Microbiology*. 61: 3261-3267.

JANISIEWICZ, W. J., JEFFERS, S. N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*,16: 629-633.

JANISIEWICZ, W.J; KORSTEN, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review Phytopathology*. 40: 411- 441.

JANISIEWICZ, W.J, YOURMAN, L.; ROITMAN, J.; MAHONEY, N. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrine, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*. 75: 490-494

JANISIEWICZ, W.J.; TWORKISKI, T.J.; KURTZMAN, C.P. 2001 Biocontrol potential of *Metchnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology*. 91:1098-1108

JANISIEWICZ, W.J.; MARCHI, A. 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease*, 76: 555-560.

JANISIEWICZ, W. J.; ROITMAN, J., 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology* 78: 194-198.

JANISIEWICZ, W.J.; ROITMAN, J. 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78: 1697-1700

JANISIEWICZ, W. J., TWORKOSKI, T. J., AND SHARER, C. 2000.Characterizing the Mechanism of Biological Control of Postharvest Diseases on Fruits with a Simple method to Study Competition for Nutrients. *Phytopathology*. 90: 1196-1200.

JANISIEWICZ, W.J.; USALL, J. y BORS, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopahtology* 82: 1364-1370.

JANISIEWICZ, W. ; YOURMAN, L.; ROITMAN, J.; MAHONEY, N. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*. 75: 490-494.

JARVIS, W.R. 1989. Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Disease*. 73:3:190-194.

JEFFRIES,T.W. 1987. Production and applications of cellulase laboratory procedures. Adapted from Mary Mandels "Production and applications of cellulose" Laboratory Procedures Handbook, U.S. Army Materials Laboratories, December 1974.

JIJAKLI, M.H.; LEPOIVRE, P. 1998. Characterization of an exo-b-1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. Phytopathology 88: 335-343.

KARABULUT , O. A.; LURIE , S.; DROBY , S. 2001. Evaluation of the use of sodium bicarbonate, potassium sorbate and yeast antagonists for decreasing postharvest decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology* 23: 233–236.

KELLER, M.; VIRET, O.; COLE, F.M. 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology*, 93:2:316-322,

KENNETH, W.; NICKERSON, AUDREY L. A.; HORNBY, J.M. 2006. Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond *Applied Environmental Microbiology*. 72: 3805-3813.

KERRY, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopahtology*. 38:423-441.

KHAN, N. I., SCHISLER, D. A., BOEHM, M. J., LIPPS, P. E. AND SHININGER, P. J. 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control* 29:245-255.

KHAN, N.I.; SCHISLER, D.A.; BOEHM, M.J.; SLININGER, P.J.; BOTHAST, R. J. 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of Fusarium head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. *Plant Diseases*. 85:1253-1258.

KHAN, N.I.; SCHISLER, D.A.; BOEHM, M.J.; LIPPS, P.E.; SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J. 1998. Biological control of scab of wheat incited by *Gibberella zeae*. Pages 45-46 in: Proceedings National Fusarium Head Blight Forum, 26-27 October 1998, East Lansing, MI.

KIM, B.S.; MOON, S.S.; HWANG, B.K. 1999. Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Canadian Journal of Botany*. 77, 850–858.

KIM, H.; FARRAND, S.K. 1997 Characterization of the acc operon from the nopaline-type Ti plasmid pTiC58, which encodes utilization of agrocinopines A and B and susceptibility to agrocin 84 *Journal of Bacteriology.* 179, 7559–7572

KIM J.; PARK, B.K.; KIM S.U.; CHOI D.; NAHM, B.H.; MOON, J.S.; READER, J.S.; FARRAND, S.K.; HWANG, I. 2006. Bases of biocontrol: Sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan Horse antibiotic that controls crown gall *PNAS* 103, 8846-8851 .

KIM, S.H.; CHI, J.G.; REITH, A.; KADENBACH, B.; 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*.11:131-140

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. 1980 *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*. 4:317–320.

KLOEPPER, JW, ZABLOTOWITCZ, RM, TIPPING, EM & LIFSHITZ, R. 1991 Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere. colonizers. InKeister, D.L.; Cregow, P.B. (Eds), The rhizosphere and Plant Growth. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp 315-326.

KÖHL, J.; GERLAGH, M.; DE HAAS, B.H. KRIJGER, M.C.; 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology*. 88:6:568-575.

KÖRSTEN, L.; TOWSEN, E.; CLAASENS, V. 1998. Evaluation of Avogreen as postharvest treatment for controlling anthracnose and stem-end rot on avocado fruit. *South African Avocado Grower's Association Yearbook*. 21:83-87

KOVACH, J; PETZOLDT, R; HARMAN, G.E. 2000. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for *Botrytis* control. *Biological Control*, 18:3: 235 – 242

KREDICS, L., ANTAL, Z., DOCZI, I., MANCZINGER, L., KEVEI, F., NAGY, E. 2003 Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung* 50:2-3:105-17.

KUPRFERMAN, E. 1997. Controlled atmosphere storage of apples. CA '97 Proceedings, Vol. 2, pp 1-30. Postharvest Horticulture Series No. 16, University of California , Davis.

KURTZMAN, C.P.; DROBY, S. 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots *Systematic and Applied Microbiology*. 24:395-399.

LAKSHMAN, D.K.; JIAN, J.; TAVANTZIS, S.M. 1998. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 6425-6429

LAMONDIA, J.A.; DOUGLAS, S.M. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* .81:7:729-732.

LANDA, B.B.; MAVRODI, O.V.; RAAIJMAKERS, J.; MCSPADDEN GARDENER, B.B.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D. M. 2002. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Applied Environmental Microbiology*.68, 3226–3237

LANDREAU, A.; POUCHUS, Y.F.; SALLENAVE-NAMONT, C.; BIARD, J.F.; BOUMARD, M,C, ROBIOU DU, P.T.; MONDEGUER, F.; GOULARD, C.; VERBIST, J.F. 2002. Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *Journal of Microbiology Methods*. 48: 181–194.

LATORRE, B.A.; FLORES, V.; SARA, A.M. 1994. Dicarboximide resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: Survey and characterization. *Plant Disease*, 78:10:990-994.

LATORRE, B.A.; SPADARO, I.; RIOJAS 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*. 21:10:957-961.

LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; ADAM, A.; GUEZ, J.S.; WATHELET, B.; ONGENA, M.; THONART, P.; GANCEL, F.; CHOLLET-IMBERT, M.; JACQUES, P. 2005. Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*.71: 4577-4584.

LEEMAN, M.; DEN OUDEN, F.M.; VAN PELT, J.A.; DIRKX, F.P.M.; STEIJL, H.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85:149-155

LEEMAN M.; DEN OUDEN, F.M.; VAN PELT, J.A.; CORNELISSEN, C.; MATAMALA-GARROS, A.; BAKKER P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. 1996. Suppression of *Fusarium* wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102, 21–31.

LEROUX, P.; CHANPELAND, F.; DESBROSSES, D. GREDT, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, 18:10:687-697.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.; JANISIEWICZ, W.; SAFTNER, R.; CAMP. 2003. effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on teh reduction of postharvest decay of Golden Delicious apples. *Postharvest Biology and Technology*. 27: 221-233.

LEWIS, J. A., FRAVEL, D. R., LUMSDEN, R. D.; SHASHA, B. 1995. Application of biocon-. trol fungi in granular formulations of pregelatinized starch-flour to control damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani*: *Biological Control* 5:397:404.

LEWIS, J. A.; PAPAVIZAS, G.C.1991. Biocontrol of plant diseases: the aproach for tomorrow. *Crop Protection*. 10: 95-98.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; ACHARYA, S.N. ERICKSON, R.S. 2004. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. *Plant Disease*, 88:11:1246-1251.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. ACHARYA, S.N. 2002. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 43:3:211-218.

LIM, T.K.; CHAN, L.G. 1986. Parasitism of *Phytophthora palmivora* by *Gliocladium roseum*. *Journal of Plant Diseases and Protection.* 93:5:509-514.

LIMA, G.; DE CURTIS, F.; CASTORIA, R.; DE CICCO, V. 1998. Activity of yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Sciece Technology*. 8:257-267

LIN, N.T.; LIU, T.J.; LEE, T.C.;YOU, B.Y.; YANG, M.H.; WEN, F.S.; TSENG, Y.H. 1999. The Adsorption Protein Genes of *Xanthomonas campestris* Filamentous Phages Determining Host Specificity. *Journal of Bacteriology*. 8: 2465-2471.

LIMANCEAU, P.; BAKKER, P.A.; PAHAM; DE KOGEL, W.J.; ALABOUVELTE, C.; SCHIPPAS, B. 1992. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Applied Enviromental Microbiology*. 58: 2978-2982.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere *Applied Environmental Microbiology*. 4: 1875 – 1883

LIU, L.; KLOEPPER ,J.W.; TUZUN, S. 1995 Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting *rhizobacteria*. *Phytopathology* 85: 843-847.

LO C-T, NELSON EB, HAYES CK, HARMAN GE. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295–22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88, 129–136.

LOPER, J.E.; HENKELS, M.D. 1999. Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere *Applied Environmental Microbiology*. 65 : 5357-5363.

LÓPEZ, M.M.; GORRIS M.T.; SALCEDO, C.I.; MONTOJO, A.M.; MIRÓ, M. 1989. Evidence of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* strains sensitive and resistant to agrocin 84 by different *Agrobacterium radiobacter* strains on stone fruit trees. *Applied Environmental Microbiology*. 55:741-746.

LU, Z.; TOMBOLINI, R.; WOO, S.; ZEILINGER, S.; LORITO, M.; JANSSON, J.K. 2004. In Vivo Study of *Trichoderma*-Pathogen-Plant Interactions, Using Constitutive and Inducible Green Fluorescent Protein Reporter Systems. *Applied and Environmental Microbiology.* 70: 3073-3081.

MANWAR, A.V.; KHANDELWAL, S.R.; CHAUDHARI, B.L.; MEYER, J.M.; CHINCHOLKAR, S.B. 2004. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Applied Biochemistry Biotechnology.* 118:243-251

MARTÍNEZ, A.; OBERTELLO, M.; PARDO, A.; OCAMPO, J. A.; GODEAS, A. 2004. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*. 14: 79-84

MARTINEZ, C.; MICHAUD, M.; BELANGER, R.R.; TWEDDELL, R.J. 2002. Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1861-1868

MAVRODI, D.V.; BLANKENFELDT, W.; THOMASHOW, L.S 2006. Phenazine Compounds in Fluorescent Pseudomonas SPP.: Biosynthesis And Regulation *Annual Review of Phytopathology*. 44: 417-445.

MAZZOLA, M. 1999. Transformation of soil microbial community structure and *Rhizoctonia*-suppressive potential in response to apple roots. *Phytopathology*. 89:920-927

MAZZOLA, M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*.81:557-564

MAZZOLA, M. 2004. Influence of plant genotype on development of interactions with non-symbiotic plant beneficial soil microorganisms. *Research Signpost: Research Developments in Agricultural and Food Chemistry*. 37:103-122.

Mc CLURE, N.C.; AHMADI, A.; CLARE, B.G. 1998. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease. *Applied Environmental Microbiology*. 64:3977-3982

MICHEREFF, S. 2004. Controle biológico de doenças de plantas. Disponible en: <www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/T17.pdf>. visitada: 15 sep. 2004.

MILAGRES, A.M.F.; NAPOLEÃO, D.; MACHUCA, A. 1999 Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37, 1–6.

MILLER, M. B.; BASSLER,B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 55:165-199.

MOLINA, L.; CONSTANTINESCU, F.; MICHEL, L.; REIMMANN, C.; DUFFY, B; DÉFAGO, G. 2003.Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism *FEMS Microbiology Ecology* 45: 71-81, 2003.

MONDINO, P. 2004. Manejo ecológico de fitopatógenos en Uruguay. En: Manejo ecológico de doenças de plantas. Stadnik, M.; Talamini, V. Eds. Florianópolis, SC:CCA/UFSC. p159-176

MONDINO, P. 2003a Reducción del uso de plaguicidas: un elemento clave en la producción integrada. En: Producción Integrada en Uruguay. Claves de un sistema amigable con el medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. PREDEG/ GTZ : Montevideo. pp 175-182.

MONDINO, P. 2003b Control biológico de enfermedades de plantas. En : Producción Orgánica en Uruguay. Montevideo. p199 – 206

MONDINO, P. ; VERO, S. 1999. Control Biológico Postcosecha. Medidas para conservar fruta y hortalizas. *Horticultura Internacional* 26: 29-36.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; BAIDYAROY, D.; BELL, J.A.; HAUSNER, G.; FULLBRIGHT, D.W.; BERTRAND, H. 2000. A circular mitochondrial plasmid incites hypovirulence in some strains of *Cryphonectria parasitica*. *Current Genetics*. 37:242-256.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; BELL, J.A.; FULLBRIGHT, D.W.; BERTRAND, H. 1995. A cytoplasmatic transmissible hypovirulence phenotype associated with mitochondrial DNA mutations in the chesnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Proceedings of National Academic Science USA. 92:5935-5939

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; ALFENAS, A.C.; BARBOSA, J.G. 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: A valuable component in botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control*. 26:3:311-317.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; SUTTON, J.C. 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica*, 29:2:103-113.

MOYANO, C.; GOMEZ, V.; MELGAREJO, P. 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology*, 152:8-9: 484-490.

MUELLER, J.D.; SINCLAIR, J.B. 1981. Association of *Gliocladium roseum* with soybeans in Illinois. *Phytopathology*, 71:2:244.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS) 1987. Research briefings 1987. Report of the research briefing panel on biological control in managed ecosystems. National Academy Press, Washington, DC.

NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L.; HORNBY, J.M. 2006. Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Applied Environmental Microbiology*.72: 3805-3813.

NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; LIMA, G. 1998. Use of UV-C light to reduce *Botrytis* rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 13, 171-181

NISHIYAMA, M.; SHIOMI, Y.; SUZUKI, S.; MARUMOTO, T.1999. Suppression of growth of *Ralstonia solanacearum*, tomato bacterial wilt agent, on/in tomato seedlings cultivated in a suppressive soil, *Soil Science and Plant Nutrition*. 45 : 79–87

NOBRE, S.A.M.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; COTA, L.V.; DIAS, A.P.S. 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control,* 34:2:132-143.

NOWAK-THOMPSON, B.; CHANEY, N.; WING, J.S.; GOULD, S.J.; LOPER, J.E. 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* 181: 2166–2174.

NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; FONS, E.; VINAS I. 2002a. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples.*Journal Applied Microbiology*. 92:247-255.

NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; VINAS I. 2002b.Control of Penicillium expansum and Botrytis cinerea on apples and pears with the combination of Candida sake and Pantoea agglomerans. Journal Food Protection. 65:178-184.

NUNES, C.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology*. 79: 53-61.

NUÑEZ, S.; LEONI, C.; DE LUCCA, R.; MERINO, N.; BUSCHIAZZO, M.; CARBONE, F.; SCATONI, B.; MONDINO, P. 2005. Programa de Producción Inetegrada Fruticola, Directivas Zona Sur-Uruguay. s/p.

OKIGBO, R.N.; IKEDIUGWU, F.E.O. 2000. Studies on Biological Control of Postharvest Rot in Yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. *Journal of Phytopathology* 148: 351-355 .

ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. 1987. Rhizosphere colonization by *Serratia marcescens* for the control of *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biology and Biochemestry*. 19: 747-751.

PALOU, L.; USALL, J.; MUÑOZ, J.A. SMILANICK, J.L. VIÑAS, I. 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 24: 93-96.

PAOLILLO, A.; BURGUEÑO, J.; MONDINO, P.; VERO, S. 1998. Control Biológico del Moho Azul causado por *Penicillium expansum* sobre frutos de manzana. *Fitopatología* 34:2:49-50

PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potencial for biocontrol. *Annual Review Phytopathology*. 23:23-54.

PELAYO. C. 1992. Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas. Editorial Limusa. Balderas, México. 303pp.

PENG, G.; SUTTON, J.C. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 13:3:247-257.

PENG, G.; KEVAN, P.G. 1992. Effectiveness of honey-bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 14:2:117-129.

PEÑALVER, R.; VICEDO, B. ; SALCEDO, C. I.; LÓPEZ, M.M. 1994. *Agrobacterium radiobacter* strains K84, K1026 and K84 Agr-produce an antibiotic-like substance, active *in vitro* against *A. tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas*. *Biocontrol Science and Technology*. 4:259-267.

PENYALVER R,; LÓPEZ M.M. 1999. Cocolonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1936–1940.

PENYALVER, R.; VICEDO, B.; LOPEZ, M.M. 2000. Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. *European journal of plant pathology* 106: 9: 801-810.

PEREYRA, S.; GARMENDIA, G.; CABRERA, M.; VERO, S.; PIANZZOLA, M.J.; DILL-MACKY, R. 2005. Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *Agrociencia*. IX:337-343

PERONDI, N.L.; LUZ, W.C. DA; THOOMAS, R. 1996.Controle microbiologico da giberela do trigo. [Biological control of Fusarium head blight of wheat]. *Fitopatologia Brasileira*. 21:243-249.

PETERSSON, S.; JONSON, N.; SCHNÜRER, J. 1999. *Pichia anomala* as a biocotrol agent during storage of high mositure feed grain under airtight conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 15: 175-184.

PIANZZOLA, M., MOSCATELLI, M., VERO, S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease*. 88 :1: 23-28.

PIRHONEN, M.; FLEGO, D.; HEIKINHEIMO, R.; PALVA, E.T.. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO Journal*. 12:2467-2476.

PLAZA P, USALL J, SMILANICK JL, LAMARCA N, VINAS I. 2004.Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal Food Protection.* 2004. 67:781-786.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus. Letters in Applied Microbiology* 25, 284–288.

PORAT, R.; DAUS, A.; WEISS, B.; COHEN, L.; FALLIK, E.; DROBY, S. 2000. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. *Postharvest Biology and Technology* 18, 151-157.

PRATELLA, G. C.; MARI, M.; GUIZZARDI, M.; FOLCHI A. 1993. Preliminary studies on the efficiency of endophytes in the biological control of postharvest pathogens *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit. *Postharvest Biology and Technology* 3: 361-368

RAAIJMAKERS, J.; Vlami, M.; de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81:537-547.

RAAIJMAKERS JM, BONSALL RF, WELLER DM. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 89, 470–475

READER, J.S.; ORDOUKHANIAN, P.T.; KIM, J.G.; DE CRÉCY-LAGARD, V.; HWANG, I.; FARRAND, S.K.; SCHIMMEL, P. 2005 Major Biocontrol of Plant Tumors Targets tRNA Synthetase. *Science* 309, 1533.

REIS, E.M.; CARMONA, M. 2002. Fusariosis del trigo. Biología, epidemiología y estrategias para su manejo. BASF Argentina S.A. 1ª edición. Buenos Aires.

REY, M. 1998. Mejoramiento de cepas de *Trichoderma* para su utilización como agentes de control biológico. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.168pp.

RHA, E.; PARK, H.J.; KIM, M.O.; CHUNG, Y.R.; LEE, CH.; KIM, J.W. 2006. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea. Fems Microbiology Letters.* 201:1:105-109.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection.* 20:1-11.

RANDHAWA, P.S.; CIVEROLO, E.L. 1986. Interaction of *Xanthomonas campestris* pv *pruni* with pruniphages and epiphytic bacteria on detached peach trees. *Phytopathology* 76:549-553.

ROBERTS, R.G. 1990. Postharvest biological control of the yeats *Cryptococcus laurentii* and *Rhdotorula glutinis* against postharvest rots on differnet frutis. *Biocontrol Science Technology.* 8:257-267

RYDER, M.H.; JONES, D.A. 1991. Biological control of crown gall using *Agrobacterium* strains K84 and K1026.*Australian Journal of Plant Physiology* 18, 571-579.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.;HU, C.H.; REDDY,, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARÉ, P.W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis. Plant Physiology.* 134:1017-1028

SABARATNAM, S.; TRAQUAIR, J.A.. 2002. Formulation of a Streptomyces biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. *Biological Control*. 23:3:245-253.

SALIGKARIAS, I.D.; GRAVANIS, F.T.; EPTON, H.A.S. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* ontomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guillermondii* strains 101 and US7 and *Candida oleophila* strin I-182: I. In vivo studies. *Bological Control*. 25: 143-150

SAMUELS, G.J.; DODD, S.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L.A.; PETRINI, O. 2002 *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94:1:146-170.

SAMUELS, G.J.; CHAVERRI, P.; FARR, D.F.; MCCRAY, E.B. 2006. *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Visitado 11 de setiembre de 2006: http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm. Consultado octubre 2006.

SANTHI, A.; SIVAKUMAR, V. 1995. Biocontrol potential of Pseudomonas fluorescens(Migula) against root-knot nematode, Meloidogyne incognita (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 on tomato. *Journal of Biological Control*. 9:113-115

SANTOS, A.; MARQUINA, D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine *Microbiology* 150 : 2527-2534

SAVARD, M.E.; MELZER, M.S.; BOLAND, G.J.; BENSIMON, C.; BLACKWELL, B.A. 2003. A new 1-hydroxy-2,6-pyrazinedione associated with hypovirulent isolates of *Sclerotinia minor*. *Journal of Natural Products*. 66: 306-309.

SCHENA, L., IPPOLITO, A., ZAHAVI, T., COHEN, L.; DROBY, S. 2000.Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biocontrol yeasts. *European Journal of Plant Pathology* 106, 681-91

SCHENA, L., IPPOLITO, A.; ZAHAVI, T.; COHEN, L.; NIGRO, F.; DROBY, S. 1999. genetic diversiy and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*. 17: 189-199

SCHISLER, D.A.; KHAN, N.I.; BOHEM, ,M.J.; SLININGER, P.J. 2002.Greenhouse and field evaluation of biological control of Fusarium head blight on durum wheat. *Plant Dis*. 86:1350-1356.

SCHNABEL, E.L.; JONES A.L.2001. Isolation and Characterization of Five *Erwinia amylovora* Bacteriophages and Assessment of Phage Resistance in Strains of *Erwinia amylovora Applied and Environmental Micro*biology, 67:1:59-64

SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.; HAYES, C.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.; KUBICEK, C. 1994 Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes andpeptaibol antibiotics, molecular mechanisms involvedin the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied Environmental Microbiology* 60:2:4364-4370

SHIOMI, H. F.; SILVA, H.S.A. ; MELO, I.S. ; NUNES, F.V. ; BETTIOL, W. 2006..Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola*, 63:32-39.

SCHIRRA, M., D'HALLEWIN, G., BEN-YEHOSHUA, S. AND FALLIK, E. 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology* 21: 71-86

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Review* 26: 257–276.

SCHROERS, H.J.; SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A.; GAMS, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its realtionship to *Bionectria ochroleuca* , and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*. 91:2:365-385.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemestry*. 35:1615-1623

SIGLER, W. V.; TURCO, R. F. 2002. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Soil Ecology*. 21:107-118

SILVEIRA, A.C.; GEPP, V.; & PEREZ, E. 2002. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum.* in Uruguayan vegetable crops. In: 8th Internacional Congress of Plant Pathology, Christchurch, Nueva Zelandia, 3 –7 de febrero de 2003. p. 33

SILVEIRA, A.C.; GEPP, V.; & PEREZ, E. 2001. Aislamiento y selección de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Anais da 7ª Reuniao de Controle Biológicos de Fitopatógenos. Bento Gonçalvez, Embrapa Uva e Vinho. 26-27 de noviembre de 2001. p.95

SILVERA-PÉREZ , A.E.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; DUARTE, V.; VALADARES-INGIS, M.C.; INGLIS, P.; BORGES, R.; GAVIÃO, C.; MENEZES, J.E. 2005. Incidência e severidade do mofo cinzento em mudas de *Fuchsia speciosa* tratadas com fungicidas e *Clonostachys rosea*. IN: FÓRUM LATINOAMERICANO DE PLANTAS ORNAMENTAIS, 2, Nova Petrópolis-RS. Resumo...Nova Petrópolis: Nova Prova, 200

SILVERA, E; WOZNIAK, A; GARAT, F; DE AURRECOECHEA, I; MONDINO P.; VERO, S 2001. Control biológico del moho azul de los citrus ocasionado por *Penicillium italicum*. VII Reuniao de Controle Biológico de Fitopatógenos. Bento Goncalves, RS, Brasil.

SIMON, H.M., SMITH, K.P., DODSWORTH, J.A., GUENTHNER, B., HANDELSMAN, J., AND GOODMAN, R.M. 2001. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the spermosphere. *Applied Environmental Microbiology*. 67:514-520

SMILANICK, J.L.; DENIS-ARRUE, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease*. 76: 481.

SMILANICK, J.L. DENIS-ARRUE, R. BOSCH, J.R. GONZALEZ, A.R., HENSON, D.; JANISIEWICZ, W.J. 1993. Control of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. *Crop Prot*. 12:513-520.

SMILANICK, J.L.; MARGOSAN, D.A.; MILKOTA, F.; USALL, J.; MICHAEL, I. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate sals and influence of comercial postharvest practices on their efficay. *Plant Disease*. 83: 139-145

SMITH, K.P.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. 1999. Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 96:4786-4790.

SPADARO, D.; VOLA, R.; PIANO, S.; GULLINO, M.L. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*. 24:123-134.

STEVENS, C. V. A.; KHAN, J. Y.; LU, C. L.; WILSON, P. L.; PUSEY, E. C. K.; IGWEGBE, K.; KABWE, Y.; MAFOLO, J.; LIU, E.; CHALUTZ; S. Droby. 1997. Integration of ultraviolet light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biological Control* 10: 98-103.

STEWART, A.; HARRISON, Y.A. 1989. Mycoparasitism of Sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Australasian Plant Pathology* 18:10-14.

STEYAERT, J.M.; RIDGWAY, H.J.; ELAD, Y.; STEWART, A. 2003 Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 31: 281-291

STICHER, L.; MAUCH-MANI,B.; MÉTRAUX, J.P. 1997. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review Phytopathology*. 35:235-270

STRANGE, R.N.; SMITH, H. 1978. Effect of choline, betaine and wheat extract on growth of cereal pathogens. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 70:193-199.

SUTTON JC, PENG G, 1993a. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology,* 83, 615-21.

SUTTON, J.C.; PENG, G. 1993b. Manipulation and vectoring of biological organisms to manage foliage and fruti diseases in corpping systems. *Annual Review Phytopathology* 31:473-493,

SUTTON, J.C. 1994. Biological control of strawberry diseases. *Advances in strawberry research*, 13:1-12,

SUTTON, J.C.; LI, D.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.H. 1997. A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*. 81:4:316-328.

SUTTON, J.C.; LIU, W.; HUANG, R.; OWEN-GOING, N. 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology*. 12:4:413-425.

TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I.; USALL, J.; MAGAN, N. 1998. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology* 88:960–964.

THOMASHOW, L.; BONSALL, R.; WELLER, D. 1997. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ, p. 493-499. Manual of environmental microbiology. ASM Press, Washington, D.C.

TOYOTA, K.; KIMURA, M.; TAKECHI, S.; KUNINAGA, S. 2000. Comparison of microbial community structure between soils suppressive and conducive to *Fusarium*-wilt of radish. *Soil Microorganisms.* 54 : 69–79.

TSAI, P; PEARSON, M. N:; BEEVER, R.E. 2004. Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. *Mycological Research*. 108: 907-912

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; SUTTON, J.C.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A.B.C. 1997. Controle Biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. *Fitopatologia Brasileira*. 22:1:69-73.

USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; FONS, E.; VIÑAS, I.. 2000. Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 83-92

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 36:453-483.

VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J.; TRIJSSENAAR, A.; VAN'T WESTENDE, Y.; HARTOG, F.; VAN LOON, L.C. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 716–724.

VERO, S.; SILVERA, E.; GARAT, F.; GARMENDIA, G.; ALANIZ, S.; DE AURRECOECHEA, I.; WISNIEWSKI, M. 2004. Biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of citrus. International Workshop: Development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food production systems. 24-27 marzo 2004. Sevilla, España

VERO, S.; GARAT, F.; AURRECOECHEA, I. 2003. Control Biológico de patógenos en poscosecha de manzanas. In: Producción Orgánica en Uruguay. Montevideo, pag. 207-211.

VERO, S.; MONDINO, P. 2002. *Control biológico de enfermedades de plantas*. En Perfil Ambiental del Uruguay 2002, Ana Dominguez y Ruben Prieto (Coordinadores) 81-92.

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.

VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. 2001 Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CAB International, Bristol, pp 311-346

VILCHES, S.; Y CASTILLO, A. 1997. A double-stranded RNA mycovirus in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 155: 125-130

VICEDO, B.; PEÑALVER, R.; ASINS, M.J.; LÓPEZ, M.M. 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tramutant strain K1026. *Applied Environmental Microbiology*. 59:309-315

VIÑAS, I.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; SANCHIS, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake. International Journal of Food Microbiology,* 40: 9-16.

WALKER, G.M.; MCLEOD, A.H.; HODGSON, V.J. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters.* 127, 213–222.

WANG, P.; NUSS, D.L. 1995. Induction of a *Cryphonectria parasitica* Cellobiohydrolase I Gene is Suppressed by Hypovirus Infection and Regulated by A GTP-Binding-Protein -Linked Signaling Pathway Involved in Fungal Pathogenesis. *Proceedings of National Academic Science* USA 92:11529–11533.

WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; GARDENER, B.B.; THOMASHOW, L.S. 2002 Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*. 40:309-48.

WHIPPS, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52:487-511

WHITEMAN, S.A.; STEWART, A. 1998. Suppression of *Botrytis cinerea*. Sporulation on irradiated grape leaf tissue by the antagonistic bacterium *Serratia liquefaciens*. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 26: 325–330.

WILSON, M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19:4:188-191.

WILSON, C.L; WISNIEWSKI, M.E. (Eds) 1994. Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice. CRC Press. Boca Raton FL.

WISNIEWSKI, M.E.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON,C.L.; CHALUTZ, E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*: Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological Mololecular Plant Pathology.* 39, 245–258

WISNIEWSKI, M.; DROBY. S.; CHALUTZ, E.; EILAM, Y. 1995.- Effects if Ca+2 y Mg+2 en *Botytis cineres* and *P. expansum* control in vitro and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pahology*. 44: 1016- 1024.

WOOD, D. W.; GONG, F.; DAYKIN, M. M.; WILLIAMS, P.; PIERSON, L. S., 3rd. 1997. *N*-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Journal of Bacteriology.*, 179, 7663–7670

WOZNIAK, A. 2003. Caracterización de los patógenos postcosecha de citrus y perspectivas para el control biológico de los mismos Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay. 93pp.

WYSS, P.; BOLLER, T.H.; WIEMKEN, A.1992. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 147:159–162.

XIAO-YAN, SONG, QING-TAO, SHEN, SHU-TAO, XIE, XIU-LAN, CHEN, CAI-YUN, SUN; YU-ZHONG, ZHANG. 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 260:1:119-125.

XIE, J.; WEI, D.; JIANG, D.; FU, Y.; LI, G.; GHABRIAL, S.; PENG, Y. 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal General Virology*. 87: 241 - 249.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET. I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syr*ingae pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperel*lum (T-203) and the accumulation of phytoalexins. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 7343-7353

YEDIDIA, I.; SRIVASTA, A.K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. 2001 Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*. 235:235-242

YOURMAN, L.F.; JEFFERS, S.N.; DEAN, R.A. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 91:.3:307-315

YOHALEM, D.S.; KRISTENSEN, K. 2004. Optimization of timing and frequency of application of the antagonist *Ulocladium atrum* for management of gray mold in potted rose under high disease pressure. *Biological Control* 29:2:256-259.

YU, G.Y.; SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L.; BERTAGNOLLI, B.L. 2002. Produciton of iturin A by *Bacillus amyloloiquefaciens* supressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* 34:955-963.

YU, H.; SUTTON, J.C. 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19:3:237-246

YU, H.; SUTTON, J.C. 1997. Effectiveness of bumblebees and honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseurn* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 10:113-122.

YU, H.; SUTTON, J.C. 1999. Density dynamics of *Gliocladium roseum* in relation to biological control of *Botrytis cinerea* in red raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21:1:.23-32

ZALDÍVAR, M.; VELÁSQUEZ, J.C.; CONTRERAS, I.; PÉREZ, L.M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontol. Electronic Journal of Biotechnology [on line]. Vol. 2, Nº 3. Disponible en : http://www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue3/full/7/ISSN 0717-3458. Consultado en octubre 2006.

ZAMBONI-PINOTTI, M.M.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; CAPALBO, D.; SILVA-RIBEIRO, R.T. 2005. Antagonismo de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea* em folhas destacadas de morangueiro, framboeseiro e amoreira. *Summa Phytopathologica*, 31:s:181

ZHANG, P.G.; HOPKIN, A.A. 1996. Inoculum concentration and time of application of *Gliocladium roseum* in relation to biocontrol of *Botrytis cinerea* in black spruce seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, 26:3:360-367.

ZHANG H.Y.; ZHENG, X.D.; FU, C.X.; XI, Y.F. 2005. Postharvest biological. control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*. *Postharvest Biology and Technology* 35 :79-86

ZHANG, X.; ZHANG,B.X.;ZHANG Z.; SHEN,W.F.; YANG, C.H.;,YU, J.Q.; ZHAO, Y.H. 2005. Survival of the biocontrol agents *Brevibacillus brevis* ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116 on the spikes of barley in the field. *Journal of Zhejiang University Science* 6:770-777

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; YAO, C.; WEI, G. 1997. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles by plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Econ. Entomol.* 90: 391-396

ZEILINGER, S.; GALHAUP, C.; PAYER, K.; WOO, S.L.; MACH, R.L.; FEKETE, C.; LORITO, M.; KUBICEK, C. P.. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.* 26:131-140.

ZHENG, X.; ZHANG, H.; XI, F. 2004. Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner on biocontrol of postharvest decay of arbutus berries *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 55-60

ZHOU, T.; BOLAND, G.J. 1997. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. *Phytopathology*. 87:147-153.

ZHOU, T.; BOLAND, G.J. 1998. Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 21:93-98.

Esta publicación responde a las demandas de conocimientos de estudiantes y técnicos acerca del Control Biológico de patógenos de plantas.

Se brindan los conceptos básicos y definiciones del Control Biológico.

Se analiza el proceso de desarrollo de métodos de CB desde la comprensión del patosistema, pasando por la búsqueda y selección de agentes de biocontrol, estudios de los mecanismos de acción hasta su aplicación.

Finalmente se presentan ejemplos de desarrollo de métodos de CB en poscosecha, CB de la fusariosis del trigo y CB del Moho gris ocasionado por Botrytis cinerea.

CO-EDITOR

FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

AG
ÁREA AGRARIA