

**Trabajo Especial II de Grado
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República**

CONTROL BIOLÓGICO EN POSTCOSECHA DE MANZANAS “RED DELICIOUS”

Bach. María Victoria Díaz Brera

Octubre, 2015
Montevideo- Uruguay



Tutora: Dra. Gabriela Garmendia
Cátedra de Microbiología
Facultad de Química-UdelaR



DEDICATORIA

*A mis dos hijos que cambiaron mi vida para siempre, por quienes
lucho y trabajo por ser cada día mejor.*

AGRADECIMIENTOS

A mi amado esposo por su sacrificio y esfuerzo, por darme su apoyo y creer en mi capacidad, aunque hayamos pasado momentos difíciles siempre ha estado brindándome su comprensión, cariño y amor.

A mi madre por su ayuda y enseñanzas de vida.

A mi compañera de carrera y amiga quien sin esperar nada a cambio compartió sus conocimientos y que durante años estuvo apoyándome para lograr que este sueño se haga realidad.

A familiares y amigos que con sus palabras de aliento no me dejaban decaer, para que siguiera.

Gracias a la Dra. Gabriela Garmendia por ser mi tutora y orientarme en elaborar este trabajo.

A la Dra. Silvana Vero por darme la oportunidad de trabajar con su equipo, por sus aportes y paciencia en este largo proceso.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Producción de manzanas en Uruguay.....	7
Conservación del fruto	7
Principales patógenos de manzana	8
Problemática Actual	9
Buenas Prácticas Agrícolas y Control Biológico.....	11
Antagonistas y sus mecanismos de acción	13
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de <i>Penicillium expansum</i> responsables de podredumbres en manzanas.....	18
1.1. Aislamiento	18
1.2. Ensayo de Patogenicidad	18
1.3. Identificación fenotípica	18
1.4. Determinación de la sensibilidad in vitro (CIM) de los aislamientos identificados como <i>Penicillium expansum</i> a los fungicidas Tiabendazol e Iprodione	19
2. Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos nativos capaces de actuar como agentes biocontroladores de <i>P. expansum</i> en postcosecha en manzanas “Red Delicious”	20
2.1. Estudio de flora epifítica y aislamiento de presuntos agentes biocontroladores.....	20
2.2. Selección primaria	20
2.3. Identificación fenotípica de las cepas antagonistas	21
2.4. Selección secundaria. Capacidad antagonista en fruta	21
2.5. Caracterización del antagonista seleccionado	22
2.5.1. Colonización de la herida por el antagonista a 5°C	22
2.5.2. Sensibilidad a Iprodione in vitro	22
2.5.3. Determinación de temperatura óptima de crecimiento	23
2.6 Identificación molecular del antagonista seleccionado	23
2.6.1 Extracción del ADN	23
2.6.2 Amplificación de la región ITS1-ITS2.....	24
2.6.3 Amplificación de la región D1-D2 del gen que codifica para el 26S rRNA	24
2.6.4 Análisis de secuencia.....	24
3. Determinación de los mecanismos de acción del antagonista seleccionado.....	25
3.1. Cultivo dual	25

3.2.	Producción de sustancias antifungicas por parte del antagonista seleccionado	26
3.2.1.	Producción de enzimas	26
3.2.2.	Producción de sideróforos	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		28
1.	Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de <i>Penicillium expansum</i> responsables de podredumbres en manzanas.....	28
1.1.	Aislamiento, ensayo de patogenicidad y selección.....	28
1.2.	Determinación de la resistencia in vitro (CIM) a los fungicidas TBZ e IP.....	29
2.	Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos nativos capaces de actuar como agentes biocontroladores de <i>P. expansum</i> en postcosecha en manzanas "Red Delicious"	30
2.1.	Estudio de flora epifítica y aislamiento de presuntos agentes biocontroladores.....	30
2.2.	Selección primaria	30
2.3.	Identificación fenotípica de las cepas antagonistas	31
2.4.	Selección secundaria. Capacidad antagonista en fruta	31
2.5.	Caracterización del antagonista seleccionado	32
2.5.1.	Colonización de la herida en el fruto a 5°C	32
2.5.2.	Sensibilidad a Iprodione in vitro	33
2.5.3.	Determinación de temperatura óptima de crecimiento	34
2.6.	Identificación molecular del antagonista seleccionado (B)	35
3.	Determinación de los mecanismos de acción del antagonista seleccionado.....	36
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....		37
REFERENCIAS.....		39
ANEXO.....		49

RESUMEN

La producción de manzanas en el Uruguay es una de las más importantes del país y dentro de ellas la variedad que componen el grupo Red Delicious aportan el 53% de la producción nacional.

Estimaciones indican que entre un 30% a un 40% de las frutas y hortalizas que se producen se pierden luego de cosechadas, esto dependiendo de la especie y la tecnología empleada.

*Una de las pérdidas más importantes en manzana es la ocasionada por el hongo *Penicillium expansum* (moho azul), el cual coloniza al fruto sobre las heridas que se generan en la cosecha y etapas de la postcosecha. Tradicionalmente este patógeno es inhibido por fungicidas sintéticos como Tiabendazol e Iprodione, sin embargo se han reportado a nivel mundial cepas resistentes a ambos fungicidas.*

En este trabajo se plantea la búsqueda y selección de microorganismos antagonistas de este patógeno con el fin de ser utilizado en el control de enfermedades postcosecha de manzanas, dentro de un esquema de manejo integrado que incluya el control biológico.

Como primer paso se aislaron patógenos autóctonos causantes de moho azul. Luego se estudió la agresividad de dichos aislados sobre las manzanas y la resistencia de estos a los fungicidas (tiabendazol e iprodione). Se seleccionaron las cepas de mayor agresividad y resistencia para ser utilizados en ensayos de control biológico sobre el fruto.

*Como segundo paso se aisló flora superficial de manzanas sanas almacenadas por 8 meses en cámara a 1°C. Se identificó y caracterizó (determinando mecanismos de acción) aquellos presuntos antagonistas capaces de tener control del deterioro causado por cepas de *Penicillium expansum* sobre manzanas heridas artificialmente en el ensayo de control biológico (5°C).*

INTRODUCCIÓN

Producción de manzanas en Uruguay

En el Uruguay, la producción de manzanas es la principal dentro de los árboles de hoja caduca, ocupando una extensión de 3.716 hectáreas (DIEA-MGAP; 2014). La variedad *Red Delicious* constituye el 53% de la producción, mientras que las restantes variedades, como las pertenecientes al Grupo Gala, *Granny Smith*, *Cripps Pink* y Fuji constituyen el resto de la producción nacional. Según los resultados del monitoreo anual de frutales, realizado por la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA), la producción de manzanas aumentaría un 15% en 2015, ubicándose en torno a las 52.349 toneladas. Parte de esta cosecha se destina al consumo directo, parte a su uso industrial y un 7,3% aproximadamente a la exportación. En promedio se exportan aproximadamente 4.000 toneladas anuales. Los principales destinos de las exportaciones en el 2014 fueron Brasil (26%), Francia (13%) e Italia (12%).

Conservación del fruto

Las manzanas una vez cosechadas continúan su proceso vital de fotosíntesis, respiración, transpiración (deshidratación superficial), cambios en la composición nutricional y producción de etileno (hormona del "envejecimiento") (Artés *et al.*, 2003; Petkovsek *et al.*, 2009; Mostafavi *et al.*, 2013). Como se trata de un fruto climatérico estos procesos llevan a la maduración y senescencia. A su vez, el progreso en la maduración hace a la fruta más susceptible al ataque microbiano, aumentando la probabilidad de pérdidas por esta causa (Guerrero *et al.*, 2004). Para retardar estos procesos de forma de mantener la calidad comercial de la fruta se recurre a distintos métodos de almacenamiento (Come *et al.*, 2002, Navarro *et al.*, 2003).

Uno de los métodos utilizados es el almacenamiento en cámara a bajas temperaturas (0°C-1°C) con el que se logra disminuir la velocidad de los procesos de maduración y disminuir la velocidad de crecimiento de microorganismos capaces de provocar daño en la fruta. También se puede recurrir al uso de atmósfera controlada (AC) con menores concentraciones de oxígeno y mayores concentraciones de dióxido de carbono que en atmósfera normal. De esta forma se logra modificar el equilibrio de la ecuación respiratoria y enlentecer la velocidad del proceso de respiración (Graell *et al.*, 2003). Las concentraciones deseadas de oxígeno, anhídrido carbónico y vapor de agua se obtienen con equipos especiales, generadores de nitrógeno, depuradores de CO₂ y eliminadores de O₂,

prolongándose la vida útil de los productos no solo durante su almacenamiento sino también en su transporte (Calero *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista fisiológico, en postcosecha, el control de la atmósfera de almacenamiento no sólo disminuye la velocidad de respiración, sino que además reduce la producción de etileno, retardando la maduración y la senescencia (Malcolm *et al.*, 1995). El etileno (C₂H₄) es un iniciador natural de la maduración y si se acumula en las cercanías de frutas, desencadena rápidamente el conjunto de reacciones asociadas a la maduración. Este compuesto aumenta la permeabilidad de las membranas y acelera el metabolismo, activando las enzimas oxidativas e hidrolíticas. Además, induce la pérdida de color, abscisión y ablandamiento, por lo que las cámaras de almacenamiento comercial deben estar equipadas para eliminar el etileno, con el fin de prolongar la conservación de las frutas (Ansorena *et al.*, 2003). Otros de los beneficios del almacenamiento en AC es la reducción del crecimiento de los principales patógenos de manzanas como *Botrytis* spp, *Monilinia* spp y *Penicillium* spp cuando la concentración de oxígeno está por debajo de un 2% (Spotts *et al.*, 1994).

A pesar de las medidas tomadas, durante el período de cámara se producen una serie de pérdidas atribuidas a diferentes causas como deshidrataciones, fisiopatías y podredumbres causadas principalmente por hongos filamentosos pudiendo llegar a representar entre el 10% y el 40% de la producción (Usall *et al.*, 1998).

Principales patógenos de manzana

Penicillium expansum es la especie predominante, siendo la responsable del 70% al 80% de los pérdidas causadas por enfermedades postcosecha en frutas y vegetales (Pianzzola *et al.*, 2004; Mostafavi *et al.*, 2011; Errampalli *et al.*, 2014). Se trata de un hongo de difusión universal y saprofítico de herida, que se desarrolla a partir de las mismas, mediante hidrólisis pectolítica y donde su sintomatología principal es la llamada podredumbre azul (moho azul) que es característica en peras y manzanas (ver Imagen 1). *Penicillium expansum* no solamente es responsable de la podredumbre de los frutos, sino que también presenta la capacidad de producir una micotoxina llamada patulina, la que puede alcanzar niveles tales que descalifiquen la fruta para procesado y también ocasiona problemas para la síntesis del ADN; efectos genotóxicos y con esto inducir daño oxidativo e inhibir la acción de ciertas enzima en el hombre.(Brause *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2007, Bandoh *et al.*, 2009). La patulina es clasificada por Agencia Internacional de Investigación

del Cáncer (IARC, 2010) como perteneciente al grupo 3, no carcinogénica para humanos (Puel *et al.*, 2010).

Penicillium expansum es un hongo polifago, extremadamente disperso, capaz de ser localizado en los ambientes más diversos, pero principalmente en restos de vegetales, zonas de envasado y conservación. (Morales *et al.*, 2010).

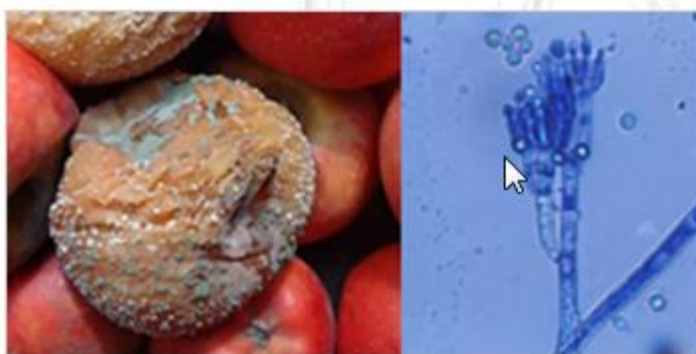


Imagen 1. Izquierda: Manzana *Red Delicious* con daño causado por la presencia de moho azul (*Penicillium expansum*). Derecha: Foto de Conidióforos de *Penicillium expansum* al microscopio. (**Fuente:** Enfermedades fúngicas del manzano. Pedro Mondino, 2002).

Otros patógenos de menor incidencia son *Penicillium solitum*, *Botrytis cinerea* y en algunos casos se han aislado cepas pertenecientes a los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Monilia*, *Alternaria* y *Stemphylium* (Dobra *et al.*, 1993; Herrero, *et al.*, 1998; Mondino *et al.*, 2009; Argòn *et al.*, 2010).

Problemática Actual

Las pérdidas postcosecha constituyen la principal causa de pérdidas de producción, las cuales se estiman en los países en desarrollo entre el 40% y el 50%, debido principalmente a la deficiencia en las infraestructura de mercadeo (FAO, 2014). Las mismas tienen importantes implicancias económicas, ya que los frutos vienen acumulando costos de producción desde la precosecha hasta su consumo. Por lo tanto es de suma importancia minimizar las pérdidas en esta etapa. *Penicillium expansum*, *Penicillium solitum* y *Botrytis cinerea*, aparecen como los principales patógenos responsables de éstas pérdidas (Morales *et al.*, 2010). Para disminuir las pérdidas por podredumbre, la primera medida es el cuidado de la fruta durante la cosecha, de forma de evitar heridas, ya que ésta es la principal vía de ingreso del patógeno. Además, se emplean diferentes tipos de sanitizantes en busca de una disminución de la carga microbiana presente en las cámaras y

en los bins (Droby *et.*, 2007). Pero estas medidas no son suficientes, lo que lleva a la necesidad de recurrir al uso de fungicidas de síntesis química. Los más utilizados en nuestro país son los benzimidazoles (tiabendazol y benomyl) y dicarboximidas (iprodione) pero su utilización es cuestionada por su toxicidad y debido a la aparición de cepas de patógenos resistentes que limitan su efectividad. La gran aceptación que tuvieron estos productos en un principio, se basó principalmente en su alto nivel de efectividad, su relativo bajo costo y la comodidad de aplicación.

Sin embargo, en la actualidad el control químico en la postcosecha presenta serios inconvenientes debido en parte al reducido número de principios activos disponibles, a la cercanía de la aplicación con el consumo y a la generación de resistencia por parte de las poblaciones de patógenos. A nivel mundial existen cerca de 1.500 ingredientes activos de plaguicidas y 60.000 preparados comerciales o formulaciones de los mismos. Se estima que aproximadamente el 85% de los plaguicidas empleados en el mundo se dedican al sector agropecuario, donde se consideran valiosas armas para evitar los daños ocasionados por plagas (Jiménez *et al.*, 2009), esto claro está desde la visión de la agricultura industrial y el enfoque reduccionista, que difiere del enfoque agroecológico.

La creciente preocupación por parte de los consumidores acerca de los riesgos a la salud que ocasionan los fungicidas y de la población en general por los efectos negativos sobre el medio ambiente obliga al desarrollo de métodos alternativos de control. La forma en que los consumidores perciben la calidad también ha cambiado y la aceptación de un producto no depende sólo de la calidad intrínseca sino también de la forma en que fue producido. Como consecuencia, se plantea un esquema de manejo integrado, buscando minimizar el control químico combinándolo con otros tipos de control como el cultural, físico y biológico.

Así, en muy poco tiempo, ha surgido la necesidad de incorporar nuevas tecnologías y nuevos sistemas de aseguramiento de la calidad en el área de producción-comercialización de productos hortifrutícolas en fresco.

Buenas Prácticas Agrícolas y Control Biológico

Agentes privados europeos, como las cadenas de supermercados, han lanzado sus propuestas de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), y han comenzado a exigir a sus proveedores la implementación del Protocolo EurepGap, a los efectos de poder acceder como abastecedores de productos seguros. Con el mismo objetivo se han implementado en Europa y en otras partes del mundo, incluido nuestro país, Programas de Producción Integrada (PI) que tienen como objetivo la minimización del uso de plaguicidas basados en protocolos de buenas prácticas agrícolas y aplicando el concepto de Manejo Integrado (MI) de plagas y enfermedades. El MI de plagas se basa en la integración de todas las medidas de control disponible (prácticas culturales, métodos físicos y métodos biológicos) a efectos de elaborar una estructura que permita minimizar el uso de plaguicidas.

El Control Biológico forma parte de esa estructura. Actualmente, de manera generalizada, se utiliza la definición dada por Baker y Cook (1974) quienes establecieron, hace más de 30 años, que el control biológico es la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar.

Esta amplia definición involucra los controles físicos, culturales y genéticos con excepción del control químico. Plantea además la utilización de microorganismos antagonistas para el control de enfermedades, lo cual no había sido hasta ese momento mencionado explícitamente en ningún otro tipo de control. Se entiende por antagonistas aquellos organismos que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos. El desarrollo de la ingeniería genética ha obligado a modificar esta definición para dar cabida dentro del Control Biológico, a los estudios de biología molecular aplicada a la obtención de organismos manipulados genéticamente. Así, Erwin y Ribeiro (1996), definieron el control biológico como la “Utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables y para favorecer organismos útiles para el hombre”.

En concordancia con esta definición, Wilson y colaboradores (1992), establecieron tres formas posibles de control biológico: a) la utilización de microorganismos antagonistas, b) el uso de fungicidas derivados de plantas y c) la manipulación de

resistencia en la fruta (Wilson et al., 1992). Según Van Driesche (1996) y Orr (1997) el control biológico incluye cualquier actividad que involucre la manipulación de enemigos naturales tendiente a reducir o suprimir el desarrollo de los patógenos.

En la actualidad se encuentran fácilmente más de treinta definiciones de control biológico, que de una u otra forma buscan precisar o delimitar el campo de acción de esta ciencia, desde la primera definición que dio el Profesor Smith en 1919 la cual definía al control biológico como “el uso de enemigos naturales bacterias, hongos, parásitos y depredadores para el control de plagas”. El control biológico se reconoce como una alternativa de control, amigable con el ambiente, la salud humana y animal, útil para el manejo de las enfermedades producidas por patógenos en especies frutales (Zoffoli. *et al.*, 2011)

Diferentes formulaciones comerciales han sido desarrolladas en el mundo para el manejo de enfermedades de postcosecha. La primera generación de formulaciones basadas solamente en microorganismos biocontroladores no tuvo el éxito esperado ya que consistía en productos que solamente presentaban acción protectora (El Ghaouth *et al.*, 2002). Una nueva generación de biofungicidas se desarrolla desde hace algunos años (Bio-Coat, Bio-Cure), las cuales no solamente incluyen microorganismos biocontroladores sino que agregan sustancias químicas de origen natural (quitosano, enzimas líticas, etc) de forma de potenciar la acción protectora y lograr efectos curativos. La combinación de levaduras con productos naturales ha aumentado los niveles de control de los patógenos a niveles similares a los logrados con los tratamientos químicos (Droby *et al.* 2009).

En nuestro país no se ha registrado hasta el momento ninguna formulación para control biológico en postcosecha. El desarrollo de una formulación implica numerosos pasos de investigación y desarrollo que, según Monte Vázquez (1997), a grandes rasgos deben incluir:

1. Comprobación de la existencia de la enfermedad
2. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de los patógenos involucrados
3. Aislamiento y selección de los posibles antagonistas
4. Ensayo de la capacidad antagonista directamente en el sitio de acción
5. Identificación del antagonista
6. Determinación de los mecanismos de acción

7. Ensayo de toxicidad
8. Producción a gran escala

Antagonistas y sus mecanismos de acción

Se llama antagonistas a bacterias, levaduras y hongos que tienen la capacidad de ejercer un efecto inhibitorio sobre diversas enfermedades en frutos y vegetales (Wisniewski., *et al.* 1992; De Costa *et al.*, 2005).

En condiciones naturales, los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. La disminución de la flora de competencia por prácticas agrícolas como lavado de frutos, aplicación de fungicidas y desinfección de suelos entre otros, favorecen el desarrollo de los patógenos (Rollán *et al.*, 1998). 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 enfermedades en la mayoría de los casos, es decir el control biológico funciona naturalmente (Cook y Baker 1983).

Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar las siguientes características generales: a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos y de persistir en ellas de manera efectiva, b) mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes y c) capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales (Wisniewski *et al.*, 1992).

Los principales modos de acción de los antagonistas son: la competencia por los nutrientes y/o el espacio, la secreción de antibióticos, la producción de metabolitos antifúngicos como las toxinas “killer”, la interacción directa con el patógeno (parasitismo y la predación en postcosecha) y la inducción de mecanismo de resistencia en el huésped (Santos *et al.*, 2004; Giobbe *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Mari *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2013).

La competencia por nutrientes y/o espacio se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de éste por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este modo de acción es favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, por otro lado

por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Bautista *et al.*, 2013).

La competencia por nutrientes (polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas) es poco efectiva cuando se emplea fertilización completa, o existe exceso de alguno de los componentes de los fertilizantes, e inclusive en suelos con alto contenido de materia orgánica. En la competición por espacio o sustrato depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una micobiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (El-Ghaouth *et al.*, 1998, Spadaro *et al.*, 2002, Vero *et al.*, 2002). En el caso particular del control biológico de enfermedades poscosecha en manzana, la producción de sideróforos aparece como un mecanismo de competencia por nutrientes a estudiar (Calvente *et al.*, 2001). Los sideróforos se definen como compuestos de relativo bajo peso molecular, quelantes específicos de hierro. Son producidos por bacterias y hongos en condiciones de estrés por bajo contenido de hierro (III) en el medio (Neilands, 1995). Cuando los sideróforos son producidos, secuestran del medio la baja cantidad de hierro (III) presente, limitando su disponibilidad para los patógenos y así suprimiendo su crecimiento. (Awasthi, 2015). Las heridas de manzanas constituyen un microambiente con baja concentración de hierro (III), donde es beneficiada la producción de sideróforos por parte de los antagonistas (Spadaro y Droby, 2016). En estas condiciones, los antagonistas compiten por el hierro, interfiriendo la germinación y crecimiento de los patógenos.

La secreción de antibióticos o metabolitos tóxicos es la producción de sustancia por un microorganismo capaz de inhibir en pequeñas dosis los procesos vitales de ciertos microorganismos, destruyendo o impidiendo su desarrollo y reproducción. Algunos investigadores opinan que el mecanismo de antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes (Vero *et al.*, 1999, Jacas *et al.*, 2005, Infante *et al.*, 2009).

El parasitismo del antagonista sobre el patógeno tiene un rol importante en el control biológico de patógenos. En este tipo de interacciones, están generalmente involucradas las producciones por parte del antagonista de enzimas, capaces de hidrolizar

las paredes de hongos (quitinasas, glucanasas y proteasas) (Wisniewski *et al.*, 1991, Bautista *et al.*, 2006).

Por otro lado, Frioni (1999) plantea que las interacciones antagónicas entre dos microorganismos pueden ser de cuatro tipos: amensalismo, competencia, parasitismo y predación. En el caso de las interacciones sobre la fruta cosechada, no hay ejemplos de predación.

Recientemente, nuevos mecanismos de acción están siendo investigados con el fin de determinar su importancia en el control biológico de patógenos postcosecha, como ser la formación de biopelículas (Ortu *et al.* 2005) y la resistencia de los antagonistas al estrés oxidativo (Castoria *et al.* 2003, Liu *et al.* 2011, Torres *et al.* 2011).

Por último y no menos importante, se deben considerar otras características específicas de los antagonistas como ser: estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no ser exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente, efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de frutos y hortalizas, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, mantenimiento en una formulación durante un largo período, fácil aplicación, no productor de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistente a los fungicidas, compatible con los procedimientos comerciales y no patogénico sobre el hospedero (Wilson *et al.*, 1989; Hernandez *et al.*, 2006).

Los principales microorganismos antagonistas de *Penicillium* en postcosecha se presentan en la tabla 1. Las levaduras *Candida membranifaciens* y *Cryptococcus laurentii* constituyen ejemplos de antagonistas las cuales compiten por la L- prolina con *Penicillium expansum* (Satyanarayana *et al.*, 2009). La competencia de nutrientes y la secreción de las enzimas β - 1,3- glucanasa y quitinasa, son los principales modos de acción de los productos comerciales que contienen levaduras como agentes responsables del biocontrol (Junaid *et al.*, 2013). El Aspire es un ejemplo de ello, que contiene la levadura *Candida oleophila* como el ingrediente activo de control biológico (Droby *et al.*, 1998). También se encuentra el ShemerTM, donde su principio activo es el microorganismo *Metschnikowia fructicola* que fue desarrollado en primera instancia por AgroGreen, Minrav Group, Israel. Este producto presenta actividad probada contra *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, y

Aspergillus en frutillas, uvas y citrus (Sharma et al., 2009). Otras levaduras, incluyendo *Aureobasidium pullulans* (Janisiewicz et al., 2000; Bencheqroun et al., 2007), *Pichia caribbica* (Xu et al., 2013) y *Pichia guilliermondii* son utilizadas como microorganismos de biocontrol, las mismas reducen efectivamente la descomposición por hongos al competir por nutrientes (Chanchaichaovivat et al., 2008).

Tabla 1. Principales microorganismos antagonistas postcosecha de *Penicillium expansum*.

Microorganismo antagonista	Enfermedad	Efecto obtenido	Referencia
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pudrición y moho en uvas y manzanas	Actividad extracelular de exoquitinasa y β - 1, 3- glucanasa (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Castoria et al., 2001
<i>Rhodoturla glutinis</i> y <i>Cryptococcus laurentii</i>	Moho azul en diferentes frutos	Altos niveles de β - 1, 3- glucanasa (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Castoria et al., 1997
<i>Pichia membranefaciens</i>	Pudrición en manzanas	Altos niveles de β - 1, 3- glucanasa (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Zhulong et al., 2005
<i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Candida ciferri</i>	Moho azul en manzanas	Reducción de la incidencia de la enfermedad, 80% <i>in situ</i>	Vero et al., 2002
<i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Cryptococcus infirmo-miniatus</i>		Reducción significativa de la incidencia y severidad del moho en aplicación simultanea el antagonista y el patógeno <i>in situ</i>	Chand et al., 1997
<i>Candida saitoana</i>	Pudrición de manzanas, naranjas y limones	Aplicación del antagonista con 0,2% de 2-deoxy-D- glucosa fue efectiva en controlar las pudriciones (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	El Ghaouth et al., 2000
<i>Candida oleophila</i>	Pudrición en duraznos	El antagonista solo tuvo efecto combinándose con atmósfera modificada <i>in situ</i>	Karabulut et al., 2004
<i>Trichoderma harzianum</i>	Moho azul en manzanas	Protección por un periodo mayor a dos meses de la enfermedad <i>in situ</i>	Batta et al., 2004
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Moho azul en manzanas	Reducción significativa con aplicación de antagonista y gamma radiación en cámaras de frío	Mostafavi et al., 2013
<i>Pichia anómala</i>	Moho azul en manzanas	Altos niveles de β - 1, 3- glucanasa (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Lahlali et al., 2009

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar y caracterizar un agente de control biológico de *Penicillium expansum* en manzanas almacenadas a temperatura baja, en atmósfera normal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *Penicillium expansum* responsables de podredumbres en manzanas “Red Delicious”.

Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos nativos capaces de actuar como agentes biocontroladores de *Penicillium expansum* en manzanas “Red Delicious”

Selección de el/los microorganismos capaces de controlar la incidencia de *Penicillium expansum* en manzana “Red Delicious”.

Determinación de los mecanismos de acción del antagonista seleccionado.

Evaluar resistencia del/los microorganismo/s seleccionados a fungicidas de uso convencional en postcosecha de manzanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *Penicillium expansum* responsables de podredumbres en manzanas

1.1. Aislamiento

Las cepas de *Penicillium spp.* fueron aisladas de manzanas “Red Delicious” que presentaban síntomas de podredumbres (moho azul), a la salida de cámara (atmósfera normal, temperatura entre 0°C-1°C) luego de 8 meses de almacenamiento. Se tomaron trozos de la zona afectada de las frutas con síntomas y se colocaron en placas de medio agar-papa-dextrosa (PDA, Oxoid) con cloranfenicol (34 µg/ml, Sigma) (Benbow *et al.*, 1999). Las placas se incubaron a 25°C durante 5 días. Los hongos desarrollados fueron observados macro y microscópicamente. Aquellos pertenecientes al género *Penicillium* y que presentaban estructura terverticilada, fueron reaislados en PDA y a partir de ellos se realizaron cultivos monospóricos en el mismo medio.

1.2. Ensayo de Patogenicidad

Manzanas *Red Delicious*, maduras y sanas, fueron lavadas con agua corriente y desinfectadas con etanol al 70%. Se realizaron 4 heridas a cada manzana, en la zona ecuatorial, con un puntero, llegando a dar una profundidad de 3 mm. Cada herida fue inoculada con 10 µl de una suspensión de conidias en suero fisiológico con Tween 80 al 0.1% ajustada a una concentración de 1.10^7 conidias/mL. Se inoculó una cepa por fruto. Se hicieron 2 repeticiones por cepa. Las manzanas se incubaron en cajas plásticas a humedad saturada, durante 10 días a 5°C. Al finalizar la incubación, se determinó la agresividad de cada cepa de acuerdo al diámetro de la lesión alrededor de cada herida inoculada. Los datos se analizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) (Sokal *et al.*, 1998). Las diferencias entre medias fueron analizadas usando el test LSD. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SigmaStat.

1.3. Identificación fenotípica

Los aislamientos que produjeron síntomas de moho azul en las manzanas inoculadas en el ensayo descrito anteriormente, fueron identificados fenotípicamente a nivel de especie de acuerdo a Pitt (1991).

1.4. Determinación de la sensibilidad *in vitro* (CIM) de los aislamientos identificados como *Penicillium expansum* a los fungicidas Tiabendazol e Iprodione

Para la determinación de la sensibilidad *in vitro* se siguió el ensayo descrito por Cabañas *et al.*, 2009. Se colocaron 300 µl de PDA en cada pocillo de una placa de Elisa adicionado con concentraciones crecientes de cada fungicida, como se indica en la tabla 2. Cada pocillo se inoculó en superficie con 6 µl de una suspensión ajustada a $1 \cdot 10^7$ conidias/ml. La placa de Elisa se incubó a 25°C durante 3 días y al cabo de ese tiempo, se registró para cada aislamiento, la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada fungicida, definida como la mínima concentración a la cual no existió crecimiento fúngico. El ensayo se realizó por triplicado, para cada patógeno. En paralelo, tres pocillos conteniendo PDA y sin fungicida, fueron inoculados con la misma cantidad de conidias. Los fungicidas utilizados en este trabajo fueron productos comerciales de uso corriente en las plantas procesadoras de frutas (Tabla 3).

Tabla 2. Las concentraciones (ppm) utilizadas en el ensayo de resistencia son las siguientes.

Fungicida		Concentración (ppm)											
TBZ	2048.0	1024.0	512.0	256.0	128.0	64.0	32.0	16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5
IP	512.0	256.0	128.0	64.0	32.0	16.0	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5		

TBZ: Tiabendazol, IP: Iprodione, ppm: partes por millón

Tabla 3. Características de los fungicidas utilizados en los análisis de agresividad.

Fungicida	Pureza (% m/m)	Concentración (g/l)	Producto comercial
Tiabendazol	42.9	450	TECTO 500
Iprodione	50	500	Rovral C.S.

Se seleccionó la cepa de *Penicillium expansum* más agresiva y que presentó baja sensibilidad a los fungicidas ensayados para ser utilizada en los ensayos posteriores de biocontrol.

2. Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos nativos capaces de actuar como agentes biocontroladores de *P. expansum* en postcosecha en manzanas "Red Delicious"

2.1. Estudio de flora epifítica y aislamiento de presuntos agentes biocontroladores

Manzanas "Red Delicious" sanas almacenadas en cámaras comerciales (0°C-1°C) durante ocho meses fueron utilizadas en este ensayo. Dichas manzanas provenían de 3 cámaras comerciales diferentes (15 manzanas de cada cámara). Las manzanas se pelaron asépticamente y las cáscaras fueron trituradas en suero fisiológico estéril en un homogeneizador (Stomacher 400) durante 1 minuto. En cada caso se trituraron 10 g de cáscara en 90 mL de suero fisiológico estéril. A partir de las suspensiones obtenidas se realizaron diluciones seriadas al décimo en suero fisiológico estéril. Se sembraron 0.1 mL de las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 en placas de PDA con cloranfenicol (34 µg/mL, Sigma) y Agar Tripticasa Soya (TSA, OXOID) y se incubaron a 25°C y a 10°C durante 2 y 10 días respectivamente. Luego del tiempo de incubación, se analizaron las placas contables realizando recuento de levaduras y bacterias en cada caso. Las colonias que presentaban distintas características macroscópicas y microscópicas procedentes de las placas contables, fueron reaisladas en el medio del cual provenían. Los cultivos puros fueron conservados en tubos rosca de PDA y TSA en heladera hasta su utilización.

2.2. Selección primaria

Todos los aislamientos obtenidos a 10°C, fueron sembrados en placas de Petri conteniendo agar jugo de manzana (Jugo de Manzana, Agar 1,5%, pH 4,6). Las placas fueron incubadas durante 7 días a 5°C. Para aquellos aislamientos capaces de crecer en dichas condiciones fue determinada la capacidad de crecer a 37°C. Para ello, los aislamientos fueron sembrados en placas de Petri conteniendo PDA e incubados a 37°C durante 48 horas.

Los aislamientos capaces de crecer en agar jugo de manzana a 5°C e incapaces de crecer a 37°C fueron seleccionados para futuros estudios de biocontrol en fruta a temperatura de cámara.

2.3. Identificación fenotípica de las cepas antagonistas

Los microorganismos preseleccionados fueron identificados fenotípicamente a nivel de género siguiendo la clasificación de Kurtzman y Fell (1999) en el caso de levaduras. La identidad a nivel de especie se determinó para las levaduras seleccionadas utilizando el sistema comercial API C Aux (BioMérieux; Marcy L'Etoile- Francia). En el caso de bacterias la identificación a nivel de familia se realizó utilizando la tabla de identificación de Cowan y Steel (Cowan *et al.*, 1993). La identificación a nivel de especie se realizó utilizando el sistema comercial API 20E 3 (BioMérieux; Marcy L'Etoile- Francia).

2.4. Selección secundaria. Capacidad antagonista en fruta

La selección de los antagonistas se basó en su capacidad de controlar el desarrollo del patógeno seleccionado previamente en heridas de manzana, a bajas temperaturas. Manzanas recién cosechadas de la variedad *Red Delicious* fueron lavadas con agua corriente y desinfectadas con etanol 70%.

Se realizó un ensayo preliminar en el cual se emplearon dos manzanas por cepa. Se realizaron seis heridas por manzana (3 mm de diámetro x 3 mm de profundidad) en la zona ecuatorial del fruto. Las heridas fueron inoculadas en primer lugar con 20 µl de una suspensión de presuntos antagonistas ajustada al N° 4 de la escala de Mc Farland en el caso de levaduras (concentración estimada de 1×10^7 ufc/mL) y N°1 en el caso de bacterias (concentración estimada 3×10^8 ufc/mL). Se incluyó la cepa *Candida oleophila* (CO), perteneciente al producto Aspire como control. Las manzanas se incubaron en cajas plásticas conservando la humedad durante 24 horas a 5°C. Transcurrido este tiempo, se inoculó cada herida con 20 µl de una suspensión de esporas de la cepa de *Penicillium expansum* seleccionada previamente, de concentración 1×10^4 conidias/mL. Como control se utilizaron dos manzanas, con seis heridas cada una, inoculadas solamente con el patógeno.

Las manzanas se incubaron en cajas plásticas conservando la humedad, durante cuatro semanas a 5°C. En el ensayo se emplearon nueve presuntos antagonistas. Los microorganismos que lograron niveles de control mayores al 80%, fueron seleccionados.

El ensayo de biocontrol se repitió para los microorganismos seleccionados utilizando cuatro frutos por cepa y a temperatura de almacenamiento comercial (0°C -1°C)

durante 4 semanas. Se utilizó también la cepa *Candida oleophila*, perteneciente al producto Aspire como control positivo (CO).

Finalizado el período de incubación se determinó el porcentaje de incidencia de enfermedad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de incidencia} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de heridas que desarrollaron infección} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ heridas totales}}$$

Los valores de incidencia transformados (arcsen de la raíz cuadrada) fueron analizados por ANOVA (Hernández *et al.*, 2010). Las diferencias entre medias fueron analizadas usando el test LSD. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SigmaStat. Se seleccionó el antagonista capaz de lograr la menor incidencia de la enfermedad.

2.5. Caracterización del antagonista seleccionado

2.5.1. Colonización de la herida por el antagonista a 5°C

Se trabajó con 4 manzanas sanas por cepa, realizando 6 heridas (3 mm profundidad x 3 mm de diámetro) en la zona ecuatorial por manzana. Cada herida fue inoculada con una concentración de 1×10^7 ufc/mL del antagonista seleccionado. Se conservaron en cajas plásticas, manteniendo la humedad. A diferentes tiempos de incubación (1, 15, 21, 30 y 45 días respectivamente) se extrajeron trozos de manzana conteniendo la herida inoculada. Las muestras fueron pesadas y resuspendidas en 10 mL de suero fisiológico. A partir de las suspensiones obtenidas se realizaron diluciones seriadas al décimo en suero fisiológico estéril. Se sembraron 0.1 mL de las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 en placas de PDA. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 48 horas. Luego del tiempo de incubación, se realizó el recuento y se determinó el número de colonias viables *in situ* por gramo de manzana. Se realizó la curva de crecimiento *in situ* a la temperatura estudiada.

2.5.2. Sensibilidad a Iprodione *in vitro*

La sensibilidad a Iprodione *in vitro* fue evaluada colocando 50 mL de Potato-Dextrose Broth (PDB) en frascos de boca ancha a los cuales se les adicionó Iprodione hasta una concentración de 0,1 g/L (decima parte de la concentración utilizada generalmente en

los baños de inmersión). Cada frasco fue inoculado con 0.1 mL de una suspensión de levadura de concentración 1×10^7 ufc/mL e incubado a 25°C. Se realizó el recuento de células viables a diferentes tiempos: 0, 1, 2 y 3 horas respectivamente, en placas de PDA. Las placas se incubaron a 25°C durante 48 horas. En paralelo, un frasco conteniendo PDB sin fungicida fue inoculado con la misma cantidad de levadura e incubado a 25°C. Se determinó el número de levaduras viables a tiempo 0, 1, 2 y 3 horas.

Posteriormente, se evaluó la sensibilidad a 0.1 g/L y 0.5 g/L de Iprodione luego de 12 horas de incubación siguiendo el protocolo mencionado anteriormente.

2.5.3. Determinación de temperatura óptima de crecimiento

Se realizaron las curvas de crecimiento en (PDB, Oxoid) para el antagonista seleccionado, a 5°C, 10°C, 25°C, 30°C y 37°C. Para cada temperatura, a diferentes tiempos de incubación, se realizó el recuento del número de levaduras totales por recuento en Cámara de Neubauer. Para cada temperatura, se determinó la velocidad de crecimiento (μ). Se graficó la velocidad de crecimiento en función de la temperatura y se determinó la temperatura óptima de crecimiento como aquella a la cual la velocidad de crecimiento es máxima.

2.6 Identificación molecular del antagonista seleccionado

El antagonista seleccionado fue identificado a nivel de especie mediante secuenciación de las regiones ITS y D1-D2.

2.6.1 Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó según Schena *et al* (1999) con modificaciones. A partir de un cultivo fresco en PDA, se preparó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, una suspensión de levadura de concentración aproximada 10^7 a 10^8 células/mL, en 300 μ L de buffer de extracción (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). A dicha suspensión se agregaron 0.05 g de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro, 300 μ L de una mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (50:48:2) y se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 5 minutos, enfriando en baño de hielo cada minuto. Las fases obtenidas se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 7 minutos y 200 μ L de la fase acuosa se transfirieron a un nuevo tubo. El ADN se precipitó por el agregado de 200 μ L de isopropanol frío y se separó de la fase líquida mediante centrifugación a

10.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se secó en estufa a 45°C y se reconstituyó en agua MiliQ estéril.

2.6.2 Amplificación de la región ITS1-ITS2

La amplificación de la región ITS1-ITS2 se realizó según Magnani *et al.* (2005). Los cebadores utilizados fueron ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC- 3'), ambos sintetizados por BYOSYNTHESIS Company (Lewisville, TX). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo, 2,5 µL Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 16,9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 25 µM, 2,5 µL de dNTP 2 µM, 0,1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International Inc., Canada) 5U/µL y 1 µL de ADN de concentración aproximada 100 ng/µL. La amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc. (Edison, NJ, USA).

2.6.3 Amplificación de la región D1-D2 del gen que codifica para el 26S rRNA

La amplificación de la región D1-D2 se realizó según Kurtzman y Droby (2001). Los primers utilizados fueron NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), ambos sintetizados por BYOSYNTHESIS Company (Lewisville, TX). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL, conteniendo 2,5 µL Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 16,9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 10 µM, 2,5 µL de dNTP 2 µM, 0,1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International Inc., Canada) 5U/µL y 1 µL de ADN de concentración aproximada 100 ng/µL. La amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguido por 45 ciclos de 94 °C 1 minuto, 52°C 1 minuto y 72°C 1,5 minutos con una extensión final de 72°C durante 5 minutos. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc. (Edison, NJ, USA).

2.6.4 Análisis de secuencia

Los productos de PCR fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) 0.8% con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0.5 µg/mL. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook *et al.*,

2001). El tamaño del amplicón fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50bp DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá).

Los amplicones fueron secuenciados de forma unidireccional en el laboratorio MacroGen Inc. (Seul, Corea). Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) mediante el programa Nucleotide Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

A partir de las secuencias obtenidas se construyeron árboles filogenéticos utilizando el programa Mega 4. Para construir los árboles se utilizaron secuencias de las regiones D1-D2 e ITS1-ITS2 de aislamientos de distintas variedades de la misma especie y especies relacionadas, presentes en la base de datos GenBank (*Aureobasidium pullulans* var *pullulans* CBS 701.76, *Aureobasidium pullulans* var *pullulans* CBS 584.75, *Aureobasidium pullulans* var *nambiae* CBS 147.37, *Aureobasidium melanogenum* CBS 109800, *Aureobasidium subglaciale* EXF 2481, *Aureobasidium microsticta* CBS 114.64, *Aureobasidium caulivora* CBS 242.64). Todas las secuencias seleccionadas para construir el árbol correspondieron a cepas depositadas en colecciones internacionales.

Las secuencias se alinearon utilizando Clustal W v.1.6 (Higgins *et al.*, 1994) como parte del programa MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007). Los árboles filogenéticos se construyeron por *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) y las distancias evolutivas fueron computadas con el método de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). Todas las posiciones conteniendo datos faltantes fueron eliminadas previo al análisis (*complete deletion option*). La estabilidad de los grupos fue alcanzada con 1000 repeticiones (*bootstrap*).

3. Determinación de los mecanismos de acción del antagonista seleccionado

3.1. Cultivo dual

Para realizar el cultivo dual se sembraron simultáneamente en placas de agar jugo de manzana el antagonista seleccionado y la cepa de *P. expansum* seleccionada como más agresiva. La cepa de patógeno se sembró en forma puntual en el centro de la placa y la cepa antagonista se sembró lateralmente en forma de estría separada 3 cm aproximadamente del centro. Para la siembra del patógeno, se utilizó un disco de PDA con micelio, previamente sembrado en PDA. Como control se sembró el patógeno sólo en

placas de PDA, empleando el mismo procedimiento. Las placas del ensayo se incubaron a 25°C por 5 días y se determinó visualmente si existía inhibición del patógeno con respecto a la placa control.

3.2. Producción de sustancias antifúngicas por parte del antagonista seleccionado

3.2.1. Producción de enzimas

Se estudió la producción de enzimas (quitinasa y β -1,3-glucanasas) capaces de hidrolizar las paredes de los hongos patógenos. La cepa seleccionada se hizo crecer en YNB (Yeast Nitrogen base) suplementado con paredes (1mg/mL) de hongos patógenos (*Penicillium expansum*) como única fuente de carbono. Se incubaron a 25° C durante 15 días. El líquido se filtró por medio de un filtro de 0,22 μ . En el filtrado se ensayaron las actividades enzimáticas. Para la preparación de paredes de hongos patógenos, la cepa de *Penicillium expansum* seleccionada previamente se hizo crecer en el medio de cultivo YES (2% extracto de levadura, 15% sacarosa,) durante 7 días a 25° C. Luego del tiempo de incubación, el micelio se retiró y secó con papel de filtro estéril, se colocó en un mortero estéril frío y se le adicionó nitrógeno líquido para romper las estructuras y obtener un polvo fino de paredes. Las paredes se re suspendieron en solución de NaCl 5M, se sonicaron durante 3 minutos y se centrifugaron durante 20 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante se descartó y se procedió al lavado de las paredes con agua destilada (3 lavados). Las paredes se secaron sobre placas de vidrio en estufa durante 3 horas a 60° C. Las muestras control empleadas En paralelo se realizó el ensayo, pero sin el agregado de levaduras antagonistas.

a) β 1,3 glucanasa

La actividad β -1,3-glucanasa se determinó de acuerdo al método de Abeles y Forrence (1970) con modificaciones. El extracto enzimático (62,5 μ L) fue incubado 25° C durante 4 horas con 62,5 μ L de laminarina al 1 % (Sigma). Luego del tiempo de incubación, se agregaron 975 μ L de agua destilada y se calentó durante 5 minutos con agua a ebullición. Posteriormente, se agregó 130 μ L de 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se determinó espectrofotométricamente la cantidad de azúcares reductores a 492 nm. Los valores de actividad fueron expresados en unidades enzimáticas (UE), definida como la cantidad de enzima necesaria para la liberación de un μ mol de azúcar reductor liberados por minuto.

b) Quitinasa

La determinación de quitinasas se realizó, sobre el extracto enzimático, de acuerdo a Mahadevan y Crawford (1997).

3.2.2. Producción de sideróforos

Se determinó la producción de sideróforos por el antagonista seleccionado de acuerdo a Calvente *et al.*, (2001), utilizando un medio de cultivo que estimula la producción de sideróforos, el cual consiste en 2,5 g sacarosa, 0,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 g de K_2HPO_4 , 0,1 g de ácido acético, 0,008 g de MgSO_4 , 0,002 g de ZnSO_4 y 100 ml de agua destilada. El medio se suplementa con 0,00163 g de FeCl_3 (100 μ M). El procedimiento consta de formar dos grupos en uno de ellos se aumenta la concentración de FeSO_4 y en el otro no. En cada placa, se sembró de forma puntual el patógeno en un extremo y en el extremo opuesto, el antagonista. Luego de incubados por 48 horas a 24°C y comparadas al control se observa el crecimiento del antagonista y del patógeno en los dos grupos de placa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *Penicillium expansum* responsables de podredumbres en manzanas

1.1. Aislamiento, ensayo de patogenicidad y selección

Se aislaron 30 cepas de *P. expansum* y tres de *P. solitum*. Todos los aislamientos generaron lesión en manzana en las condiciones ensayadas. En la figura 1 se muestran los diámetros de lesión generados por los aislamientos más agresivos de *P. expansum* (P8, P9, P10, P12, P13, P14, P15, P16, P17) y *P. solitum* (Ps).

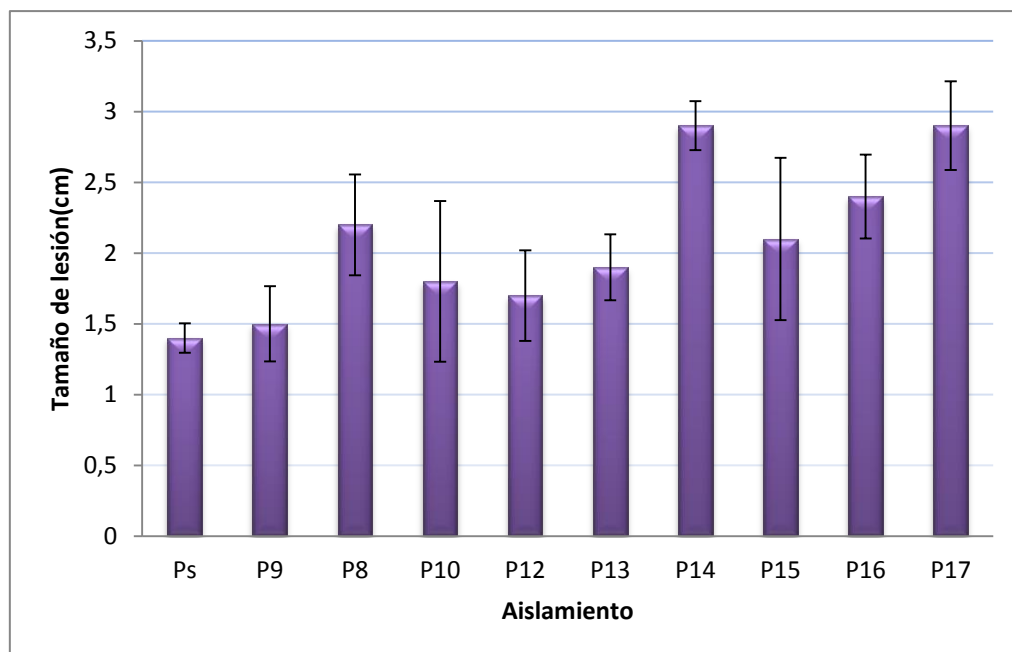


Figura 1. Agresividad de cada aislamiento sobre heridas de manzana.

1.2. Determinación de la resistencia *in vitro* (CIM) a los fungicidas TBZ e IP

En la tabla 4 se presentan los resultados del ensayo de resistencia *in vitro* a TBZ e IP para los aislamientos que de acuerdo al ensayo anterior mostraron ser más agresivos. Para el caso de *P. expansum* se apreció que la población se dividió en dos grupos, un grupo formado por aislamientos que son sensibles a bajas concentraciones y el otro grupo por aislamientos resistentes a altas concentraciones. Esto es debido a que la resistencia se adquiere en un solo paso, lo que conduce a las cepas a ser totalmente sensibles o de lo contrario resistentes, no determinándose resistencia a concentraciones intermedias.

Para el caso de *P. solitum* la cantidad de cepas empleadas (una) no permitió realizar una conclusión del comportamiento como en el caso anterior.

El comportamiento de los patógenos frente al IP fue totalmente diferente, se determinó una resistencia variable, no pudiendo agrupar el comportamiento de los diferentes aislamientos. Se observó que *P. expansum* fue el único que resistió mayores concentraciones de IP, mientras que *P. solitum* no superó los 4 ppm.

Tabla 4. CIM para los diferentes aislamientos de patógenos frente a los fungicidas TBZ e IP

Patógeno	CIM promedio para TBZ	CIM promedio para IP
P8	8	<0,5
P9	>2048	8
P10	>2048	256
P12	>2048	8
P13	>2048	8
P14	>2048	4
P15	>2048	256
P16	>2048	4
P17	>2048	256
P19	>2048	<0,5
Ps	>2048	4

Para continuar con los ensayos de control biológico se seleccionó la cepa P17 por ser el aislamiento más agresivo en las condiciones ensayadas y que presentó menor sensibilidad a TBZ e IP.

2. Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos nativos capaces de actuar como agentes biocontroladores de *P. expansum* en postcosecha en manzanas "Red Delicious"

2.1. Estudio de flora epifítica y aislamiento de presuntos agentes biocontroladores

La tabla 5 muestra el promedio del recuento a 10°C y 25°C de la flora superficial en manzanas sanas almacenadas en cámara a 1°C por 8 meses. En todos los casos, independientemente del origen de la fruta se obtuvieron recuentos del mismo orden. Se determinó que solamente el 10% de la flora bacteriana obtenida a 25°C, era capaz de crecer a 10°C, mientras que aproximadamente el 50% de las levaduras aisladas resultaron ser psicrótrofas.

Tabla 5. Recuento de bacterias y levaduras en la superficie de manzana almacenadas en cámara a 1°C por 8 meses

Temperatura de cultivo (°C)	Bacterias(ufc/g cáscara)	Levaduras(ufc/g cáscara)
10	2.00E+04	9,30E+04
25	8.00E+05	1,90E+05

De las placas contables incubadas a 10°C se obtuvieron 20 aislados con morfología diferente. Estos aislados fueron los que se utilizaron en los procedimientos de selección posterior.

2.2. Selección primaria

De los 20 aislados recuperados sólo ocho fueron capaces de crecer en agar jugo de manzana a 5°C. Siete de estos microorganismos correspondían a levaduras (denominados A, B, C, D, 2F, 4F y 2O) mientras que uno solo de ellos correspondió a una bacteria (M14). Ninguno de ellos fue capaz de crecer a 37 °C.

2.3. Identificación fenotípica de las cepas antagonistas

Las levaduras fueron identificadas fenotípicamente como pertenecientes a los géneros *Aureobasidium*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. El aislamiento bacteriano fue identificado como *Enterobacter Agglomerans*.

2.4. Selección secundaria. Capacidad antagonista en fruta

En la figura 2 se muestra la incidencia de moho azul (*Penicillium expansum* P17) en heridas de manzana protegidas con los diferentes aislamientos (ocho presuntos antagonistas), la cepa *Candida oleophila* (CO, antagonista control), así como la incidencia de este patógeno en heridas sin protección (control).

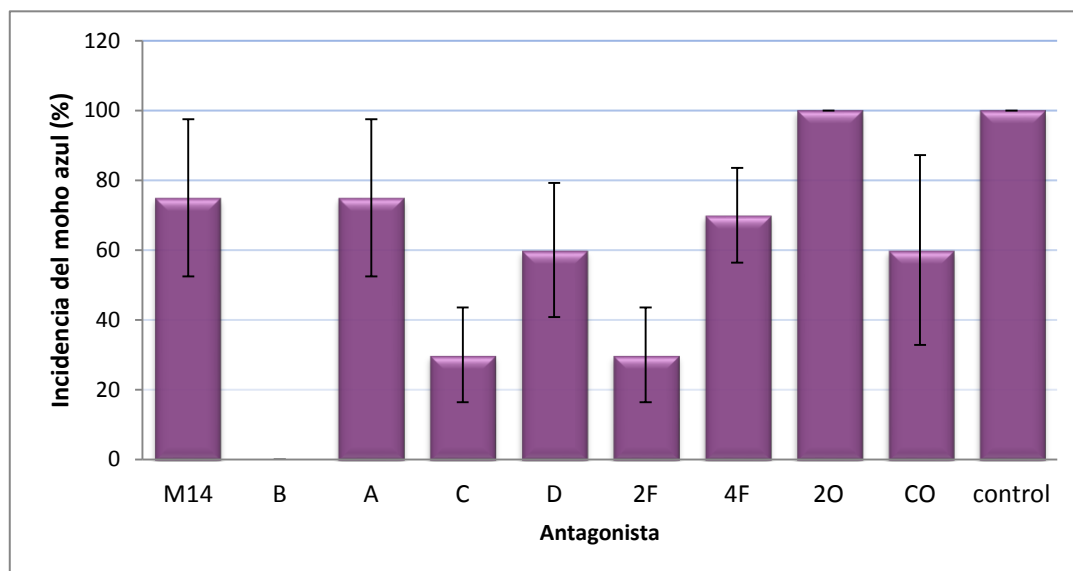


Figura 2. Capacidad antagonista en fruta de los aislamientos preseleccionados.

De acuerdo a los resultados del ensayo de biocontrol preliminar a 5 °C durante 30 días, fueron seleccionados los aislamientos B, C y 2F por presentar un porcentaje de incidencia menor al que presentaba el antagonista de la fórmula comercial (CO). También se continuaron los ensayos con el aislamiento M14 por ser de origen bacteriano.

Los microorganismos seleccionados en el ensayo anterior fueron evaluados nuevamente con un número mayor de manzanas y a condiciones de almacenamiento comercial entre 0°C y 1°C. La Figura 3 muestra el resultado del porcentaje de incidencia de moho azul en heridas de manzana protegidas con los diferentes antagonistas preseleccionados y la cepa comercial *Candida oleophila* (principio activo de la formulación Aspire) en comparación con el control.

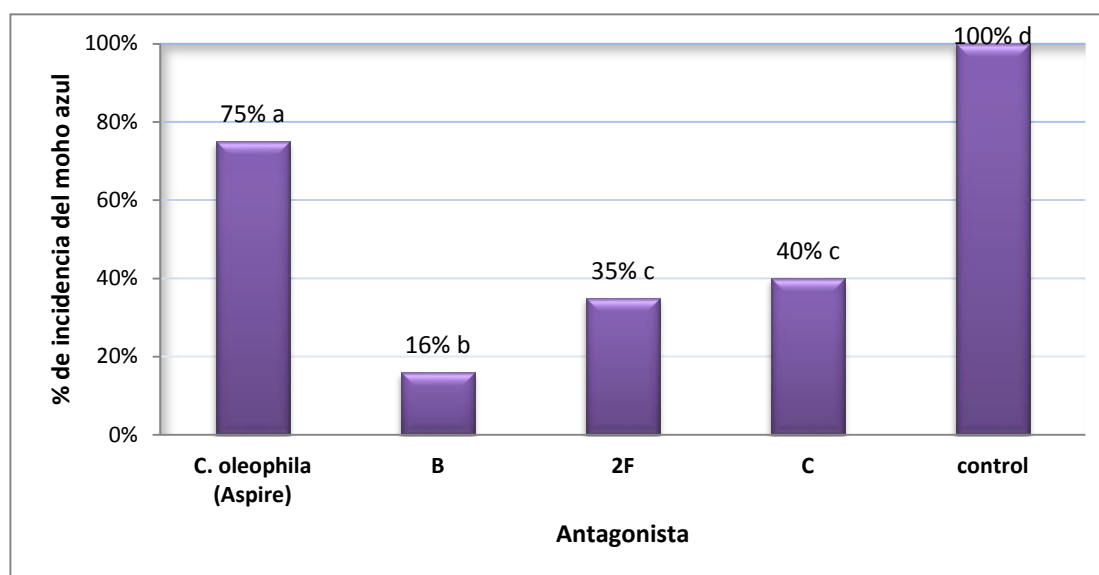


Figura 3. Porcentaje de incidencia de moho azul en heridas de manzana protegidas con diferentes antagonistas y sin protección (control). Letra diferentes indican valores significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Según los resultados obtenidos, el aislamiento B presenta mejor capacidad biocontroladora. El porcentaje de incidencia de *P. expansum* en manzana fue significativamente menor cuando previamente se había inoculado la cepa B en las heridas de manzana, respecto a la incidencia determinada cuando se habían inoculado las cepas C, 2F, cepa comercial *C. oleophila*(CO y el control positivo de acción del patógeno. En la imagen 2 se observa el efecto biocontrolador del antagonista B (herida a la derecha de la manzana) y también la incidencia del patógeno sobre la herida sin previa inoculación del antagonista (herida a la izquierda de la manzana).

2.5. Caracterización del antagonista seleccionado

2.5.1. Colonización de la herida en el fruto a 5°C

En la figura 4 se presentan los resultados de la colonización del antagonista seleccionado (*Aureobasidium* sp., aislamiento B), a 5°C sobre heridas de manzana. Se observó que el antagonista fue capaz de colonizar eficientemente el sitio de acción a bajas temperaturas, constatándose que se mantuvo viable y en una concentración suficiente para la protección.

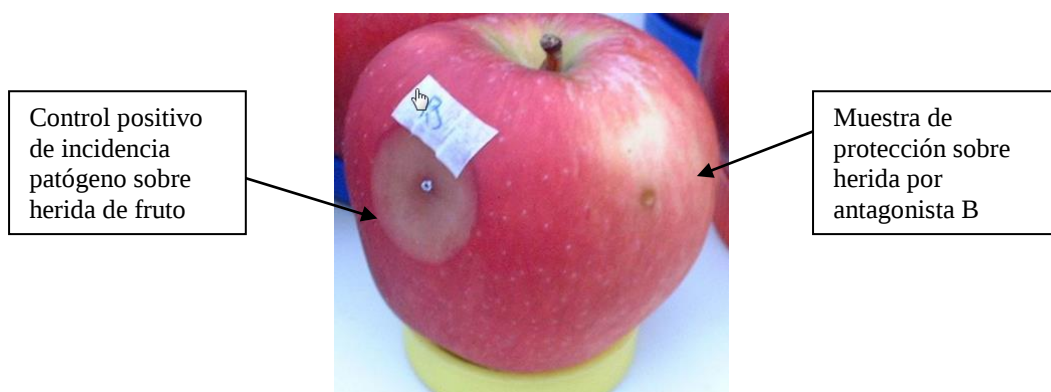


Imagen 2: Fotografía mostrando la acción protectora del antagonista B (herida derecha) y la acción del patógeno *P. expansum* sobre herida sin protección (herida izquierda)

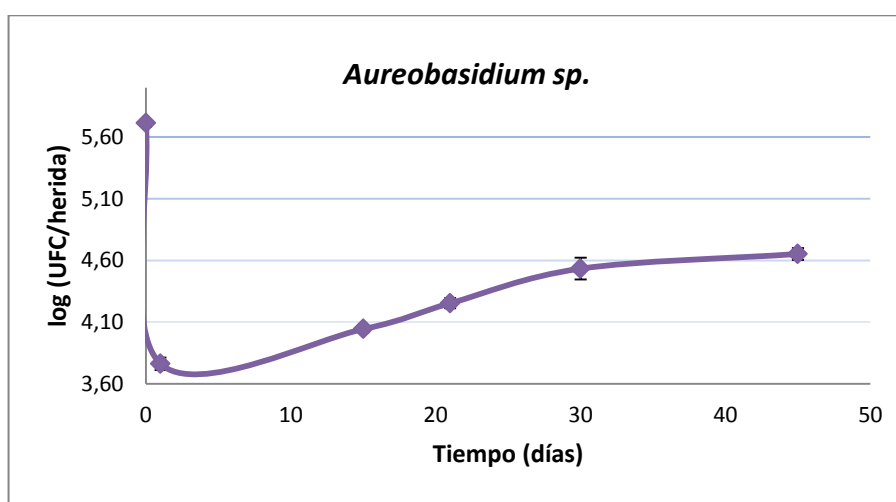


Figura 4. Colonización en herida de manzana por *Aureobasidium sp.* (Aislamiento B) a 5°C.

2.5.2. Sensibilidad a Iprodione *in vitro*

Los resultados del ensayo de sensibilidad a Iprodione *in vitro* se presentan en la gráfica 5. Como se observa el aislamiento B no fue capaz de crecer y desarrollarse a la concentración de Iprodione ensayada, pero tampoco se observa una disminución del orden de su concentración por lo cual en estas condiciones (concentración – tiempo) no se observaron efectos sobre la viabilidad celular.

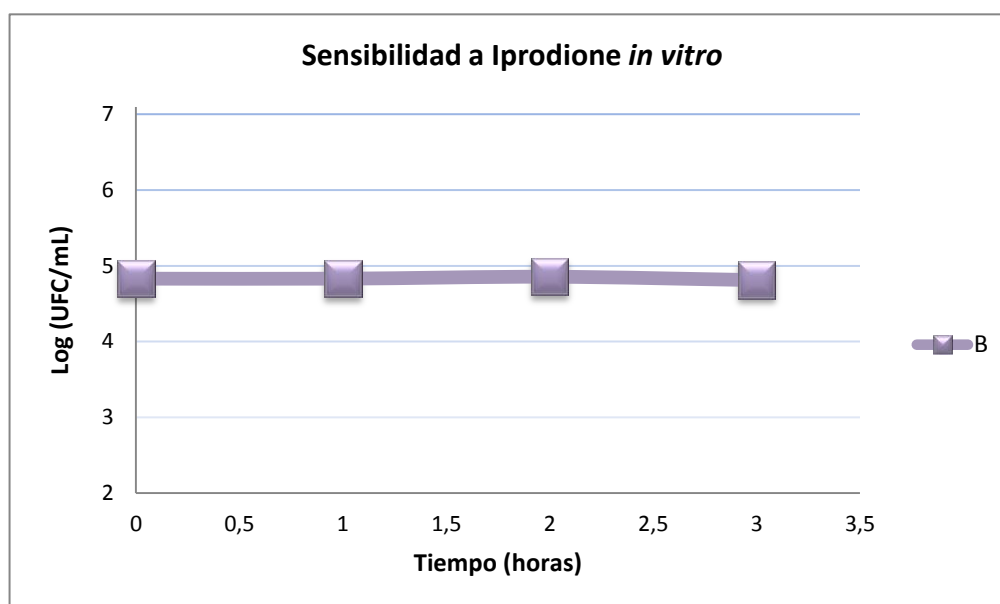


Figura 5. Sensibilidad a Iprodione *in vitro* para el antagonista B por tres horas a 25°C.

Los resultados del ensayo de sensibilidad a mayor concentración de Iprodione y tiempo de exposición se presentan en la siguiente tabla 6. Se observa que luego de 12 horas de contacto con Iprodione la concentración del antagonista disminuye un orden para 0,1 g/L de Iprodione y dos órdenes si la concentración del fungicida es de 0,5 g/L. El resultado de este ensayo muestra la sensibilidad del aislamiento B al Iprodione, la cual impide el uso de ambos en forma conjunta, en prácticas de control integrado

Tabla 6. Resistencia a Iprodione para el antagonista B a 12 horas de exposición.

Concentración de Iprodione (g/L)	Concentración de cepa B (ufc/ml)
0	2×10^5
0,1	2×10^4
0,5	$< 1 \times 10^3$

2.5.3. Determinación de temperatura óptima de crecimiento

Se determinó la temperatura óptima de crecimiento para el aislamiento B. Se puede observar que la temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el entorno de los 25°C y que a temperaturas superiores a los 35°C se observa muerte celular. Este último aspecto es favorable ya que el microorganismo no tendría la capacidad de sobrevivir y desarrollarse a

la temperatura del cuerpo humano, por lo cual sería seguro si se piensa en su uso para formulaciones aplicables a productos alimenticios.

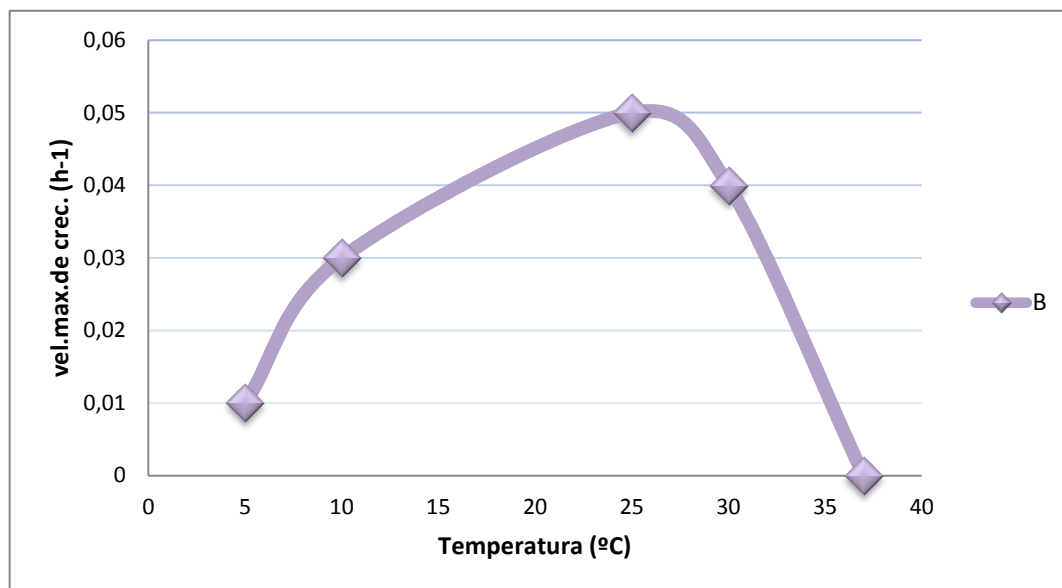


Figura 6. Temperatura optima de cultivo para el aislado B (*Aureobasidium* sp.)

2.6. Identificación molecular del antagonista seleccionado (B)

Con las secuencias obtenidas correspondientes a la región D1/D2 e ITS1/ITS2 del aislamiento B, se realizó un árbol filogenético de similitud, el cual se muestra en la figura 7. El árbol filogenético se construyó utilizando el método de Neighbor-Joining, incluyendo el test bootstrap con 1000 réplicas. El porcentaje de réplicas en las cuales los datos quedaron asociados de determinada forma se muestra en los nodos donde divergen las diferentes ramas. Las distancias evolutivas se calcularon con el método de Jukes- Cantor y corresponden al número de sustituciones por sitio. El análisis filogenético mostrado se realizó mediante el programa Mega 5. El agrupamiento obtenido en el árbol filogenético determinó que el aislamiento B fuera identificado como *Aureobasidium pullulans*.

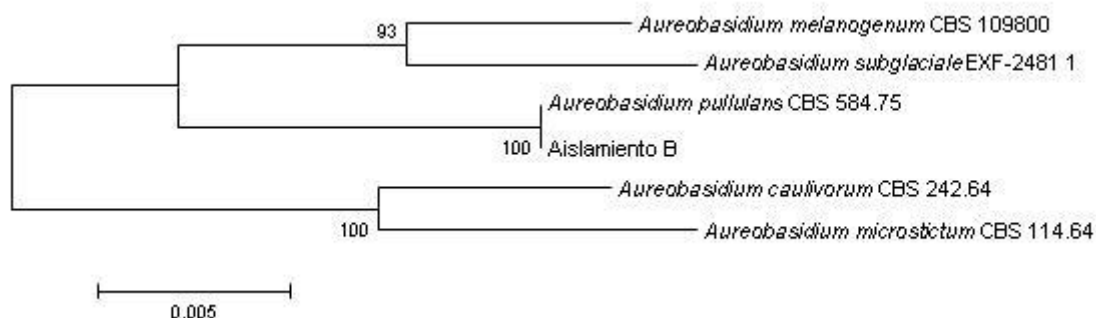


Figura 7. Árbol filogenético basado en secuencias ITS1/ITS2 y D1/D2

3. Determinación de los mecanismos de acción del antagonista seleccionado

Los mecanismos de acción estudiados se presentan en la tabla 7. No se observó disminución del crecimiento del patógeno con respecto al control en los cultivos duales, lo que permite inferir que la producción de metabolitos difusibles no sería uno de sus mecanismos de acción contra este tipo de patógenos.

Con respecto a la producción de la enzima β 1,3 glucanasa se detectó una producción de 8,4 UE en cultivo líquido, mientras la producción de quitinasa registrada fue menor, con un valor de actividad enzimática de 0,47 UE. Este resultado revela la capacidad del antagonista seleccionado de degradar paredes fúngicas, por lo que podría ser un mecanismo de acción involucrado en el control de *P. expansum*.

Se determinó la capacidad de producción de sideróforos por parte del antagonista seleccionado tanto en cultivo dual como por espectrofotometría. En ausencia de Fe^{+3} , en cultivo dual, se observó una disminución notoria del crecimiento del patógeno en comparación al control.

Tabla 7. Mecanismo de acción del antagonista B

Mecanismo de acción evaluado	Resultado
Producción de antibiótico	-
Producción de β 1,3 glucanasa	8,40 UE
Producción de Quitinasa	0,47 UE
Producción de sideróforos	+

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo, se ha interesado en la búsqueda, selección y caracterización de cepas nativas antagonistas del principal patógeno postcosecha de manzana (*P. expansum*), causante de moho azul, como primer paso en el desarrollo de un producto alternativo o complementario al uso de fungicidas en postcosecha.

Se determinó la existencia de cepas patógenas con diferente agresividad y resistencia a tiabendazol e iprodione, los fungicidas más utilizados en nuestro país para baños de fruta previos al almacenamiento; lo cual corrobora la necesidad de investigar en el desarrollo de métodos alternativos de control.

Se logró aislar y caracterizar una cepa nativa (aislamiento B) de superficie de manzana antagonista capaz de reducir la incidencia del moho azul en un 100% a 5°C y en un 84% a 1°C en un período de 30 y 60 días respectivamente; lo cual confirma la correcta elección del sitio y método de aislamiento. Según los resultados de los análisis moleculares el aislamiento B correspondería a *Aureobasidium pullulans*.

La protección de las heridas de las frutas con el uso de el aislamiento B, (*Aureobasidium pullulans*) nativa, fue mayor que el logrado utilizando la cepa de *Candida oleophila* usada como principio activo en el producto comercial Aspire.

Los resultados de caracterización del antagonista demuestran la capacidad de producción de enzimas en este caso de β - 1,3- glucanasa, la cual tiene capacidad lítica para componentes de la membrana fúngica así como una producción menor de quitinasas. El cultivo dual demuestra que no se producen metabolitos difusibles en el medio ensayado, el cual tiene una composición muy similar al sitio donde ocurrirá la interacción con el patógeno. Se demostró además la sensibilidad a bajas concentraciones de iprodione, lo cual impide el uso de ambos en forma conjunta, en prácticas de control integrado. Por último la curva de temperatura muestra una temperatura óptima de 25°C y ausencia de crecimiento a 37°C, procurando no ser por tanto un patógeno humano.

El antagonista fue capaz de colonizar eficientemente el sitio de acción a temperaturas bajas, constatándose que se mantiene viable y en concentraciones necesarias para lograr impedir la aparición de síntomas de heridas de manzana. Todos estos análisis

corroboran la potencial capacidad de la cepa seleccionada (B) como un buen biocontrolador capaz de ser utilizada en una formulación para el control postcosecha de cepas nativas patógenas.

Se plantea continuar este trabajo, estudiando la capacidad de las cepas aisladas de controlar la pudrición producida por cepas agresivas de *Botrytis cinerea* y ahondar en el conocimiento de los mecanismos de control que ocurren en el sitio de interacción.

REFERENCIAS

- **Abeles**, F.B., y Forrence, L.E. 1970. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 45: 395-400.
- **Ansorena**, D. 2003. Frutas y Frutos Secos. Alimentos. Composición y Propiedades. Editores: I. Astiasarán, J.A. Martínez. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. 191-211. ISBN: 84-486-0305-2
- **Aragón**, J., Barnes, N., Colodner, A; Di Masi, S.; Franco, C.; Giambelluca, A; Miracca, C.; Salvador, E.; Sánchez, D.; Sanoner, C.; Sosa, M.C. 2010. Enfermedades de postcosecha. Pera William's: Manual para el productor y empacador / coord. Enrique E. Sánchez. 1ra. Ed. Gral. Roca, Río Negro AR: Erregé. Cap. 13, 138- 157.
- **Artés**, F. y Gómez, P. 2003. Packaging and colour control: the case of fruit and vegetables. En: *Novel Food Packaging Techniques*. Ed. R. Avenhainen. Edit. CRC Press and Woodhead Publishing Ltd. Chapter 20. 416-438
- **Awasthi**, L.P. 2015. Recent advances in the diagnosis and management of plant diseases. Springer Ed
- **Baker**, K.F., y Cook, R.J., 1974 *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman, San Francisco, USA. 433 pp. (Libro, reimpresso en 1982, la Sociedad Americana de Fitopatología, St. Paul, MN).
- **Bandoh** S, Takeuchi M, Ohsawa K, Higashihara K, Kawamoto Y, Goto T. 2009. Patulin distribution in decayed apple and its reduction. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 379–382.
- **Batta**, Y.A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *International Journal of Food Microbiology* 96: 281-288.
- **Bautista**, P., Calderon, M., Servin, R., Ochoa, N., Ragazzo, J., 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control* 65: 293–301.
- **Bautista**, S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos

Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.8(1):1-6 Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C

- **Benbow, J., Sugar D.**1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by pre-harvest yeast applications. *Plant Dis.* 83: 839-844.
- **Bencheqroun, S. K, Bajjia, M., Massarta, S., Labhililib, M., El Jaafaric, S. M. Jijaklia, H.**2007. Biocontrol of blue mold on apple fruits by *Aureobasidium pullulans* (strain Ach 1-1): in vitro and in situ evidence for the possible involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology.* 46: 128–135.
- **Brause AR, Trucksess MW, Thomas FS, Page SW.** 1995. Determination of patulin in applejuice by liquid chromatography. Collaborative study. *J. AOAC int.* 79(2): 451-455.
- **Cabañas R, Abarca ML, Bragulat MR, Cabañes FJ.** 2009. In vitro activity of imazalil against *Penicillium expansum* : Comparison of the CLSI M38-A broth microdilution method with traditional techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1): 26-29.
- **Calero, F. A.** 2006. El envasado en atmosfera modificada mejora la calidad del consumo de los productos Hortofructícolas y minimamente procesados en fresco. *Revista-Iberoamericana. Tecnología Postcosecha.* 7 (2): 61-85
- **Calvente, V de Orellano ME, Sansone G, Benuzzi D and Sanz de Tosetti MI.** 2001. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 26(4): 226-229.
- **Castoria, R., Caputo, L.; De Curtis, F. and De Cicco, V.** 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible mechanism of action. *Phytopathology.* 93: 564- 572
- **Castoria, R.; De Curtis, F.; Lima, G.; Pacifico, S.; De Cicco.-** 2001.- *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action.- *Postharvest Biology and Technology.-* 22: 7-17
- **Castoria, R.; De Curtis, F.; Lima, G.; De Cicco, V.-**1997.β 1-3 glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases.- *Postharvest Biology and Technology.-* 12: 293-300.

- **Chanchaichaovivat**, A. Panijpan, B., Ruenwongsa, P. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biological Control*. 47(2): 207-215.
- **Chand-Goyal**, T. y 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.
- **Come**. D. y Corbineau, F. 2002. Clasificación y principales características fisiológicas de las hortalizas. Tirilly Y. Bourgeois, C.M. Tecnología de las hortalizas. EdAcribia. Zaragoza. 3-14.
- **Cook** J. R. y Baker K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogenos. ASP Press St. Paul, Minnesota, 539.
- **Cowan**, S. T. y Steel, K.J. 1993. Manual for Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press. Cambridge 3rd. de. G. I. Barrow. 351.
- **De Costa**, D.M., and Erabadupitiya, H.R.U.T. 2005. Anintegrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the Burkholderia cepacia complex. *Postharvest Biology and Technology* 36: 31-39
- **DIEA**, 2014. <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx>
- **Dobra**, A.; Rossini, M. 1993. Patógenos de postcosecha: Aspectos epidemiológicos, resistencia a fungicidas y su control. Curso internacional de sanidad en frutales de pepita / INTA EEA Alto Valle. Cap. 11, 22.
- **Droby** S, Wisniewski M, Macarisin D, Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research, is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52: 137–145.
- **Droby**. S., 2007. Avances en el control de las enfermedades de frutas y hortalizas en postcosecha. Una perspectiva global. *Phytoma*. Vol. 189: 90-93.
- **Droby**, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Kere-Tzur, M., Shachnai, A., 1998. Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control* 12, 97–101.
- **El-Ghaouth** A, Wilson CL, Wisniewski M, Droby S, Smilanick JL, Korsten L. 2002. Biological control of postharvest disease of citrus fruits. In: Gnanamanickam SS (Ed.) *Biological Control of Crop Diseases*. New York NY. Marcel Dekker Inc. 289-312.

- **El Gaouth**, A.; Smilanick, J.L. and Wilson, C.L. 2000. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit.- Postharvest Biology and Technology.19: 103-110
- **El Ghaouth**, A, Charles I. Wilson and Michel Wisniewski. 1998. Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in Apple Fruit.-Phytopathology.- 88: 282-291.
- **Errampalli**, D. 2014. Capítulo 6 *Penicillium expansum* (blue mold) Postharvest Decay and Control. Elsevier 189-231
- **Erwin** DC y **Ribeiro** O., .1996. *Phytophthora*. Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, EEUU. 145-184.
- **FAO**. 2014. Iniciativa mundial sobre la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. www.fao.org/save-food
- **Frioni**, L. 1999. Procesos Microbianos. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. 286
- **Giobbe**, S., Marceddu, S., Scherm, B., Zara, G., Mazzarello, V.L., Budroni, M., Migheli, Q., 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. FEMS Yeast Res. 7: 1389–1398.
- **Graell**, J., Ortiz, A. 2003. Área de Poscosecha, CeRTA, UdL-IRTA (Lleida) Recomendaciones para almacenamiento en Atmósfera Controlada; revista. 38-44.
- **Guerrero-Prieto**, V. M., Trevizo-Enriquez, M. G., Gardea-Bejar, A. A., Figueroa-Valenzuela, C., Romo-Chacón, A., Blanco-Perez, A. C., 2004. Identificación de levaduras epifitas obtenidas de manzana (*Malus sylvestris* (L.) Mill. Var. Domestica (Borkh.) Mansf.) para el control biológico poscosecha. Revista Mexicana de Fitopatología, 22(2), 223–230.
- **Hernández**, A, Velásquez M, Hernández AR. 2006 Use of antagonistic microorganisms for the control of postharvest diseases in fruits. Revista Mexicana de Fitopatología. 24: 111-121
- **Hernández**, R., Fernández, C. y Baptista, P. 2010. Metodología de la Investigación. México D.F., Editorial McGraw Hill

- **Herrero A.** 1998 Tratamientos de post- recolección de peras y manzanas. Post-cosecha.. Transferencia tecnológica Revista Phytoma España 98: 19-32
- **Higgins D.G.** 1994. Clustal V: multiple alignments of DNA and protein sequences. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)25: 307-318.
- **IARC.** Agencia Internacional de Investigación del Cáncer. 2010. <http://www.iarc.fr/search.php?Cx=00998750164199931167%3Aajwf5bx4tx78&cof=FORID%3A9&ie=UTF-8&ie=ISO-8859-1&oe=ISO-8859-1&q=patulin&sa=Search>.
- **Infante, D.,** Martínez B., González N. and Reyes, Y. 2009. mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista, Protección Vegetal La Habana, Cuba. 24(1)14-21.
- **Jacas, J.** 2005. El control biológico de plagas y enfermedades. Publicación de la University Jaume I. Dil. 115-126.
- **Janisiewicz, W.J.,** Tworowski, 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.
- **Jiménez, L.C.** 2009. Curso de control químico. Manuscrito no publicado. Departamento de Biología-Sanidad Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
- **Jukes T.H. y** Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Mammalian Protein Metabolism (ed. by HN IM).21-132. Academic Press, New York.
- **Junaid, J.M.;** Dar, N.A.; Bhat, T.A.; Bhat, A.H.; Bhat, M.A. 2013. Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. International Journal of Modern Plant & Animal Sciences. 1(2): 39-57
- **Karabulut, O.,** and Baykal, N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. Crop Protection. 23: 431-435.
- **Kurtzman C.P. y** Fell J.W. 1999. Classification of yeasts. En: Elsevier (Ed). The yeasts - a taxonomic study. Elsevier Science BV, Amsterdam, the Netherlands. 891-947
- **Kurtzman C.P. y** Droby S. 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. Systematic and Applied Microbiology. 24: 395-399.

- **Lahlali, R.**, Massart, S., De Clercq, D., Serrhini, M. N., Creemers, P., & Jijakli, M. H. 2009. Assessment of *Pichia anomala* (strain K) efficacy against blue mould of apples when applied pre- or post-harvest under laboratory conditions and in orchard trials. *European Journal of Plant Pathology*. 123:37–45.
- **Liu B.H.**, Wu Feng-Yih, Su Ching-Chyuan. 2007 “Induction of Oxidative Stress Response by the Mycotoxin Patulin in Mammalian Cells”. Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University. Taiwan. *Toxicological Science*. 95(2):340-347.
- **Liu J.**, M Wisniewski, Droby S, Vero S, Tian S, Hershkovitz V. 2011. La glicina betaína mejora la tolerancia al estrés oxidativo y biocontrol eficacia de la levadura antagonista *Cystofilobasidium infirmominatum*. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*. P.146.
- **Lutz, M.**, Lopes, C., Rodríguez, M., Sosa, M., Sangorrin, M., 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *Int. J. Food Microbiol*. 164: 166–172.
- **Magnani, M.**; Fernandes, T.; Cavenaghi Prete, C.E.; Homechim, M.; Sataque Ono, E.Y.; Vilas-Boas, L.A.; Sartori, D.; Furlaneto, M.C.; Pelegrielli Fungaro, M.H. 2005. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*. 62(1): 45 - 49.
- **Mahadevan, B.** and Crawford D.L. 1997. Purification of chitinase from the biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbia. Technology*. 20: 489-493.
- **Malcolm, G.L.** and Gerdt, D.R. 1995. Tecnologías de cosecha y postcosecha de frutas y hortalizas. *Proceedings of a Conference Held in Guanajuato Mexico*. 530–537.
- **Mari, M.**, Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., Bertolini, P., 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol. Technol*. 73: 56– 62.
- **Mondino, P.**; Di Masi, S.; Falconí, C.; Montealegre, J.; Henríquez, J.; Nunes, C.; Salazar, M.; Stadnik, M.; Vero, S.; Usall, J. 2009. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha, Proyecto CYTED 106AC0302 “Desarrollo de tecnologías para manejo integrado (MI) de enfermedades del manzano”. 67.

- **Mondino**, P. 2002. Enfermedades fúngicas del manzano. Sarna del manzano. Sitio WEB: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Sarna_del_manzano.htm
- **Monte**., E. 1997. Curso de postgrado: Control Biológico. Principios Generales y aplicación de biofungicidas en la Agricultura. Dictado por el Dr. Enrique Monte Vázquez (Facultad de Farmacia/Biología de la Universidad de Salamanca, España.) Organizado por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Escuela para Graduados y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Lugar IMYZA; CICA; INTA Castelar; Buenos Aires.
- **Morales**, H., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. 2010. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: a review. Food Control, 21(7), 953-962.
- **Mostafavi**, H., Mirmajlessi, S., Fathollahi, H. Shahbazi., S. and Mirjalili, S. 2013. Integrated effecto gamma radiation and biocontrol agent on quality parameters of apple fruit: An innovative commercial preservation method. Radiation Physics and Chemistry 91: 193-199.
- **Mostafavi**, H., Mirmajlessi,S., Fathollahi,H.,Minassyan,V.,Mirjalili,S.M. 2011.Evaluation of gamma irradiation effectand *Pseudomonas flourescens* against *Penicillium expansum*. Afr.J.Biotechnol.10(54),11290–11293
- **Navarro**, J.2003. Los envases: Segunda piel de los productos de la IV Gama Productos Hortofrutícolas mínimamente procesados. (Eds) M.G. Lobo y M. González. Gobierno de Canarias. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y alimentación. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 111-124. ISBN: 84-606-3514-7.
- **Neilands**, J.B. 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. The journal of biological chemistry. 270 (45): 26723–26726.
- **Orr**, D and Baker, J. 1997, Biological control: Purchasnig Natural Erewis <http://upm.www.ncsu.edu/biocontrol/3³.htm>
- **Ortu** G, Demontis MA, Budroni M, Goyard S, d'Enfert C, Migheli P. 2005. Estudio de la biopelícula la formación en *Candida albicans* puede ayudar a la comprensión de la capacidad de biocontrol de cepa *Saccharomyces cerevisiae*

contra el hongo fitopatógeno *Penicillium expansum*. Journal of Plant Pathology 87: 300. Resumen.

- **Petkovsek**, M., Stampar, F., Veberic, R., 2009. Changes in the inner quality parameters of apple fruit from technological to edible maturity. Acts Agric. Slov. 93: 17-29.
- **Pianzzola**, M.J., Moscatelli, M., Vero, S., 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. Plant Dis. 88: 23–28.
- **Pitt** JI. Leistner. L. 1991. Toxigenic *Penicillium* species. En Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS (Ed.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. 81-99.
- **Puel** O., Galtier P., Oswald P. 2010. “Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin”. INRA, UR66, Pharmacologie-Toxicologie, F-31027 Toulouse, France. Toxins. 2(4):613-631.
- **Saitou** N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.
- **Sambrook** J. and Russell D.W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- **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.
- **Satyanarayana**, T. y Kunze, G. 2009. Yeast Biotechnology: Diversity and applications. Springer Ed. Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Nigro F. & Droby S. 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. Postharvest Biology and Technology 17: 189-199.
- **Sharma** RR, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50: 205-221.
- **Sokal**, A., and Bricmont, J. 1998. Fashionable Nonsense. Postmodern Intellectuals' Abuse of Science. Picador USA, New York.
- **Spadaro**, D., Vola, R., Piano, S., and 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 24:123-13

- **Spadaro**, D. y **Droby**, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*. 47: 39 – 49.
- **Spotts** R. A. and **Sanderson** P. G. 1994. The Postharvest Environment and Biological Control/ Cap. 4.- En *Biological control of postharvest diseases*.- 43- 45.- Edited, **Wilson** C.L. and **Wisniewski** M. E., CRC Press, Inc./ Boca Ratón.
- **Tamura** K., **Dudley** J., **Nei** M. & **Kumar** S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- **Torres** R, **Teixió** N, **Usall** J, **Abadias** M, **Mir** N, **Larrigaudiere** C, **Viñas** I. 2011. Anti-oxidant activity of oranges after infection with the pathogen *Penicillium digitatum* or treatment with the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Biological Control* 57: 103-109
- **Usall**, J., 1998. Influencia de factores de campo en el grado de susceptibilidad de manzanas “*Golden Delicious*” a podredumbres de post- cosecha. *Phytoma*. España.
- **Van Driesche**, R. G., and T. S. **Bellows**. 1996. *Biological Control*. Chapman & Hall, New York. 539.
- **Vero**, S., **Mondino** P., **Burgueño**, J., **Soubes**, M., and **Wisniewski**, M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*. 26: 91-98.
- **Vero**, S., **Mondino** P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*. 7: 1-10
- **Wilson**, C. L.; **Wisniewski**, M. E. 1992. Futures alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases.133-138. *Biological Control Of Plant diseases*, edited by E.S. Tjamos et al., Plenum Press, New York
- **Wilson**, C.L., and **Wisniewski**, M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27: 425-441.
- **Wisniewski**, M.E., and **Wilson**, C.L.1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent adevances. *HortScience* 27: 94-98.
- **Wisniewski**, M., **Biles**, C., **Droby**, S., **McLaughlin**, R., **Wilson**, C., and **Chalutz**, E. 1991. Mode of action of the Postharvest biocontrol yeast *Pichia*

guilliermondii: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 39: 245–258.

- **Xu, B., Zhang, H., Chen, K., Xu, Q., Yao, Y., Gao, H., 2013.** Biocontrol of postharvest *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. Curr. Microbiol.. [http:// dx.doi.org/10.1007/s00284-013-0359-9](http://dx.doi.org/10.1007/s00284-013-0359-9).
- **Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2010.** Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. Biol. Control 54: 172–180.
- **Zhulong, C., and Tian, S. 2005.** Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Postharvest Biology and Technology 36: 215-223
- **Zoffoli J., Latorre B. 2011.** Table grape (*Vitis vinifera*L.). En: E.M. Yahia (ed.). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Cocona to Mango. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Vol. 3: 179-212.

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Aislamiento, ensayo de patogenicidad y selección

Número de aislamiento	Media del tamaño de lesión (cm) ± Desvío estándar	Desvío Estándar	Intervalo de confianza	Coefficiente de variación
Ps	1,4 ± 0,1	0,10	0,1	7,5
P9	1,5 ± 0,3	0,27	0,3	17,4
P8	2,2 ± 0,4	0,36	0,4	16,1
P10	1,8 ± 0,6	0,57	0,7	31,6
P12	1,7 ± 0,3	0,32	0,4	19,4
P13	1,9 ± 0,2	0,23	0,3	12,6
P14	2,9 ± 0,2	0,17	0,2	6,0
P15	2,1 ± 0,6	0,57	0,7	27,6
P16	2,4 ± 0,3	0,30	0,3	12,5
P17	2,9 ± 0,3	0,31	0,4	10,9

Selección secundaria. Capacidad antagonista en fruta

Antagonistas	Media % incidencia	Desvío estándar	Intervalo de confianza	Coefficiente de variación
M14	75	19	23	26
B	0	0	0	0
A	75	19	23	26
C	30	12	14	38
D	60	16	19	27
2F	30	12	14	38
4F	70	12	14	16
2O	100	0	0	0
CO	60	23	27	38
control	100	0	0	0

Colonización en heridas de manzana por *Aureobasidium* sp.

Promedio log (ufc/herida)	Tiempo (Días)	Antagonista B		
		Desvío Estándar	Intervalo de confianza	Coefficiente de variación
5,71	0	0,02	0,03	0,30
3,76	1	0,03	0,05	0,80
4,04	15	0,02	0,03	0,39
4,25	21	0,02	0,04	0,58
4,53	30	0,05	0,09	1,15
4,65	45	0,03	0,05	0,62