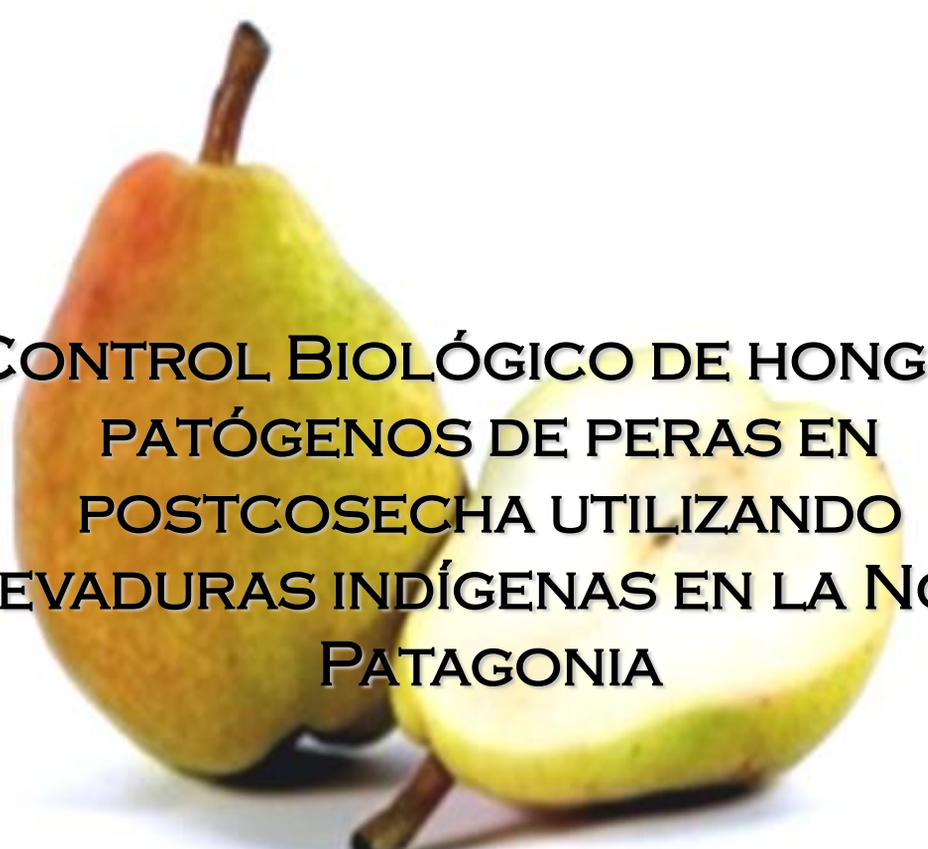




TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Two pears are shown against a white background. The pear on the left is whole, with a mix of yellow and orange-red skin. The pear on the right is sliced, showing its pale yellow flesh and a brown stem. The title text is overlaid on the pears.

**CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS
PATÓGENOS DE PERAS EN
POSTCOSECHA UTILIZANDO
LEVADURAS INDÍGENAS EN LA NOR-
PATAGONIA**

Ing. Agr. María Cecilia Lutz

Dra. Marcela P. Sangorrin

Directora

Dr. Christian A. Lopes

Co-Director

2015

Este trabajo de Tesis fue desarrollado en:

- Laboratorio de Microbiología, del Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, CONICET-UNCo). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue.
- Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue.
- Empaques regionales La Deliciosa S.A. (Centenario, Neuquén); Agro Roca S.A. (General Roca, Río Negro); Neuquén Produce - Moño Azul (El Chañar, Neuquén).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS PATÓGENOS DE
PERAS EN POSTCOSECHA UTILIZANDO LEVADURAS
INDÍGENAS EN LA NOR-PATAGONIA

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ING. AGR. MARÍA CECILIA LUTZ

DRA. MARCELA PAULA SANGORRIN
DIRECTORA

DR. CHRISTIAN ARIEL LOPES
CO-DIRECTOR

2015

“La única manera de descubrir los límites de lo posible es aventurarse un poco más allá, en lo imposible”

Arthur Clarke

A mis padres, hermanos y abuelas ...

AGRADECIMIENTOS

A las personas:

♥ A mis padres, por su amor, acompañamiento, apoyo incondicional y hacerme siempre el camino más sencillo. Los Adoro!

♥ A mis hermanos, especialmente por la paciencia y contención en los peores momentos. Los Adoro!

♥ A María Cristina Sosa, Christian Lopes y Marcela Sangorrín, por abrirme las puertas a un mundo totalmente distinto al que pensaba para mi futuro. Por darme la oportunidad de trabajar con ustedes. Por la paciencia, por enseñarme a cuestionar todo y hacerme cada día más crítica. Por la pasión con que hacen las cosas y por como lo transmiten. Infinitas gracias para ustedes!

♥ A los dos seres de más luz del Laboratorio: Leti y Silvanita María. Por estar siempre! Por contenerme, acompañarme, ayudarme y enseñarme sobre ciencia, y sobre todo de la vida. ... Por haberlas conocido y los lindos momentos que viví (y vivo) con ustedes!

♥ A Euge Rodriguez, una grande en todo sentido. Por preocuparte mucho más que por los experimentos!

♥ A Adriana, Raul, Laly, Miria, Euge Roca, Irene, Julix y a las nuevas generaciones del laboratorio: Bet, Andrea y Meli. Siempre bien predispuestos para brindar una mano o una sonrisa en el momento oportuno.

♥ A Andrea Robiglio, con quien nos iniciamos en el fascinante mundo de los agentes de control biológico. Por todo lo que me enseñaste y lo que aprendimos juntas!

♥ A Pedro Mondino y Silvana Vero, que siempre tuvieron y tienen toda la predisposición para ayudarme. Grandes personas!

♥ A mis amigos, en especial a Tefi, Seba, Zaca, Paulita, Nadia y Luli, por la contención, acompañamiento en los momentos más complicados y sobre todo, por la paciencia.

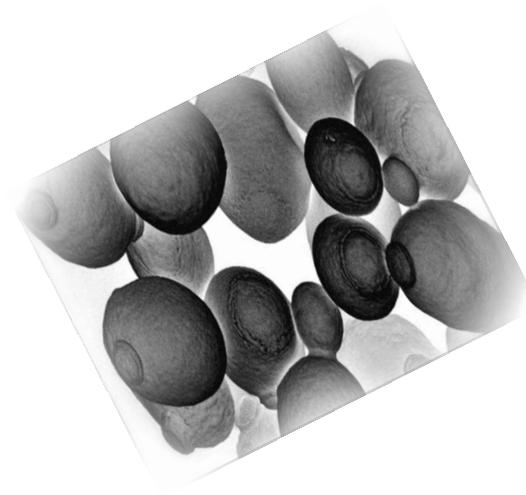
♥ A los estudiantes de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, quienes con su curiosidad me estimulan constantemente a seguir el camino del conocimiento.

♥ A Cristina Bartusch y Betina Schulz por la predisposición y colaboración brindada.

A las instituciones y empresas que permitieron que pudiera desarrollar este trabajo de tesis:

- A la Universidad Nacional del Comahue, en particular a la Facultad de Ingeniería, Depto de Química y a la Facultad de Ciencias Agrarias.
- Actual Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, CONICET-UNCo), Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras.
- A las empresas, en las cuales se desarrollaron los experimentos, haciendo uso de sus instalaciones, mano de obra, insumos de empaque y fruta: La Deliciosa (Centenario, Neuquén), AgroRoca (General Roca, Río Negro) y Moño Azul (Servicios Frutícolas, El Chañar, Neuquén).

ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	XIII
SUMMARY	XVI
INTRODUCCIÓN	1
1. Producción Argentina de Peras	
1.1. Cadena productiva de la Pera en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén	2
1.2. Procesamiento de la fruta para el consumo en fresco. Empaque y acondicionamiento.	4
1.2.1. Momento oportuno de cosecha.....	4
1.2.2. Acondicionamiento de los frutos en la planta de empaque	4
1.2.3. Sistemas de almacenamiento de la fruta	7
1.2.3.1. Manejo del frío.....	7
1.2.3.2. Uso de atmósferas controladas y modificadas.....	7
1.2.3.3. Aplicaciones de 1- MCP.....	8
2. Principales pérdidas producidas durante la vida postcosecha de la fruta	9
2.1. Pérdidas producidas por patógenos de heridas	9
2.1.1. Podredumbres postcosecha producidas por <i>Penicillium</i> sp.....	11
2.1.2. Podredumbres postcosecha producidas por <i>Botrytis cinerea</i> Pers. Fr	12
3. Condiciones que favorecen la infección y el desarrollo de las enfermedades	14
3.1. Condiciones ambientales	14
3.2. Resistencia del fruto al ataque del patógeno.....	14
4. Estrategias de manejo de las principales enfermedades postcosecha	15
4.1. Aplicación de fungicidas de síntesis química.....	16
4.2. Aplicación de cloruro de calcio	18
5. Exigencias de calidad y sanidad de la fruta	18
5.1. Manejo integrado de plagas (MIP) y producción orgánica	19
6. Control biológico postcosecha	20
6.1. Estrategias de aislamiento y selección de ACB	25
6.2. Mecanismos de acción de los ACB	27
6.2.1. Competencia en el hospedante	30
6.2.2. Amensalismo.....	31
6.2.3. Parasitismo.....	32
6.2.4. Estimulación de las defensas del hospedante	33
6.2.4.1. Producción de biofilms o biopelículas.....	33
6.3. Mejoramiento de la acción biocontroladora de los ACB	33
6.3.1. Combinación de antagonistas	34
6.3.2. Adición de sales inorgánicas.....	35

6.3.3. Adición de nutrientes.....	37
6.3.4. Integración con otros métodos de control	37
6.4. Producción de los ACB	38
6.4.1. Cultivos por lotes o <i>batch</i>	39
6.4.2. Factores que influyen en el proceso de producción	39
6.4.2.1. Factores nutricionales.....	39
6.4.2.2. Factores físicos.....	41
6.4.3. Medios de cultivo utilizados para la producción de microorganismos	43
6.4.3.1. Melaza de caña como medio de producción de levaduras.....	44
6.5. Estudios sobre patogenicidad en humanos	45
6.6. Formulación de ACB	46
6.7. Ensayos a escala semicomercial	47
7. Levaduras.....	50
7.1. Generalidades.....	50
7.2. Ocurrencia de levaduras en los frutos	50
7.3. Las levaduras como agentes de control biológico (ACB)	53
FUNDAMENTACIÓN.....	55
HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL.....	57
ESQUEMA DE DESARROLLO DE TESIS	59
CAPITULO I. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE HONGOS PATÓGENOS	
INTRODUCCIÓN.....	62
MATERIALES	66
MÉTODOS	
1. Aislamientos	67
2. Identificación.....	68
2.1 Especies de <i>Penicillium</i>	
2.1.1 Morfológica y fisiológica	68
2.1.2 Producción de metabolitos del indol	69
2.2.3 Identificación molecular	69
2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	
2.2.1 Morfológica	72
3. Caracterización fenotípica y selección de microorganismos	
3.1 Determinación de la patogenicidad	73
3.2 Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas	74

3.3 Determinación de la Concentración Infecciona Mínima	75
4. Análisis estadístico	76
RESULTADOS	
1. Aislamientos	76
2. Identificación	
2.1 Especies de <i>Penicillium</i>	
2.1.1 Morfo-fisiológica	77
2.1.2 Identificación molecular	80
2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	
2.2.1 Morfológica	81
3. Caracterización fenotípica de los aislamientos	
3.1 Determinación de la patogenicidad	82
3.2 Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas	83
4. Correlación entre la patogenicidad y la CIM	86
5. Selección de aislamientos	86
5.1 Determinación de la Concentración Infecciona Mínima	86
DISCUSIÓN	86

CAPITULO II. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRE - SELECCIÓN DE LEVADURAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA

INTRODUCCIÓN	92
MATERIALES	94
MÉTODOS	
1. Crecimiento y producción de inóculo de los hongos patógenos	96
2. Aislamiento de levaduras con potencial antagonico	96
2.1 <i>Screening</i> primario	97
3. Identificación molecular de levaduras con potencial antagonico	100
4. Selección de levaduras antagonistas	
4.1 <i>Screening</i> secundario	103
5. Análisis estadístico	104
RESULTADOS	
1. Aislamiento e identificación de levaduras con capacidad antagonica	105
2. Selección de levaduras antagonistas	
2.1 <i>Screening</i> secundario	108
2.2 Acción biocontroladora de los aislamientos de mayor potencial frente a <i>Botrytis cinerea</i>	111
DISCUSIÓN	112

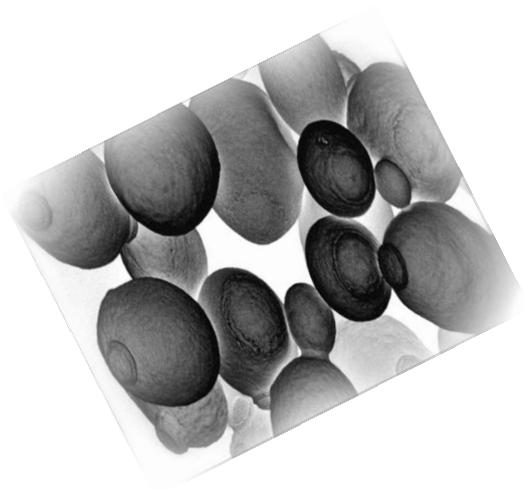
CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS ANTAGÓNICOS. SELECCIÓN DE LEVADURAS BIOCONTROLADORAS

INTRODUCCIÓN	120
MATERIALES	121
MÉTODOS	
1. Crecimiento de microorganismos	
1.1 Hongos patógenos	124
1.2 Levaduras antagonicas	124
2. Evaluación de la actividad antagonica <i>in vitro</i>	
2.1 Producción de compuestos difusibles en agar	125
2.2 Producción de compuestos volátiles	126
2.3 Efecto de las levaduras antagonicas en la germinación de las esporas .	126
2.4 Producción de toxinas <i>killer</i>	127
2.5 Inhibición de la germinación	127
2.6 Producción de sideróforos.....	128
2.7 Capacidad de formación de biofilms	128
2.8 Producción de enzimas extracelulares	128
3. Evaluación de la actividad antagonica <i>in situ</i>	
3.1 Colonización del sitio de la herida	130
3.2 Actividad antagonica de las levaduras en heridas	131
4. Interacción de las levaduras antagonicas seleccionadas – hongos patógenos	
4.1 Perfil metabólico de las levaduras y los patógenos para algunos nutrientes de pera	131
4.2 Competencia por nutrientes en heridas	132
5. Análisis estadístico	133
RESULTADOS	
1. Evaluación mecanismos <i>in vitro</i>	
1.1 Producción de compuestos antifúngicos	134
1.2 Producción de enzimas extracelulares	136
1.3 Capacidad de formación de biofilms.....	137
1.4 Evaluación de la competencia por nutrientes	138
2. Evaluación del comportamiento <i>in situ</i>	
2.1 Colonización de heridas por los ACB.....	140
2.2 Evaluación de la actividad antagonica de las levaduras <i>in situ</i> frente a los dos patógenos	141
3. Relación entre los posibles mecanismos y la actividad antagonista <i>in situ</i>	142
4. Interacción levaduras antagonicas seleccionadas – hongos patógenos	
4.1 Efecto de los nutrientes sobre las levaduras antagonistas y los patógenos	144
4.2 Competencia de nutrientes <i>in situ</i>	146

DISCUSIÓN	148
 CAPITULO IV. ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE PATOGENICIDAD EN HUMANOS - MEJORAMIENTO DEL BIOCONTROL	
INTRODUCCIÓN	155
MATERIALES	157
MÉTODOS	
1. Crecimiento de hongos filamentosos y levaduras antagonistas	159
2. Pruebas de patogenicidad de las levaduras seleccionadas	159
2.1 Crecimiento de las levaduras a 37°C	159
2.2 Producción de fosfolipasas	159
2.3 Evaluación de la tolerancia a las condiciones del jugo gástrico	159
3. Mejoramiento del biocontrol	
3.1 Efecto de las concentraciones de levaduras	160
3.2 Efecto de la combinación de levaduras	160
3.3 Efecto de la combinación de las levaduras con sustancias potenciadoras	
.....	161
3. Análisis estadístico	162
RESULTADOS	
1. Pruebas preliminares sobre la posible patogenicidad en humanos	162
2. Mejoramiento del biocontrol	
2.1 Efecto de las concentraciones de antagonista sobre el biocontrol	162
2.2 Efecto de la combinación de levaduras antagonistas	163
2.3 Efecto de la combinación de las levaduras con sustancias potenciadoras en el biocontrol	164
DISCUSIÓN.....	167
 CAPITULO V. PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ENSAYOS A ESCALA SEMICOMERCIAL DE LAS LEVADURAS ANTAGÓNICAS SELECCIONADAS	
INTRODUCCIÓN.....	175
MATERIALES	178
MÉTODOS	
1. Medios de crecimiento para las levaduras antagonistas	180
2. Determinación de condiciones de crecimiento a escala de laboratorio	
2.1 Determinación de la concentración óptima de melaza y temperatura de producción	180
2.2 Determinación de la concentración óptima de urea	181
2.3 Determinación de la actividad acuosa (aw) del medio de cultivo	181
3. Efecto del medio de cultivo sobre la eficacia de las levaduras en el biocontrol....	181

4. Viabilidad de las levaduras durante el almacenaje	182
5. Producción de biomasa	182
5.1 Modelado del crecimiento microbiano	182
5.2 Obtención de biomasa de levaduras en el reactor	183
6. Ensayos a escala semicomercial.....	184
6.1 Aplicación de antagonistas.....	184
6.2 Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las levaduras.....	186
6.3 Eficacia de aplicación de las levaduras sobre la superficie la fruta y capacidad de colonización	186
6.4 Análisis estadístico	186
RESULTADOS	
1. Condiciones de cultivo a escala laboratorio	
1.1 Determinación de la concentración de melaza y temperatura óptima de producción	187
1. 2 Determinación de la concentración óptima de urea	189
2. Efecto del medio de cultivo sobre la eficacia en el biocontrol de las levaduras....	191
3. Viabilidad de los ACB durante el almacenaje.....	191
4. Producción de biomasa a escala reactor.....	192
5. Efectividad de las levaduras antagonistas en condiciones semicomerciales	193
5.1 Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las antagonistas.	197
5.2 Capacidad de colonización de las levaduras en la superficie de las peras en almacenamiento frigorífico	197
DISCUSIÓN.....	199
CONCLUSIONES	208
ANEXOS	212
BIBLIOGRAFÍA	218
ARTICULO DE RESPALDO.....	250

INDICE DE ABREVIATURAS



1-MCP: 1-metilciclopropeno

A: valor de producción máxima

ACB: Agente de control biológico

AC: Atmósfera controlada

AcK: Acetato de potasio

ACoP: Análisis de coordenadas principales

AD: Agua destilada

ADE: Agua destilada estéril

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJP: Agar jugo de pera

AL: Agua de lavado

AM: Atmósfera modificada

APD: Agar papa dextrosa

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

a_w : Water activity (Actividad agua)

CO₂: Dióxido de carbono

CaCl₂: Cloruro de calcio

CB: Control Biológico

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CMI: Concentración mínima infectiva

CREA: Creatine Agar

cvs: cultivos

CYA: Czapek yeast autolysate

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

Ee: Efecto esperado

FRAC: Fungicide Resistance action committee (Comité de Acción para la Resistencia a Fungicidas)

FS: Factor de Sinergia

GLM: Modelo linealmente generalizado

GPY-A: Glucose, peptone, yeast extrac, agar (glucosa, peptona, extracto de levadura, agar).

GRAS: Generally Regarded As Safe (Considerados generalmente como seguros)

H₂O mQ: Agua miliQ (ultra pura)

ha: hectáreas

HR: Humedad relativa

h: Horas

I (%): Incidencia

ITS: Internal transcribed spacer (Espaciador interno transcrito)

JP: Jugo de pera

Kg: kilogramo

k_La: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

LMR: Límite Máximo de Residuos

Log₁₀: Logaritmo en base 10

mg: Miligramo

min: Minuto

MIP: Manejo integrado de plagas

mL: Mililitro

mm: Milímetro

MR: Moderadamente resistente

NaCl₂: Cloruro de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)

NH₄Mo₇O₂₄: Molibdato de amonio

nm: Nanómetros

Nmoles. nanomoles

NPCC: North Patagonia Culture Collection (Colección de Cultivos Patagonia Norte)

NYDA: Nutrient broth, yeast extract, glucose and agar (Caldo nutritivo, extracto de levadura, glucosa y agar)

O₂: Oxígeno

p/p: peso/peso

p/v: Peso/volumen

pb: Pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

Ppm: Partes por millón

Proteínas PR: pathogenesis-related proteins (Proteínas relacionadas con las patogénesis)

R: Resistente

rDNA: DNA ribosómico

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)

RL (%): reducción de lesión

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Reactive oxygen species (Especies reactivas del oxígeno)

RP (%): Porcentaje de reducción de podredumbre

rpm: Revoluciones por minuto

RR: Altamente resistente

rRNA: RNA ribosómico

S: Sensible

SAR: Systemic Acquired Resistance (Resistencia sistémica adquirida)

SS: Sólidos Solubles

TBZ: 2- (4 -tiazolil-benzimidazol). Tecto® 500 SC.

tons: toneladas

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UV: Ultravioleta

v/v: volumen/ volumen

V: Voltios

YES: Yeast extrac – sucrosa (Extracto de levadura - sacarosa)

YEPD-MB: Yeast extract, peptone, dextrose - Methil blue (Extracto de levadura, peptona, dextrosa, azul de metileno)

YNB: Yeast Nitrogen Base (Base Nitrogenada de levaduras)

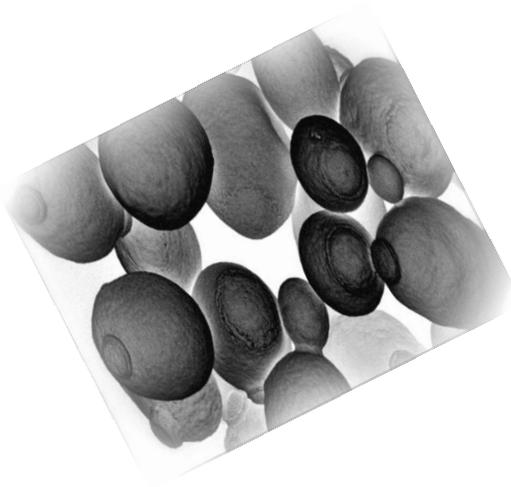
λ : fase Lag

μM : microMolar

μmax : velocidad máxima de crecimiento

μl : Microlitro

RESUMEN



El Alto Valle de Río Negro y Neuquén constituye la principal área productora y exportadora de peras de Argentina. Las variedades más importantes destinadas a la exportación son Beurré D'Anjou y Packham's Triumph, las cuales se almacenan en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95%HR) entre 3 y 7 meses. Durante este período, se producen importantes pérdidas por *Penicillium* sp. y *Botrytis cinerea*. El desarrollo de cepas resistentes de estos hongos por el uso intensivo de fungicidas químicos, el incremento de la demanda de alimentos inocuos y la implementación del manejo orgánico e integrado de plagas, requieren de prácticas sustentables para el control de estos patógenos. El control biológico con levaduras es una de las alternativas más promisorias.

En esta Tesis se propone un sistema de biocontrol basado en el uso de dos levaduras nativas de la Norpatagonia, seleccionadas *in situ* para el control de las principales enfermedades fúngicas de postcosecha de pera. Los antagonistas seleccionados fueron *Pichia membranifaciens* NPCC 1250 y *Cryptococcus victoriae* NPCC 1263, los cuales fueron aislados y seleccionados por enfrentamientos *in situ* en fruta, en condiciones de almacenamiento frigorífico, frente a aislamientos locales de *P. expansum* y *B. cinerea* seleccionados por su patogenicidad.

La estrategia de aislamiento y selección empleada supera a las propuestas planteadas hasta el momento en bibliografía. Las dos levaduras, fueron aisladas a partir de aguas de lavado obtenidas de heridas sanas de fruta orgánica y de transición del cultivar Packham's Triumph, luego de 6 meses de almacenamiento frigorífico bajo presión natural de inóculo. Las aguas de lavado conteniendo una mezcla de levaduras se enfrentaron a *P. expansum* en fruta, se incubaron a 4°C durante 60 días (*screening* primario), y a partir de las heridas sanas se aislaron en agar-jugo de pera, para finalmente evaluarlas individualmente frente a ambos patógenos (*screening* secundario) en frutos en condiciones de almacenamiento comercial.

Se aislaron 11 especies de levaduras, con predominio de los géneros *Aureobasidium*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. En general, las especies identificadas correspondieron a levaduras psicrófitas, característica fundamental para el potencial uso en la postcosecha.

Se evaluaron los mecanismos antagónicos de cinco aislamientos preseleccionados por su capacidad biocontroladora, en ensayos *in vitro* e *in situ*. Las dos levaduras finalmente seleccionadas se caracterizaron por su capacidad de producir toxinas *killer* frente a los dos patógenos postcosecha; secretar enzimas hidrolíticas de pared (quitinasas, glucanasas y proteasas) a -1/0°C; sobrevivir y colonizar las heridas hasta los 120 días de almacenamiento en frío y competir por diferentes nutrientes. *In situ*, *P. membranifaciens* NPCC 1250 mostró un crecimiento poblacional de 5,2905 lnUFC/herida con una fase *lag* de 2,7 días, mientras que *Cr. victoriae* NPCC 1263 alcanzó 5,8984 lnUFC/herida y 0,76 días de fase *lag*. Los dos aislamientos compitieron por ácido aspártico y NH₄NO₃ frente a *P. expansum*; mientras que solo *Cr. victoriae* NPCC 1263 compitió por glicina. Esta última se destacó además por su capacidad de producir biofilms *in vitro*.

Se evaluaron distintas estrategias de mejoramiento del biocontrol *in situ*, en condiciones de conservación: incremento de la concentración de células, combinación de las dos levaduras y adición de diferentes compuestos (glucosa, NH₄Mo₇O₂₄ y CaCl₂). La combinación con CaCl₂ (2% p/v) logró mejorar la capacidad antagonista de las levaduras.

Finalmente, los estudios sobre patogenicidad (crecimiento a 37°C, producción de fosfolipasas y crecimiento en condiciones similares a las del estómago) resultaron negativos para las dos levaduras.

La producción de biomasa para los experimentos a escala semicomercial, se realizó en un reactor de tanque agitado de 22L, utilizando melaza de caña de azúcar (128,2 g/L) y urea (0,6 g/L). La recolección de las células se realizó en fase estacionaria entre las 40-60 h, con rendimientos de $2,5 \times 10^{13}$ UFC/mL para *P. membranifaciens* NPCC 1250 y $5,75 \times 10^{12}$ UFC/mL para *Cr. victoriae* NPCC 1263. Las células de las levaduras se mantuvieron en agua destilada estéril a 4°C por 50 días sin pérdidas significativas de la viabilidad.

A escala semicomercial, las levaduras se aplicaron por pulverización en línea en dos empaques (A y B) sobre pera orgánica Beurré D'Anjou (solo en B) y Packham's Triumph (A y B) y la fruta fue almacenada en frío 3 y 5 meses, respectivamente. Sobre 400 Kg de fruta se aplicaron 25L de una solución de 10^{11} UFC/mL de levaduras solas o combinadas con CaCl_2 (2% p/v).

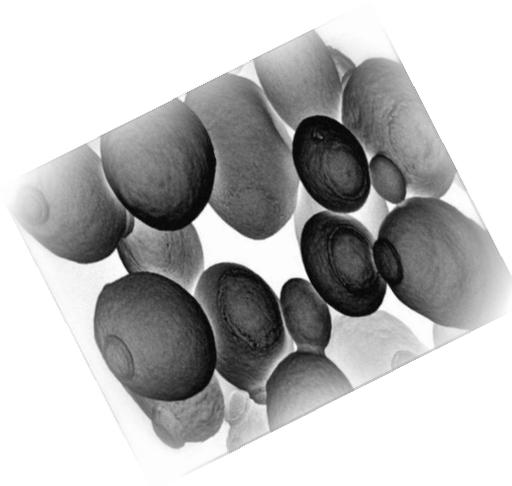
En peras Beurré D'Anjou, en B, a los 3 meses de conservación las levaduras con CaCl_2 redujeron significativamente la incidencia de *P. expansum* (63,7% de control con *P. membranifaciens* NPCC 1250 y 68,2% con *Cr. victoriae* NPCC 1263). La combinación con *Cr. victoriae* NPCC 1263 controló totalmente a *B. cinerea*; mientras que con *P. membranifaciens* NPCC 1250 controló 87,8% de esta enfermedad. El nivel poblacional alcanzado por *Cr. victoriae* NPCC 1263 fue de $4,5 \times 10^8$ UFC/cm² de fruto, mientras que *P. membranifaciens* NPCC 1250 $7,94 \times 10^7$ UFC/cm² de fruto. El agregado de CaCl_2 no mejoró la capacidad de colonización de las levaduras sobre el fruto.

Sobre Packham's Triumph, en el empaque A, los tratamientos redujeron entre 50 y 100% la incidencia de los dos patógenos con respecto al control, luego de 5 meses de conservación. *Cr. victoriae* NPCC 1263 con CaCl_2 controló totalmente la incidencia de ambos patógenos; mientras que *P. membranifaciens* NPCC 1250 sola o combinada entre 77 y 86%. En B, nuevamente los mejores resultados se obtuvieron de la combinación de *Cr. victoriae* NPCC 1263 con CaCl_2 , que controló a ambos patógenos en un 63%; *P. membranifaciens* NPCC 1250 sola redujo la incidencia de *P. expansum* en un 55,7% y 49% la de *B. cinerea*. El nivel poblacional promedio alcanzado por *Cr. victoriae* NPCC 1263 a los 5 meses de conservación fue de 10^8 UFC/cm² de fruto, mientras que *P. membranifaciens* NPCC 1250 10^7 UFC/cm² de fruto. El agregado de CaCl_2 no mejoró la capacidad de colonización de las levaduras sobre el fruto.

Estos resultados son alentadores, ya que mediante el uso de esta tecnología inocua se reduce significativamente la incidencia de las enfermedades postcosecha de peras, lo cual repercute directamente en los parámetros económicos de la actividad.

Finalmente, los aislamientos *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, forman parte de la patente de invención "**Cepas de levaduras para el biocontrol de frutas postcosecha, composiciones que las contienen, métodos de aplicación de las composiciones y usos**" otorgada por el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial, Administración Nacional de Patentes (INPI. N°: 20120101053).

SUMMARY



The High Valley of Río Negro and Neuquén provinces is the main producer and exporter of pears from Argentina. The most important pear varieties for export are Beurre D'Anjou and Packham's Triumph, which are normally conserved under cold storage (-1/0°C and 95% HR) during 3 and 7 months, respectively. During this time, large losses are produced because the development of blue and gray molds caused by *Penicillium sp.* and *Botrytis cinerea*. Different chemical fungicides have been used during decades in order to control these fungi; however, the development of resistant strains added to the increasing demand for safe food and organic products originate the necessity for sustainable control practices. In this context, biological control with yeast arises as one of the most promising alternatives.

In this Thesis a biocontrol system based on the use of two native yeasts, selected *in situ* for control of the main fungal diseases of postharvest pears was developed. The antagonists yeasts selected were *Pichia membranifaciens* NPCC 1250 and *Cryptococcus victoriae* NPCC 1263 were isolated and selected *in situ* in fruit under cold storage conditions, against local isolates of *P. expansum* and *B. cinerea* selected for their pathogenicity.

The strategy employed for isolation and selection exceeds the proposals made so far in literature. The two yeasts were isolated from washing waters obtained from healthy wounds of fruits, after 6 months of cold storage with natural inoculum pressure. Wash waters containing a mixture of yeast were co-inoculated with *P. expansum* in fruit, incubated in cold for 60 days at 4°C (primary *screening*), and finally yeast cultures were isolated from healthy wounds. Finally, individual yeast cultures were evaluated against both pathogens (secondary *screening*) in fruit under commercial storage conditions.

Eleven yeast species were recovered, with predominance of *Aureobasidium*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* genera. In general, the species identified showed a psychrophilic nature, fundamental feature for their potential use in cold postharvest.

Putative mechanisms involved in the biocontrol capacity were evaluated in five selected isolates. Our results suggest that the ability to produce *killer* toxin against the two postharvest pathogens; the secretion of wall hydrolytic enzymes (chitinase, glucanase and protease) at -1/0°C; the capacity to produce biofilms, to survive and colonize the wounds until 120 days of cold storage and to compete for nutrients (particularly aspartic acid, NH₄NO₃ and glycine) were the most important mechanisms involved in the biocontrol.

The effect of increasing cell numbers, combining both yeast and adding different compounds (glucose, NH₄Mo₇O₂₄ and CaCl₂) was assessed in storage conditions. CaCl₂ (2% w/v) significantly improved yeast antagonism of the two yeasts against *P. expansum*.

Finally, the two selected biocontrol agents were evaluated in their potential pathogenicity (growth at 37°C, production of phospholipase and growth similar conditions in the stomach) with favorable results.

Biomass of the two yeasts was obtained in a stirred tank reactor of 22L using sugar cane molasses (128.2 g/L) and urea (0.6 g/L). Harvesting of the cells was performed in stationary phase between 40-60 h, with yields 2.5x10¹³UFC/mL to *P. membranifaciens* NPCC 1250 and 5.75x10¹²CFU/mL for *Cr. victoriae* NPCC 1263. The yeast cells were kept in sterile distilled water at 4°C for 50 days without significant loss of viability.

At semicommercial scale, the yeasts were sprayed in two packaging lines (A and B) on organic pear Beurrè D'Anjou (at B only) and Packham's Triumph (A and B) and the fruit were stored for 3 and 5 months in cold, respectively. About 400 kg of fruit were sprayed

with 25L of the respective yeast suspension containing 10^{11} CFU/mL alone or in combination with CaCl_2 (2% w/v).

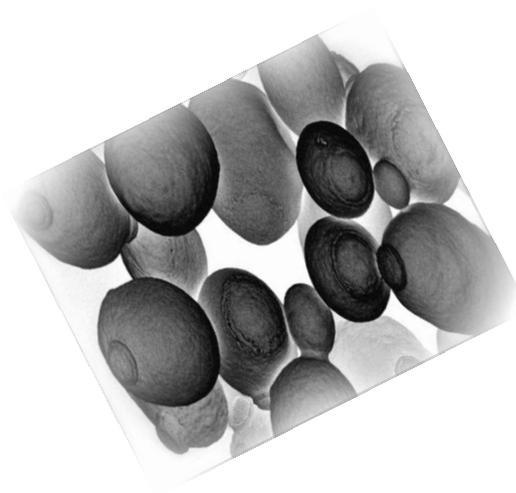
After 3 months of storage, yeasts combined with CaCl_2 significantly reduced the incidence of *P. expansum* on Beurré D'Anjou pears (63.7% of control with *P. membranifaciens* NPCC 1250 and 68.2% *Cr. victoriae* NPCC 1263). *Cr. victoriae* NPCC 1263 with CaCl_2 , fully controlled *B. cinerea* development; while *P. membranifaciens* NPCC 1250 controlled 87.8% of the disease. After 3 months of storage, *Cr. victoriae* NPCC 1263 conserved a population level of 4.5×10^8 UFC/cm² of fruit, while *P. membranifaciens* NPCC 1250 7.94×10^7 UFC/cm² of fruit. Adding CaCl_2 did not significantly influence the population of two yeast in fruits.

The packaging line A after 5 months of storage on Pachkam's Triumph, treatments reduced between 50 and 100% incidence of the two pathogens with respect to control. Combining *Cr. victoriae* NPCC 1263 with CaCl_2 completely controlled the incidence of both pathogens; while *P. membranifaciens* NPCC 1250 alone or combined control between 77 and 86%. At packaging line B, the best results were obtained from the combination of *Cr. victoriae* NPCC 1263 with CaCl_2 again, that controlled both pathogen by 63%; *P. membranifaciens* NPCC 1250 alone reduced the incidence of *P. expansum* by 55.7% and 49% of *B. cinerea*. The end of storage, the population level at *Cr. victoriae* NPCC 1263 was 10^8 CFU/cm² of fruit; while *P. membranifaciens* NPCC 1250 10^7 CFU/cm² of fruit. The addition of CaCl_2 did not improve the ability of yeast colonization on the fruit.

Our results are encouraging, since the use of a safe technology based on yeasts, we could significantly reduce the incidence of postharvest diseases of pears under commercial conditions.

P. membranifaciens NPCC 1250 and *Cr. victoriae* NPCC 1263 isolates, selected in this Thesis are part of the patent "Yeast strains for biocontrol of postharvest fruit, compositions containing, methods of applying the compositions and uses" (National Institute of Industrial Property, National Patent Administration, INPI N° 20120101053).

INTRODUCCIÓN



1. Producción Argentina de Peras

1.1 Cadena productiva de la Pera en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén

Con una producción anual que supera las 700.000 toneladas (tons) de pera, Argentina es el tercer país productor de esta fruta en el hemisferio sur y el primer exportador a nivel mundial al comercializar el 60% de la producción total (Secretaría de Fruticultura, Provincia de Río Negro 2013). La principal zona de producción (aproximadamente el 90% del total producido en el país) se encuentra concentrada en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Anexo I), siendo la provincia de Río Negro la principal provincia productora con un 78% del total nacional (INTA 2013; FunBaPa 2013). El cultivo de pera en esta región presenta ventajas agroecológicas, obteniendo cosechas con altos rendimientos y de alta calidad, lo cual genera que a nivel comercial sea una actividad económicamente competitiva. El rol de Argentina en el mercado internacional, es muy importante por su carácter de comercializador de productos a contraestación al hemisferio norte, compitiendo con países como Chile y Sudáfrica. El continente Europeo representa el principal destino con el 50% del total de las exportaciones (203 mil tons). Se destacan como principales compradores Rusia, con 96 mil tons, Holanda con 43 mil tons y finalmente Italia con 37 mil tons. Las exportaciones al continente americano conforman el 46% del total, siendo los principales destinos Brasil y Estados Unidos (Bevilacqua y Storti, 2011; FunBaPa 2013).

En la cadena productiva de la pera, se distinguen dos etapas: la producción y el proceso industrial. En cuanto a la producción, la superficie cultivada con pera en la región alcanza las 22.000 hectáreas (ha) distribuidas entre las variedades: 45% William's Bon Chrétien, 33% Packham's Triumph y 10% Beurré D' Anjou (Figura 1). En términos de rendimiento promedio por ha, Argentina presenta un buen posicionamiento relativo en el hemisferio sur, ya que se encuentra un 7% por arriba del promedio de la región (Bevilacqua y Storti, 2011). Los principales cultivares producidos y exportados desde el Alto Valle de Río Negro y Neuquén son: Williams Bon Chrétien, Packham's Triumph y Beurré D'Anjou.

La etapa industrial implica el procesamiento de la fruta en fresco, el cual comprende el empaque y la conservación en frío para su posterior consumo (Funbapa, 2010). El 60% de la producción de pera se exporta y el resto se destina al mercado interno tanto para ser procesada (26%, industria de jugos) como para su consumo en fresco (14%) (FunBaPa 2013), estos destinos están fuertemente condicionados por los estándares de calidad alcanzados por la fruta.

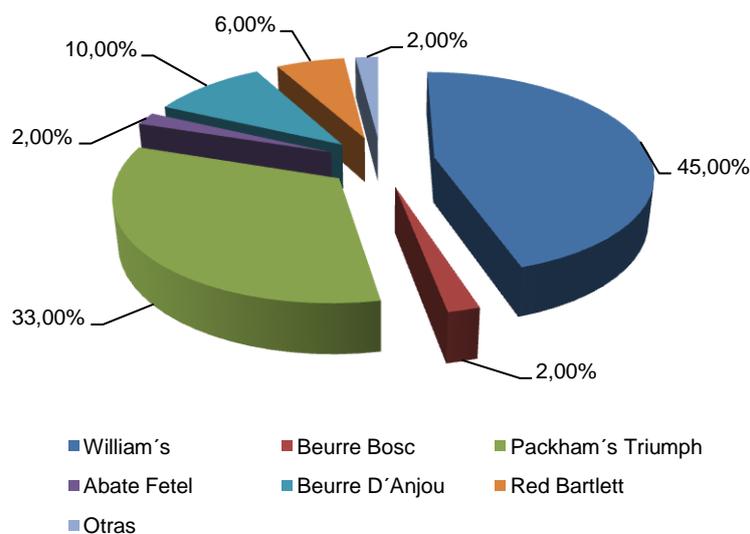


Figura 1. Distribución de la superficie destinada al cultivo por variedad

Informe sectorial Ministerio Agricultura 2010; SeNaSa 2010

El procesamiento de la fruta en fresco para exportación, implica una serie de actividades organizadas, que van desde la clasificación, en base a criterios de calidad (bajo ciertos parámetros de sanidad, tamaño y color), hasta el envasado en distintos tipos de envases según el destino (ultramar, mercado interno, o Brasil).

En esta cadena, la conservación de la fruta a baja temperatura es indispensable, ya que la tecnología del frío es la que permite mantener las cualidades de la fruta que será comercializada a lo largo del año. Las plantas frigoríficas de la región utilizan fundamentalmente dos tipos de tecnologías para la conservación de la fruta: frío convencional y atmósfera controlada.

De acuerdo a las proyecciones regionales de producción para el año 2020, si bien no se prevén cambios significativos en los volúmenes producidos, sí se infieren importantes cambios en la mejora de calidad de la fruta, con lo cual se elevaría la proporción de la fruta destinada a la exportación.

La exportación de estos *comodities* presenta una serie de barreras asociadas a su ingreso a los mercados compradores. Se distinguen las barreras arancelarias y no arancelarias. Con respecto a las primeras, Argentina debe pagar un arancel de 1,2% para exportar peras a la Unión Europea, 7,5% para las ventas hacia Rusia y 8% para México. En el caso de Brasil, que es el principal socio comercial del MERCOSUR, la exportación de peras no paga aranceles. Por otro lado, las barreras no arancelarias, rigen fundamentalmente para la Unión Europea y Brasil; estas constituyen exigencias que están relacionadas al producto en sí, como es el caso de los límites máximos de residuos (LMR) de agroquímicos y contaminantes. En general esta medida es

obligatoria y es exigida en todos los destinos de exportación. Los límites a los residuos se basan en las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y buscan lograr frutas sin efectos tóxicos para la salud humana. En respuesta a estos requerimientos, se ha desarrollado en el mundo la producción orgánica, en la cual no se pueden utilizar productos de síntesis química.

En Argentina la superficie cultivada de peras orgánicas fue de 1.595 ha y en el año 2012 se exportaron 21.352 tons de fruta fresca a la Unión Europea y Estados Unidos (SeNaSa, 2013).

1.2 Procesamiento de la fruta para el consumo en fresco. Empaque y acondicionamiento

1.2.1 Momento oportuno de cosecha

El tratamiento de la fruta durante la cosecha, transporte y empaque es determinante para el mantenimiento de todos los atributos que se obtuvieron en el campo. El objetivo es no transformar un producto de excelentes características para el consumo en fresco, en uno de pobres características destinado al descarte para la industria, con la pérdida económica que ello implica (Campana, 2007).

Desde el punto de vista fisiológico, el modo en que se realiza la cosecha influye directamente sobre los atributos de la fruta, ya que suele ser el origen de numerosos daños que afectan a la calidad de la misma. El momento oportuno de cosecha y el manejo apropiado de la fruta resultan claves para el éxito final del producto. El momento oportuno de cosecha está relacionado con el estado fisiológico de los frutos y con el destino posterior de los mismos. Las peras son frutos climatéricos, lo cual permite que sean cosechados con distintos estados de madurez y continuar su maduración fuera de la planta. Cosechas tempranas y medias, responden a estrategias comerciales de almacenamiento a largo plazo; mientras que las cosechas tardías (frutos maduros en planta) a comercialización inmediata. Así, el momento de cosecha, condiciona a los frutos a la susceptibilidad a enfermedades de origen fisiológico y/o parasitarias (podredumbres).

1.2.2 Acondicionamiento de los frutos en la planta de empaque

Para ser enviada al mercado, ya sea interno o de exportación, la fruta debe ser acondicionada, clasificada y embalada, estas acciones constituyen lo que se denomina proceso de empaque (Figura 2). Todas las operaciones se llevan a cabo en el mismo lugar físico que se denomina planta de empaque o galpón de empaque.

Habitualmente las líneas de empaque para el procesamiento de los frutos de pepita (manzanas y peras) y carozo (cerezas, duraznos) son líneas húmedas, es decir que hay agua involucrada en alguna de las operaciones de empaque. En general están conformadas por los siguientes componentes:

1. Módulo de vaciado
2. Módulo de limpieza
3. Módulo de tratamiento y encerado
4. Túnel de secado
5. Mesa de selección
6. Módulo de selección por tamaño
7. Sistema de empaque.

Las operaciones del procesamiento de la fruta se desarrollan en forma manual, mecánica o electrónica. La fruta pasa a las diferentes secciones de la línea por el movimiento de rodillos o cintas transportadoras que facilitan la elevación, avance y pasaje de la fruta de un sector a otro (Figura 2).

Una vez ingresada a la línea de empaque, la fruta puede ser procesada inmediatamente o bien, en el mismo camión de ingreso en los bins de cosecha, puede ser lavada con agua en *drencher* (estructura que pulveriza en forma de lluvia) y almacenarse hasta que sea procesada. Si la fruta es inmediatamente procesada, ingresa al módulo de vaciado, llamado hidromersor, con el objetivo de reducir la carga de materia orgánica que trae desde el campo. A través de una noria de elevación y un sistema de rodillos y cepillos la fruta se traslada a través de la línea e ingresa al módulo de lavado y enjuague. Luego del lavado, en la línea de empaque se localiza el módulo de aplicación de productos químicos, donde típicamente se pueden llevar a cabo tratamientos antifúngicos químicos, aunque también podrían ser biológicos. El proceso continúa en el túnel de secado, con ventiladores que fuerzan aire a 30-45°C. Una vez que la fruta se seca, sigue la etapa de clasificación que se realiza manualmente sobre mesas destinadas a tal fin. La fruta clasificada ingresa al sector de calibrado o tamañado, constituido por balanzas individuales en forma de platillos, para que toda la fruta de igual tamaño llegue a una misma salida de embalaje. El embalado es llevado a cabo manualmente por operarios, los cuales colocan las frutas en bandejas dentro de cajas de cartón y éstas finalmente llegan al sector de palletizado de cajas, para ser almacenadas o bien para su transporte e inmediata distribución (Figura 2).

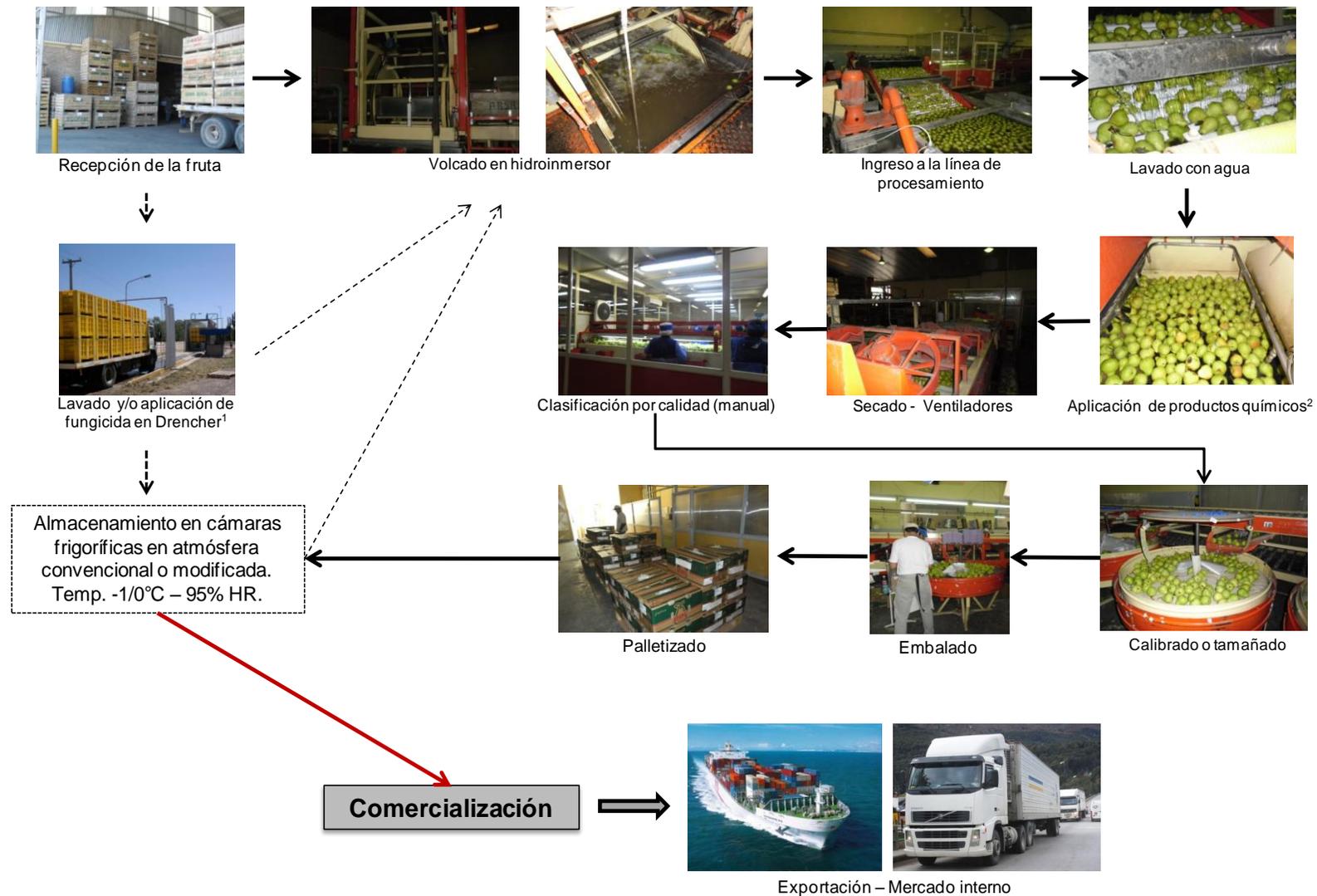


Figura 2. Diagrama del procesamiento en la línea de empaque para frutales de pepita (peras y manzanas). ¹Instalación sencilla que permite la aplicación en forma de lluvia de agua o solución de fungicida sobre la fruta que ingresa desde el campo. ² Sistema constituido por cañerías y toberas de pulverización para aplicación de fungicidas y aplicador de cera.

1.2.3 Sistemas de almacenamiento de fruta

Las peras son frutos climatéricos, es decir que pueden continuar la maduración una vez separados de la planta. Esta característica les permite tener largos períodos de almacenamiento en cámaras frigoríficas, extendiéndose también su período de comercialización. Si bien existen numerosas tecnologías de conservación, las más difundidas en la región son: el manejo del frío, el uso de atmósferas controladas y modificadas, como también la aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP). En general la conservación de la calidad del fruto se basa en la reducción de la tasa respiratoria y la producción de etileno. En otras palabras, se intenta disminuir al mínimo los procesos metabólicos que desencadenan la maduración y senescencia natural del fruto. Si la fruta madura durante el período de conservación, incrementa su susceptibilidad a las enfermedades de origen fisiogénico y al ataque de los organismos parásitos.

1.2.3.1 Manejo del frío

Es la herramienta más efectiva para extender la vida de los frutos durante la postcosecha. Someter a los frutos a baja temperatura disminuye la actividad enzimática, desacelera la respiración y el consumo de sus reservas, retarda la maduración y reduce el déficit de presión de vapor entre el ambiente y el fruto, reduciendo de esta manera la transpiración. La temperatura de conservación varía con el tipo de fruto, siendo para las peras de entre -1 y $0,5^{\circ}\text{C}$ dependiendo del varietal (Tabla 1). Un factor muy importante en la conservación a bajas temperaturas es la humedad relativa (HR) del ambiente, que debe ser elevada ya que retarda la pérdida de agua por parte del fruto (deshidratación) y mejora la vida útil del mismo. Al igual que con la temperatura, la humedad relativa (HR%) recomendada depende de cada variedad de pera, pero en general varía entre 90 y 95%.

1.2.3.2 Uso de atmósferas controladas y modificadas

El frío es una herramienta imprescindible para la conservación de peras y manzanas; sin embargo, si a esto se le adiciona el manejo adecuado de la atmósfera dentro de las mismas cámaras de frío, el tiempo de conservación aumenta considerablemente (Tabla 1).

En las cámaras de **atmósfera controlada (AC)** se modifica intencionalmente la composición de la atmósfera gaseosa normal (21% de O_2 y 0,03% de CO_2), aumentando la cantidad de CO_2 , y disminuyendo la cantidad de O_2 . Esta técnica asociada al frío, mejora el efecto de la refrigeración sobre la actividad metabólica de los frutos, y permite que las temperaturas de conservación sean un poco más

elevadas que las utilizadas en cámara normal reduciendo considerablemente los riesgos por daños por frío (Tabla 1).

Por otro lado, la condición de **atmósfera modificada (AM)** se basa fundamentalmente en empaquetar los frutos en materiales (bolsas) con barrera a la difusión de los gases, en los cuales el ambiente gaseoso ha sido modificado. El envasado en AM es un método que implica la eliminación del aire del interior del envase y su sustitución por un gas o mezcla de gases (CO₂, O₂ y N₂, entre los principales), la mezcla de gases a emplear depende el tipo de producto (Drake *et al.*, 2004). La atmósfera gaseosa cambia continuamente durante todo el período de almacenamiento por la influencia de diferentes factores como la respiración del producto envasado, cambios bioquímicos y la lenta difusión de los gases a través del envase (Parry, 1995). Esta tecnología para los frutos de pepita aún no está muy desarrollada en nuestra región. Existen únicamente algunas experiencias a escala semicomercial desarrolladas por la Estación Experimental INTA Alto Valle (Calvo 2014, comunicación personal).

1.2.3.3 Aplicaciones de 1-MCP

El 1-MCP es una molécula en clasificada como regulador de crecimiento. Actúa como antagonista del etileno, ocupando los sitios de unión de esta hormona en las moléculas receptoras.

El efecto que produce el 1-MCP es el retraso en la maduración de los frutos climatéricos, impide el desarrollo de escaldadura superficial y de desordenes fisiológicos relacionados con la senescencia. En cámaras frigoríficas esta molécula es utilizada combinada con bajas temperaturas para la conservación de muchos tipos de frutos. Los resultados que presenta en la conservación de manzana en particular son exitosos; sin embargo, su uso en pera es muy cuestionado ya que luego de la conservación, los frutos no alcanzan la madurez óptima de consumo (Chiririboga *et al.*, 2008).

Tabla 1. Condiciones para el almacenamiento recomendadas para las principales peras cultivadas en los valles del norte de la Patagonia¹.

Variedad	Condición Atmósfera convencional		Atmósfera controlada			
	Temp. (°C)	Almac. (meses)*	Temp. (°C)	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	Almac. (meses)*
Williams Bon Chrétien	-0,75/-1	3-4	-0,5/-1	2-1,2	1,3-1	5-6
Packham's Triumph	0/-1	6-7	-0,5	2-3	1-2	8-9
Beurré D'Anjou	-0,5/-1	5-7	-0,5	2-1,5	1,5-1	7-8

¹ Tomado de Benitez, 2001.

*El período de almacenamiento es el período máximo durante el cual el producto permanece apto para su comercialización.

2. Principales pérdidas producidas durante la vida postcosecha de la fruta

La acción del frío o su combinación con la generación de atmósferas particulares, no son suficientes para mantener la calidad de la fruta hasta que llega al consumidor. Asimismo, existe una susceptibilidad varietal diferente frente a las distintas afecciones que pueden ocurrir durante el período de almacenaje. Las principales pérdidas de la postcosecha de la pera pueden agruparse de acuerdo a su origen en: fisiogénicas y desordenes físicos (escaldadura de senescencia, escaldadura superficial, *bitter pit*, daños por congelamiento, por altas concentraciones de CO₂ y bajas de O₂) y enfermedades patogénicas de origen fúngico.

A nivel mundial, se considera que las mayores pérdidas en postcosecha se producen por enfermedades ocasionadas por patógenos fúngicos. Las pérdidas por esta causa son en general de 5-25% del total de la producción (Bondoux, 1992; Pimienta *et al.*, 2009); sin embargo, de acuerdo al país estas pérdidas podrían alcanzar hasta el 50% (Droby & Litcher, 2004; Nunes, 2012). Jijakli & Lepoivre (2004) aseguran que ante los elevados porcentajes de pérdidas por patógenos, las enfermedades fisiogénicas y desordenes físicos resultan insignificantes.

De acuerdo a lo informado para nuestro país y nuestra región en particular (Tabla 2), los principales problemas en postcosecha se producen por patógenos de heridas.

2.1 Pérdidas producidas por patógenos de heridas

La capacidad de un patógeno para iniciar una enfermedad después de la cosecha, dependerá de un número de factores que se asocian convenientemente. Estos factores son: 1) la presencia del patógeno virulento, 2) la presencia del hospedante susceptible, y 3) el medio ambiente favorable. La combinación apropiada de estos factores es necesaria para que la enfermedad se produzca y se desarrolle de manera óptima (Sommer, 1982; Tian, 2007). Es así que, comprender los factores intervinientes resulta imprescindible para establecer estrategias de control de las enfermedades.

Todos los agentes patógenos de postcosecha en pera (Tabla 2) se caracterizan por su capacidad de desarrollarse por debajo de los 0°C, tal es el caso de los hongos filamentosos correspondientes a los géneros *Penicillium* y *Botrytis* (Bondoux, 1992). Las heridas o microheridas son la vía más común de entrada para estos hongos. Debido a que las esporas de estos patógenos requieren alta humedad o agua libre para germinar con éxito en pocas horas (Berg & Lentz, 1968) y una gran cantidad de nutrientes, las heridas de la fruta resultan un lugar ideal para que allí prosperen (Droby

et al., 1992). En las heridas las esporas son capaces de germinar, desarrollar las estructuras fúngicas características y colonizar los tejidos de la fruta ocasionando las podredumbres.

Tabla 2. Enfermedades de peras que se producen durante la conservación en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén.¹

Vía ingreso	Enfermedad	Agente causal	Fuente inoculo*	Importancia/ Presencia o Distribución
Heridas	Moho Azul	<i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium spp.</i>	C/E	Importantes pérdidas en conservación/A nivel mundial
	Moho Gris**	<i>Botrytis cinerea</i>	C/E	Importantes pérdidas en conservación/A nivel mundial
Lenticelares	Ojo de pescado	<i>Athelia epiphylla</i>	C	Poco importante/Esporádica en la región/Escasa distribución
Otras	Podredumbres por <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sp.</i>	C/E	Importancia relativa en la región de acuerdo a la temporada y cv./A nivel mundial
	Podredumbres por <i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	C/E	Importancia relativa en la región de acuerdo a la temporada y cv/A nivel mundial
	Podredumbres por <i>Phytophthora</i>	<i>Phytophthora spp.</i>	C	Importancia emergente en la región/Esporádica en el mundo
	Podredumbre por <i>Mucor</i>	<i>Mucor sp.</i>	C/E	Escasa importancia en la región. Importante en Estados Unidos
	Sarna del peral	<i>Venturia pyrina</i>	C	Importancia relativa en la región de acuerdo a condiciones ambientales/A nivel mundial

¹Adaptación de Dobra y Rossini (1995), Dobra et al. (2007) y Sosa M.C. (2014) (Comunicación personal).

* C: campo / E: empaque. ** Suele ingresar por cáliz en algunos cultivares.

La manipulación de la fruta desde el momento de la cosecha hasta su embalaje definitivo, es el período en el cual se producen las heridas (Barkai-Golan, 2001). La principal fuente de inoculo de estos patógenos es el aire o el agua por donde los conidios se diseminan durante cosecha, transporte y manipulación antes y durante el

almacenamiento (Jijakli *et al.*, 1999; Jijakli & Lepoivre, 2004). Las condiciones de almacenamiento, con elevada humedad relativa y temperaturas de entre -1/0,5°C, son favorables para el desarrollo de los patógenos. Por ejemplo, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* pueden producir enfermedad hasta los -2°C, *Cladosporium herbarum* hasta los -5°C y *Alternaria sp.* hasta los -3°C (Jijakli & Lepoivre, 2004; Tian, 2007).

La incidencia de las pérdidas postcosecha en la región es variable de acuerdo a la variedad de pera de la cual se trate y el manejo particular que se le otorgue. En general, las variedades de mediana a la larga conservación (Tabla 1), como Beurré D'Anjou y Packham's Triumph, son las que presentan mayores problemas por enfermedades de origen fúngico.

2.1.1 Podredumbres postcosecha producidas por *Penicillium sp.*

Al menos 11 especies de *Penicillium* se han aislado de frutas de pepita (peras y manzanas) con síntomas de moho azul, siendo la más frecuente y habitual *Penicillium expansum* Link ex Thom (Bondoux, 1992; Sanderson & Spotts, 1995; Janisiewicz, 1999; Giraud & Fauré, 2000). Sin embargo, *Penicillium verrucosum* (Penrose *et al.*, 1984) y *Penicillium solitum* (Holmes, 1990) fueron reportados como los mayores responsables de las pérdidas por podredumbres postcosecha en manzanas en Australia. Para el alto valle de Río Negro y Neuquén, Dobra *et al.* (1995) observan como principal agente causal del moho azul en manzanas a *P. expansum*, aunque también obtienen aislamientos de *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium echinulatum* y *Penicillium wacksmanii* de fruta con los mismos síntomas. Contrariamente, no existen reportes regionales acerca de cuáles son las especies de *Penicillium* que afectan a las peras en conservación frigorífica.

Penicillium es un patógeno que inicia las infecciones a través de heridas como cortes o pinchazos, o bien a través de las lenticelas intactas del fruto cuando estos presentan estados avanzados de madurez, y en algunas oportunidades afecta también al pedúnculo (Figuras 3A y 3B). Los síntomas típicos de moho azul son lesiones circulares con los márgenes agudos, de consistencia blanda acuosa (Bondoux, 1992).

Penicillium puede ser aislado de los suelos en el huerto, pero la enfermedad (moho azul) es poco frecuente en el campo. La principal fuente de inóculo en la postcosecha son los conidios provenientes de fruta enferma, de los contenedores de cosecha (bines), o del ambiente de procesamiento y conservación (Jijakli & Lepoivre, 2004).

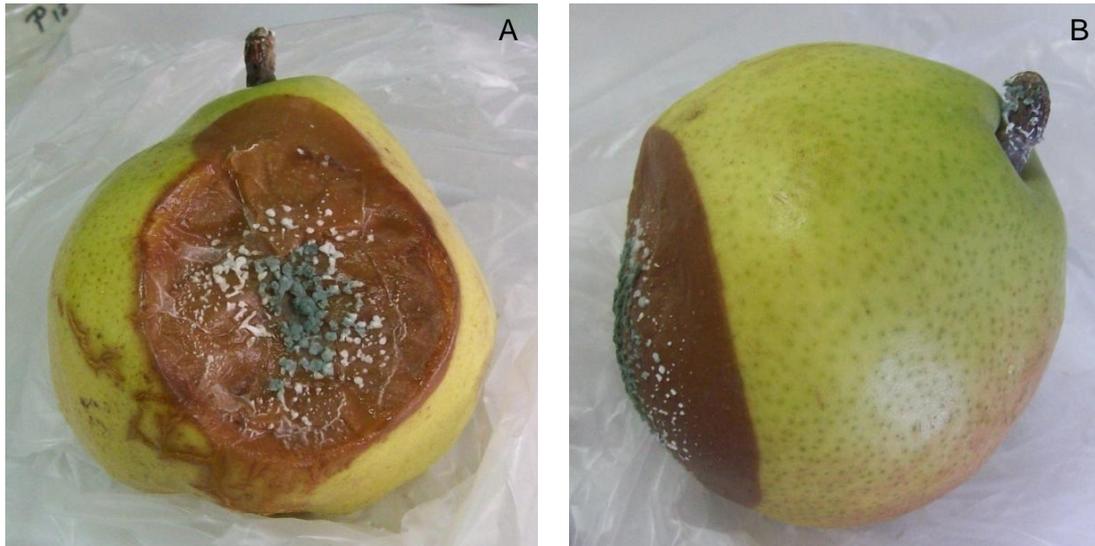


Figura 3. Frutos de pera Pachkam's Triumph (A) y Beurré D'Anjou (B) afectados por *P. expansum* en la zona ecuatorial en (A) y en zona calicinal y peduncular en (B).

2.1.2 Podredumbres postcosecha producidas por *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

B. cinerea es un parásito necrótrofo, que produce la muerte de la célula del hospedante provocando una podredumbre progresiva del tejido vegetal infectado. Es un hongo de crecimiento rápido que puede crecer a expensas de una gran variedad de sustratos; sobrevive como micelio en restos vegetales en descomposición y también en forma de esclerocio (Staats *et al.*, 2005). Este patógeno se encuentra mundialmente distribuido y causa una de las principales enfermedades de conservación de peras. La enfermedad causada por este hongo es conocida vulgarmente como pudrición gris o moho gris, y se caracteriza por dañar el fruto produciendo un ablandamiento que, cuando es muy severo, se cubre completamente con un micelio gris (Jones & Aldwinckle, 1990) (Figura 4A). Su desarrollo se ve favorecido con alta humedad y bajas temperaturas. En la oscuridad en presencia de una atmosfera muy húmeda se forma sobre la superficie de los frutos un abundante micelio blanco grisáceo que puede contaminar a los frutos vecinos. Este fenómeno se denomina vulgarmente nido de podredumbre (Figura 4B). En ciertas oportunidades, se suelen observar sobre la podredumbre, cuerpos negros, redondeados, duros, los que corresponden a las estructuras de resistencia del hongo denominadas esclerocios (Figura 5).

Si bien es un típico patógeno de heridas, esta demostrado que *Botrytis* puede generar infecciones en el campo desde el momento de floración (Droby & Litcher, 2007).

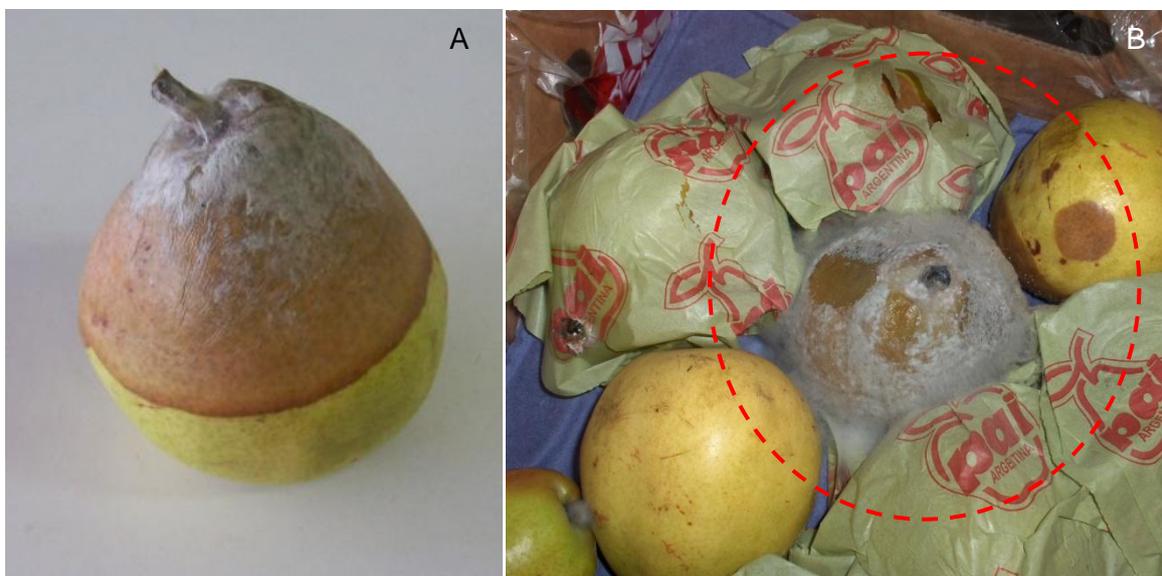


Figura 4. Peras Beurré D'Anjou afectadas por *B. cinerea*, con síntomas y signos de podredumbre iniciada en zona peduncular (A) y detalle de formación de nidos en cajas almacenadas (B)

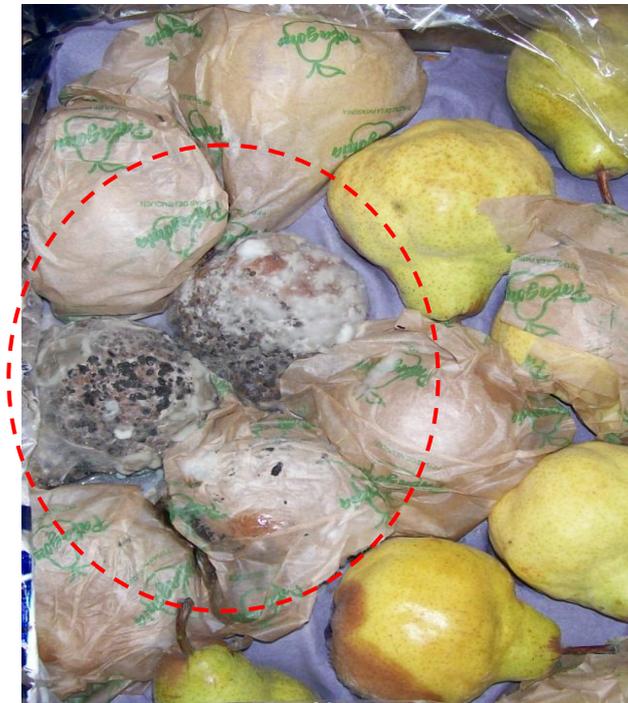


Figura 5. Nido de *B. cinerea* en peras Packham's Triumph en conservación frigorífica. Peras con presencia de micelio y esclerocios sobre la fruta envuelta en papel.

3. Condiciones que favorecen la infección y el desarrollo de las enfermedades

De acuerdo a los factores intervinientes en el desarrollo de la enfermedad, la presencia de inóculo virulento de un patógeno, las condiciones ambientales y la resistencia del fruto son las que determinan el progreso de la misma.

3.1 Condiciones ambientales. Los principales factores ambientales que predisponen el inicio y desarrollo de las enfermedades postcosecha son la temperatura, la humedad y la composición del aire (especialmente las concentraciones de O₂ y CO₂).

- **Temperatura.** Las bajas temperaturas no sólo reducen la tasa de crecimiento de los patógenos y el tamaño de las lesiones, sino que además retrasan la senescencia y mantienen la resistencia de los frutos (Tian & Bertolini, 1999). En estas condiciones; los cambios fisiológicos y bioquímicos de la fruta son más lentos y ello es lo que permite que sean más resistentes al ataque por patógenos.

- **Humedad.** La germinación de conidios de algunos hongos, y la penetración directa a la fruta es favorecida por una atmósfera saturada o la presencia de agua libre sobre la superficie (Hollier & King, 1985). La elevada humedad puede promover el desarrollo de enfermedades si las temperaturas son favorables (Parker & Sutton, 1993). Para las frutas frescas, valores de 90-95% de HR son necesarios para minimizar la deshidratación, evitando que los tejidos se arruguen y pierdan turgencia (Kader, 1985).

- **Atmósfera del fruto.** La atmósfera con baja concentración de O₂ y alta de CO₂ puede tener un efecto directo o indirecto sobre las enfermedades de postcosecha de las frutas (Tian *et al.*, 2001). Sitton & Patterson (1992) sostienen que incrementar el CO₂ por encima de 5% y reducir el O₂ alrededor de 5%, reduce apreciablemente la respiración de la fruta, mantenimiento la calidad y la resistencia de los tejidos.

3.2 Resistencia del fruto al ataque del patógeno. La fruta puede resistir el ataque de hongos de varias maneras. La piel de la fruta, la cutícula y la epidermis proporcionan protección contra la infección por patógenos. La mayoría de los hongos suele infectar a la fruta a través de las heridas, pero algunos son capaces de ingresar directamente en el fruto por degradación enzimática de los compuestos de pared de acuerdo a las condiciones ambientales y el nivel de patogenicidad del parásito (Sommer, 1985a). Entre los principales factores que hacen a la resistencia de los frutos se encuentran:

- Mecanismos de defensa. La resistencia de la fruta al ataque por patógenos está determinada por estructuras preformadas de los tejidos que se denominan barreras (Agrios, 2005). Las barreras preformadas del tipo estructural están relacionadas con la composición propia de la epidermis del fruto, presencia de tricomas, cutina, etc. Las barreras químicas preformadas las conforman compuestos tóxicos como glucósidos, proteínas, enzimas, fitoalexinas, que afectan directamente al patógeno.

- Estado de madurez. La fruta cosechada en el momento oportuno (madurez fisiológica) es apta para una larga conservación, ya que presenta un alto grado de resistencia al ataque por microorganismos. En contraposición, los frutos maduros son más susceptibles a la invasión, ya que tienen un alto contenido en humedad y los nutrientes se encuentran más disponibles para los patógenos. Asimismo, la fruta es más susceptible a herirse cuando alcanza plena madurez, y por lo tanto, se torna más vulnerable a ser colonizada por patógenos (Creemers, 1998). De acuerdo a Sommer (1985b) patógenos como *B. cinerea*, *Rhizopus spp.* o *Penicillium spp.* tienen más probabilidades de invadir el fruto después que está completamente maduro o se ha convertido en senescente.

- Cicatrización de heridas. La habilidad de cicatrización de las heridas juega un rol importante en la resistencia frente a los patógenos y parece estar asociada a la producción de etileno (Sommer, 1989). En general, la cicatrización de los tejidos se produce durante la división y extensión celular. Las heridas cicatrizadas son menos propensas a la invasión de hongos (Tian, 2007). Durante la postcosecha de los frutos, no se produce el proceso de cicatrización, sin embargo se desencadenan procesos de síntesis de lignina y calosa, los cuales impiden que ingresen los patógenos (Jijakli & Lepoivre, 2004).

4. Estrategias de manejo de las principales enfermedades postcosecha

Los patógenos *P. expansum* y *B. cinerea* son considerados como la mayor problemática en los valles productores de pera de la Argentina; por lo tanto, la mayoría de las prácticas de manejo se concentran en el control de estos dos patógenos. Estas prácticas son de carácter preventivo y pueden clasificarse de la siguiente manera:

1. **A campo:** Manejo nutricional balanceado del monte. Prácticas de fertilización equilibradas, estimularían el desarrollo de la resistencia natural de los frutos a las enfermedades.

2. En cosecha:

- i. Momento de cosecha en madurez fisiológica;
- ii. Cuidados para evitar golpes y heridas en los frutos;
- iii. Uso de canastas de cosecha y bines limpios y desinfectados.

3. En planta de empaque:

- i. Manipulación cuidadosa evitando golpes y heridas.
- ii. Higiene adecuada de instalaciones.
- iii. Protección de la fruta con fungicidas u otros tratamientos.
- iv. Almacenamiento a bajas temperaturas, con altos porcentajes de HR y distintos tipos de atmósferas (ítems 1.2.3).

Las pérdidas en postcosecha por patógenos de heridas se deberían reducir minimizando las lesiones mecánicas del fruto, utilizando adecuadamente los procedimientos de saneamiento y el mantenimiento de la resistencia natural de fruta para retrasar la senescencia (Shweleft, 1986). Sin embargo, aun cuando se trata de cumplir con estas pautas, las mismas no resultan suficientes. Debido a ello lo más habitual es añadir productos químicos que aseguren la protección de la fruta.

4.1 Aplicación de fungicidas de síntesis química

Las medidas de control basadas en la aplicación de fungicidas durante la postcosecha son de carácter preventivo, y su objetivo es el de proteger la fruta de la acción de los patógenos. Consiste en la aplicación de algún principio activo que asegure la protección de la fruta durante el período total de almacenamiento. Hasta la temporada 2012-2013, una práctica habitual era la combinación de fungicidas con productos antiescaldantes, para evitar también problemas de índole fisiogénico de la fruta (Sanderson, 2000; Biggs & Rosenberger, 2001). Sin embargo, para peras y manzanas con destinado a la Unión Europea, el uso de estos últimos ya no se encuentra autorizado (Resolución CE 91/414; Resolución 1107/2009; Documento SANCO 11415/2013).

Uno de los principales limitantes del uso de fungicidas es el destino comercial de la fruta. De acuerdo al mercado comprador, un determinado número de principios activos se encuentran autorizados con un límite máximo de residuos (LMR) presentes en fruta. En la Tabla 3, se muestran los principios activos permitidos para ser utilizados para postcosecha con los LMR para cada destino para la temporada 2013 - 2014.

Tabla 3. Límites Máximos de Residuos para peras en ppm.¹

Fungicida Grupo químico	Principio Activo	Límites máximos residuos		
		Argentina	USA	UE
Aminopirimida	Pirimetanil	5,00	14,00	5,00
Benzimidazoles	Carbendazin	1,00	NR	0,20
	Metil tiofanato	1,00	3,00	0,50
	Tiabendazol (TBZ)	3,00	5,00	5,00
Dithiocarbamatos	Iprodione	5,00	RST	5,00
Fenilpirroles	Fludioxonil	5,00	5,00	5,00
Ftalimida	Captan	15,00	25,00	3,00
Imidazoles	Imazalil	2,00	RST	2,00

¹ Adaptada de Colodner *et al.* (2013).

NR: no registrado, aplica tolerancia cero. **RST:** registrado pero sin tolerancia para peras y manzanas.

El control de *P. expansum* y *B. cinerea*, se ha basado en el uso de fungicidas del grupo de los benzimidazoles desde la década del 70, fundamentalmente los tiabendazoles TBZ (Eckert & Ogawa, 1988). Sin embargo, su uso continuado ha generado una fuerte presión de selección que ha permitido el surgimiento de cepas resistentes de ambos patógenos en la mayoría de las regiones en que se utilizan (Rosenberger, 1991; Viñas *et al.*, 1991; Dobra & Rossini, 1993; Sanderson, 2000; Biggs & Rosenberger, 2001; Baraldi *et al.*, 2003; Robiglio *et al.*, 2010). La resistencia que adquieren los patógenos a este grupo de fungicidas es del tipo persistente, es decir que existen cepas que mantienen la resistencia después de años de no aplicarse ningún principio activo perteneciente al grupo (Jijakli & Lepoivre, 2004). En la mayoría de los casos, la resistencia a este grupo ha sido asociada con mutaciones en el gen de la β tubulina, en el que se encuentran alteradas las secuencias de aminoácidos en el sitio blanco del fungicida (Davidse, 1986).

Otro de los fungicidas históricamente utilizado en la región Norpatagónica es el captan, perteneciente al grupo de las Ftalimidias. Este fungicida ejerce su acción inhibiendo la germinación de las esporas y es ineficaz para la protección de las heridas de frutas. El uso de captan se recomienda en combinación con otros principios activos capaces de proteger la fruta, estrategia que también se utiliza para evitar el desarrollo de resistencia (Rosenberger, 2009). No obstante, debido a que este es un fungicida multisitio, presenta de por sí un bajo riesgo de desarrollo de resistencia (FRAC 2013).

En general, la tendencia actual es a la reducción del uso de sustancias de síntesis química en los productos alimentarios. Las principales razones se centran en el desarrollo de cepas de patógenos resistentes (Brent & Hollomon, 2007), en las exigencias de los consumidores por productos más saludables y sin riesgos para el medio ambiente, y en la prohibición definitiva de muchos de los principios activos en los mercados compradores (Adaskaveg & Förster, 2010). De hecho, ya desde hace un tiempo, las políticas gubernamentales de varios países restringen fuertemente su uso o están reevaluando el registro de uso de moléculas ampliamente utilizadas.

4.2. Aplicaciones de cloruro de calcio

Muchos de los empaques regionales utilizan el CaCl_2 en aplicaciones precosecha y postcosecha (en hidromersor), como complemento para reducir la incidencia de las podredumbres y la enfermedad fisiogénica *bitter pit*. El CaCl_2 es también utilizado como sal de flotación en el procesamiento postcosecha de la pera.

Resultados observados por varios autores, indican que la aplicación postcosecha de esta sustancia tiene efectos positivos sobre la calidad del fruto (Conway *et al.*, 1992; Lester, 1996; Martinis Romero *et al.*, 1999; Irfan *et al.*, 2013; Salem & Moussa, 2014). El agregado de calcio produce un retraso en la maduración y en la senescencia, ya que participa en la reducción de los desordenes fisiogénicos y de desintegración de los tejidos de los frutos (Conway, 1989; Fallahi *et al.*, 1997). El calcio desempeña un papel regulador en varios procesos que influyen en la función celular, incluyendo la transducción de señales de la fruta (Marne & Dieter, 1983; Poovaiah, 1988). La participación del calcio en la generación de la resistencia del fruto a los patógenos es considerada indirecta, ya que su agregado modifica la composición de la pared celular, produciendo una reducción en la tasa de ablandamiento natural de los frutos y manteniendo la firmeza de los tejidos, haciéndola por lo tanto menos accesible a las enzimas líticas producidas por patógenos (Conway *et al.*, 1988).

5. Exigencias de calidad y sanidad de la fruta

El cambio de escala de los mercados a nivel mundial, el crecimiento del consumo y el surgimiento de consumidores cada vez más preocupados por la calidad de los alimentos, ha generado que en las últimas décadas aumenten las exigencias fitosanitarias y de inocuidad para la producción frutícola, en un contexto caracterizado por la constante aparición de nuevas normas para la comercialización de fruta fresca (Jamalizadeh *et al.*, 2008).

El rumbo que hoy marca el mercado global, obliga a producir alimentos “seguros” para los consumidores, trabajadores y para el medio ambiente. Es de esperar que estas normas permitan unificar y armonizar las normas sobre inocuidad, calidad, medio ambiente y aspectos socio-laborales actuales.

En este contexto, las prácticas de manejo integrado de plagas (MIP) y de producción orgánica se están desarrollando e incrementando cada vez más a nivel mundial en la producción de alimentos. Esta situación causó un aumento en la demanda de métodos alternativos para el control de enfermedades postcosecha, acordes al tipo de producción buscada (Jijakli & Lepoivre, 2004). El control biológico (CB) surge como una de las más promisorias dentro de las alternativas planteadas, ya que desarrolla estrategias de manejo de los cultivos con el menor impacto ambiental (Spadaro & Gullino, 2004).

5.1 Manejo integrado de plagas (MIP) y producción orgánica

El enfoque del MIP en el desarrollo sostenible de un sistema de producción fue descrito por Boller *et al.* (1999). Uno de los pilares fundamentales en este sistema es la utilización de medidas fitosanitarias profilácticas preventivas antes que utilizar medidas de control directo. La decisión de la aplicación de medidas de control directas debe basarse en umbrales económicos y evaluaciones de riesgo. En el MIP se da prioridad a los métodos naturales, culturales, biológicos, genéticos y biotecnológicos para el control de las enfermedades y el uso de agroquímicos debe ser minimizado atendiendo a su eficacia, selectividad y la seguridad del medio ambiente (Cross, 2002). Mundialmente la superficie de frutas bajo MIP se ha incrementado considerablemente. Hasta el momento el MIP fue desarrollado con éxito en la protección contra insectos plagas de cultivos y hongos patógenos antes de la cosecha (ejemplo: sarna del manzano, oídio) (Vilajeliu *et al.*, 1994; Prokopy, 2003; Simon *et al.*, 2010). Sin embargo, para los patógenos postcosecha, aun son necesarios métodos efectivos acordes a la normativa que implica este tipo de práctica (Jijakli & Lepoivre, 2004).

La producción orgánica, a diferencia del MIP, implica el manejo preventivo de las plagas y enfermedades sin la utilización de ningún producto o subproducto de síntesis química. De acuerdo a la legislación Argentina, se define como producto orgánico al proveniente de un sistema de producción sustentable en el tiempo, que implica manejo racional de los recursos naturales sin la utilización de productos de síntesis química, brindando alimentos sanos, abundantes y manteniendo o incrementando la fertilidad del suelo, la diversidad biológica y permitiendo asimismo la identificación clara por

parte de los consumidores de las características señaladas a través de un sistema de certificación que las garantice (IASCAV - Res.423/92).

6. Control biológico postcosecha

Desde finales de la década de los 80, el control biológico (CB) utilizando microorganismos ha surgido como una estrategia efectiva para el control de las principales enfermedades de postcosecha de la fruta (Wilson & Wisniewski 1989; Korsten *et al.*, 1994). Esta estrategia cobra vital importancia por constituir una alternativa compatible con las producciones bajo MIP o producción orgánica (Cook *et al.*, 1999; El-Ghaouth *et al.*, 2003).

Existen varias definiciones de CB, una de las primeras es la que plantean Baker & Cook (1974), que lo definen 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”. Por su parte, Nigam & Mukerji (1988) puntualizan que “es la manipulación directa o indirecta por parte del hombre, de los agentes vivos que, de forma natural, tienen capacidad de control. Esta manipulación provoca un incremento de su capacidad de inhibición de las enfermedades”. En esta definición, los autores indican que la relación biológica entre los agentes de control biológico (ACB) y los patógenos es bastante específica, de tal forma que se debe buscar un método de control para cada enfermedad.

El ambiente de postcosecha presenta numerosas ventajas para desarrollar un sistema de control biológico utilizando microorganismos, ya que las heridas producidas durante la cosecha y el transporte pueden ser protegidas de los patógenos aplicando al ACB directamente al sitio de infección, haciendo uso de las instalaciones y condiciones existentes en planta de empaque (Wilson & Wisniewski, 1989; Chalutz & Droby, 1997; Jijakli *et al.*, 1999; Wisniewski *et al.*, 2001; Janisiewicz & Korsten, 2002; Jamalizadeh *et al.*, 2011). Asimismo, el ambiente del almacenamiento, al ser controlado por el hombre, mantiene sus parámetros conocidos y constantes, lo que permite seleccionar ACB que sean aptos para crecer y actuar en este ambiente invariable (Wilson & Wisniewski, 1989).

Los microorganismos antagonistas más comúnmente usados (algunas levaduras y bacterias) están presentes de forma natural en las superficies de las frutas, por lo que este sustrato es la principal fuente de potenciales antagonistas para el control de los patógenos postcosecha (Wilson & Wisniewski, 1993).

La mayoría de los estudios sobre potenciales ACB están centrados en las levaduras (Droby *et al.*, 2009; Pimenta *et al.*, 2009; Jijakli & Lepoivre, 2004; Schisler *et al.*, 2011) ya que muchas de ellas son consideradas organismos seguros (GRAS, siglas en inglés Generally Recognized As Safe).

Las características que debe reunir un ACB se resumen a continuación (Wilson & Wisniewski, 1989; Jijakli *et al.*, 1999; Droby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013a):

- Ser eficaz en bajas concentraciones
- Ser capaz de sobrevivir en el medio ambiente adverso en cuanto a nutrientes y condiciones ambientales del almacenaje: bajas temperaturas y atmósferas controladas o modificadas
- Ser capaz de multiplicarse en sustratos de bajo costo y lograr formularse con una vida útil prolonga y de fácil aplicación
- Ser compatible con las prácticas del procesamiento comercial
- Ser genéticamente estable
- No crecer a 37°C y no estar asociado con infecciones en humanos
- No ser patógeno para el consumidor, ni el hospedante
- No producir metabolitos que tengan efectos nocivos sobre la salud humana
- Ser eficaz frente a un amplio espectro de productos y agentes patógenos, en diferentes condiciones, y
- Ser resistente a los agentes químicos utilizados en el ambiente de postcosecha.

Como ACB para el control de *P. expansum* y *B. cinerea* en peras y manzanas se han evaluado numerosas levaduras provenientes de distintos orígenes y obtenidas mediante diferentes métodos de aislamiento y selección (Tabla 4). Ejemplos de algunas de ellas son: el hongo similar a levaduras o *yeast-like Aureobasidium pullulans* (Vero *et al.*, 2009; Robiglio *et al.*, 2011), *Candida sake* (Viñas *et al.*, 1998), *Candida saitoana* (Wilson *et al.*, 1993; El-Ghaouth *et al.*, 1998), *Cryptococcus albidus* (Fan & Tian, 2001; Robiglio *et al.*, 2011), *Cryptococcus laurentii* (Chand-Goyal & Spotts, 1996; Zhang *et al.*, 2007), *Leucosporidium scottii* (Vero *et al.*, 2011), *Metschnikowia andauensis* (Manso & Nunes, 2011), *Metschnikowia pulcherrima* (Piano *et al.*, 2007), *Pichia membranifaciens* (Tian *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008), *Rhodotorula aurantiaca* (Chand-Goyal & Spotts, 1996), *Rhodotorula glutinis* (Chand-Goyal & Spotts, 1996; Zhang *et al.*, 2008), *Rhodospiridium paludigenum* (Wan *et al.*, 2011) y *Sporidiobolus*

metaroseus (Janisiewicz *et al.*, 1994). Las levaduras antagonistas mencionadas representan algunos ejemplos de las existentes y reportadas como ACB; sin embargo, a nivel comercial para uso en la postcosecha de pomáceas, solo unas pocas están disponibles y dependiendo del país está permitido o no su utilización (Droby *et al.*, 2009; Nunes, 2012). Los formulados comerciales en base a levaduras, disponibles actualmente son:

- 1 . Aspire. *Candida oleophila* (Ecogen Inc., Langhorne, EE.UU)
- 2 . Yield Plus. *Cryptococcus albidus* (Lallemand, Montreal, Canadá)
- 3 . ShemerTM. *Metschnikowia fructicola* (Bayer CropScience)
- 4 . Candifruit. *Candida sake* (Sipcam - Inaagri, SA Valencia, España)
- 5 . Nexy. *Candida oleophila* (Lesaffre - Bionext, Francia)

Una de las razones del número reducido de antagonistas comercializado se debe a que sólo Estados Unidos dispone de normativas específicas y simplificadas para el registro de este tipo de productos biológicos. En otros países, como los que integran la Unión Europea, el registro se ve obstaculizado por la exigencia de estudios toxicológicos largos y costosos equiparables a los exigidos para cualquier pesticida de síntesis química (Pássaro Carvalho *et al.*, 2012). En Argentina, no se han desarrollado ACB para el control de las podredumbres postcosecha y ninguno de los productos comerciales disponibles en el extranjero están registrados en el país, lo cual condiciona los manejos postcosecha de los sistemas bajo MIP o producción orgánica. El desarrollo de un ACB para el control de las enfermedades postcosecha es un proceso largo y costoso, que implica un proceso investigación y desarrollo tecnológico de gran envergadura (Figura 6). Dos fases o etapas son fácilmente distinguibles en el proceso: la de descubrimiento y la de desarrollo comercial. La fase de descubrimiento incluye desde el aislamiento hasta las pruebas de eficacia a escala laboratorio, semicomercial e incluso escala comercial en la planta de empaque, a fin de evaluar su comportamiento frente a diferentes patógenos y su compatibilidad con las prácticas habituales de la postcosecha (Nunes, 2012). También se añade a esta fase, el estudio de los posibles mecanismos de acción de los ACB, requerimientos nutricionales y posibles estrategias de mejora de su actividad antagónica. La segunda fase, es la de desarrollo comercial, que incluye las etapas de producción de biomasa, desarrollo de un producto formulado, los estudios sobre la seguridad biológica del microorganismo y finalmente el registro (Nunes, 2012).

Tabla 4. Yeast-like y levaduras antagonistas aisladas y seleccionadas por distintas estrategias para el control biológico de las enfermedades de postcosecha de peras y manzanas.

Especie de yeast-like/levaduras	Estrategia de Selección				Bioensayos		Referencia
	Medio	Origen	Temp. (°C)	Selección aislamiento	Hospedante	Temp. (°C)	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	AJM	Superficie de manzana almacenada	5°	-	Manzana	1°	Vero <i>et al.</i> , 2009
	GPY	Superficie de pera almacenada	26°	<i>In vitro</i>	Pera	-1 - 0°	Robiglio <i>et al.</i> 2011
<i>Candida ciferrii</i>	-	Superficie de manzana	-	-	Manzana	4 - 25°	Vero <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida saitoana</i>	-	Superficie de naranja			Manzana	24°	El-Ghauoth <i>et al.</i> , 1998
<i>Candida sake</i>	NYDA	Superficie de manzana	20°	<i>In situ</i>	Manzana	1°	Viñas <i>et al.</i> 1998
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	Superficie de manzana	-	-	Manzana	4 - 25°	Vero <i>et al.</i> , 2002
	NYDA	Superficie de manzana	4 - 20°	<i>In situ</i>	Manzana	4 - 20°	Lima <i>et al.</i> , 1998
	NYDA	Superficie de peras	28°C		Pera		Zhang <i>et al</i> 2007
	-	Superficie de peras	-	-	Manzana	-1- 20°	Chand Goyal & Spotts 1996
<i>Cryptococcus albidus</i>	GPY	Superficie de pera	26°	<i>In vitro</i>	Pera	-1 - 0°	Robiglio <i>et al.</i> 2011
	NYDA	Superficie de durazno	24°	<i>In vitro - In situ</i>	Manzana	1 - 23°	Fan & Tian, 2001
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	-	Superficie de peras	-	-	Manzana	-1 - 20°	Chand- Goyal & Spotts 1996
	TSA – APD	Superficie de limón almacenado	8 - 10°	<i>In situ</i>	Manzana	0°	Vero <i>et al.</i> , 2011
<i>Leucosporidium scottii</i>	TSA - APD	Superficie de limón almacenado	8 - 10°	<i>In situ</i>	Manzana	0°	Vero <i>et al.</i> , 2011
	AJM	Suelo de la Antártida	9°	<i>In situ</i>	Manzana	1°	Vero <i>et al.</i> , 2013
<i>Metschnikowia andauensis</i>	NYDA	Superficie de manzana almacenada	25°	<i>In vitro - In situ</i>	Manzana	1°	Manso & Nunes, 2011

Tabla 4. Continuación

Especie de <i>yeast-like</i> /levaduras	Estrategia de Selección				Bioensayos		Referencia
	Medio	Origen	Temp. (°C)	Selección aislamiento	Hospedante	Temp. (°C)	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	Superficie de manzana	-	-	Manzana	4 - 22°	Piano <i>et al.</i> , 1997
		Carpóforo de manzana			Manzana	1°	Saravanakumar <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	-	Marina	-	-	Manzana	23°	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	Superficie de frutilla sin tratamientos	-	-	Pera	4 - 20°	Zhang <i>et al.</i> , (2008)
	-	Superficie de peras	-	-	Manzana	-1 - 20°	Chand- Goyal & Spotts 1996
	-	Superficie de olivo	4 - 20°C	<i>In situ</i>	Manzana	20°	Lima <i>et al.</i> , 1998
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	NYDA	Superficie de pera	-	<i>In vitro - In situ</i>	Pera	1°	Janisiewicz <i>et al.</i> , 1994

AJM: Agar jugo de manzana. APD: Agar papa dextrosa. GPY: Siglas en inglés de glucose, peptone, yeast extract. NYDA: Siglas en inglés de nutrient broth, yeast extract, glucose & agar. TSA: Siglas en inglés de Tryptic soy agar.

En el aislamiento y selección de un ACB es fundamental considerar los factores que intervienen en el progreso de la enfermedad, es decir tipo de agente patógeno, hospedante, epidemiología de la enfermedad, estado fisiológico del hospedante y condiciones ambientales en las cuales se produce. El conocimiento de estos factores trazará la dirección de las estrategias a seguir para seleccionar el antagonista adecuado y así controlar con éxito un determinado patógeno. En general, los sistemas de biocontrol en postcosecha son complejos y están influenciados por diversos parámetros relacionados con la fruta, el ambiente, el ACB y el manejo general del proceso.

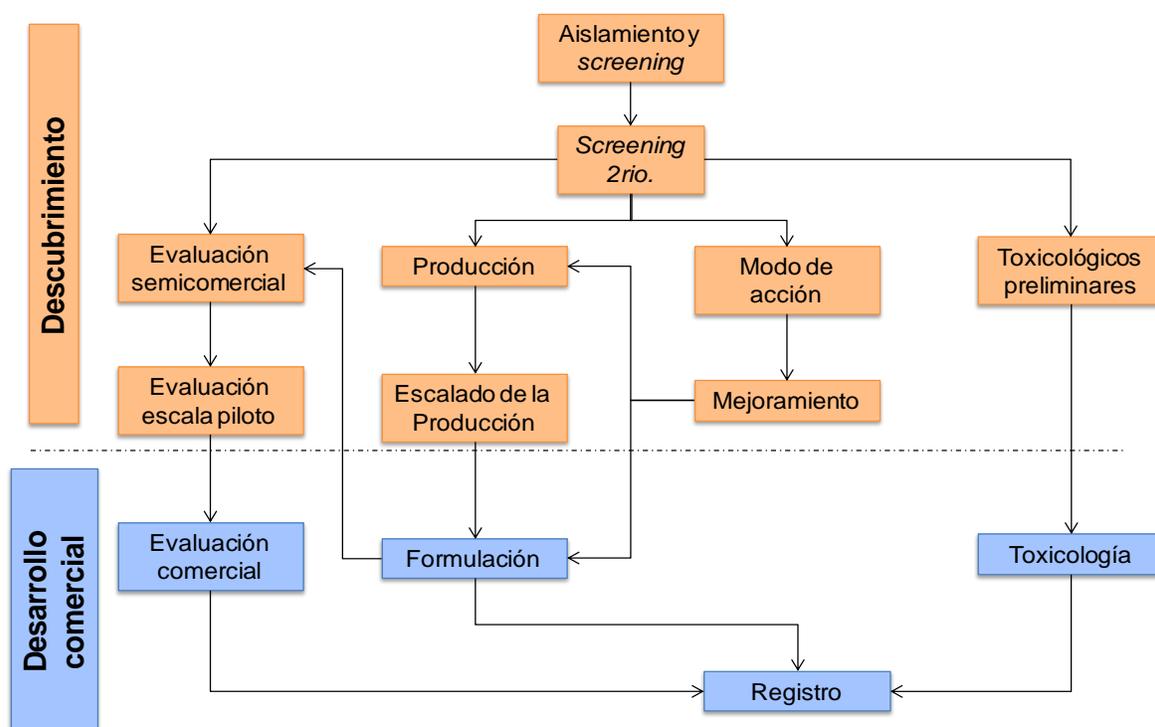


Figura 6. Diagrama de flujo de las etapas que implican el desarrollo de un ACB postcosecha (Nunes, 2012).

6.1 Estrategias de aislamiento y selección de ACB

El primer paso en la búsqueda de un ACB es el aislamiento y *screening* de los microorganismos. Este paso es crítico ya que condiciona completamente la eficacia de los ACB que se seleccionarán (Droby *et al.*, 2009; Abano *et al.*, 2012; Nunes, 2012). Esta etapa tiene un impacto directo sobre las especies aisladas y por consiguiente, sobre el modo de acción de los antagonistas. Debido a que en general todas las estrategias de

aislamiento desarrolladas son muy similares, solo un rango estrecho de géneros de levaduras (*Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* y *Rhodotorula*) son aislados y luego seleccionados como biocontroladores (Droby *et al.*, 2009; Teixidó *et al.*, 2011).

Una estrategia típica de aislamiento y selección en busca de un ACB para postcosecha, se compone de los siguientes pasos:

1. Aislamiento de potenciales ACB desde el agua de lavado de frutas recolectadas en el huerto en un medio de cultivo general a temperatura ambiente
2. Detección *in vitro* de potenciales candidatos para la actividad antagonista
3. Ensayos *in situ* para la evaluación de la actividad biocontroladora en las heridas de frutas inoculadas con los patógenos

Un problema potencial en este enfoque general es el hecho de que tanto el aislamiento de levaduras como los bioensayos se realizan generalmente a temperatura ambiente (Lima *et al.*, 1998; Viñas *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005, 2010). Las levaduras aisladas y seleccionadas mediante esta estrategia no son capaces de crecer a bajas temperaturas, por lo cual no pueden colonizar las heridas de los frutos en las condiciones de almacenamiento comercial (-1/0°C).

Wilson *et al.* (1993) desarrollan una estrategia de aislamiento y selección de ACB focalizada en frutas con heridas en un ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad, buscando potenciales ACB en las heridas que se mantienen sanas luego de un período de tiempo prolongado (Baker & Cook, 1974). La metodología propuesta emplea aguas de lavado (AL) de frutas heridas, que luego se enfrentan en frutos al/los patógeno/s; los frutos co-inoculados (agua de lavado-esporas del patógeno) son incubados a temperatura ambiente por un par de días y los potenciales ACB son aislados desde las heridas no infectadas. Los microorganismos aislados son obtenidos en estado puro y evaluados individualmente en bioensayos sobre fruto. Esta estrategia ha sido muy aceptada ya que permite la rápida selección de los posibles antagonistas con un costo mínimo de tiempo y dinero. Asimismo, favorece la selección de antagonistas de rápido crecimiento, y son capaces de colonizar eficazmente las heridas de la fruta, es decir que esta estrategia favorece la selección de los organismos cuyo principal mecanismo de acción es la competencia por nutrientes (Droby *et al.*, 1989; Droby & Chalutz, 1994; Janisiewicz & Korsten, 2002; El-Ghaouth *et al.*, 2004; Wisniewski *et al.*, 2007). Sin embargo, la principal limitación de esta metodología es que los bioensayos y los

aislamientos de los potenciales ACB se realizan a temperatura ambiente, lo cual condiciona su actividad biocontroladora en frío.

6.2 Mecanismos de acción de los ACB

Un mecanismo de acción puede ser definido como la estrategia utilizada por un microorganismo beneficioso frente a un patógeno que causa la enfermedad, en función de las interacciones ecológicas dadas en el sistema (Liu *et al.*, 2013a). Los mecanismos de acción de los ACB son poco conocidos, sobre todo porque no se han desarrollado los métodos apropiados para estudiar las complejas interacciones microbianas (ACB - patógeno - hospedante - ambiente) en las heridas de las frutas (Figura 7) (Droby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013a). Durante los últimos años, el desarrollo de microarrays de ADN y las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, han proporcionado un mejor entendimiento de cómo funcionan los sistemas de CB.

Un ACB exitoso estará equipado generalmente con varios mecanismos que a menudo trabajan en conjunto y que son cruciales para controlar el desarrollo de la enfermedad (Mondino & Vero, 2006, Janisiewicz 2010, Jamalizadeh *et al.*, 2011). En la Tabla 5, se muestran los posibles mecanismos involucrados en la actividad biocontroladora de algunos ACB postcosecha estudiados. Varios autores (Janisiewicz & Korsten, 2002; Jamalizadeh *et al.*, 2011; Nunes, 2012; Tripathi *et al.*, 2013) aseguran que la comprensión del modo de acción de los antagonistas es importante porque:

- a) permite el desarrollo de procedimientos más confiables para la efectiva aplicación de los antagonistas
- b) permite seleccionar antagonistas más eficaces
- c) permite desarrollar formulaciones acordes a las necesidades específicas de los ABC
- d) facilita el registro de los ACB por las agencias reguladoras del gobierno
- e) es útil para la optimización de la formulación de mezclas de distintos microorganismos con mecanismos complementarios (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007).

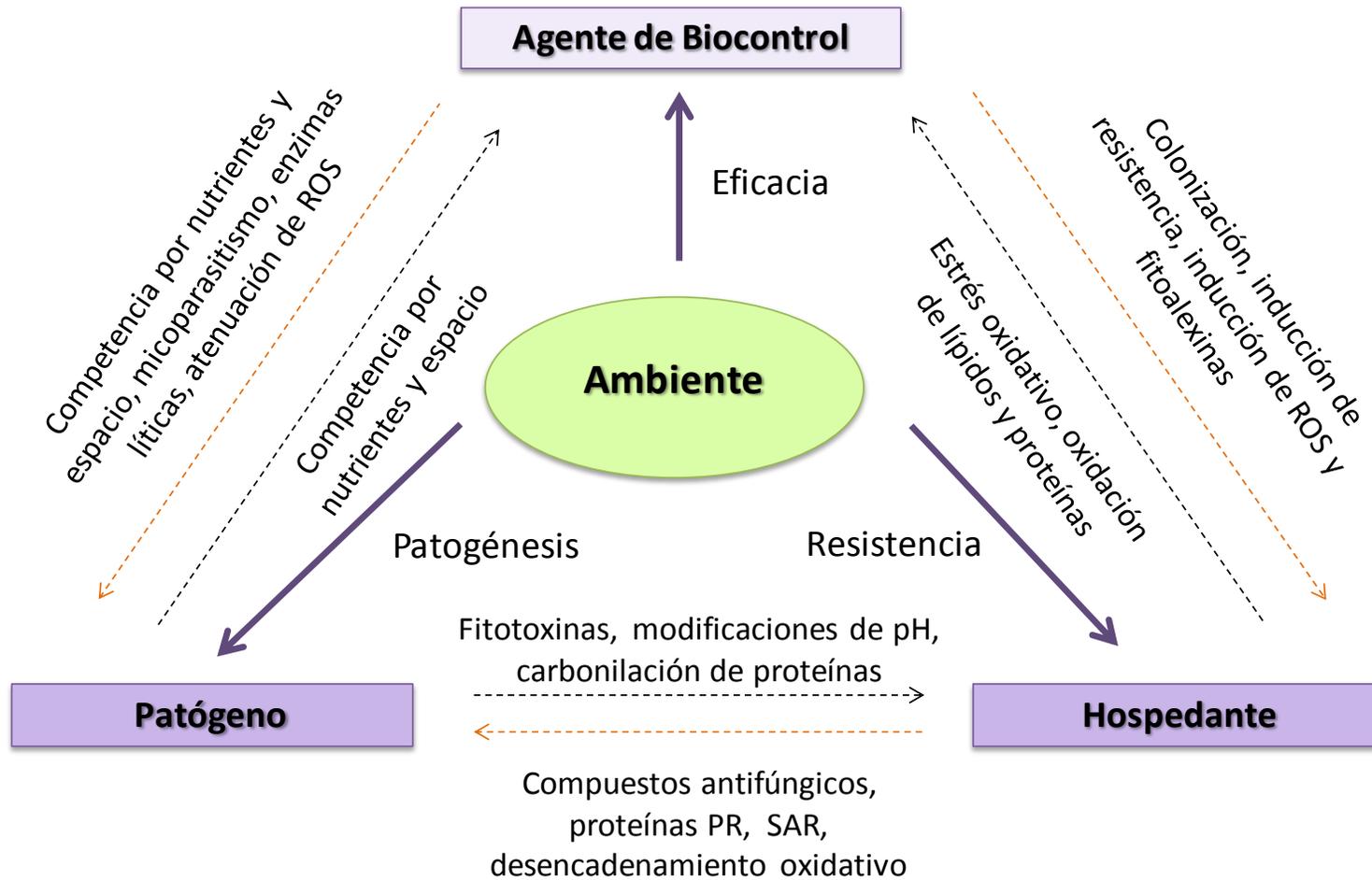


Figura 7. Diagrama de las posibles interacciones entre hospedante, patógeno y antagonista en las heridas (Liu *et al.*, 2013a).

Tabla 5. Mecanismo de acción de algunos ACB.

Mecanismo de acción		Patógeno	Hospedante	Antagonista	Referencia
Competencia	Amino ácidos	<i>P. expansum</i>	Manzana	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Bencheqroun <i>et al.</i> 2007
		<i>P. expansum</i>	Manzana	<i>Cryptococcus laurenti</i>	Vero <i>et al.</i> , 2002
	Hierro	<i>B. cinerea</i>	Manzana	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Vero <i>et al.</i> , 2009
		<i>B. cinerea, P. expansum, Alternaria alternata</i>	Manzana	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Saravanakumar <i>et al.</i> , 2008
Carbono y nitrógeno	<i>B. cinerea, P. expansum</i>	Manzana	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Castoria <i>et al.</i> , 2001	
Amensalismo	Compuestos solubles y volátiles	<i>B. cinerea, P. expansum</i>	Manzana	<i>Leucosporidium scottii</i>	Vero <i>et al.</i> , 2013
	Exoquitinasa y β 1,3 glucanasa	<i>B. cinerea, P. expansum</i>	Manzana	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Castoria <i>et al.</i> , 2001
	Producción toxinas <i>killer</i>	<i>B. cinerea</i>	Uva	<i>Pichia membranifaciens</i>	Santos & Marquina, 2004
Parasitismo	Producción de enzimas líticas	<i>P. digitatum</i>	Cítricos	<i>Pichia guilliermondii</i>	Arras <i>et al.</i> , 1998
		<i>P. expansum, M. fructicola, Rhizopus stolonifer</i>	Manzana	<i>Pichia membranifaciens</i>	Chan & Tian, 2005
Inducción de resistencia en el hospedante		<i>Penicillium digitatum</i>	Pomelo	<i>Candida oleophila</i>	Droby <i>et al.</i> , 2002
		<i>B. cinerea</i>	Manzana	<i>Candida saitoana</i>	El-Ghaouth <i>et al.</i> , 2003
		<i>P. expansum</i>	Durazno	<i>Pichia membranifaciens</i>	Chan <i>et al.</i> , 2007
		<i>R. stolonifer</i>	Durazno	<i>Pichia caribbica</i>	Xu <i>et al.</i> , 2013
	Inducción de ROS	-	Manzana	<i>Candida oleophila</i> <i>Metschnikowia fructicola</i>	Macarisin <i>et al.</i> , 2010
Producción Biofilms		<i>B. cinerea, P. expansum</i>	Manzana	<i>Leucosporidium scottii</i>	Vero <i>et al.</i> , 2013
		<i>Monilinia fructicola</i>	Durazno	<i>Pichia fermentans</i>	Giobbe <i>et al.</i> , 2007

Baker (1991) postula que los mecanismos relacionados con la actividad biocontroladora, se pueden clasificar en: competencia en el hospedante, amensalismo, parasitismo directo y estimulación de las defensas del hospedante (inducción de la resistencia).

6.2.1 Competencia en el hospedante

Se la define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento que se encuentra en cantidad limitante (Droby & Chalutz, 1994; Janisiewicz, 2000, Spadaro *et al.*, 2010). Este último punto es esencial para que exista competencia; si existe un exceso del elemento, la competencia no se produce. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. Los patógenos de postcosecha son típicamente dependientes de los nutrientes, los cuales se encuentran disponibles en las heridas de las frutas, algunos de ellos se encuentran presentes en cantidades limitantes y es allí donde la competencia microbiana entre el patógeno y el ACB puede actuar inhibiendo el desarrollo de los primeros.

Un gran número de estudios revelan que la competencia por nutrientes y espacio entre el ACB y el patógeno es considerado como el principal modo de acción por el cual los antagonistas microbianos eliminan a los agentes causantes de las podredumbres postcosecha en los frutos (Droby *et al.*, 1989; Wilson & Wisniewski, 1989; Calvente *et al.*, 1999; Roberts, 1990; Wisniewski *et al.*, 1991; Droby *et al.*, 1992; Filonow *et al.*, 1996, Castoria *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Piano *et al.*, 1997; Arras *et al.*, 1998; Filonow, 1998; Janisiewicz *et al.*, 2000; Saravanakumar *et al.*, 2008). Para competir con éxito frente a los patógenos en el sitio de la herida, los ACB deben tener la capacidad de adaptarse y sobrevivir mejor que los patógenos a las condiciones nutricionales y de conservación de la fruta (Barkai-Golan, 2001; El-Ghaouth *et al.*, 2004). Esta capacidad de adaptación junto con la capacidad de multiplicarse en las heridas, permitiría una rápida colonización de las heridas de la fruta (Droby *et al.*, 1992; Mercier & Wilson, 1994). En este sentido, el antagonismo del patógeno en las heridas de los frutos, está relacionado cuantitativamente con la capacidad de multiplicación del ACB. Asimismo, muchos autores indican que el nivel de control proporcionado por los antagonistas microbianos depende, en gran medida, de la concentración inicial de aplicada y su capacidad de colonización de los mismos (Janisiewicz & Roitman, 1988; Wisniewski *et al.*, 1989; McLaughlin *et al.*, 1990).

Estudios *in vitro* han demostrado que los antagonistas microbianos toman los nutrientes más rápidamente que los patógenos, que son capaces de establecerse y de inhibir la germinación de las esporas de los agentes patógenos en el sitio de la herida

(Wisniewski *et al.*, 1989; Droby & Chalutz, 1994; Droby *et al.*, 1998). En general, las heridas son sustratos ricos en hidratos de carbono y pobres en compuestos nitrogenados (Janisiewicz & Korsten, 2002), por lo cual la competencia más frecuente es debida a estos últimos.

El hierro es otro de los nutrientes por el que se puede dar la competencia entre los antagonistas y los patógenos (Raaska & Mattila-Sandholm, 1995). Este compuesto es esencial para el crecimiento y el proceso de patogénesis de los hongos. Algunas levaduras, bacterias y hongos tienen la capacidad de producir y excretar al medio moléculas que secuestran este nutriente, no dejándolo disponible para los patógenos (Than *et al.*, 2002). Es por ello que esta propiedad es considerada como un mecanismo de control (Riquelme, 1996; Calvente *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007). Las moléculas producidas por los antagonistas se denominan sideróforos, y son agentes quelantes férricos. Se ha demostrado que levaduras como *M. pulcherrima* (Saravanakumar *et al.*, 2008) y *Rh. glutinis* (Calvente *et al.*, 1999) producen estas moléculas y constituyen el principal mecanismo antagónico frente a patógenos como *B. cinerea* y *P. expansum*.

6.2.2. Amensalismo

Constituye la producción de sustancias inhibitorias o tóxicas por parte de un ACB para otro tipo de organismo. En general se incluyen en este grupo los siguientes casos:

- Producción de antibióticos. Los antibióticos pueden ser sustancias producidas por un microorganismo y efectivas a bajas concentraciones (menos de 10 ppm). Para ser eficaces, los antibióticos deben ser producidos *in situ* en cantidades suficientes en el momento preciso de la interacción con el patógeno (El-Ghaouth *et al.*, 2002). Aunque la antibiosis podría ser una herramienta eficaz para el control de enfermedades de postcosecha en algunas frutas, en la actualidad se buscan ACB no productores de antibióticos debido al posible desarrollo de cepas de patógenos resistentes (Mondino & Vero, 2006; Melin *et al.*, 2007; Singh & Sharma, 2007).
- Producción de bacteriocinas o toxinas *killer*. Las bacteriocinas son proteínas antibacterianas producidas por las bacterias, que son capaces de matar o inhibir el crecimiento de otras bacterias (Cleveland *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de las bacteriocinas consiste en la formación de poros en la membrana celular, reduciendo por consiguiente el potencial transmembrana (Cleveland *et al.*, 2001). Por su parte, las toxinas *killer*, llamadas también zymocinas, son producidas por distintas especies de levaduras. Estos

compuestos son también de naturaleza proteica y con demostrada actividad frente a un gran número de patógenos de origen fúngico y bacteriano. La actividad antimicrobiana de estas toxinas está mediada por receptores primarios específicos de la pared celular del microorganismo susceptible, por lo que nunca podrían afectar la salud humana. El carácter *killer* está ampliamente distribuido entre los géneros de levaduras y presenta alta frecuencia en los hábitats naturales (Walker *et al.*, 1995). Se ha visto que este fenómeno estaría relacionado con la capacidad de biocontrol de las levaduras antagonistas como *P. membranifaciens* (Santos & Marquina, 2004) frente a *B. cinerea* en vid y *Wickerhamomyces anomalus* y *Meyerozyma guilliermondii* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (Lima *et al.*, 2013).

- Producción de enzimas líticas de pared y de señales de *quorum sensing*. Los microorganismos antagonistas pueden producir quitinasas, celulasas, β -glucanasas y proteasas capaces de degradar la pared de los patógenos ocasionando la destrucción de la integridad celular de los mismos (Jijalki *et al.*, 1998; Jijakli & Lepoivre, 1998; Kapat *et al.*, 1998; Mortuza & Ilag, 1999; Castoria *et al.*, 2001; Chernin & Chet, 2002; Friel *et al.*, 2007; Vero *et al.*, 2009). Muchos autores relacionan esta capacidad con el parasitismo entre el ACB y el patógeno (Droby *et al.*; 2009; Sharma *et al.*, 2009; Jamalizadeh *et al.*, 2011). Sin embargo, también indican que los ACB pueden producir enzimas que degradan las señales de *quórum sensing*, señales que gobiernan la expresión de los factores de virulencia del patógeno, mejorando así la capacidad de control de los antagonistas (Droby *et al.*, 2009).

6.2.3. Parasitismo

Consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Sin bien son pocos los reportes sobre este mecanismo en las levaduras (Sharma *et al.*, 2009), algunos géneros tienen la capacidad de adherirse y actuar como micoparásitos de hifas de hongos patógenos. Wisniewski *et al.* (1991) fueron los primeros en demostrar esta capacidad para la levadura *P. guilliermondii* (actualmente *Meyerozyma guilliermondii*) sobre hifas de *B. cinerea* y *Penicillium*. En ese trabajo se evidenció que las células adheridas de la levadura generaron la degradación parcial de la pared en los sitios de unión a las hifas de los hongos. En general, en los procesos de parasitismo están involucradas enzimas líticas como quitinasa, celulasas, β -glucanasas y proteasas como las mencionadas anteriormente.

6.2.4. Estimulación de las defensas del hospedante: inducción de resistencia

La inducción de respuestas de defensa en las frutas por los ACB se ha propuesto como otro mecanismo de acción que intervendría en el control de las podredumbres postcosecha (Arras, 1996; El-Ghaouth *et al.*, 1998; Ippolito *et al.*, 2000). Los antagonistas estimularían los mecanismos de defensa naturales de los frutos, los cuales incluyen: la síntesis de compuestos antifúngicos (Prusky & Wilson, 1994; Yakoby *et al.*, 2001) o fitoalexinas (Rodov *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Arras, 1996; Spadaro & Gullino, 2003), la lignificación de las paredes celulares de los frutos, la síntesis de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas, proteasas) y enzimas relacionadas a las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Castoria *et al.*, 2003; Bajji & Jijalji, 2007; Xu & Tian, 2008), así como también la expresión de una amplia gama de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Droby *et al.*, 2009; Jamalizadeh *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013b).

Por otra parte, algunos antagonistas pueden interactuar con el tejido hospedante, fundamentalmente en las heridas, produciendo determinados factores químicos que estimulan un aumento de los procesos de cicatrización (Droby *et al.*, 2009).

6.2.4.1 Producción de biofilms o biopelículas

Una situación particularmente estudiada, es la producción de biofilms o biopelículas como posible mecanismo de biocontrol (Scherm *et al.*, 2003; Ortu *et al.*, 2005). A los biofilms microbianos se los define como una comunidad de microorganismos que crecen adheridos a una superficie de tejido vivo, que se encuentran embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos han sintetizado. La formación de estos biofilms o biopelículas implica que se desencadene un proceso en el que los microorganismos formen estructuras multicelulares morfológicamente distintas, alterando los patrones de expresión de genes, y mejorando la resistencia al estrés (Lazizzera, 2005; Nobile & Mitchell, 2005; Suntharalingam & Cvitkovitch, 2005; Visick & Fuqua, 2005). Se sabe que en la producción del biofilm están implicados mecanismos de adhesión celular y que estas biopelículas podrían producir elicitores químicos activos que produzcan señales de reconocimiento, constituyendo de esta manera un mecanismo de defensa para el hospedante (Wisniewski *et al.*, 1991; Castoria *et al.*, 1997; El-Ghaouth *et al.*, 1998).

6.3 Mejoramiento de la acción biocontroladora de los ACB

La mayoría de las investigaciones desarrolladas sobre ACB indican que el principal mecanismo por el cual se desarrolla el antagonismo es la competencia por nutrientes y

espacio en la herida, de modo que la rápida colonización del sitio de infección es fundamental para el control de las podredumbres. Esta condición requiere de ciertas manipulaciones que conduzcan a la mejora de la colonización de las heridas de los frutos, produciendo una mejora global en el biocontrol de los patógenos (Janisiewicz *et al.*, 1992; Mercier & Wilson, 1994). En este sentido, dentro de las comunidades microbianas se producen interacciones que son dependientes de la cantidad de células presentes, y que más de un tipo de interacción pueden ocurrir dependiendo de la fase de crecimiento, la densidad de la población y la diversidad de especies presentes (Janisiewicz & Korsten, 2002). Considerando estos aspectos, se han propuesto en bibliografía diferentes estrategias de mejoramiento del biocontrol.

A continuación se realizará una descripción breve de algunos de los métodos más comúnmente utilizados para potenciar la actividad antagónica del ACB.

6.3.1 Combinación de antagonistas

La combinación de diferentes ACB es una estrategia de mejora que presenta las siguientes ventajas:

- Amplía el espectro de acción del formulado, resultando en el control de más de una enfermedad de forma simultánea.
- Incrementa la eficacia del formulado en distintas situaciones tales como distintos cultivares y estados de madurez de la fruta.
- Mejora la eficiencia, ya que a través de las mezclas se pueden combinar agentes con diferentes mecanismos antagónicos. De esta manera se pueden combinar diferentes características del control biológico sin la transferencia de genes por transformación genética.
- Permite utilizar menor cantidad de inóculo de cada antagonista y de esta manera reducir los costos de producción de biomasa de cada uno de los ACB (Nunes *et al.*, 2002).

Asimismo, la mejora de la eficacia del biocontrol por la combinación de antagonistas podría explicarse por:

- la mejor utilización de sustrato, lo cual incrementaría la tasa de crecimiento y la eliminación de sustancias inhibitoras generadas de uno de los organismo por otro,
- la producción de nutrientes por un microorganismo que se pueden utilizar por el otro,

- la exclusión de otros organismos por la formación de una comunidad microbiana más estable (Janisiewicz, 1998).

Para la selección de los agentes que constituirán la mezcla se debe tener en cuenta que no deben competir entre ellos, sino que deben prevalecer las interacciones sinérgicas entre los mismos. El uso de mezclas de antagonistas es una labor complicada, ya que los microorganismos tienen diferentes hábitos de crecimiento, requisitos alimenticios y condiciones de desarrollo. Para la conformación de la comunidad se debe responder a los requerimientos de cada integrante de la misma (Andrews & Harris, 2000). En este sentido, han sido reportadas diversas combinaciones exitosas entre levaduras y bacterias, y entre distintas especies de levaduras (Tabla 6).

Algunos autores, coinciden en que si bien el uso de mezclas antagónicas ofrece un control más eficaz sobre el control de las enfermedades, su adopción definitiva dependerá de la viabilidad económica de la producción y formulación de la mezcla, como así también del registro de dos antagonistas microbianos (Janisiewicz & Korsten, 2002).

6.3.2 Adición de sales inorgánicas

La combinación con sales inorgánicas se ha propuesto como una estrategia segura y eficaz de mejorar la actividad de biocontrol de un ACB frente a los patógenos que causan enfermedades de postcosecha de la fruta (El-Ghaouth *et al.*, 2004). Las sales están categorizadas como sustancias GRAS, lo cual constituye una ventaja si se analiza su utilización con un ACB para aplicaciones sobre la fruta para consumo en fresco.

La mejora del CB con sales inorgánicas puede deberse a la inhibición directa del patógeno, la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) del tejido del hospedante y/o la estimulación de la actividad antagónica del biocontrolador. El empleo de este tipo de sales, permite utilizar una menor concentración de células del antagonista, sin afectar o incluso mejorando los niveles de protección.

Se han descripto diferentes sales para el control de enfermedades de postcosecha de frutas en combinación con los ACB incluyendo CaCl_2 , propionato de calcio, carbonato de sodio (Conway *et al.*, 2007; Janisiewicz *et al.*, 2008), bicarbonato de sodio (Teixidó *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2004; Karabulut *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2007), etanol (Karabulut *et al.*, 2003; Spadaro *et al.*, 2004) y molibdato de amonio (Cao *et al.*, 2010), entre otras. En la Tabla 7 se muestran distintas sales inorgánicas que lograron mejorar la capacidad biocontroladora de diferentes ACB en pomáceas.

Tabla 6. Combinación de antagonistas para el control de *B. cinerea* y *P. expansum*.

Antagonistas	Patógeno	Hospedante	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> * + <i>A. pullulans</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i>		Leibinger <i>et al.</i> , 1997
<i>Kloeckera apiculata</i> + <i>Candida guilliermondii</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Uva	McLaughlin & Wilson, 1992
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> + <i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>P. expansum</i>	Manzana	Conway <i>et al.</i> , 2007; Janisiewicz <i>et al.</i> , 2008
<i>Pantoea agglomerans</i> * + <i>Candida sake</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i>	Pera - Manzana	Nunes <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas syringae</i> * + <i>Sporobolomyces roseus</i>	<i>P. expansum</i>	Manzana	Janisiewicz & Bors, 1995
<i>Rahnella aquatilis</i> * + <i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i>	Manzana	Calvo <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhodotorula glutinis</i> + <i>Cryptococcus albidus</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i>	Manzana	Calvo <i>et al.</i> , 2003
<i>Rahnella aquatilis</i> * + <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i>	Manzana	Calvo <i>et al.</i> , 2010

*Corresponden a bacterias.

Tabla 7. Agentes de Control Biológico combinados con sales inorgánicas para el control de patógenos postcosecha de pomáceas.

Sal adicionada	ACB	Hospedante	Patógeno	Referencia
Bicarbonato de sodio	<i>Cryptococcus. laurentii</i>	Pera	<i>P. expansum</i> - <i>Alternaria spp.</i>	Yao <i>et al.</i> , 2004
		Manzana	<i>P. expansum</i>	Janisiewicz <i>et al.</i> , 2008a
Carbonato de sodio	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Manzana	<i>P. expansum</i>	Janisiewicz <i>et al.</i> , 2008b
Cloruro de calcio	<i>Candida saitoana</i>	Pera	<i>B. cinerea</i> - <i>P. expansum</i>	Wisniewski <i>et al.</i> , 1995
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Pera	<i>B. cinerea</i> - <i>P. expansum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2005
	<i>Trichosporon sp.</i>	Manzana	<i>B. cinerea</i> - <i>P. expansum</i>	Shiping <i>et al.</i> , 2001
Molibdato de amonio	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pera	<i>B. cinerea</i>	Wan & Tian, 2005
	<i>Candida sake</i>	Manzana	<i>P. expansum</i> - <i>B. cinerea</i>	Nunes <i>et al.</i> , 2002
Propionato de calcio	<i>Candida oleophila</i>	Manzana	<i>P. expansum</i>	Droby <i>et al.</i> , 2003

6.3.3 Adición de nutrientes

Debido a que la eficacia de la mayoría de los ACB está relacionada con la cantidad de células en las heridas de las frutas a proteger, las modificaciones nutricionales que provoquen la estimulación del crecimiento del antagonista y por lo tanto una mejor colonización, permitirán mejorar la capacidad antagónica de los ACB (Nunes *et al.*, 2001). Los nutrientes deben ser seleccionados en base al criterio de que sean fácilmente metabolizados por el antagonista y menos, o no metabolizados por el patógeno (Janisiewicz, 1997). Además del efecto directo sobre la colonización, algunos autores indican que el ambiente nutricional puede influir directamente en la producción de ciertas enzimas líticas de pared o metabolitos por parte de los ACB, incrementando por lo tanto su acción antagonista (Wisniewski *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que biocontroladores como *C. saitoana* y *C. sake* pueden mejorar su eficacia biológica en el control de las podredumbres de postcosecha con la adición de algunos amino ácidos como la L-serina y L-aspártico (Nunes *et al.*, 2001), dado que estos compuestos mejoran la capacidad de colonización de estas levaduras. El compuesto análogo de la glucosa, el 2-desoxi-D-glucosa mejora la actividad antagónica de las mismas levaduras en peras, manzanas y cítricos (Janisiewicz, 1994; El-Ghaouth *et al.*, 2000; Nunes *et al.* 2001), permitiendo reducir la cantidad de células de levadura necesarias para un eficaz control de las podredumbres. No obstante, este hidrato de carbono por sí mismo es capaz también de inhibir el crecimiento de varios hongos filamentosos, incluidos los principales patógenos postcosecha por ser tóxicos para ellos (El-Ghaouth *et al.*, 1995).

6.3.4 Integración con otros métodos de control

Existe reportadas diferentes estrategias de mejoramiento de los ACB para control de enfermedades postcosecha:

- Adición de bajas dosis de fungicidas (Droby *et al.*, 1998; Arras *et al.*, 2002).
- Manipulación genética de los ACB (Jones & Prusky 2002; Spadaro & Gullino 2004; Wisniewski *et al.*, 2005)
- Integración con otros métodos de control de enfermedades postcosecha: físicos (temperatura de almacenamiento, atmósferas modificadas, radiación ultravioleta, tratamientos de la fruta con calor, etc.) ó químicos (otras sustancias GRAS como el quitosano, ácido salicílico, ácido jasmónico; metil S acibenzolar) (Palou, 2009; Janisiewicz & Conway, 2010; Nunes, 2010).

- Manipulación fisiológica y de las formulaciones de los ACB (Teoxidó *et al.*, 2010a; Nunes, 2012).
- Aplicaciones de antagonistas en precosecha (Larena *et al.*, 2005; Teoxidó *et al.* 2010b).

6.4 Producción de los ACB

Durante la última etapa de selección de un ACB se debe evaluar su eficacia en condiciones comerciales o semicomerciales. Para ello resulta imprescindible aumentar la escala del proceso de producción de las células, al menos a nivel de planta piloto (Patiño-Vera *et al.*, 2005). La producción de biomasa es además un paso esencial en el proceso de comercialización y los resultados obtenidos son decisivos para el desarrollo comercial del producto (Teoxidó & Torres, 2011; Nunes, 2012).

Se busca que la producción de la biomasa del antagonista microbiano sea rápida, eficiente y a bajo costo (Abadias *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2001; Patiño-Vera *et al.*, 2005), cualidades importantes para lograr el uso comercial de un fungicida biológico (Wraight *et al.*, 2001). En general, la producción de biomasa se lleva a cabo en sistemas de fermentación líquidos en cultivo por lote o *batch*, cultivo alimentado o *fed batch*, o en sistemas continuos, empleando sustratos económicos que aporten los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos.

Para realizar el escalado de la producción desde las condiciones de laboratorio a las de fermentadores o reactores de mayor volumen se deben establecer las condiciones de funcionamiento que incluyen aireación, agitación, pH y temperatura, así como los componentes del medio de crecimiento, los cuales pueden afectar a la calidad y cantidad de los microorganismos producida (Abadias *et al.*, 2003; Patiño-Vera *et al.*, 2005; Gómez-Pastor *et al.*, 2011).

En general, los reactores de tanque agitado son los que se utilizan en la producción de biomasa de levaduras, tanto en laboratorios de investigación, como en la industria de fermentaciones comerciales. En este tipo de reactores todas las variables (concentración, temperatura, pH, presión, etc.) deben ser iguales en cualquier punto del medio contenido en el tanque, esto se consigue con una buena agitación que permita homogenizar la mezcla en el reactor.

En lo que respecta a las levaduras descritas como ACB para pomáceas para el control de *B. cinerea* y *P. expansum*, son limitados los reportes bibliográficos sobre la producción de biomasa a escala de biorreactor (Tabla 8).

Tabla 8. *Yeast-like* y levaduras biocontroladoras producidas a escala biorreactor reportadas en bibliografía.

Agente control biológico	Tipo de cultivo	Medio de producción	Escala de producción	Referencia
<i>A. pullulans</i>	Lote alimentado	Glucosa- vitaminas- sales minerales	2 L	Mounir <i>et al.</i> , 2007
<i>C. sake</i>	Lote	Melaza caña – Urea	5 L	Abadias <i>et al.</i> , 2003
<i>M. pulcherrima</i>	Lote	YEMS*	5 L	Spadaro <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhodosp. paludigenum</i>	Lote	Melaza caña - extracto levadura	10 L	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Rh. minuta</i>	Lote	Medio mineral enriquecido	10 - 100 L	Patiño-Vera <i>et al.</i> , 2005

* YEMS: en inglés: yeast extract, D-mannitol, sorbose. Extracto de levadura, D-manitol y sorbosa.

6.4.1 Cultivos por lote o *batch*

Se caracterizan porque el crecimiento de los microorganismos se desarrolla en un volumen fijo de nutrientes que es consumido hasta el agotamiento del compuesto limitante. Este cultivo también se denomina sistema de fermentación discontinua o cerrada, ya que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores. La principal ventaja de este sistema con respecto a los cultivos del tipo continuo, es su simpleza, tanto desde el punto de vista del equipo necesario, como de su operación.

6.4.2 Factores que influyen en el proceso de producción

Para la producción de biomasa de levaduras deben ser considerados varios aspectos relacionados con su crecimiento y reproducción, que incluyen factores nutricionales, factores físicos, actividad de agua libre, cantidad de inóculo inicial de levaduras, etc.

6.4.2.1 Factores nutricionales

Para el óptimo crecimiento de las levaduras, son necesarias fuentes de carbono, fuentes nitrogenadas, vitaminas y factores minerales. Estos pueden clasificarse de acuerdo a la su demanda en:

a) **Macronutrientes:** Son elementos requeridos en grandes cantidades. Los mayoritarios son el carbono y el nitrógeno. Otros macronutrientes en menor proporción son el fósforo, azufre; potasio, magnesio, calcio, sodio, manganeso y sodio.

b) Micronutrientes o elementos trazas: Son compuestos esenciales, que comprenden 13 vitaminas (donde las principales son la biotina, tiamina, ácido pantoténico e inositol) y 16 minerales (que incluyen Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co, entre otros), todos necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

c) Factores de crecimiento: Son componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células microbianas, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica. Algunos ejemplos de ellos son los algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc.

6.4.2.1.1 Fuentes de carbono

Las levaduras para su crecimiento pueden utilizar monosacáridos (glucosa y fructosa) y a su vez algunos géneros, pueden asimilar moléculas más complejas como los disacáridos, trisacáridos o polisacáridos. Estos últimos son asimilados después de ser hidrolizados en el interior o exterior de la célula (Bourgeois & Larpent, 1994). En muchas especies de levaduras la sacarosa es hidrolizada fuera de la membrana celular gracias a la actividad de la enzima invertasa, la cual hidroliza el disacárido en los monosacáridos (glucosa y fructosa) que ingresan por difusión facilitada al interior de la célula para ser rápidamente metabolizados.

6.4.2.1.2 Fuentes de nitrógeno

Las levaduras pueden utilizar fuentes de nitrógeno mineral u orgánico. Entre las fuentes de nitrógeno mineral más utilizadas, las sales de amonio las cuales se destacan porque con ellas se obtienen elevadas tasas de crecimiento. Dentro del segundo grupo, la urea, los ácidos glutámico, aspártico y sus aminas arrojan los resultados más alentadores en general.

El nitrógeno de los compuestos inorgánicos se disocia en forma de iones amonio e hidrógeno, que en los medios de cultivo utilizados en la producción de los microorganismos confieren valores de pH alcalino, lo cual beneficia el crecimiento de determinados organismos.

Aun cuando se prefieren los sustratos más sencillos como los descritos previamente, muchas levaduras pueden también asimilar péptidos y proteínas, que son hidrolizados a aminoácidos como la arginina, ácido glutámico, prolina, entre otros por medio de proteasas producidas por ellos mismos.

6.4.2.1.3 Vitaminas

Las levaduras necesitan diversas vitaminas para su crecimiento y metabolismo, las hay específicas para actividades respiratorias y otras para crecimiento. Estos compuestos pueden ser también utilizados como coenzimas en algunas especies de levaduras.

La biotina es la principal vitamina requerida por las levaduras, participa en las reacciones de carboxilación involucradas en la síntesis de otras proteínas, ácidos nucleicos, metabolismo de carbohidratos y síntesis de ácidos grasos.

6.4.2.1.4 Fuentes de minerales

Los minerales son parte integral de las proteínas, actúan como activadores enzimáticos y funcionan en muchos casos como cofactores en las reacciones enzimáticas de la célula. En orden de importancia se encuentran fósforo, magnesio, potasio, sodio, manganeso y azufre.

6.4.2.2 Factores físicos

6.4.2.2.1 Temperatura

Todos los microorganismos se ven afectados por la temperatura y cada uno tiene una gama de temperaturas variables para su desarrollo. La temperatura afecta a la tasa de crecimiento, los requerimientos nutricionales, producción enzimática y la composición química de las células (Inagraham, 1962; Precht *et al.*, 1973). La temperatura óptima de crecimiento es en la cual su tasa de crecimiento es la máxima. Los microorganismos también tienen temperaturas de crecimiento mínimo por debajo del cual están inactivos metabólicamente y uno superior más allá del cual no crecen. Como factor influyente en el crecimiento, la temperatura debe ser adecuada para mantener la integridad y la fluidez de las membranas celulares de los organismos.

La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras es de alrededor de 25-30°C; sin embargo, el rango está comprendido entre 5° y 37°, con algunas excepciones de especies que pueden crecer por debajo de los 0°C (Bisson *et al.*, 1980; Barnett *et al.*, 1990). White (1954) indica que la temperatura influye en los tiempos generacionales de las levaduras, Kamel & Kawano (1986) observaron que la temperatura óptima para el crecimiento de *Candida sp.* fue 37°C. Por su parte, Charoenchai *et al.* (1998) demostraron que las tasas de crecimiento de *Kloeckera. apiculata*, *Pichia anomala*, *S. cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* se reducen cuando la temperatura alcanza los 25°C. Kang *et al.* (2006) establecen el máximo crecimiento obtenido de dos levaduras

marinas, *Debaryomyces hansenii* y *Candida austromarina*, estuvo en el rango de temperatura de 20-30°C y 20-25°C, respectivamente.

6.4.2.2.2 Oxígeno

En los sistemas de producción de células el aporte de oxígeno es necesario para la respiración, proceso metabólico central por el cual se obtiene el máximo rendimiento en energía y por consiguiente en biomasa. La presencia de oxígeno minimiza las posibilidades de fermentación alcohólica. De acuerdo a resultados experimentales, se necesita 1 g de oxígeno para la formación de 1 g de masa de *Saccharomyces* (Mateles, 1971).

El oxígeno es un componente esencial en el crecimiento aeróbico de las levaduras, pero es a su vez, un compuesto difícil de suministrar por su baja solubilidad en agua, siendo un factor determinante de la velocidad metabólica. En general, la cantidad de oxígeno transferido en un medio de crecimiento está en el orden de los nmoles/h. El medio de cultivo empleado condiciona la solubilidad del oxígeno.

Es a través de los dispositivos de aireación que el cultivo microbiano dispone del oxígeno suficiente para sus necesidades metabólicas, mientras que a través de los dispositivos de agitación, se aseguran que la distribución en el medio sea homogénea (Stanbury *et al.*, 1995).

6.4.2.2.3 Actividad acuosa del medio de cultivo (a_w)

La actividad de agua o actividad agua (a_w) es el parámetro que se utiliza normalmente como medida de la cantidad de agua disponible en el sustrato donde se desarrollará el crecimiento microbiano. Si el valor de a_w del medio es bajo, es decir la presión osmótica es alta, se produce la pérdida de agua de los microorganismos por osmosis y por lo tanto, el encogimiento y plasmólisis de la célula, ocasionando una inhibición del crecimiento. La a_w ideal para las levaduras es de aproximadamente 0,98 (Mossel & Moreno, 1982).

6.4.2.3 El inóculo

Las condiciones en las que se encuentra el inóculo es el factor más importante para la óptima producción de un microorganismo a escala de reactor. Debe estar en estado puro, libre de contaminaciones y activo metabólicamente para reducir la fase *lag* o de latencia en el proceso de producción de biomasa. Además de la calidad del inóculo, es importante la cantidad. En general el inóculo se obtiene mediante un pie de cuba, que

corresponde a un escalado de menor a mayor volumen del microorganismo a producir. Un punto negativo en los sucesivos cultivos es el alto riesgo de contaminaciones.

6.4.3. Medios de cultivo utilizados para la producción de microorganismos

Para el crecimiento de los microorganismos el medio de cultivo debe responder a sus necesidades nutricionales. La selección del medio de producción es fundamental para asegurar una productividad óptima de biomasa microbiana (Mignone *et al.*, 1994).

En general, los componentes utilizados a nivel industrial para la producción de biomasa son medios complejos. El medio deber aportar fundamentalmente hidratos de carbonos y compuestos nitrogenados, ya que son los principales nutrientes requeridos para el crecimiento celular (Costa *et al.*, 2001). Para la producción a gran escala es fundamental tener en cuenta el costo, la disponibilidad y la estabilidad de la composición química del medio a utilizar.

Las materias primas que se destacan como fuentes de hidratos de carbono son los granos, melazas, celulosas, suero de queso, mosto de uva y extracto de levadura. En lo que respecta a los compuestos nitrogenados son comúnmente utilizados los de naturaleza inorgánica, como ya se ha mencionado; no obstante, algunas de origen orgánico como hidrolizados de proteínas, extracto de carne, extracto de levadura o extracto de malta también son frecuentemente empleados.

El medio de cultivo utilizado para producir microorganismos y en particular para los ACB, tiene un profundo efecto en ellos y en sus productos (Wraight *et al.*, 2001; Peighami-Ashnaei *et al.*, 2009). Algunos estudios han demostrado que medios ricos en nutrientes los cuales son modificados con el agregado de algunos solutos, como glucosa, glicerol y/o NaCl, producen cambios en el crecimiento celular, con consecuentes alteraciones en la acumulación endógena de polioles (glicerol, arabitol, manitol y meso-eritritol) y azúcares como la trehalosa (Teixidó *et al.*, 1998a, b; Magan, 2001). La producción de biomasa en estas condiciones generaría una mejor tolerancia a las condiciones de estrés a las cuales las células son sometidas en los procesos formulación y en el mismo biocontrol en las heridas de la fruta (Abadias *et al.*, 2001).

En la producción de células a gran escala, el medio de cultivo seleccionado debe permitir una concentración máxima de biomasa y productos activos, con un bajo costo (Lewis, 1991). En este sentido, la melaza de caña de azúcar es considerada como un importante sustrato para la producción de ACB, ya que cumple con la mayor parte de las características deseables para tal fin (Spadaro *et al.*, 2004).

6.4.3.1 Melaza de caña de azúcar para producción de biomasa

La melaza es un subproducto de la elaboración de azúcar de caña, está constituida por una mezcla compleja que contiene sacarosa, glucosa, fructosa, sales, vitaminas y otros compuestos solubles en álcali que usualmente están en el jugo de caña, como otros formados durante el proceso de manufactura y procesamiento. La composición de la melaza es muy variable y depende de la variedad de caña de azúcar, el suelo, el clima, el período de cosecha del cultivo, la eficiencia de la operación de la fábrica y el sistema de obtención.

La melaza de caña se caracteriza por presentar un porcentaje de sólidos solubles (SS) de entre 68 y 80% (°Brix), y su pH puede variar entre 5 y 6. En la Tabla 9 se muestra la composición general de la melaza (Yepez, 1995; Tellez, 2004).

Tabla 9. Composición de la melaza de caña.

Componentes	Constituyente	Contenido (p/p)
Mayoritarios	Sacarosa	60 - 63%
	Agua	16%
	Azúcares reductores	3 - 5%
	Sustancias disueltas	4 - 8%
	Proteínas	3%
	Grasas	0,40%
Minerales	Potasio	3,67%
	Calcio	0,74%
	Magnesio	0,35%
	Glicina	0,10%
	Fósforo	0,08%
Amino ácidos	Treonina	0,06%
	Valina	0,02%
	Leucina	0,01%
	Lisina	0,01%
Vitaminas	Colina	600 ppm
	Ácido Pantoténico	42,90 ppm
	Niacina	48,86 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Rioflavina	4,40 ppm
	Biotina	1,2–3,2 ppm
	Tiamina	0,8-1,8 ppm

La melaza utilizada como medio de cultivo suele ser diluida con agua. Como es deficiente en compuestos nitrogenados (Tabla 9) debe considerarse la adición extra de estos compuestos (Dhamankar, 1992; Gómez-Pastor *et al.*, 2011), como también se suele suplementar además con magnesio y fósforo. En cuanto a los requerimientos de vitaminas de las levaduras, la melaza de caña presenta un alto contenido de biotina y suele tener cantidades suficientes de pantotenato, inositol, tiamina, piroxidina y ácido nicotínico. Dos aspectos negativos de la melaza como materia prima es su alta variabilidad y que puede presentar sustancias tóxicas para el crecimiento de las levaduras (Gómez-Pastor *et al.*, 2012).

6.5 Estudios sobre patogenicidad en humanos

Los ACB seleccionados para su aplicación sobre la fruta, deben resultar inocuos para los consumidores. En general, las levaduras presentan una amplia gama de aplicaciones tecnológicas relacionadas con los alimentos, es así que, por su cualidad de inocuas algunas especies están reconocidas como GRAS, por ejemplo: *S. cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis* y *Candida utilis*, entre otras (Food & Drug Administration U.S.; Protecting & Promoting Your Health, 2013). No obstante, existen reportes sobre el comportamiento patogénico de algunas levaduras en pacientes inmunodeprimidos, razón por la cual, se las considera como patógenos oportunistas (Mc Cusker *et al.*, 1994; Murphy & Kavanagh, 1999). Las infecciones por patógenos oportunistas implican la producción de factores de virulencia, que favorecen el crecimiento no regulado de los patógenos (van Burik & Magee, 2001). Debido a la naturaleza compleja de la interacción “huésped-humano” y “patógeno-oportunista” se considera que son pocos los factores absolutamente necesarios para que se produzca la enfermedad. Entre los factores de virulencia más importantes reconocidos en los procesos de infección se encuentran:

- Crecimiento a elevadas temperaturas: La capacidad de crecer a la temperatura corporal del huésped humano es un requisito importante para que se produzca la infección sistémica.
- Adherencia: Para la mayoría de las infecciones por hongos o levaduras, estas deben tener la capacidad de resistir la limpieza física generada como respuesta del hospedante humano. Un gran número de estudios han demostrado la importancia de la adhesión en varios patógenos.
- Factores necróticos. Los producen los microorganismos para superar las barreras estructurales que el hospedante humano utiliza para prevenir la

infección. La mayoría de los factores necróticos son enzimas y cuya función principal en la infección es la degradación de los tejidos del hospedante: proteasas, fosfatasas, fosfolipasas y ADNasas.

Considerando estos factores de virulencia, se realizan habitualmente estudios preliminares sobre la posible acción patogénica en condiciones de *in vitro* para los ACB seleccionados. Estos estudios preliminares sobre patogenicidad constituyen un requisito esencial para el registro de los formulados que los contengan. También se realizan estudios ampliados que incluyen pruebas en animales.

6.6 Formulación de los ACB

Luego de la producción a escala, la próxima etapa para llegar a la comercialización es la formulación del ACB. El objetivo del proceso de formulación es mantener al microorganismo en condiciones tales que conserve su viabilidad y condición de biocontrolador entre 6 y 18 meses en condiciones normales de almacenamiento (20-25°C), como así también que mejore la efectividad del microorganismo, asegurando su estabilidad y facilitando su manejo y aplicación (Rhodes, 1993; Usall, 2003; Sanzani *et al.*, 2009; Nunes, 2012). Schisler *et al.* (2004) indican que la producción a gran escala no sólo implica maximizar la cantidad de biomasa producida sino que también otorga a las células de las condiciones fisiológicas más adecuadas para que sean formuladas. Las condiciones de producción de biomasa y la edad del cultivo influyen significativamente en la eficacia, estabilidad y tolerancia a la desecación de muchos de ACB (Melin *et al.*, 2006; Li & Tian, 2006; Zhang *et al.*, 2005).

La formulación debe conservar la pureza específica del ACB y las células deben mantener su estabilidad genética, la viabilidad celular y los atributos como la colonización de la fruta y sus mecanismos antagónicos. El proceso de formulación implica varios pasos y pueden adicionarse distintas sustancias como adhesivos, emulsionantes y adyuvantes, los cuales deben seleccionarse cuidadosamente, ya que pueden afectar las propiedades los biocontroladores.

En general, las formulaciones utilizadas para los biocontroladores pueden ser líquidas o sólidas (Melin *et al.*, 2006). La principal ventaja de las formulaciones líquidas es el bajo costo de producción, ya que no son necesarios los procesos de deshidratación, que a menudo provocan una alta mortalidad de las levaduras (Abadias *et al.*, 2003). Las formulaciones líquidas implican el uso de soluciones isotónicas, logradas con el agregado de sustancias como la trehalosa, glicerol, goma xántica, cloruro de sodio, etc.

Por otro lado, las formulaciones secas presentan mayor tiempo de conservación en condiciones no refrigeradas, presentan menos riesgos de sufrir contaminaciones y abaratan el envío, la distribución y el almacenamiento del producto (Li & Tian, 2006; Melin *et al.*, 2007). Las formulaciones sólidas son las más habituales, logradas a través de las técnicas de liofilización o lecho fluido (Costa *et al.*, 2000; Mounir *et al.*, 2007). La formulación líquida del biocontrolador *C. sake* resultó una buena opción ante la pérdida de eficacia de la formulación seca de la levadura (Abadias *et al.*, 2003).

Independientemente de los ingredientes de la formulación, técnicas de secado y condiciones de almacenamiento, los microorganismos se encuentran expuestos a un medio ambiente estresante. Sin embargo, la mayoría tienen mecanismos celulares intrínsecos para protegerse contra condiciones externas que les resultan desfavorables (Melin *et al.*, 2010). En general, con el objetivo de obtener una mayor capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés y de adaptación a condiciones más hostiles, los organismos son sometidos a un período de aclimatación bajo una condición de estrés leve, tales como el hambreado celular, temperaturas subóptimas o cambios en la presión osmótica (Hohmann & Mager, 2003; Cañama *et al.*, 2008); esta etapa en general es previa al proceso de formulación y se denomina preacondicionamiento celular. Por lo tanto, para obtener buenos resultados son necesarias tanto la optimización de la producción de biomasa, como el régimen de preacondicionamiento para cada levadura, para así maximizar de forma natural la cantidad y supervivencia de las células (Melin *et al.*, 2010).

6.7 Ensayos a escala semicomercial

En los programas de desarrollo de ACB el éxito está determinado por los resultados del biocontrolador en experimentos o ensayos a escala semicomercial o piloto, donde se tratan importantes cantidades de fruta con las células frescas o ya formuladas, en distintas ubicaciones geográficas, frente a la presión natural de inóculo de las plantas y cámaras comerciales (Torres *et al.*, 2007). Los resultados de experimentos a gran escala desarrollados con ACB seleccionados en varios laboratorios de investigación del mundo, indican una alta variabilidad e inconsistencia en los niveles de control de las enfermedades (Droby, 2006; Sanzani *et al.*, 2009; Teixidó *et al.*, 2011; Nunes, 2012). Esta situación es un desafío a superar y que actualmente impide que sea utilizada como única estrategia para el manejo de las enfermedades postcosecha, y en general se encuentra integrada a otros sistemas de control (Talibi *et al.*, 2014). Son varios los factores que influyen en la variabilidad de los resultados: el proceso de producción y formulación, el método de aplicación, la presión de inóculo, el estado

fisiológico de la fruta y las estrategias de mejoramiento utilizadas (Droby, 2006). A estos factores, se suman: el nivel de susceptibilidad del hospedante, el tiempo transcurrido entre la infección y el tratamiento, y la posible presencia de infecciones latentes o quiescentes (Sanzani *et al.*, 2009).

Para los ACB y su aplicabilidad en condiciones comerciales, la formulación es todavía una cuestión clave, a lo que se le añade la compatibilidad con las prácticas habituales de procesamiento y almacenamiento de la fruta (Sanzani *et al.*, 2009). Varios autores coinciden en que es importante la integración de los biocontroladores con sustancias GRAS como sales de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, o inductores de resistencia, con el objetivo de generar efectos aditivos o sinérgicos entre diferentes estrategias de control.

Para la evaluación de los biocontroladores a escala semicomercial se emplean los sistemas de aplicación habitualmente utilizados para los fungicidas. Los métodos por los cuales se pueden aplicar los biocontroladores sobre los frutos son: sistemas de tanque de inversión, pulverización ó a través de cortina de líquido (*drencher*). De las tres alternativas mencionadas, la menos utilizada y recomendada para la aplicación es la de los tanques de inmersión. Estos tanques, se utilizan en muchos sistemas de manejo para limpiar y desinfectar la fruta cuando ingresa a la línea de empaque, pero no resulta compatible con la aplicación de ACB, fundamentalmente por el incremento de los propágulos de los patógenos en la solución a medida que ingresa la fruta, lo cual afecta la eficacia del biocontrol (Droby, 2006). Es así que, los sistemas de aplicación más utilizados para los ACB son aquellos que pulverizan o empapan la fruta en la línea de empaque (Figura 8). Estos sistemas emplean boquillas tipo cono impulsados hidráulicamente o por presión de aire para pulverizar el líquido sobre la fruta.

Los experimentos de eficacia a escala semicomercial finalizan luego un determinado período de conservación de la fruta en postcosecha, donde se evalúa la incidencia natural con y sin la aplicación de los ACB. Los ensayos a esta escala, constituyen una importante etapa en el proceso de registro de los ACB.

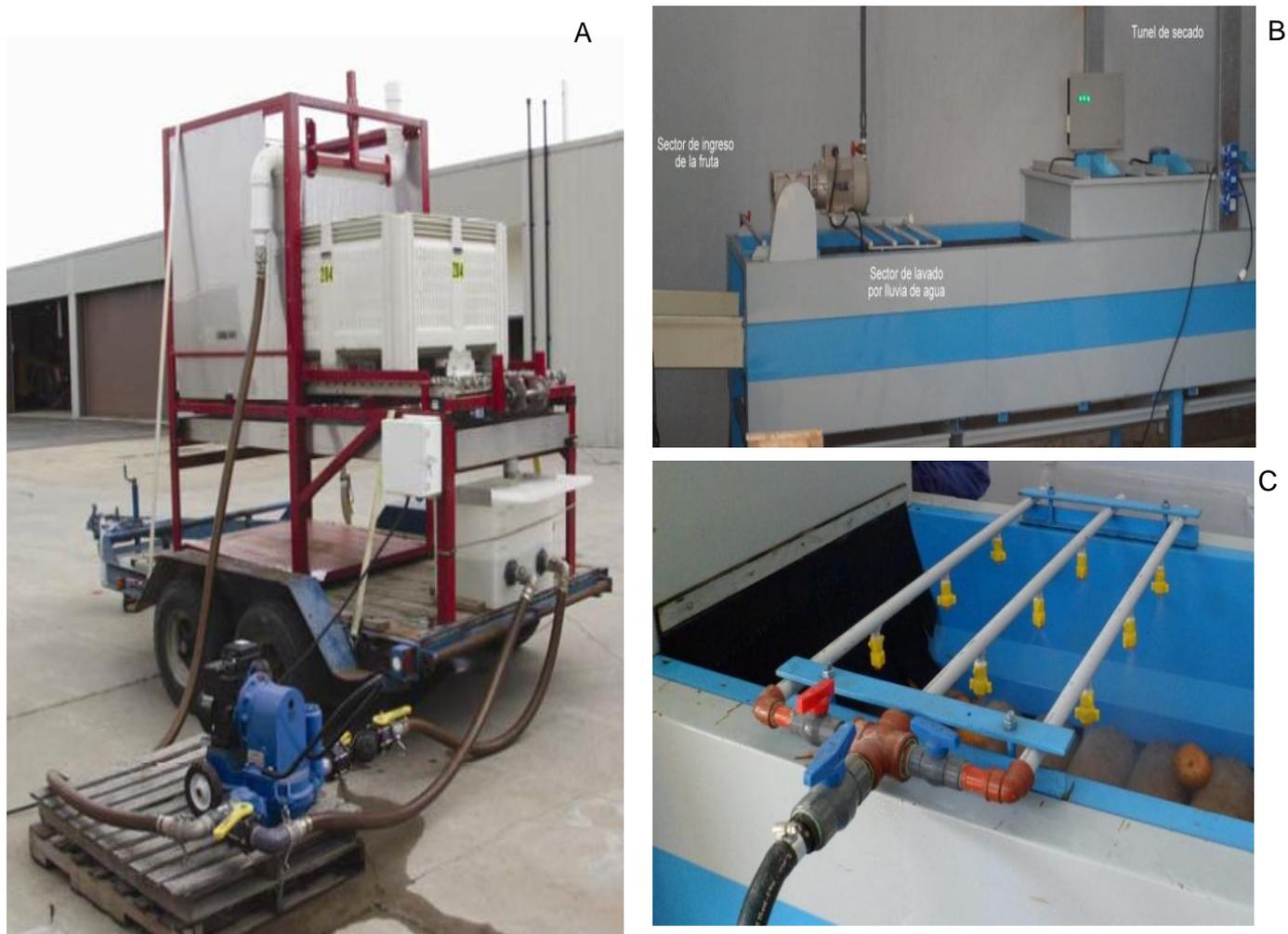


Figura 8. Sistemas de aplicación de biocontroladores. A) *Drencher* experimental (Janisiewicz *et al.*, 2005). B y C) Línea experimental para el tratamiento de fruta; en B sector de ingreso, lavado y túnel de secado; en C toberas de pulverización.

7. Levaduras

7.1. Generalidades

Taxonómicamente las levaduras forman un grupo artificial de hongos que comprenden en su mayoría organismos unicelulares que se reproducen vegetativamente por gemación. Sin embargo, varios géneros pueden desarrollar hifas similares a las de los hongos filamentosos, otros pueden formar pseudohifas y otros dividirse por fisión, lo cual evidencia su gran heterogeneidad.

Este grupo diverso de hongos puede clasificarse filogenéticamente dentro de los Ascomycetes (por ejemplo los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora*) o dentro de los Basidiomycetes (por ejemplo, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Rhodotorula*) (Kurtzmann *et al.*, 2011). No obstante, la reproducción sexual, se caracteriza por la generación de ascosporas o basidiosporas, y se conoce en menos de la mitad de las especies

Las levaduras son organismos ubicuos, extendidos en la naturaleza y capaces de colonizar ambientes terrestres, aéreos y acuáticos. Viven en general sobre la superficie de plantas y animales, aunque también se las encuentra en el agua e incluso en ambientes extremos como glaciares, océanos, lagunas ácidas, etc. (Deak, 2009; Buzzini & Margesin, 2014).

De acuerdo a su hábitat o nicho, las levaduras pueden definirse como generalistas o especializadas; las primeras se caracterizan por su habilidad de utilizar diversas fuentes carbonadas y por su capacidad de sobrevivir y crecer en diferentes ambientes; mientras que las segundas, poseen un perfil fisiológico simple y sólo pueden obtener energía de unos pocos compuestos carbonados. En la búsqueda de levaduras como ACB el perfil metabólico de tipo especializado resulta más interesante ya que el hecho de estar limitadas a determinado nicho específico, hace que sean capaces de colonizarlo más rápidamente y con una menor competencia interespecífica. Como desventaja, las levaduras muy especializadas son en general difíciles de producir industrialmente, debido a su restringido uso de posibles sustratos, y por lo tanto de ser utilizadas con fines biotecnológicos (Pimienta *et al.*, 2009).

7.2 Ocurrencia de las levaduras en los frutos

La microbiota natural de la superficie de las partes aéreas de la planta (tronco, hojas, flores y frutos) incluye levaduras, bacterias y hongos filamentosos (mohos en general) (Lindow & Brandl, 2003; Fonseca & Inácio, 2006). Durante las primeras etapas de desarrollo de las yemas florales, cuando la humedad es elevada y temperatura moderada, predominan las bacterias, mientras que durante las etapas de floración, cuaje

y crecimiento de los frutos, aumenta la población de levaduras y se reduce la de bacterias (Blakeman, 1985). Finalmente durante la maduración, existe un predominio significativo de levaduras y hongos filamentosos (Blakeman, 1991).

El crecimiento de los microorganismos epífitos necesita de los nutrientes que salen de los tejidos (heridas en hojas, frutos, por ejemplo), como así también de fuentes externas, como depósitos de polen, desechos orgánicos y exudados azucarados producidos por insectos (psílidos, pulgones) (Janisiewicz *et al.*, 2010). La presencia de estos compuestos proporciona la base alimenticia para que microorganismos saprófitos y parásitos puedan establecerse sobre el hospedante.

De acuerdo a algunos estudios las levaduras basidiomicéticas como *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *Rh. minuta*, *Rh. glutinis* y *S. roseus*, como así también *A. pullulans*, son las que colonizan principalmente las hojas, flores, frutos y otras superficies aéreas de la planta. Sin embargo, estas poblaciones cambian de acuerdo a la temporada a lo largo del año, especialmente durante la maduración de los frutos. En esta etapa, levaduras como *Hanseniaspora spp* y *Metschnikowia spp* (ascomicéticas) son las predominantes en la superficie de los frutos (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004).

Poco se conoce aun acerca de la ecología microbiana sobre la superficie de los frutos (Janisiewicz *et al.*, 2010). Estos son ricos en nutrientes (azúcares, compuestos nitrogenados, vitaminas) y poseen un elevado contenido de humedad, lo cual los hace un hábitat favorable para el desarrollo de levaduras y mohos. Como se mencionó previamente, las comunidades de levaduras forman parte de la microbiota natural, y las poblaciones y proporciones relativas de las especies presentes varían de acuerdo al tipo de fruto, y son altamente influenciadas por las condiciones del medio ambiente durante su crecimiento en la planta, la cosecha y el ambiente de conservación (Dennis & Buhagiar, 1980). En el mismo sentido, las especies de levaduras presentes, difieren según la zona geográfica y las condiciones climáticas donde se cultiva la fruta, los cultivares utilizados, el tipo de manejo del cultivo, y la etapa de maduración del fruto al momento de la recolección (Davenport, 1976; Doores, 1983). En la Tabla 10 se indican algunas de las levaduras que pueden aislarse con mayor frecuencia a partir de frutos de pepita (peras y manzana).

La microbiota de los frutos se puede clasificar en principal y secundaria. La primera (estable) está conformada por los organismos adheridos a la superficie, mientras que la secundaria es más variable y se trata de aquellos organismos que llegan a la superficie de los frutos a través de vectores como insectos, partículas de polvo, etc. La distribución de las levaduras en los frutos se limita principalmente a la superficie y en muy pocas ocasiones ingresan a su interior (Doores, 1983).

Tabla 10. Diversidad de levaduras aisladas de frutos de manzanas y peras antes de ser procesados y almacenados.

Especie	Hospedantes	Referencia
<i>Candida oleophila</i>	Pera	Pellicia <i>et al.</i> , 2011.
<i>Candida stellata</i>	Manzana	Davenport, 1976.
<i>Cryptococcus albidus</i>	Manzana, pera	Davenport, 1976; Doores, 1983; Chand-Goyal & Spotts, 1996; Pellicia <i>et al.</i> , 2011.
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Pera	Chand-Goyal & Spotts, 1996.
<i>Debaromyces hansenii</i>	Manzana, pera	Davenport, 1976; Doores, 1983; Chand-Goyal & Spotts, 1996,
<i>Galactomyces candidus</i>	Manzana, pera	Vadkertiová <i>et al.</i> , 2012
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Manzana, pera	Davenport, 1976; Doores, 1983; Pellicia <i>et al.</i> , 2011; Vadkertiová <i>et al.</i> , 2012.
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Pera	Pellicia <i>et al.</i> , 2011.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Manzana	Davenport, 1976; Doores, 1983; Vadkertiová <i>et al.</i> , 2012.
<i>Pichia anomala</i> (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)	Manzana, pera	Davenport, 1976; Pellicia <i>et al.</i> , 2011.
<i>Pichia membranifaciens</i>	Manzana, pera	Vadkertiová <i>et al.</i> , 2012
<i>Pichia kluyveri</i>	Pera	Pellicia <i>et al.</i> , 2011.
<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	Pera	Chand-Goyal & Spotts, 1996.
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Manzana, pera	Davenport, 1976; Chand-Goyal & Spotts, 1996; Gildemacher <i>et al.</i> , 2006; Pellicia <i>et al.</i> , 2011.
<i>Rhodotorula minuta</i>	Pera	Chand-Goyal & Spotts, 1996.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Manzana, pera	Davenport, 1976, Vadkertiová <i>et al.</i> , 2012.
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	Manzana, pera	Vadkertiová <i>et al.</i> , 2012.
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Manzana, pera	Davenport, 1976; Chand-Goyal & Spotts, 1996; Gildemacher <i>et al.</i> , 2006.
<i>Zigosaccaromyces bailli</i>	Manzana, pera	Davenport, 1976; Vadkertiová <i>et al.</i> , 2012.

A medida que progresa la estación de crecimiento, la microbiota de los frutos va sufriendo cambios asociados al flujo de nutrientes; se incrementan los contenidos de hidratos de carbono, compuestos nitrogenados y el pH (Janisiewicz & Buyer, 2010). Asimismo, Doores (1983) diferencia una microbiota de levaduras en el huerto, otra en las instalaciones de procesamiento y otra en el almacenamiento para frutos de manzana. En la búsqueda de ACB para el control de las enfermedades de postcosecha de los frutos, la microbiota de éstos sitios ha sido la principal fuente de antagonistas, alcanzando algunos de ellos formulaciones comerciales como las mencionadas anteriormente: Aspire, Yield Plus, Shemer, Candifruit y Nexy.

La selección de antagonistas a partir de la microbiota residente de la fruta, presentaría ventajas ecológicas sobre organismos provenientes de otros sitios u órganos de la planta (Janisiewicz *et al.*, 2010).

7.3 Las levaduras como ACB

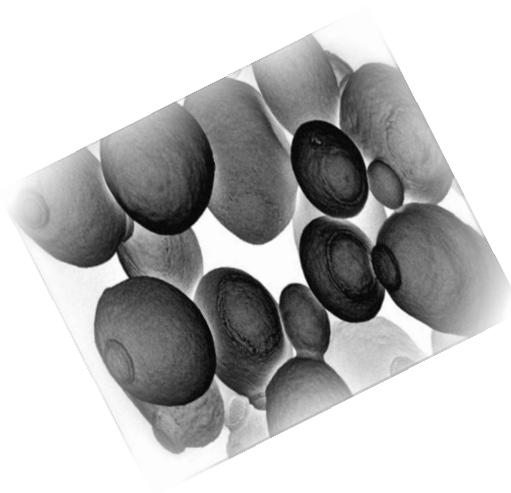
Las levaduras propias de los frutos, son los microorganismos ideales para ser utilizados en los programas de Control Biológico debido a que:

- Pueden ser aisladas de los mismos alimentos que se quieren preservar;
- Pueden utilizar un amplio rango de nutrientes y muchas pueden crecer en condiciones de baja actividad de agua (a_w), bajos niveles de oxígeno y baja temperatura;
- Tienen una proporción favorable de la relación superficie/volumen con respecto a las bacterias, esto les permite utilizar de forma más rápida los nutrientes disponibles, favoreciendo la colonización. En este sentido, las heridas constituyen el hábitat perfecto para las levaduras, por ser ricas en nutrientes, bajo pH y alta humedad.
- Son genéticamente estables y efectivas en bajas cantidades;
- Tienen capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas
- Producen grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que intensifican su supervivencia.
- Son aceptadas por el consumidor, más fácilmente que las bacterias.
- Son relativamente fáciles de producir y mantener en condiciones de laboratorio e industrialmente;
- Presentan características fisiológicas que permiten su manipulación para mejorar sus usos y eficiencia;
- No son patógenas para los humanos;

- No producen esporas alergénicas, micotoxinas u otros metabolitos secundarios que puedan comprometer la salud humana.

Sumado a estas características, algunos autores indican que el uso de la ingeniería genética y otras herramientas de manipulación de ADN podrían, en un futuro próximo, incrementar el uso de las levaduras como ACB de las frutas y otros alimentos, y además para agregar sabores deseables, más altos contenido de nutrientes y propiedades probióticas a los alimentos (Pimienta *et al.*, 2009).

FUNDAMENTACIÓN



La región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, es la principal área productora de frutales de pepita de la Argentina. Durante la conservación postcosecha, ocurren importantes pérdidas económicas causadas por el deterioro de la fruta.

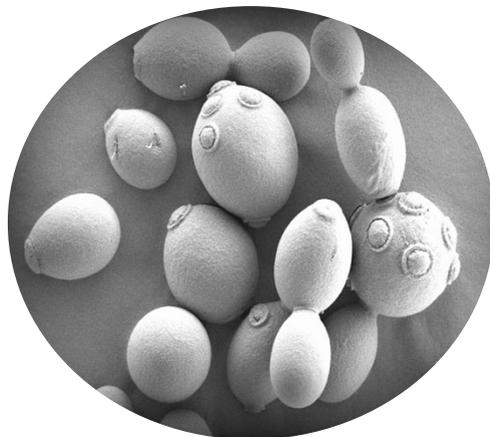
Las podredumbres de la fruta en cámaras de conservación son causadas principalmente por hongos filamentosos como *Penicillium spp.* y *Botrytis cinerea*, cuyo control se realiza fundamentalmente por medio del agregado de compuestos antifúngicos de síntesis, o bien, acortando los períodos de conservación para evitar dichas pérdidas, obteniendo por esta fruta menor valor de mercado.

Los compuestos antifúngicos tradicionalmente aplicados presentan limitaciones debido a que son perjudiciales no solo para la salud humana, sino que también para el medio ambiente y favorecen la aparición de cepas fúngicas resistentes. A ello se le suma, el número reducido de principios activos permitidos por los países compradores de nuestra fruta. La aplicación de microorganismos antagonistas como controladores de patógenos postcosecha es una alternativa en auge a nivel mundial con resultados muy promisorios.

Regionalmente faltan alternativas eco-compatibles para el control de este tipo de patógenos, cuya superación implica un desafío científico-tecnológico. Específicamente en lo que respecta a los sistemas de control basados en microorganismos antagónicos no existe ningún precedente local.

Para el desarrollo de un exitoso programa de control biológico es fundamental un adecuado esquema de aislamiento y selección de antagonistas. Cuanto más similares a las condiciones reales en las cuales se deba desarrollar el antagonismo se realicen los ensayos, mayores serán las posibilidades de éxito del mismo. Es así que la superficie de la fruta almacenada es el soporte principal de una comunidad microbiana adaptada (-1/0°C y 95% HR) que comprende diferentes especies de levaduras, bacterias y hongos filamentosos, donde es posible encontrar y seleccionar organismos regionales con capacidad antagónica.

HIPÓTESIS
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS ESPECÍFICOS



HIPOTESIS

Las levaduras aisladas a partir de la fruta sana almacenada a $-1/0^{\circ}\text{C}$, y seleccionadas en base a su actividad antagonica *in situ* y a sus mecanismos de acción *in vitro*, permitirán desarrollar un sistema efectivo de control biológico que permita disminuir la incidencia de enfermedades fúngicas de postcosecha en pera y por lo tanto reducir el empleo de fungicidas de síntesis y constituir una herramienta sustentable para el manejo regional de la fruta en conservación.

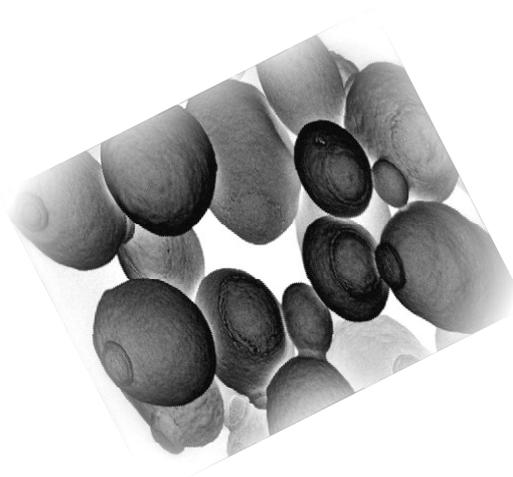
OBJETIVO GENERAL

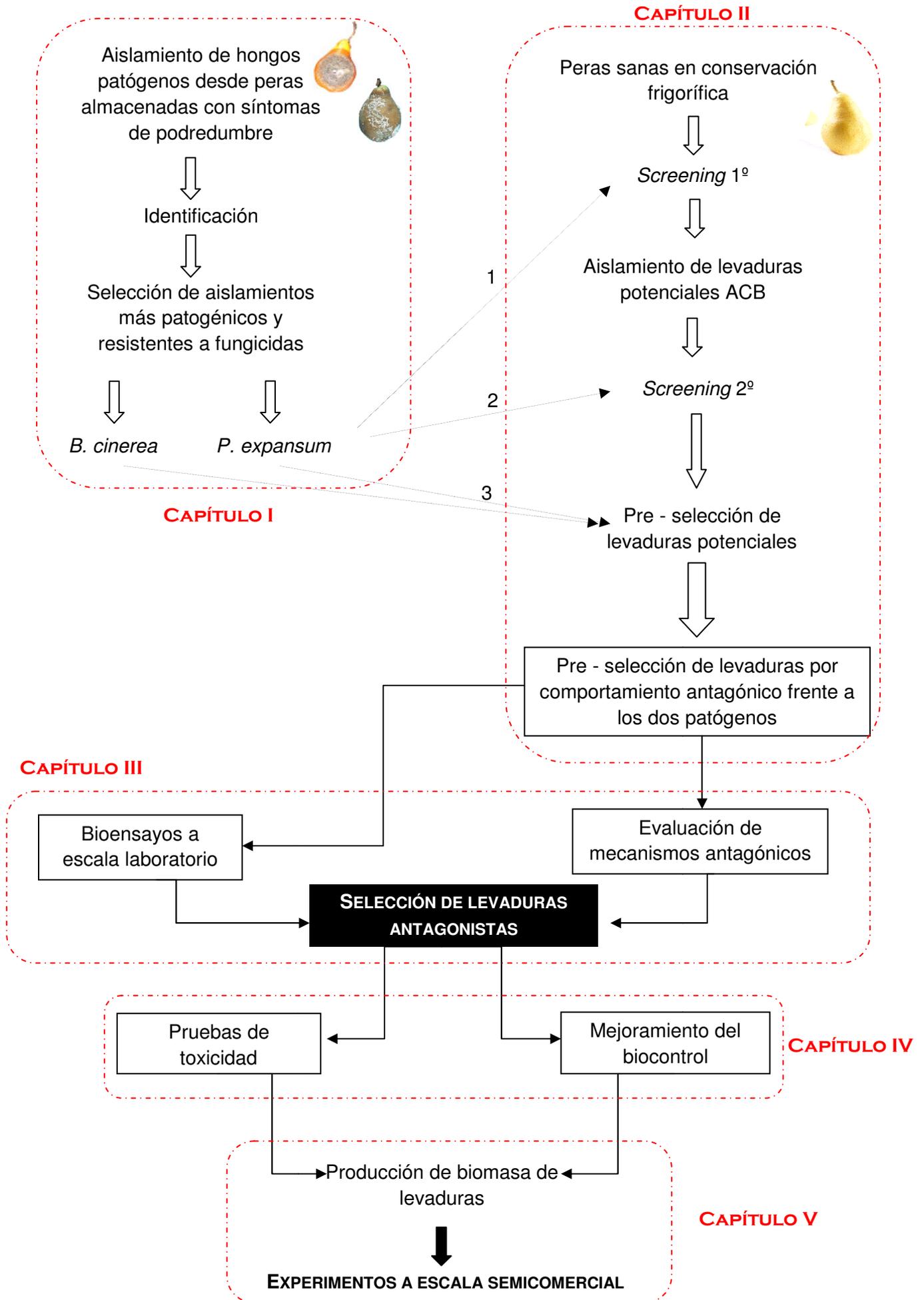
Desarrollar un sistema de biocontrol para los principales agentes patógenos (hongos filamentosos) de la postcosecha de peras, basado en el uso de levaduras indígenas de la Patagonia. Al llevar a cabo el aislamiento de las levaduras antagonicas a partir del mismo hábitat en que deben actuar y que la selección se realizará frente a cepas locales de los organismos patógenos a controlar, se pretende finalmente obtener un producto de origen nacional con mejor potencial y efectividad que los importados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar hongos patógenos y levaduras epifíticas a partir de peras conservadas en cámaras frigoríficas de la región.
- Caracterizar los aislamientos de hongos obtenidos en base a su virulencia y resistencia a diferentes fungicidas.
- Desarrollar una estrategia de selección de levaduras antagonistas en base a su capacidad biocontroladora en condiciones de conservación.
- Caracterizar algunos de los mecanismos de acción involucrados en la capacidad antagonica de las levaduras seleccionadas.
- Evaluar la efectividad de la levadura como agente de biocontrol en escala semicomercial.
- Conservar y preservar la biodiversidad microbiana de levaduras y hongos filamentosos de la región Patagónica.

ESQUEMA GENERAL DE
DESARROLLO DE TESIS





CAPITULO I

ÁISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE HONGOS PATÓGENOS



INTRODUCCIÓN

Penicillium expansum Link ex Thom y *Botrytis cinerea* Pers. Fr. son los agentes causales de las enfermedades moho azul y moho gris, que generan significativas pérdidas en la postcosecha de peras y manzanas en todas las regiones en las cuales se producen, procesan y almacenan estos frutos (Lennox *et al.*, 2003; Mari *et al.*, 2003; Sholberg *et al.*, 2005; Dobra *et al.*, 2008; Cabañas *et al.*, 2009). Para producir la enfermedad en los frutos, tanto *P. expansum* como *B. cinerea*, primero deben ingresar al mismo. El ingreso del hongo al fruto se realiza a través de heridas, las infecciones del tipo latente no juegan un rol importante en la epidemiología de dichos patógenos (Spotts, 1985). En las dos enfermedades la infección se inicia a través de las lesiones de la piel de la fruta, cáliz o pedúnculo (Adaskaveg *et al.*, 2006; Dobra *et al.*, 2008).

La sintomatología del moho azul (ocasionado por *P. expansum*) se inicia con manchas claras, aguanosas y circulares de tamaño variable, que con el tiempo toman una coloración castaña, de consistencia blanda y húmeda, con excesiva liberación de agua. En general, sobre la podredumbre se desarrolla un micelio blanco que luego se torna verde-azulado, debido al desarrollo de las estructuras reproductivas asexuales del patógeno (Figura 1A). La podredumbre se caracteriza por ser de rápida evolución en frutos maduros (Agris, 2005).

La podredumbre ocasionada por *B. cinerea* (moho gris) se caracteriza por ser de color marrón claro con contorno neto e irregular y presentar consistencia húmeda firme. En frutos afectados expuestos a la luz, sobre la superficie de la podredumbre se desarrolla un fieltro gris denso, que está constituido por las estructuras reproductivas del hongo (moho gris) (Figura 1B). En ciertas oportunidades, se suelen observar sobre la podredumbre, cuerpos negros, redondeados, duros, que son estructuras de resistencia del hongo denominadas esclerocios.

P. expansum es el principal agente causal del moho azul en las podredumbres postcosecha de peras y manzanas almacenadas (Dobra *et al.*, 1995). En la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, le seguirían en importancia las especies de *Penicillium crustosum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium echinulatum* y finalmente *Penicillium wacksmanii*. En otras regiones como la costa del Pacífico de los Estados Unidos, también *P. expansum* es el principal patógeno de peras y manzanas, le siguen en importancia *Penicillium solitum*, *Penicillium commune* y *Penicillium aurantiogriseum* (Sanderson & Spotts, 1995). Es así, que distintas especies de

Penicillium pueden estar implicadas en las podredumbres postcosecha (Barkai-Golan, 1974; Holmes 1990; Rosenberger *et al.*, 1991; Dobra *et al.*, 1995; Shim *et al.*, 2002; Pianzola *et al.*, 2004; Amiri & Bompix, 2005; Dobra *et al.*, 2008). Otras de las especies citadas para pomáceas son *Penicillium verrucosum* (Penrose *et al.*, 1984; Amiri & Bompix, 2005), *Penicillium griseofulvum* (Sanderson & Spotts, 1995) y *P. chrysogenum* (Amiri & Bompix, 2005).



Figura 1. Podredumbre ocasionada por *P. expansum* (A) y *B. cinerea* (B), en peras Beurré D'Anjou, luego de 6 meses de conservación frigorífica.

Penicillium es un género complejo, con más de 150 especies, de las cuales muchas pueden presentar similar morfología. A su vez, dentro de muchas especies existe una gran variabilidad, y al menos 1.000 fenotipos reconociblemente diferentes, pueden ser catalogados; debido a la variabilidad inherente al género, sólo entre el 70 al 80% de los aislamientos, son fácilmente identificables (Pitt, 1988). Numerosas técnicas han sido descritas para la identificación de las distintas especies de *Penicillium*. Entre las más antiguas, y no por ello en desuso, se encuentran las que se basan fundamentalmente en el uso de las características microscópicas, tipo de crecimiento y morfología de las colonias (Pitt, 1979; Frisvad *et al.*, 1983). Sin embargo, algunos autores han demostrado que varias de estas características son muy variables y que los criterios morfológicos no siempre permiten la clasificación inequívoca (Frisvad *et al.*, 1981; Frisvad *et al.*, 1983; Pitt, 1988). Es así que se proponen otras técnicas para la identificación como los zimogramas de isoenzimas (Cruickshank & Pitt, 1987), la detección de actividad enzimática específica (Jiménez *et al.*, 1990) y el perfil de micotoxinas producido (Frisvad & Filtenborg, 1989). La identificación a través de estas técnicas es laboriosa y en general lleva mucho tiempo (Pianzola *et al.*, 2004;

Sholberg *et al.*, 2005). Actualmente, la caracterización genotípica por métodos moleculares resuelve con certeza y rápidamente la identidad de las distintas especies de *Penicillium* (Chen *et al.*, 1999; Dupont *et al.*, 1999; Soll, 2000). Entre los métodos moleculares más utilizados se encuentran la técnica basada en PCR-RFLP (Dupont *et al.*, 1999; Pianzola *et al.*, 2004; Florez *et al.*, 2007), la secuenciación de total o parcial de genes, como por ejemplo del gen que codifica para la región Bt2 de la β tubulina (Seifert & Louis-Seize, 2000).

El género *Botrytis* es uno de los géneros de patógenos más cosmopolitas; comprende 22 especies consideradas especialistas con un estrecho rango de hospedantes (Hennebert, 1973). *B. cinerea*, agente causal del moho gris, es capaz de afectar a más de 200 hospedantes, especialmente en tejidos senescentes, debilitados o heridos (MacFarlane, 1968). Para el género *Pyrus*, incluyendo *Pyrus communis* L. y *Pyrus pyrifolia* Nak (Coley-Smith *et al.*, 1980; Farr *et al.*, 1989), es la única especie del género reportada como capaz de ocasionar podredumbres postcosecha a nivel mundial (Jarvis, 1977; Coley-Smith *et al.*, 1980; Xiao, 2006). La determinación de las especies de *Botrytis*, se ha basado tradicionalmente en el análisis de las características morfológicas, tanto de aspectos micro como macroscópicos (Jarvis, 1977; Khazael *et al.*, 2010).

El origen de las enfermedades de postcosecha es discutido. De acuerdo a Lennox *et al.* (2003), existe una correlación positiva entre los niveles poblacionales de *B. cinerea* y *Penicillium* spp sobre la superficie de la fruta y la incidencia de las enfermedades causadas por estos hongos. De esta manera, los autores sugieren que esta variable podría utilizarse como predictor de podredumbres. Sin embargo, no descartan que el inóculo presente en el ambiente de conservación, contribuya también a la epidemiología de los patógenos. Asimismo, varios autores coinciden en que un número considerable de conidios proveniente de frutas infectadas se dispersa en el agua del hidromersor en el ingreso de la fruta al empaque, y esta agua se convierte en la fuente de contaminación de frutos sanos (Spotts & Cervantes, 1986; Sanderson & Spotts, 1995; Lennox *et al.*, 2003; Sholberg, 2004).

El ambiente controlado de la planta de empaque es el sitio donde se realizan distintos tratamientos a la fruta. Entre estos tratamientos se encuentra la aplicación de fungicidas para el control de hongos que producen podredumbres postcosecha (Lennox *et al.*, 2003). Los fungicidas tradicionalmente utilizados en las líneas de empaque de diferentes lugares del mundo y la región son captan (phtalimida) y TZB (benzimidazol) (Lennox *et al.*, 2003; Dobra *et al.*, 2007). En este sentido, *B. cinerea* y *P. expansum* se caracterizan por ser patógenos de alto riesgo de desarrollo de resistencia a los fungicidas, fundamentalmente por su corto ciclo de vida, alta tasa

reproductiva y en consecuencia alta variabilidad genética que pueden desarrollar (Brent & Hollomon, 1998; Leroux *et al.*, 2002).

En particular, el mecanismo de acción del fungicida tiabendazol (TBZ), radica en inhibir la polimerización de microtúbulos de β tubulina (Davidse, 1986). La aparición de cepas de *B. cinerea* y *P. expansum* resistentes al TBZ (Spotts & Cervantes, 1986; Dobra y Rossini, 1993; Cabañas *et al.*, 2009) se ha asociado a la presencia de mutaciones en el gen de la β tubulina, que alteran la secuencia de aminoácidos en el sitio de unión del grupo químico de los benzimidazoles al cual pertenece el TBZ (Davidse, 1986).

Captan es un fungicida que actúa evitando la germinación de las esporas de los hongos. Su modo de acción involucra varios blancos o dianas en las células fúngicas, lo cual evita que los hongos desarrollen resistencia a este principio activo. No obstante, la aplicación de este fungicida como único principio activo no proporciona la protección adecuada a la fruta herida en aplicaciones por aspersión en la línea (Rosenberger, 2009).

En la actualidad, el uso de fungicidas como los mencionados en los párrafos precedentes es cuestionado debido a factores tales como: i) la aparición de numerosas cepas de patógenos resistentes, ii) las restricciones impuestas por los distintos mercados compradores sobre los principios activos permitidos y residuos tolerados y iii) el incremento paulatino del sector consumidor que pretende el consumo de productos más inocuos y amigables con el medio ambiente (Mari *et al.*, 2003). Por todo ello, la tendencia es a la reducción en el uso de estos productos químicos y el incremento de los productos controladores de base biológica (control biológico).

El objetivo central de este Capítulo fue la identificación y selección de un aislamiento de cada una de las dos especies patógenas más importantes de pera, *P. expansum* y *B. cinerea*, para ser utilizados en futuros ensayos de selección de levaduras biocontroladoras. La selección se llevó a cabo a través de dos evaluaciones fenotípicas: patogenicidad y sensibilidad/resistencia a fungicidas.

Es importante mencionar, que la estrategia de búsqueda de ACB desarrollada en esta tesis, se llevó a cabo a partir de fruta de dos situaciones productivas distintas: de transición (de tratamiento convencional -con uso de plaguicidas- a orgánico, sin utilización de productos de síntesis química hace menos de 3 años) y de producción orgánica (sin utilización de sustancias de síntesis química por más de 3 años). Esta estrategia se estableció con el objetivo de encontrar la mayor diversidad de levaduras nativas a partir de fruta. Por su parte, los patógenos también fueron aislados desde fruta de la misma procedencia.

MATERIALES

1. Material vegetal

Frutos de peras de producción orgánica y de transición de los cultivares Beurré D'Anjou y Packham's Triumph conservados en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95 %HR).

2. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento, crecimiento e identificación de hongos filamentosos

Todos los medios de cultivo utilizados en este Capítulo fueron realizados con agua destilada y esterilizados por vapor saturado a presión en autoclave a 120°C y 2 atmósferas por 20 min.

Agar Papa Dextrosa (APD): Se utilizó la formulación sólida en polvo de Laboratorios Britania, según especificaciones del producto (39 g/L). Para inhibir el crecimiento bacteriano en los aislamientos desde tejido vegetal enfermo se añadió 100 mg/L de cloranfenicol al medio de cultivo.

Czapek Yeast Autolysate (CYA) agar (Pitt, 1979). Medio selectivo para la identificación del género *Penicillium*. Composición: NaNO₃ 3 g/L; extracto de levadura 5 g/L; sacarosa 30 g/L; K₂HPO₄·3H₂O 1,3 g/L; MgSO₄·7H₂O 0,5 g/L; KCl 0,5 g/L; FeSO₄·7H₂O 0,01g/L; CuSO₄·5H₂O 0,005 g/L; ZnSO₄·7H₂O 0,01 g/L; agar 15 g/L. pH 6,3 ± 0,2.

Creatine sucrose (CREA) agar (Frisvad, 1981, 1985, 1993). Medio selectivo para la identificación del género *Penicillium*. Composición: creatina·1H₂O 3 g/L; sacarosa 30 g/L; K₃PO₄·7H₂O 16 g/L; MgSO₄·7H₂O 0,5 g/L; KCl 0,5 g/L; FeSO₄·7H₂O 0,01 g/L; CuSO₄·5H₂O 0,005 g/L; ZnSO₄·7H₂O 0,01g/L; bromocresol púrpura 0,05 g/L; agar 15 g/L. pH 8 ± 0,2.

Yeast extract sucrose (YES). Medio líquido para crecimiento de micelio y extracción de DNA. Composición: extracto de levadura 20 g/L; sacarosa 15 g/L.

3. Medios de conservación de hongos filamentosos. En APD, en tubos pico de flauta y solución de glicerol 20% (v/v).

4. Insumos de biología molecular

- Taq ADN polimerasa. Promega.

- **Primer ITS I** (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') - **ITS 4** (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Biosynthesis Company
- **Marcadores de peso molecular** de 100 y 50 pb. Fermentans
- **Endonucleasa de restricción *Hinf* I.** Roche
- **Agarosa** Biodynamics
- **Agua miliQ.** Merk
- **Bromuro de etidio.** Sigma

Soluciones para extracción de ADN y electroforesis:

- **Acetato de potasio (5M/3M):** a 60 mL de solución AcK 5M se le añade ácido acético glacial hasta llegar a pH 4,8 y se lleva a 100 mL con H₂O destilada.
- **Buffer lisis:** 100mM Tris, 20 mM EDTA, 250 mM NaCl, 2% (p/v) SDS
- **Buffer TE:** Tris - HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.
- **Solución reguladora TAE:** 45 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.

5. Reactivos y fungicidas

- **Cloranfenicol.** Farmacéuticos unidos.
- **Reactivo de Ehrlich.** 4-dimetilaminobenzaldehido 20 g/L; etanol 96% (v/v) 850 mL; ácido clorhídrico 37% (v/v) 150 mL.
- **2- (4-tiazolil-benzimidazol).** Tecto® 500 SC. Syngenta
- **N-(triclorometiltio) ciclones-4-ene-1,2-dicarboximida.** Captan® 80 W. (S. Ando & Cía.S.A.).

M E T O D O S

1. Aislamientos

El aislamiento de los patógenos se realizó desde frutos de pera con 6-7 meses de conservación frigorífica, con síntomas del moho azul o moho gris ocasionadas por *P. expansum* y *B. cinerea*, respectivamente. Los aislamientos se realizaron de los dos

cultivares de pera a partir de porciones de tejido afectado desde la zona de avance de la podredumbre en agar papa dextrosa (APD) suplementado con cloranfenicol (100 mg/L). Los cultivos se incubaron de 7 a 10 días a 25°C, se obtuvieron los cultivos puros y posteriormente los cultivos monospóricos, los cuales fueron mantenidos en APD a 4°C en la Colección de Cultivos de la Patagonia Norte (North Patagonian Culture Collection, NPCC). Para mantener la virulencia de los cultivos se realizaron reinoculaciones y reaislamientos periódicos en frutos (Figura 2).

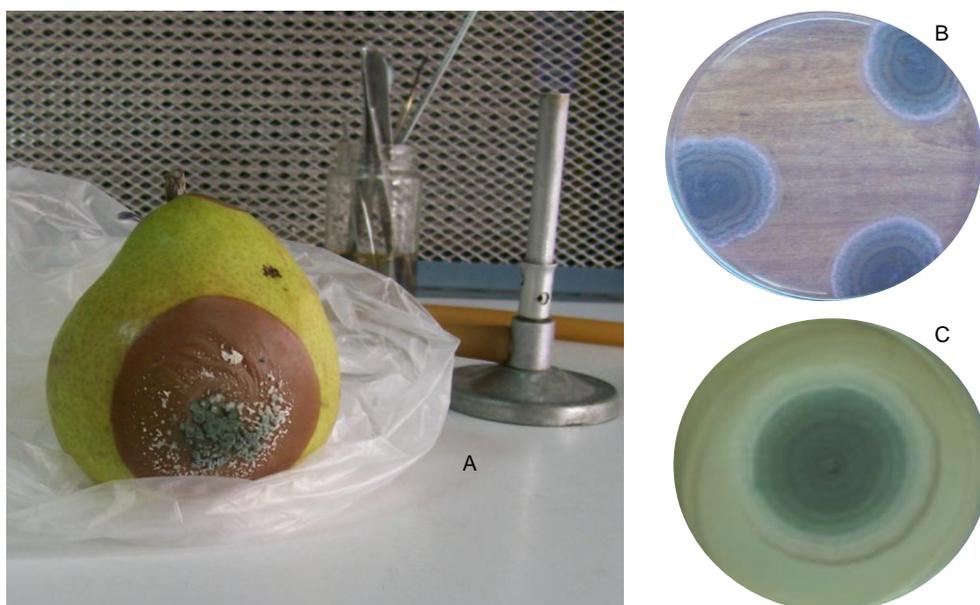


Figura 2. Podredumbre ocasionada por *P. expansum* (A), aislamientos obtenidos a partir de trozos de tejido de la zona de avance (B) y cultivo monospórico del patógeno(C).

2. Identificación

2.1 Especies de *Penicillium*

2.1.1 Morfológica y fisiológica

Para la identificación de los aislamientos de *Penicillium* se utilizaron los medios *Czapek yeast autolysate agar* (CYA) y *creatine agar* (CREA). Cada aislamiento se inoculó en placas de Petri conteniendo los mencionados medios de cultivo. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 7-14 días. Se describieron aspectos morfológicos y fisiológicos generales (Pitt 1988; Frisvad & Samson, 2004). La producción de metabolitos básicos fue evaluada en CREA luego de 8 y 15 días de incubación. El cambio de color de violeta a amarillo del medio se consideró como positivo para la producción de ácidos.

Con fines comparativos se añadieron cepas de referencia de distintas especies de *Penicillium* del Agricultural Research Service Northern Regional Research Laboratory (NRRL): *P. crustosum* NRLL 35178, *P. brevicompactum* NRLL 2011 y *P. viridicatum* NRLL 961.

2.1.2 Producción de metabolitos del indol

Se utilizó el método propuesto por Lund (1995) como prueba complementaria para la determinación de las especies de *Penicillium*. Se examinó la producción (+) de ácido ciclopiazónico y otros alcaloides que reaccionan con el reactivo de Ehrlich. Los aislamientos se inocularon en los medios CREA y CYA, y los resultados se analizaron luego de 7 y 14 días de incubación a 25°C. Trozos de papel de filtro estériles fueron inmersos en el Reactivo de Ehrlich y colocados sobre la zona central de discos de agar de 6 mm obtenidos de cada aislamiento, previamente extraídos asepticamente de ambos medios de cultivo. El color de halo producido sobre el papel de filtro se evaluó luego de 2 a 10 min (Figura 3).

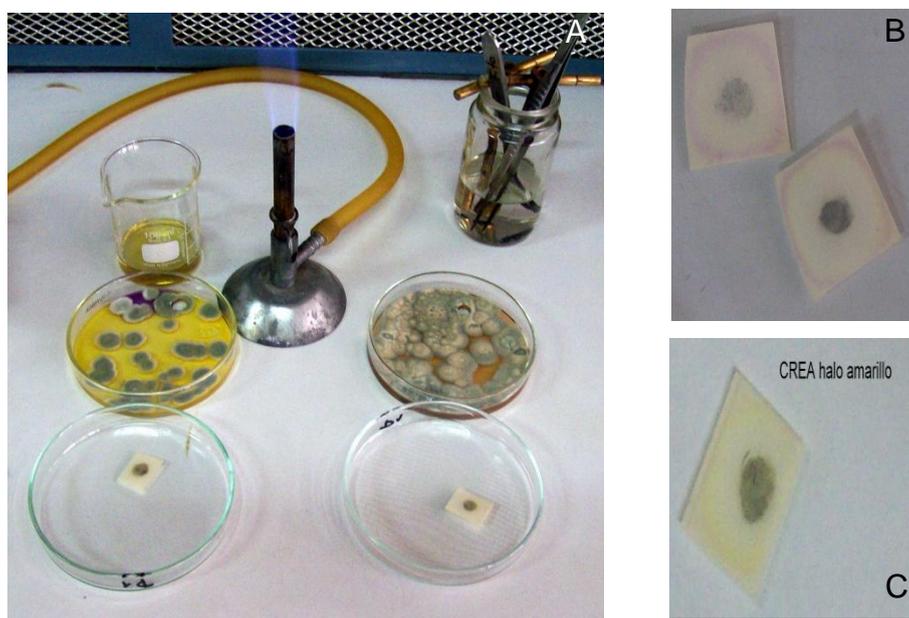


Figura 3. A) Placas de *P. expansum* crecidos en CREA y CYA y discos de cultivos cubiertos por papel del filtro estéril embebido en el reactivo de Ehrlich (Vaso de precipitado). B y C) Detalle de halos (violetas y amarillo) producidos luego de incubación.

2.2.3 Identificación Molecular

Para confirmar la identidad a nivel de especie obtenida por métodos morfo-fisiológicos se utilizó el método molecular de restricción de los fragmentos de ITS1-5.8s ADN-ITS2 PCR-RFLP, de acuerdo a lo propuesto Pianzola *et al.* (2004).

2.2.3.1 Extracción ADN

Para la extracción de ADN de cada aislamiento, se procedió de acuerdo al siguiente protocolo:

- Se hizo crecer el micelio del aislamiento en medio líquido YES.
- Se tomó el micelio con una espátula estéril y se lo secó en papel absorbente estéril.
- El micelio seco se colocó en un tubo de base redondeada.
- Sobre el micelio se colocó nitrógeno líquido y se molió con una varilla de vidrio estéril hasta que el micelio quedó pulverizado totalmente.
- Se colocaron 500 µL de buffer de lisis, se agitaron e incubaron por una hora a 65°C.
- Se añadió 200 µL de acetato potásico 5 M
- Los tubos con el micelio, buffer y acetato potásico se dejaron en hielo durante 10 min.
- Las muestras se centrifugaron a 20800 g durante 15 min a 4°C.
- El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos, y se mantuvo 15 min a -20°C. Luego se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente.
- Una vez centrifugadas, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf con 700 µL de isopropanol.
- Las muestras se agitaron suavemente y se mantuvieron a temperatura ambiente 10 min.
- Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 20800 g durante 10 min.
- El sobrenadante obtenido se eliminó, y sin resuspender el precipitado, se agregaron 500 µL de etanol al 70% (v/v)
- Se centrifugó nuevamente a 20800 g durante 10 min.
- Se repitió el paso 13 y 14.
- De las muestras centrifugadas se volvió a eliminar el sobrenadante y los restos del alcohol, con ayuda de una bomba de vacío.
- Las muestras en los tubos se colocaron en estufa a 37°C durante 15-30 min aproximadamente.
- Al precipitado seco se le agregó 20 µL de H₂O mQ estéril y se dejó en heladera por 30-60 min y luego se resuspendió.
- Las muestras se conservaron a -20°C durante 12 horas.
- El precipitado se resuspendió con pipeta varias veces.

- Finalmente se efectuó una corrida electroforética en un gel de agarosa 1% con 3 μL de muestra y 2 μL de colorante, a voltaje constante de 100 V. El gel se reveló utilizando tinción con bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 min y observación de bandas por exposición a luz UV. Se fotografió el gel obtenido con equipo de fotografía Kodak (Figura 4)
- Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

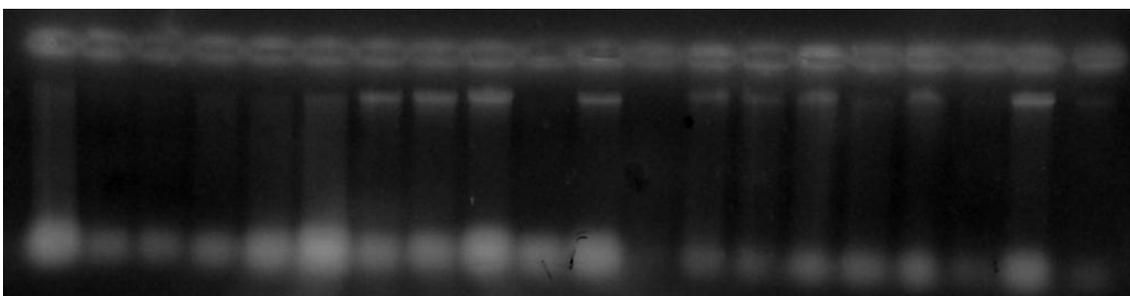


Figura 4. Bandas de ADN en gel de agarosa al 1%.

Los rendimientos de extracción de ADN se determinaron por la relación entre la densidad óptica de la muestra a 260 nm y la obtenida a 280 nm.

2.2.3.1 Amplificación de segmentos por la reacción en cadena de la polimerasa

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región ITS1-5.8s ADN_r-ITS4 en termociclador PTC-0150 Minicycler MJ Research Incorporated. Para la amplificación de los fragmentos, se utilizaron los cebadores ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), previamente descritos por White *et al.* (1990).

Las amplificaciones se llevaron a cabo como se detalla a continuación:

- Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación: 0,3 μL de solución de cada primer (50 μM), 5 μL de una solución de deoxinucleótidos (1 mM), 5 μL de solución reguladora para Taq ADN polimerasa, 0,4 μL de Taq ADN polimerasa (1 U/ μL) y 31 μL de agua miliQ.
- Se tomaron 5 μL de ADN diluido (1/100 en H_2O mQ), extraído de acuerdo al ítem anterior, y se les añadieron a 45 μL de la mezcla de amplificación.
- Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo (94°C 5 min), 40 ciclos (94°C 1 min; 55°C 2 min; 72°C 2 min) y 1 ciclo (72°C 10 min).

- Del producto de amplificación obtenido, se tomaron 5 µl que se sembraron en un gel de agarosa 1,5% (p/v) en la solución reguladora TAE. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 V) en solución reguladora TAE. Se reveló utilizando la misma metodología descrita anteriormente. Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de 100-pb de ácido desoxiribonucleico (ADN).
- El volumen restante se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.2.3.1 Restricción del producto de PCR

El producto de amplificación del ADN de cada muestra (15 µL o 0,5-10 µg) se digirió a 37°C sin previa purificación utilizando la endonucleasa de restricción *Hinf I*, de acuerdo a lo que establece Pianzola *et al.* (2004). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 3% (p/v) en solución TAE a voltaje constante (100 V). Se reveló utilizando la misma metodología descrita anteriormente. Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de 100-pb de ácido desoxiribonucleico (ADN). Los patrones de restricción obtenidos fueron comparados con los obtenidos por Pianzola *et al.* (2004).

2.2 Botrytis cinerea

2.2.1. Morfológica

Los cultivos monospóricos de *B. cinerea* se identificaron a través de las características macro y micro-morfológicas de los cultivos en APD de acuerdo a Jarvis (1977), Howard *et al.* (1992) y Ellis (2004). El aspecto general de la colonia, textura, color y tipo de desarrollo fueron evaluados. La longitud de los conidióforos y dimensión conidios fueron medidos. El largo y ancho de 100 conidios de cada aislamiento se midieron en microscopio óptico.

3. Caracterización fenotípica y selección de microorganismos

Con el objetivo de seleccionar un aislamiento de cada especie de patógeno para ser utilizados en estudios posteriores, se evaluó la patogenicidad y la sensibilidad/resistencia a fungicidas de todos los aislamientos de *P. expansum* y de *B. cinerea*. Se utilizaron los fungicidas tradicionalmente empleados en la postcosecha de la fruta de pepita: Tecto (TBZ) y Captan.

3.1 Determinación de la patogenicidad

La patogenicidad de cada aislamiento se determinó *in situ* a través de la medición del diámetro de lesión (mm) provocada por el desarrollo del patógeno en peras heridas e inoculadas artificialmente. Para ello, frutos sanos de peras Packham's Triumph se lavaron y esterilizaron superficialmente con etanol al 70% (v/v). En la zona ecuatorial del fruto se realizaron heridas puntuales, utilizando un elemento punzante estéril (heridas de 3 mm de profundidad y 3 mm de diámetro). Los conidios de *P. expansum* se obtuvieron a partir de cultivos de 7 días desarrollados en APD en oscuridad a 20°C y los conidios de *B. cinerea* a partir de cultivos de 14 días en APD, incubados con períodos de luz-oscuridad de 12 h a 20°C. Las suspensiones conidiales se obtuvieron por raspado de la superficie de la colonia con escalpelo estéril, resuspensión en agua destilada estéril (ADE) y filtración a través de malla de tela estéril para eliminar restos de micelio. Las suspensiones se ajustaron a 10⁶ conidios/mL utilizando cámara de recuento (Neubauer) y 10 µL de cada suspensión se inocularon en las heridas de los frutos. Los frutos inoculados se colocaron en bandejas de cartón dentro de bolsas de polietileno y se incubaron a 10°C y 95% de humedad relativa (HR) por 60 días. La incidencia (%I) y el diámetro de lesión (severidad) de cada patógeno fueron evaluadas periódicamente. El %I fue determinado de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\%I = \frac{x - b}{x} \times 100$$

Donde:

%I: Incidencia de la enfermedad en porcentaje

x: Número de frutos inoculados

b: Número de frutos inoculados y enfermos

Finalmente se determinó el aislamiento más patogénico de acuerdo al diámetro de lesión ocasionado en los frutos (Figura 5) luego del período de incubación. Se utilizaron cinco frutos por cada aislamiento y tres repeticiones de cada experimento.



Figura 5. Medición del diámetro (severidad) de podredumbre en pera Packham's Triumph inoculada con *B. cinerea*.

3.2. Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas

Se evaluó *in vitro* la sensibilidad/resistencia de los aislamientos de *P. expansum* y *B. cinerea*, a los fungicidas de postcosecha tecto (TBZ) y captan. Para ello se agregaron concentraciones crecientes de las formulaciones comerciales de cada uno de los fungicidas a placas de Petri conteniendo 15 mL de medio de cultivo APD. Las concentraciones correspondieron a 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 5 y 1 mg/L de TBZ (tiabendazol) [2-(4-tiazolil)-1H-bencimidazol] (Pianzzola *et al.* 2004; Lima *et al.*, 2006) y 666, 333, 166, 88, 41, 20, 10, 5 y 1 mg/L de captan [N-(triclorometiltio) phtalimida]. Para el TBZ se consideró como dosis discriminadora de resistencia la establecida por la FRAC (10 mg/L). Se consideraron sensibles (S) a aquellos aislamientos que no fueron capaces de crecer en concentraciones entre 1 mg/L y 10 mg/L; moderadamente resistentes (R) a los que crecieron en concentraciones entre 10 mg/L y 50 mg/L; y altamente resistentes (RR) a los que se desarrollaron a más de 100 mg/L (Sholberg *et al.*, 2005). En cada placa, se sembraron 10 μ L de cada suspensión de 10^6 conidios/mL (Pianzzola *et al.*, 2004). Las placas se incubaron durante 72 h a 20°C en oscuridad y el crecimiento de los cultivos de los hongos se determinó visualmente (Figura 6). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Se estableció para cada fungicida y patógeno, la concentración inhibitoria mínima (CIM), la cual correspondió a la menor concentración de fungicida capaz de inhibir el crecimiento del hongo (Pianzzola *et al.*, 2004).

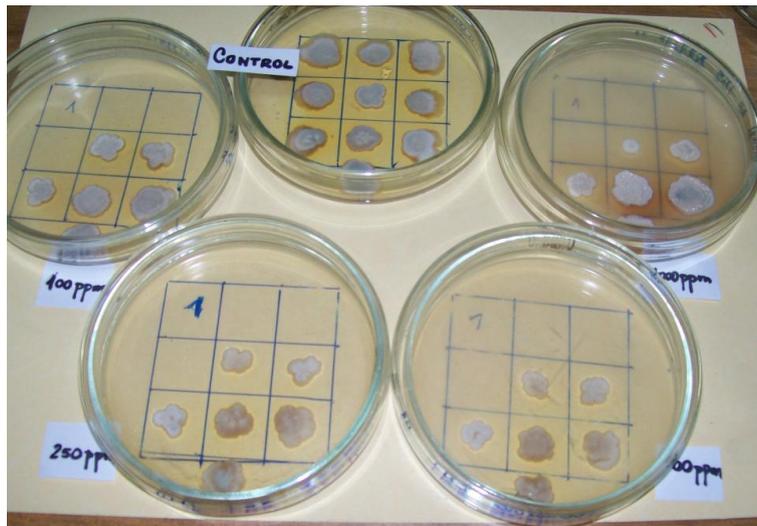


Figura 6. Crecimiento de distintos aislamientos de *P. expansum* en placas de Petri enmendadas o no, con distintas concentraciones de fungicida, a las 72 h de incubación a 20°C.

3.3. Determinación de Concentración Mínima Infecciosa (CMI)

Con el objetivo de establecer la concentración de uso de cada patógeno para los estudios posteriores, se determinó la concentración mínima infecciosa (CMI) para los aislamientos seleccionados. La CMI, se define como la concentración mínima de conidios que genera la podredumbre del 100% de las heridas de los frutos tratados con el inóculo del patógeno.

Se utilizó la misma metodología descrita para establecer la patogenicidad de los aislamientos. Se inocularon heridas realizadas en frutos de pera con 10 μ L de la suspensión de cada patógeno, a diferentes concentraciones: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^3 , 10^4 y 10^5 conidios/mL (Figura 7). Fueron inoculados 3 frutos para cada concentración y los experimentos se realizaron por triplicado. Los frutos fueron incubados bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente (-1/0°C y 95% HR) por 60 días. El porcentaje de incidencia (%I) de cada patógeno para cada concentración fue determinada de acuerdo a la expresión descrita en el inciso 3.1.



Figura 7. Frutos de pera del cultivar Packham's Triumph, inoculados con concentraciones decrecientes de *B. cinerea*.

4. Análisis estadístico

La severidad se determinó por la medición del diámetro de lesión (mm) y los resultados se analizaron como un modelo lineal de un sólo factor, con el efecto tratamiento. Las comparaciones de medias se realizaron utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$). Se construyeron dendrogramas basados en el método UPGMA con los datos de los diámetros de podredumbre, utilizando el programa, StatSoft, Inc. (2007) STATISTICA (Data Analysis Software System), version 8.0. www.statsoft.com.

Se realizó el análisis de correlación entre el diámetro de la lesión (patogenicidad) y la CIM (sensibilidad/resistencia a los fungicidas), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

La incidencia (%I), se analizó utilizando un modelo lineal no generalizado de distribución binomial (GLM) del Sistema de Análisis Estadístico (INFOSTAT, versión 9.1. 2004).

RESULTADOS

1. Aislamientos

Se obtuvieron 32 aislamientos de *Penicillium* a partir de frutos de los cultivares Packham's Triumph y Beurré D'Anjou con síntomas de podredumbre del moho azul. El 90,6% de los aislamientos provinieron del procesamiento productivo de transición, mientras que el 9,4% restante provinieron del orgánico. Para *B. cinerea*, patógeno causal del moho gris, se obtuvieron 27 aislamientos, de los cuales 65,4% fueron provenientes del proceso de transición y 34,6% del procesamiento de orgánico (Tabla 1). En lo que respecta a *P. expansum* se obtuvieron 32 aislamientos, donde el 68,75%

fueron de Beurrè D´Anjou, todos desde fruta de transición; mientras que el 31,25% desde Packham´s Triumph; se observa una leve prevalencia de los aislamientos de fruta de transición (70%) (Tabla 1).

Tabla 1. Número de aislamientos obtenidos de cada patógeno de acuerdo al cultivar y tipo de producción de origen.

Patógeno	Cultivar de aislamiento	Tipo de producción	Nº aislamientos
<i>Penicillium sp.</i>	Beurrè D´Anjou	Transición	22
		Orgánica	0
	Packham´s Triumph	Transición	7
		Orgánica	3
<i>B. cinerea</i>	Beurrè D´Anjou	Transición	6
		Orgánica	9
	Packham´s Triumph	Transición	12
		Orgánica	0

2. Identificación

2.1. *Penicillium sp.*

2.1.1. Identificación morfo-fisiológica

En la Tabla 2 se resumen las características morfológicas de las colonias, la capacidad de producción de ácidos orgánicos en el medio de crecimiento, la capacidad de producción de metabolitos del indol y alcaloides en los medios CYA y CREA (Figura 8), para los 32 aislamientos de *Penicillium*. Mediante observación al microscopio óptico se evidenció que todos los aislamientos fueron terverticilados, de acuerdo a las claves de identificación de Pitt (1988) (Figura 9).

El desarrollo de las colonias en CYA mostró alta variabilidad morfológica, en cuanto al diámetro de crecimiento, la coloración de la cara superior y reverso, la textura, y en el grado de esporulación de cada aislamiento. En CREA, el crecimiento en diámetro de colonia y la producción de ácido al medio fue homogéneo para todos los aislamientos evaluados a los 7-14 días a 25°C.

Teniendo en cuenta el resultado de las pruebas de crecimiento, morfológicas y producción de ácido, se determinó que 90% de los aislamientos correspondieron a la especie *P. expansum*, mientras que el 10% restante (NPCC 2001, NPCC 2006 y NPCC 2015) presentó características que corresponderían a la especie *Penicillium solitum*. Las características que permiten separar ambas especies corresponden a la coloración de adverso y reverso de las colonias en CYA (Tabla 2).

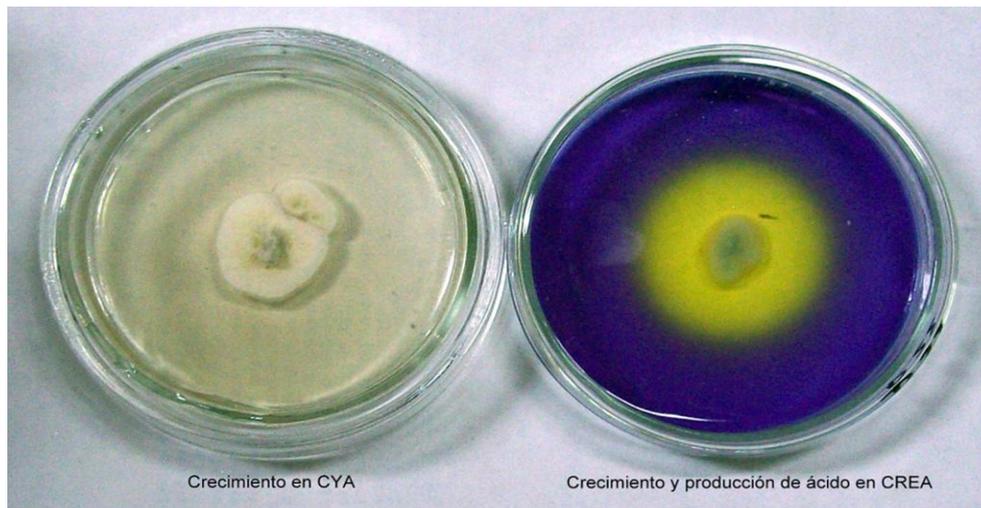


Figura 8. Aislamiento de *Penicillium* sp. en CYA y CREA, a los 7 a 25°C.

En cuanto a la producción de metabolitos del indol, se utilizó la metodología del papel de filtro propuesta por Lund (1995). Los 32 aislamientos estudiados, tanto en CYA como en CREA, resultaron positivos a la reacción de Ehrlich presentando halos de color violeta de distinta intensidad (Tabla 2), lo cual indica la producción de ácido ciclopiazoico o alcaloides relacionados. De acuerdo a estos resultados, todos los aislamientos corresponderían *P. expansum*, inclusive los aislamientos NPCC 2001, NPCC 2006 y NPCC 2015.

Considerando en conjunto todos los resultados de estas pruebas, no existe una plena certeza sobre la identificación del patógeno, razón por la cual se recurrió a métodos moleculares.

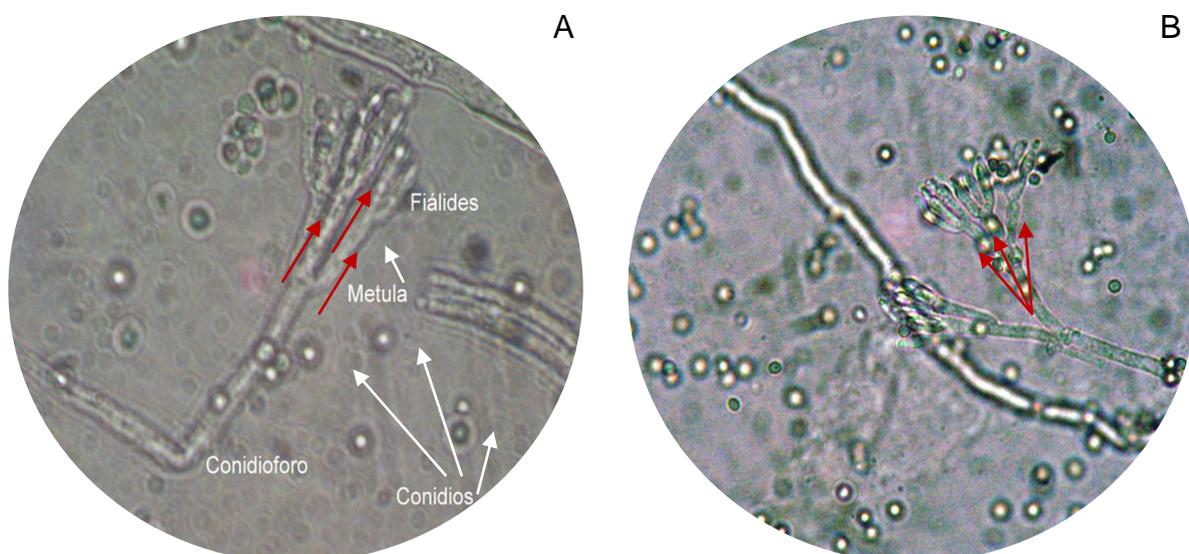


Figura 9. Aislamientos de *Penicillium* sp. patógenos de pera (40X), crecidos en CYA, A) NPCC 2011 y B) NPCC 2032. Las flechas rojas indican los verticilos.

Tabla 2. Caracterización morfo-fisiológica de los aislamientos de *Penicillium* sp. obtenidos de peras con síntomas de podredumbres a los 14 días de incubación a 25°C.

Aislamiento	NPCC	Origen ^a		CYA		CREA ^b		Producción metabolitos del indol ^b	
		Tipo productivo	Cultivar	Color Colonia	Reverso colonia	Crecimiento	Producción Ácido	CYA	CREA
DP1	2001	T	D	Verde/Blanco	Crema/marrón	+	++	+++	Violeta tenue
DP2	2002	T	D	Verde azulado	Crema	+	++	+++	Violeta tenue
DP3	2003	T	D	Verde azulado	Marrón	+	++	+++	Violeta tenue
DP4	2004	T	D	Verde	Marrón	+	++	+++	Violeta tenue
DP5	2005	T	D	Verde	Marrón	+	++	++	Violeta tenue
DP6	2006	T	D	Verde/Crema	Rosado	+	++	+	Violeta
DP7	2007	T	D	Verde	Marrón/rojizo	+	++	+++	Violeta tenue
DP8	2008	T	D	Verde azulado	Crema	+	++	++	Violeta tenue
DP9	2009	T	D	Verde	Rosado	+	++	+++	Violeta tenue
DP10	2010	T	D	Verde	Rojizo/marrón	+	++	++	Violeta tenue
DP11	2011	T	D	Verde	Rojizo/marrón	+	++	++	Violeta tenue
DP12	2012	T	D	Verde	Marrón	+	++	++	Violeta muy tenue
DP13	2013	T	D	Verde	Marrón	+	++	+++	Violeta
DP14	2014	T	D	Verde azulado	Crema/marrón	+	++	+++	Violeta
DP15	2015	T	D	Verde/Blanco	Crema	+	++	+++	Violeta
DP16	2016	T	D	Verde	Rojizo	+	++	++	Violeta tenue
DP17	2017	T	D	Verde	Crema	+	++	++	Violeta muy tenue
DP18	2018	T	D	Verde azulado	Crema	(+/-)	+	+++	Violeta
DP19	2019	T	D	Verde	Crema/marrón	+	++	++	Violeta
DP20	2020	T	D	Verde	Marrón	+	++	+	Violeta
DP21	2021	T	D	Verde oscuro	Crema	+	++	+	Violeta muy tenue
DP22	2022	T	D	Verde oscuro	Crema	+	++	+	Violeta muy tenue
DP23	2023	T	P	Verde	Rojizo	+	++	++	Violeta
DP24	2024	T	P	Verde azulado	Crema/rosado	+	++	+	Violeta muy tenue
DP25	2025	T	P	Verde azulado	Crema/rosado	+	++	++	Violeta tenue
DP26	2026	T	P	Verde	Marrón	+	++	+++	Violeta
DP27	2027	T	P	Verde azulado	Crema	+	++	+++	Violeta
DP28	2028	T	P	Verde	Crema/marrón	+	++	+++	Violeta
DP29	2029	T	P	Verde	Crema/marrón	+	++	+	Violeta
CP30	2030	O	P	Verde	Crema/marrón	+	++	+	Violeta muy tenue
CP31	2031	O	P	Verde	Marrón/rojizo	+	++	+++	Violeta muy tenue
CP32	2032	O	P	Verde	Crema/marrón	+	++	++	Violeta
<i>Penicillium brevicompactum</i>			NRRL 35178			(+/-)	(+/-)	- (Amarillo)	Amarillo
<i>Penicillium crustosum</i>			NRRL 2011	Verde grisáceo	Amarillo	(+/-)	++	-- Sin coloración	Sin coloración
<i>Penicillium viridicatum</i>			NRRL 961	Verde	Crema	+	++	- (Amarillo)	Violeta

NPCC: North Patagonian Culture Collection. NRRL: Northern Regional Research Laboratory

^aT: Producción de Transición - O: Producción Orgánica - D: Cultivar Beurre D´Anjou - P: Cultivar Packham´s Triumph - ^bCrecimiento/intensidad de producción.

2.1.2 Identificación molecular

La extracción de ADN de los diferentes aislamientos de *Penicillium* fue exitosa a partir de discos de micelio crecidos en medio YES. El producto de amplificación de PCR con la utilización de los primers ITS1-5.8s ADNr-ITS2, fue de 600 pb para los 32 aislamientos analizados (Figura 10).

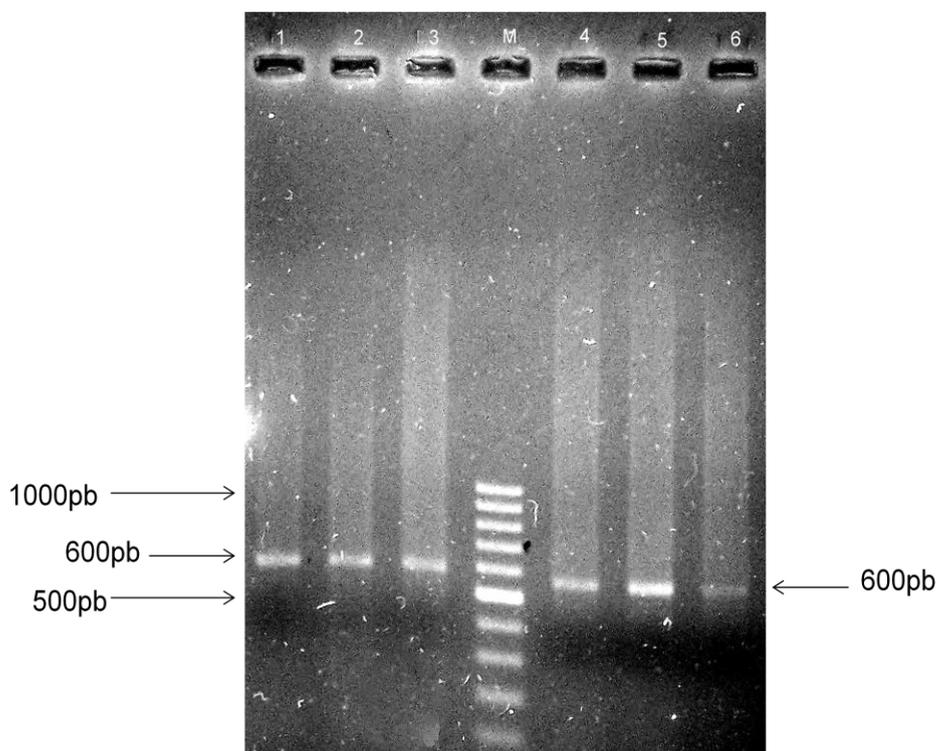


Figura 10. Electroforesis del producto de amplificación de ITS I - ITS 4 de seis aislamientos de *Penicillium* sp. en gel de agarosa al 1,5% p/v. 1: NPCC 2007 - 2: NPCC 2011 - 3: NPCC 2014 - M: Marcador de peso molecular de 100 pb - 4: NPCC 2017 - 5: NPCC 2025 - 6: NPCC 2030.

Los productos de amplificación del ITS 1-ITS 4 digeridos con la enzima de restricción *Hinf* I, evidenciaron un mismo perfil de restricción; se obtuvieron tres fragmentos o bandas cuyo peso molecular fue de 300 pb, 180 pb y 120 pb, respectivamente (Figura 11). De acuerdo a lo propuesto por Pianzola *et al.* (2004), todos aislamientos de *Penicillium* provenientes podredumbres de peras correspondieron a la especie *P. expansum*.

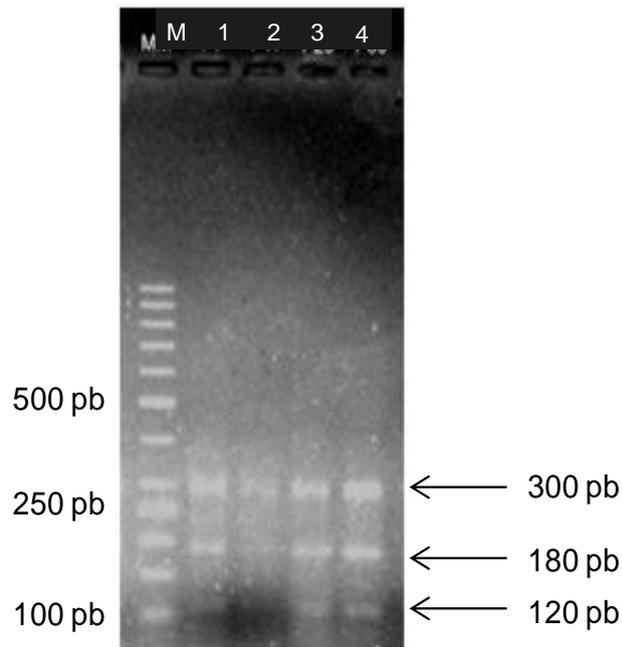


Figura 11. Patrón de restricción del producto de PCR de la región ITS I-ITS 4 de cuatro aislamientos digeridos con *Hinf* I. Calles: M: Marcador de peso molecular de 50 pb. 1: NPCC 2007; 2: NPCC 2017; 3: NPCC 2025; 4: NPCC 2030.

2.2. *Botrytis cinerea*

2.2.1. Identificación morfológica

Todos los aislamientos obtenidos a partir de peras con síntomas del moho gris se caracterizaron en base a la morfología de las colonias y células. El desarrollo de las colonias en APD mostró inicialmente una coloración blanca que posteriormente se tornó color gris oliváceo, de aspecto denso y piloso (Figura 12A y B). Las hifas se observaron septadas, hialinas y ramificadas de manera irregular o dicotómica, que con el tiempo se tornaron de color marrón. Se observaron conidióforos septados, macronematosos que nacían del micelio sin formar una estructura especializada, características que se corresponden con las descritas para el género *Botrytis* por Ellis (2004) y Howard *et al.* (1992). El ápice de cada conidióforo finalizaba en una ampolla donde se desarrollaban conidios solitarios, unicelulares, lisos y globosos de 10-12 x 6-7 μm . Estas características se ajustaban con las señaladas por Mass (1998), Castañeda (2004) y Ellis (2004), para la especie *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr, estado anamórfico de *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel. Estos resultados permitieron identificar a los aislamientos como pertenecientes a la especie *Botrytis cinerea*.

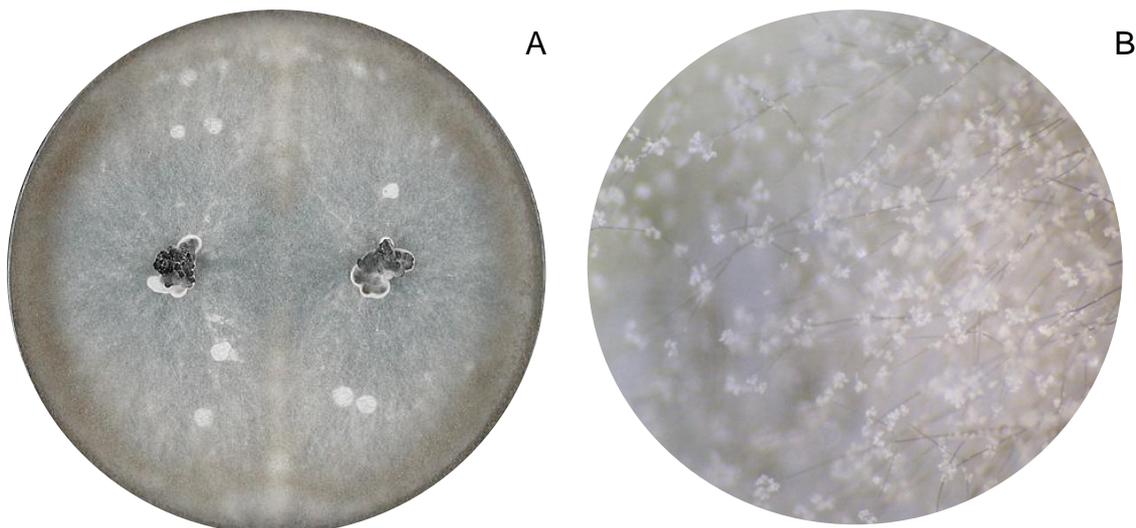


Figura 12. Cultivo en APD de *B. cinerea* con formación de esclerocios (A) y detalle de la esporulación (conidióforos y conidios) del cultivo bajo la lupa de 40X.

3. Caracterización de los aislamientos: patogenicidad y comportamiento frente a fungicidas

3.1 Patogenicidad

La patogenicidad fue evaluada en la fruta inoculada a los 60 días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$. Todos los aislamientos de *P. expansum* y *B. cinerea* ocasionaron el 100% de incidencia de las respectivas enfermedades, aunque generaron diámetros de lesión con diferencias significativas entre ambos géneros y entre aislamientos dentro de la misma especie (Tabla 3).

Se realizó un análisis de clusters con los resultados obtenidos para cada género (Anexo II). Este análisis evidenció la presencia de 3 grupos de aislamientos para la especie *B. cinerea* (Figura 13). Los aislamientos del grupo I (18,5% del total de aislamientos) presentaron un diámetro medio de lesión de 60,52 mm y la particularidad de que todos provenían del empaque en transición y del cultivar Packham's Triumph (Tabla 3). Los aislamientos del grupo II (26%) mostraron un diámetro medio de 26,91 mm y todos provinieron del empaque orgánico y del cultivar Beurré D'Anjou (Tabla 3). Finalmente, en el grupo III (55,5% de los aislamientos) agrupó a los aislamientos menos patogénicos (24,54 mm de diámetro medio) (Figura 13). Entre los aislamientos más patogénicos de *B. cinerea* (grupo I) se destacaron NPCC 2046, 2049 y 2050, con 64,2 mm, 71,6 mm y 65 mm de diámetro de podredumbre, respectivamente (Tabla 3).

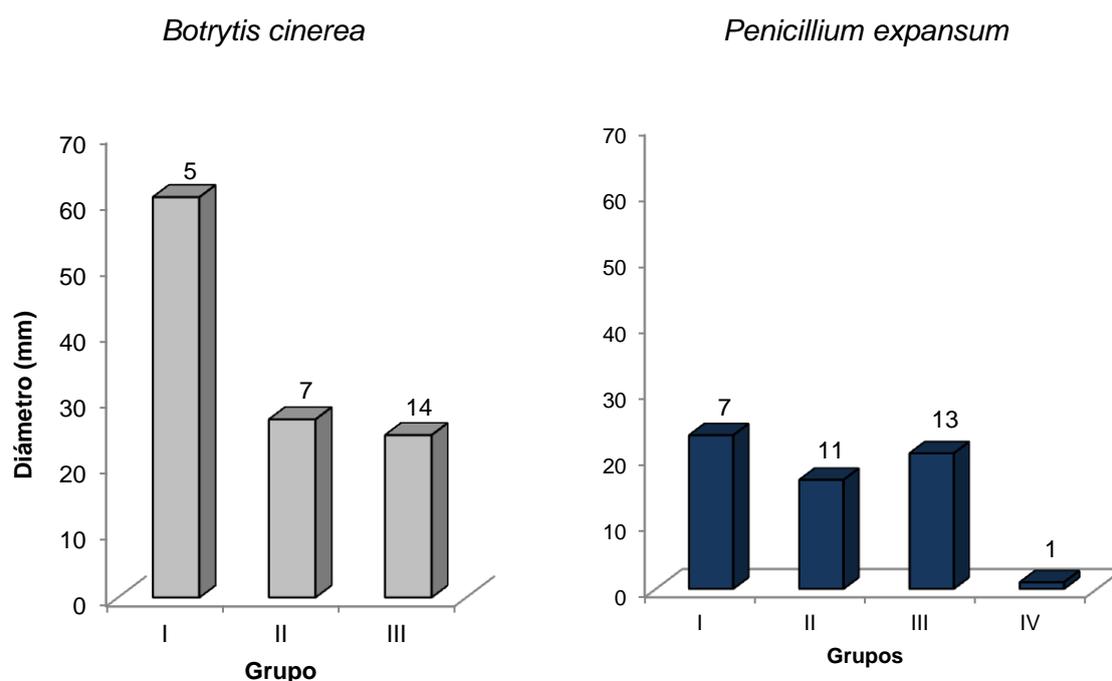


Figura 13. Grupos de aislamientos por género, obtenidos del análisis de clusters utilizando los datos de patogenicidad (diámetro medio de podredumbre). Sobre las barras en números arábigos, se indica el número de aislamientos de cada grupo.

Con respecto a los aislamientos de *P. expansum*, el análisis de clusters evidenció la existencia de 4 grupos (Figura 13); el 21,9% de los aislamientos se concentró en el grupo I (23,26 mm de diámetro medio), siendo los más patogénicos NPCC 2006, 2023 y 2032, con 26,4 mm, 26,2 mm y 26,8 mm de diámetro de lesión, respectivamente (Tabla 3). El 34,4% de los aislamientos pertenecieron al grupo II, 40,6% al III y el restante 3,1% al grupo IV. Todos los aislamientos agrupados en el grupo mayor patogenicidad (grupo I, con valores entre 16,4 mm y 26,8 mm) fueron obtenidos de peras Packham's Triumph (Tabla 3).

3.2 Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas

La CIM de cada fungicida fue evaluada *in vitro* a las 72 h de incubación a 20°C. Los aislamientos de *P. expansum* presentaron variabilidad en el comportamiento frente a los dos fungicidas (TBZ y captan) y concentraciones evaluadas (Figura 14). Por su parte, los aislamientos de *B. cinerea* presentaron uniformidad en la respuesta frente a TBZ, ya que ninguno fue capaz de crecer con 1 mg/L del fungicida, y fueron variables frente a captan (Tabla 3) (Figura 14).

El 53,1% de los aislamientos de *P. expansum* fue sensible (S) a TBZ, ya que el crecimiento de los aislamientos fue inhibido con concentraciones inferiores a 10 mg/L; el 6,3% fue moderadamente resistente (R) y el 40,6% restante fue altamente resistente (RR), dado que fueron capaces de crecer a concentraciones de TBZ mayores a 100 mg/L, Tabla 3). Los resultados indican que todos los aislamientos de origen orgánico fueron sensibles a TBZ, mientras 48,3% de los provenientes de transición mostraron ese comportamiento.

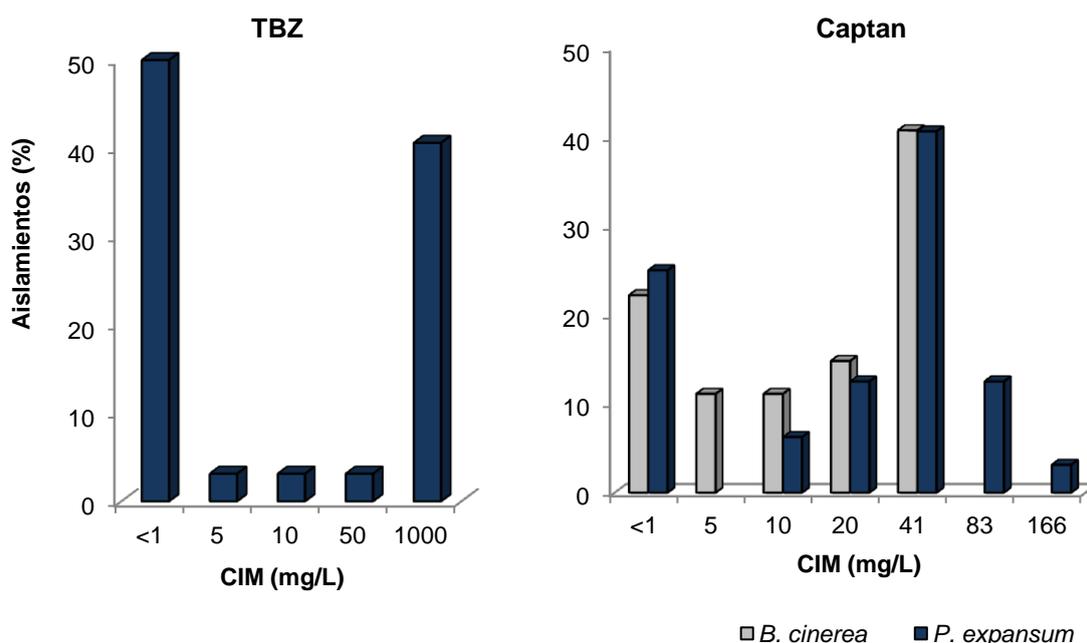


Figura 14. Porcentaje de aislamientos de *P. expansum* y *B. cinerea* para cada una de las CIM evaluadas de TBZ y captan.

Ninguno de los aislamientos de *P. expansum* fue capaz de desarrollarse a la dosis de captan de uso comercial (660 mg/L); el 25% fue altamente sensible con una CIM de 1 mg/L; el 59,37% toleraron dosis hasta 41 mg/L y uno de los aislamientos fue capaz de tolerar 166 mg/L (aislamiento NPCC 2028, Tabla 3).

El 22,2% de los aislamientos de *B. cinerea* fue sensible a 1 mg/L de captan, mientras que el restante 77,8% mostró desarrollo hasta valores de concentración de 41 mg/L (Tabla 3) (Figura 14). Tanto para TBZ como para captan, las CIM *in vitro* resultaron ser inferiores a las concentraciones comerciales de uso.

Tabla 3. Origen y caracterización de los aislamientos de *P. expansum* y *B. cinerea* aislados de peras en conservación frigorífica.

<i>Penicillium expansum</i>				<i>Botrytis cinerea</i>					
NPCC	Diámetro de lesión (mm) ± DE ^a	CIM (mg/L) ^b		NPCC	Origen ^c		Diámetro de lesión (mm) ± DE ^a	CIM (mg/L) ^b	
		TBZ	Captan		T/O	D/P		TBZ	Captan
2001	21,4±2,5ek	50	20	2033	T	D	24,8±1,8df	< 1	5
2002	25,2±1,5ik	< 1	< 1	2034	T	D	28,4±2,4eh	< 1	< 1
2003	14,4±5,4bd	< 1	< 1	2035	T	D	14,6±2,1ac	< 1	5
2004	23,2±1,3gk	10	41	2036	T	D	36,2±2,5hi	< 1	10
2005	25,8±2,4jk	< 1	41	2037	T	D	19,6±1,1bd	< 1	5
2006 [£]	26,4±1,8k	> 1000	20	2038	T	D	28,8±3,4fh	< 1	20
2007	17,2±1,8cf	> 1000	41	2039	T	P	10,4±1,1a	< 1	< 1
2008	19,0±3,4dh	> 1000	< 1	2040	T	P	36,0±2,3hi	< 1	10
2009	22,6±2,6fk	> 1000	< 1	2041	T	P	28,4±3,6eh	< 1	20
2010	25,2±1,3ik	5	41	2042	T	P	39,4±3,4i	< 1	41
2011	21,4±3,5ek	< 1	10	2043	T	P	20,0±1,6be	< 1	< 1
2012	22,6±1,1fk	< 1	41	2044	T	P	25,1±1,5dg	< 1	< 1
2013 [£]	21,8±3,1ek	> 1000	41	2045	T	P	10,0±1,6a	< 1	20
2014	17,8±4,1ch	> 1000	41	2046 [§]	T	P	64,2±9,8k	< 1	20
2015	1,0±0,0a	> 1000	83	2047	T	P	21,8±1,9bf	< 1	41
2016	20,0±0,0ei	< 1	< 1	2048	T	P	53,0±1,9j	< 1	41
2017 [£]	23,3±1,0gk	> 1000	41	2049 [§]	T	P	71,6±6,0k	< 1	41
2018	9,6±1,1b	< 1	41	2050 [§]	T	P	65,0±2,0k	< 1	41
2019	20,8±3,8ej	< 1	10	2051	O	D	34,0±5,9hi	< 1	41
2020	20,0±2,1ei	< 1	< 1	2052	O	D	24,6±1,5df	< 1	41
2021	9,6±1,5b	> 1000	20	2053	O	D	33,8±7,8gi	< 1	41
2022	18,2±3,1ch	< 1	< 1	2054	O	D	13,6±1,1ab	< 1	< 1
2023 [£]	26,2±0,8k	> 1000	83	2055	O	D	34,8±3,3hi	< 1	41
2024	18,8±2,4ch	< 1	< 1	2056	O	D	23,2±0,4cf	< 1	10
2025	13,4±1,1bc	>1000	20	2057	O	D	24,4±3,3df	< 1	41
2026	10,0±1,6b	< 1	41	2058	O	D	48,8±4,3j	< 1	41
2027 [£]	26,0±1,6jk	> 1000	41	2059	O	D	14,2±1,5ab	< 1	< 1
2028	24,8±1,3ik	< 1	166						
2029 [£]	25,2±1,3ik	> 1000	41						
2030	16,4±1,1ce	< 1	83						
2031	17,4±2,4cf	< 1	83						
2032	26,8±1,6k	< 1	41						

^a Los resultados se presentan como media de experimentos independientes con diámetros de lesión de 5 peras, ± desvío estándar (DE). Los valores en una columna seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo a Test de Tukey (P > 0,05). ^b CIM: concentración inhibitoria mínima de TBZ y Captan. ^cT: Producción de Transición - O: Producción Orgánica - D: Cultivar Beurré D'Anjou - P: Cultivar Packham's Triumph NPCC: North Patagonia Culture Collection. [£] Aislamientos más patogénicos y con mayor resistencia a fungicidas. [§] Aislamientos más patogénicos.

4. Correlación entre la patogenicidad y la CIM

Se realizó un análisis de correlación de Pearson por especie y fungicida utilizado las variables diámetro de lesión (severidad) y CIM obtenida para cada aislamiento. Los coeficientes obtenidos para los dos patógenos no fueron significativos para ninguno de los dos fungicidas utilizados, lo cual indica que no hay correlación entre las variables analizadas. Para *P. expansum* los coeficientes fueron -0,07424 ($p=0,1662$) y 0,00741 ($p=0,001531$, con un $R^2=0,31$) para TBZ y captan, respectivamente; mientras que para *B. cinerea* con captan, el coeficiente fue 0,551 ($p=11,25325$).

5. Selección de los aislamientos

Para la evaluación del comportamiento antagónico de los potenciales ACB, se seleccionó un aislamiento de cada patógeno en base a los resultados obtenidos de la patogenicidad y el comportamiento frente a los fungicidas de postcosecha TBZ y captan. Los aislamientos seleccionados fueron *P. expansum* NPCC 2023 por su patogenicidad (26,2 mm) y resistencia a los fungicidas (CIM >1000 mg/L para TBZ y 83 mg/L para Captan) y *B. cinerea* NPCC 2049 por su patogenicidad (71,6 mm) (Tabla 3).

5.1 Determinación Concentración Mínima Infecciosa (CMI)

La CMI que produjo 100% de infección en los frutos inoculados e incubados a $-1/0^{\circ}\text{C}$ luego de 60 días fue 10^4 conidios/mL para *P. expansum* NPCC 2023 y 5×10^3 conidios/mL para *B. cinerea* NPCC 2049.

DISCUSIÓN

Las principales pérdidas que se producen durante el almacenamiento comercial de las peras son las causadas por la presencia del moho azul y moho gris, ocasionados por *Penicillium expansum* Link y *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., respectivamente (Spotts & Cervantes, 2002; Lennox *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Dobra *et al.*, 2008; Sugar &

Basile, 2008). El control biológico con microorganismos de estas enfermedades surge como una de las alternativas más promisorias. Las levaduras son buenas candidatas para esta función por ser consideradas GRAS (Generally recognized as safe). En la búsqueda y selección de antagonistas indígenas para el control de las enfermedades de la región, la estrategia que se decidió llevar a cabo en esta tesis fue a través del enfrentamiento de las cepas de patógenos más patogénicas y resistentes a los principios químicos utilizados para su control, a potenciales levaduras antagonistas.

En este Capítulo se realizaron aislamientos de *B. cinerea* y *P. expansum* a partir de peras de las variedades Beurrè D'Anjou y Pachkam's Triumph almacenadas en cámara frigorífica durante 6-7 meses y con síntomas de cada enfermedad. Los aislamientos fueron identificados, caracterizados fenotípicamente y finalmente seleccionados para ser utilizados en posteriores ensayos de selección de levaduras antagonistas.

En este trabajo se obtuvieron 32 aislamientos desde peras con síntomas de moho azul. Para su identificación se emplearon en primera instancia los métodos morfofisiológicos y las claves propuestos por Pitt (1988), Lund (1995) y Frisvad & Samson (2004), las cuales brindan resultados objetivos y son de sencilla ejecución. Los resultados obtenidos del uso de estos métodos parecían indicar que la mayoría de los aislamientos pertenecía a la especie *P. expansum*, mientras que una menor proporción a *P. solitum*. Esta última especie, fue reportada como agente causal de podredumbres postcosecha en pera por Pitt *et al.* (1991), Sanderson *et al.* (1995), Jurick *et al.* (2012), por lo cual su detección en la región Norpatagónica era factible. Más aún, Pianzola *et al.* (2004) lo describen por primera vez en Uruguay como patógeno en postcosecha de manzana. En nuestra región, no existen reportes de dicha especie como causal de enfermedades de postcosecha. Pitt *et al.* (1991) y Frisvad & Samson (2004) describen que *P. expansum* y *P. solitum* presentan características morfológicas, de crecimiento, de rango de hospedantes y de comportamiento frente a los fungicidas del grupo de los benzimidazoles, muy similares. Por otra parte, Pitt *et al.* (1991) y Pianzola *et al.* (2004) describen a los aislamientos de *P. solitum* como menos patogénicos que los de *P. expansum*. De acuerdo a esta afirmación, de los tres aislamientos que corresponderían a *P. solitum*, solo el aislamiento NPCC 2015 (1 mm de diámetro de podredumbre) cumpliría este requisito, ya que los dos restantes fueron agrupados en este trabajo dentro del grupo de los aislamientos más patogénicos (grupo II, 26,8 mm de diámetro medio de lesión) según el análisis de clusters. Del análisis de esta expresión fenotípica (comportamiento patogénico sobre pera) y los resultados de la producción de metabolitos del indol por

la reacción Ehrlich (todos positivos), surge la necesidad de utilizar métodos adicionales de identificación.

Los métodos moleculares se caracterizan por tener una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de microorganismos, y distintas técnicas pueden ser empleadas de acuerdo al organismo que se pretenda identificar. Para el género *Penicillium* una de las más utilizadas es la técnica de PCR-RFLP (Dupont *et al.*, 1999; Pianzola *et al.*, 2004; Florez *et al.*, 2007). Sholberg *et al.* (2005), exponen que los métodos moleculares son muy útiles cuando se utilizan junto con métodos fenotípicos tradicionales, ya que permiten eliminar toda ambigüedad al momento de identificar especies estrechamente relacionadas como *P. expansum* y *P. solitum*. Es así, que se utilizó la técnica molecular PCR-RFLP con la enzima *Hinf I*, descrita por Pianzola *et al.* (2004) para confirmar la identidad de todos los aislamientos. Los resultados confirmaron que la totalidad de los aislamientos correspondió a la especie *P. expansum*.

Los niveles de patogenicidad alcanzados por los aislamientos de *P. expansum* en condiciones de almacenamiento comercial fueron variables, con diámetros de lesión que fueron en el rango de 1 a 27 mm. En un estudio previo realizado en el mismo grupo de trabajo y región productiva, se observaron valores levemente superiores (17 y 29 mm de diámetro de lesión en peras) para aislamientos de *P. expansum* provenientes de empaques con manejo convencional y de transición (Robiglio *et al.*, 2011). Esta pequeña diferencia podría deberse a que los ensayos de Robiglio *et al.* (2011) fueron realizados a temperatura ambiente, mientras que los realizados en esta Tesis se llevaron a cabo a temperatura de cámara (-1/0°C). Asimismo, es importante mencionar que el análisis de patogenicidad de los aislamientos de las dos especies patógenas, muestra que los más patogénicos, provienen del cultivar Packham's Triumph, probablemente, este resultado se fundamente en que estos experimentos se llevaron a cabo sobre este mismo varietal.

Baraldi *et al.* (2003) reportaron una correlación positiva entre la patogenicidad y la sensibilidad/resistencia a TBZ entre aislamientos de *P. expansum* provenientes de peras de la región de Emilia Romagna (Italia). En ese estudio, los aislamientos más patogénicos también fueron los más resistentes al fungicida, con diámetros de lesión entre 32 y 39 mm. No obstante, en esta Tesis no se observó correlación para los aislamientos de *P. expansum* entre la patogenicidad y la sensibilidad/resistencia a los dos fungicidas comúnmente utilizados en postcosecha, TBZ y captan.

El TBZ es un fungicida con un sitio específico de acción, y ha sido clasificado por la FRAC como un fungicida de alto riesgo por la generación de cepas de patógenos resistentes a causa de su prolongado uso (Brent & Hollomon, 2007). La dosis

discriminatoria de resistencia determinada por la FRAC para TBZ es de 10 mg/L. Los resultados muestran que el 51,8% de los aislamientos estudiados de *P. expansum* fueron resistentes. Resultados similares fueron reportados por Pianzola *et al.* (2004) y Sholberg *et al.* (2005) en manzana, donde 50% de los aislamientos de *P. expansum* fueron altamente resistentes a TBZ (toleraron concentraciones superiores a los 500 mg/L). Baraldi *et al.* (2003), por otra parte, informó porcentajes más altos (82%) de aislamientos resistentes de aislados de pera. La resistencia a los benzimidazoles se ha descrito para aislamientos de *B. cinerea* y *P. expansum* expuestos a los fungicidas por prolongados períodos y aplicados con dosificaciones incorrectas (Lennox & Spotts, 2003; Sanderson, 2011). Si bien los resultados aquí obtenidos no responden a un estudio poblacional, estos indicarían la ineficacia del TBZ como fungicida, siendo una necesidad urgente la búsqueda de alternativas eficaces para su control, y el control biológico con levaduras sería una de ellas (Wilson & Wisniewski, 1989; Korsten *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1999; El-Ghaouth *et al.*, 2003).

Interesantemente, entre los aislamientos de *P. expansum* obtenidos de empaques de transición, el 51,8% de los aislamientos fueron resistentes a TBZ, mientras que los provenientes de empaques orgánicos todos fueron susceptibles. Teniendo en cuenta que se considera empaque de transición a aquel en el cual no se han utilizado fungicidas al menos durante los últimos 3 años de producción, nuestros resultados indicarían que las cepas resistentes se conservan en el empaque durante un tiempo prolongado, aun en ausencia de la presión selectiva causada por el fungicida (Leroux & Clerjeau, 1985; Lorenz, 1988; Beever *et al.*, 1989; Lennox & Spotts, 2003).

Otro de los fungicidas usados en la postcosecha es captan, el cual es recomendado en combinación con otros principios activos (Rosenberger, 2009). A diferencia del TBZ, el captan es un fungicida multi-sitio, que actúa sobre distintos sitios blanco, lo que implica que el riesgo intrínseco de los hongos para generar resistencia a este fungicida es muy bajo (Brent & Hollomon, 2007; Leroux, 2007; Rosenberger, 2009). La CIM de este fungicida para los 32 aislamientos de *P. expansum* presentó valores de hasta 166 mg/L; valores superiores a los obtenidos por Robiglio *et al.* (2011) (menor a 5 mg/L) para aislamientos de este mismo hongo en pera y de la misma región.

Los aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de peras respondieron en su totalidad a los caracteres micro y macromorfológicos característicos para la especie (Jarvis, 1977; Ellis, 2004). Los resultados de patogenicidad muestran una importante variabilidad entre los distintos aislamientos, con diámetros de lesión entre 10 y 71,6 mm con diferencias importantes a los resultados reportados por Robiglio *et al.* (2011) que a 20°C obtuvieron diámetros de lesión entre 24 y 45,3 mm. Al igual que con *P. expansum*, para *B. cinerea* no se encontró correlación entre los niveles de

patogenicidad y la sensibilidad/resistencia para ninguno de los dos fungicidas evaluados.

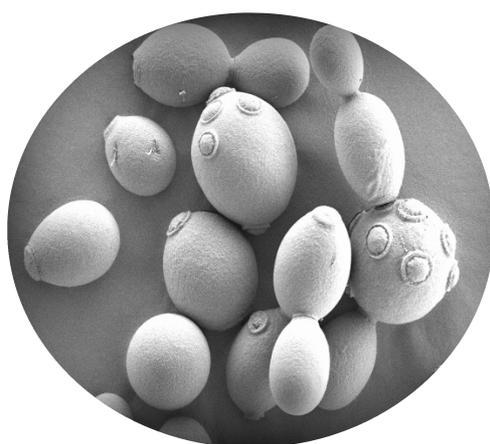
En la caracterización fenotípica frente a TBZ, ninguno de los aislamientos de *B. cinerea* creció en presencia de 1 mg/L del fungicida. De acuerdo a algunos reportes bibliográficos, los porcentajes de aislamientos de *B. cinerea* resistentes a este fungicida son en general bajos. Zhao *et al.* (2010) indican que solo tres aislamientos fueron resistentes de un total de 123 provenientes del cultivo, empaque y conservación de peras y manzanas. Particularmente esos tres aislamientos fueron obtenidos de partes florales y ninguno causal de podredumbre postcosecha. Resultados similares fueron obtenidos por Lennox & Spotts (2003), con solo 1,52% de los aislamientos resistentes de un total de 126. Los valores de resistencia obtenidos por Robiglio *et al.* (2011) para aislamientos de la misma región superan los valores obtenidos en este Capítulo: el 90% de los aislamientos obtenidos de sistemas de producción convencional, con fuerte presión de fungicidas, fueron capaces de crecer a más de 250 mg/L de TBZ.

De acuerdo a bibliografía, la presencia de cepas de *B. cinerea* con resistencia a captan es baja, no obstante fueron reportadas algunas cepas aisladas de frutilla resistentes a 1000 mg/L (Pepin & Mac Pherson, 1982). La respuesta de los aislamientos de *B. cinerea* frente a captan en este estudio mostró un comportamiento variable, observándose que la mayor parte de los aislamientos crecieron hasta concentraciones de 41 mg/L.

La utilización de aislamientos de los patógenos de la región que se pretenden controlar y entre ellos aquellos más patogénicos y más resistentes a fungicidas, es una importante ventaja al momento de la selección de antagonistas, ya que permite recrear las condiciones locales a las cuales podrían enfrentarse los potenciales ACB (Vero *et al.*, 2002). Este estudio permitió seleccionar a los aislamientos de *P. expansum* NPCC 2023 y de *B. cinerea* NPCC 2049 que fueron utilizados en los ensayos posteriores de este trabajo de Tesis. Asimismo, es posible hacer una aproximación sobre el estado y características de las poblaciones de los dos patógenos más importantes de postcosecha en peras de la región Norpatagónica, de la que hay pocos reportes en la bibliografía científica.

CAPITULO II

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRE-SELECCIÓN DE LEVADURAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA



Los resultados de este Capítulo fueron publicados como: A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science & Technology* 22, 12: 1465-1483 (2012).

Two selection strategies of epiphytic native yeasts with potential biocontrol capacity against postharvest pears pathogens in Patagonia. *Acta Horticulturae* 909: 761-768.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 30 años un número importante de levaduras han sido identificadas como ACB de postcosecha y han demostrado ser una alternativa al uso de fungicidas químicos para el control de las podredumbres postcosecha de los frutos (Wisniewski *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009; Teixidó *et al.*, 2011). Los primeros pasos en el desarrollo de un ACB lo constituyen los procesos de aislamiento y selección. De la estrategia implementada en estos procesos depende en gran medida, la eficacia y el éxito del biocontrol en las condiciones comerciales de aplicación. El enfoque utilizado en estos pasos tendrá un gran impacto en las especies de antagonistas aisladas y su modo de acción sobre los patógenos a controlar.

El aislamiento y selección de antagonistas microbianos para el CB de patógenos de postcosecha de fruta ha utilizado distintas estrategias, enmarcadas en distintos criterios de selección (Janisiewicz & Roitman, 1988; Droby *et al.*, 1999; Bleve *et al.*, 2006; Zhang *et al.* 2010). En general las estrategias más utilizadas para la búsqueda y selección de antagonistas cuentan con los siguientes pasos:

- a. aislamiento de los potenciales ACB a partir de aguas de lavado (AL) de frutas recogidas en el huerto, en un medio de cultivo artificial incubando a temperatura ambiente;
- b. *screening in vitro* de actividades antagónicas de interés de los potenciales antagonistas,
- c. ensayos *in situ* de actividad antagónica en las heridas de frutas inoculadas con los patógenos que se pretenden controlar.

Uno de los problemas de esta estrategia general de aislamiento y selección es que tanto el aislamiento de las levaduras, como los experimentos de antagonismo *in situ* se llevan a cabo a temperatura ambiente (Lima *et al.*, 1998; Viñas *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Esto resulta una limitante, ya que las levaduras aisladas y seleccionadas a partir de estas estrategias, seguramente no son capaces de sobrevivir y colonizar eficientemente las heridas de la fruta a bajas temperaturas, condición de almacenamiento de la fruta en postcosecha.

Baker & Cook (1974) proponen que la mejor estrategia para el aislamiento de un ACB para un agente etiológico en particular, es la búsqueda en aquellos sitios en los cuales

se dan todas las condiciones para que la enfermedad se produzca y esta no se desarrolla. Es así que Wilson *et al.* (1993) incorporan este concepto para desarrollar una estrategia de aislamiento y selección de levaduras, en la cual utilizan como fuente de antagonistas microbianos a las heridas sanas de fruta expuesta a inóculo fúngico. Muchos autores adoptaron la estrategia: Wisniewski *et al.*, 1995; Chand & Goyal Spott 1996; Lima *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 1998; Viñas *et al.* 1998; Scherm *et al.*, 2003; Sugar & Basile, 2008; Zhang *et al.*, 2011. Sin embargo, tanto el aislamiento de los microorganismos, como los bioensayos se realizaron a temperatura ambiente, lo que repercute en el aislamiento y la selección de ACB para conservación de fruta en frío. Esta situación es la que podría explicar la falta de correlación entre la eficacia de biocontrol lograda en los experimentos a escala laboratorio y las desarrolladas a escala piloto con los ACB seleccionados por estos métodos (Droby *et al.* 1993; Wisniewski *et al.*, 2001).

La mejor estrategia para el desarrollo de un ACB para enfermedades de postcosecha, es la que en el proceso de aislamiento y selección se potencien los antagonistas que tengan la capacidad de establecerse, crecer y ser eficaces a bajas temperaturas en las heridas de los frutos. Otro factor a tener en cuenta, es desarrollar la estrategia empleando cepas de patógenos locales (Vero *et al.*, 2002), aspecto que en pocas investigaciones es considerada; el uso de patógenos locales para los enfrentamientos en el proceso de selección, permitiría una selección más acorde a las condiciones regionales para las que se pretende desarrollar el ACB.

En esta Tesis se propone el desarrollo de un sistema de biocontrol para las principales enfermedades de postcosecha de la región basado en el uso de levaduras indígenas. Considerando la importancia de la estrategia utilizada en el proceso de aislamiento y selección, aquí se propone una mejora de las estrategias desarrolladas hasta el momento, teniendo en cuenta:

- a. Fruta de origen orgánico y de transición, es decir sin alteración de la microbiota nativa;
- b. Aislamiento de cepas indígenas de levaduras epífitas de pera, capaces de establecerse y crecer en las condiciones de almacenamiento comercial de la fruta (-1/0°C);
- c. Aislamiento de los potenciales ACB desde heridas y superficie de fruta que se hayan conservado sanas durante 6 meses de conservación frigorífica;
- d. Bioensayos de selección de ACB con enfrentamientos con cepas regionales de patógenos e incubación en condiciones de almacenamiento comercial (-1/0°C y 95% HR).

Considerando todos estos aspectos, el objetivo de este Capítulo fue el aislamiento y selección de levaduras indígenas con potencial antagónico, capaces de controlar las enfermedades de postcosecha de pera causadas por *P. expansum* y *B. cinerea* durante la conservación frigorífica (-1/0°C y 95%HR).

MATERIALES

1. Material vegetal

Frutos de peras de producción orgánica y de transición de los cultivares Beurrè D'Anjou y Packham's Triumph cosechadas con madurez fisiológica y conservados en cámaras frigoríficas (-1/0° C y 95%HR) hasta su utilización.

2. Microorganismos

Patógenos. Aislamientos de *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049, seleccionados por su patogenicidad y resistencia a los fungicidas postcosecha (Capítulo I).

3. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento y crecimiento de levaduras y hongos filamentosos

Todos los medios de cultivo utilizados se realizaron con agua destilada y esterilizados por vapor saturado a presión en autoclave a 120°C y 2 atmósferas por 20 min.

Glucosa-Peptona-Extracto de Levadura (GPY) Agar: Extracto de levadura 5 g/L; Peptona 5 g/L; Glucosa 40 g/L; Agar 20 g/L

Agar jugo de pera (AJP): Jugo de pera natural 85 % (v/v); Agar 20 g/L. El jugo natural de pera fue obtenido a partir del licuado de frutos del cultivar Packham's Triumph, homogenizado y filtrado a través de malla de tela. El medio fue esterilizado por vapor fluyente por 20 min.

Jugo de pera, con las mismas proporciones indicadas, sin el agregado de agar se utilizó como medio de cultivo líquido (caldo jugo de pera - JP)

Agar Papa Dextrosa (APD): Se utilizó, la formación sólida en polvo 39 g/L de agua destilada (Britania).

4. Conservación de levaduras antagónicas. Solución de glicerol 20% (v/v).

5. Insumos de biología molecular

- **Zimoliasa.** Seikagaku Corporation
- **Novozyma.** Seikagaku Corporation
- **Taq ADN polimerasa** Promega.
- **Primer ITS I (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') – ITS 4 (5' - CCTCCGCTTATTGATATGC - 3').** Biosynthesis Company
- **Marcadores de peso molecular** de 100 a 1000 pb. Fermentans
- **Endonucleasas de restricción** *Cfo* I, *Hae* III y *Hinf* I. Roche
- **Agarosa** Biodynamics.
- **Agua miliQ.** Merk.
- **Bromuro de etidio.** Sigma
- **Kit de purificación ADN** PuriPrep - GP Kit.

Las soluciones utilizadas fueron:

- **Solución 1 (400 mL):** 372,27mL sorbitol 1M y 72,72 EDTA mL 0,5M.
- **Solución 2 (400 mL):** 20 mL de Tris-HCl 1M, 16 mL de EDTA 0,5M y 400 mL de H₂O destilada. pH 7,4
- **Acetato de potasio (5M/3M):** a 60 mL de solución AcK 5M se le añade ácido acético glacial hasta llegar a pH 4,8 y se lleva a 100 mL con H₂O destilada.
- **Tampón lisis:** 100mM Tris, 20mM EDTA, 250mM NaCl, 2% SDS
- **Tampón TE:** Tris - HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8
- **Solución reguladora TAE:** 45 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.

6. Antibióticos y fungicidas

- **Cloranfenicol.** Farmacéuticos unidos.
- **2- (4 -tiazolil-benzimidazol).** Tecto® 500 SC. Syngenta.

- **N-(triclorometiltio) ciclones-4-ene-1,2- dicarboximida.** Captan® 80W. S. Ando & Cía. S.A.
 - **Tween 80%.** Sigma
-

M E T O D O S

1. Crecimiento y producción de inoculo de los hongos patógenos

Los aislamientos de *B. cinerea* NPCC 2049 y *P. expansum* NPCC 2023 se hicieron crecer en APD, a partir de los cultivos conservados. *B. cinerea* creció en APD con períodos de 12 h de luz-oscuridad, a 25°C durante 14 días; mientras que *P. expansum* siete días mantenido en oscuridad a la misma temperatura. Las suspensiones conidiales de cada patógeno, se obtuvieron por raspado de la superficie de la colonia con escalpelo estéril, con los cuales se realizó una suspensión en agua destilada estéril (ADE) con 0,01% (v/v) de Tween 80% y filtración a través de malla de tela estéril para eliminar restos de micelio. Las suspensiones se ajustaron de acuerdo a su CMI, por recuento directo con cámara de Neubauer al microscopio óptico.

2. Aislamiento de levaduras con potencial antagonico

Las levaduras con capacidad antagonica se aislaron de acuerdo a la metodología utilizada por Wilson *et al.* (1983), con modificaciones. Se seleccionaron lotes de 100 frutos (cosechados con la madurez fisiológica óptima) de cada una de las variedades (Beurrè D`Anjou y Packham`s Triumph) y de distintos tipos de manejo productivo (orgánico y transición). Los frutos con un mes de almacenamiento en cámara frigorífica (-1/0°C y 95% HR), se hirieron artificialmente (3 mm de diámetro x 3 mm de profundidad) y se conservaron en condiciones comerciales de almacenamiento por seis meses. Lotes similares se mantuvieron sin herir durante el mismo período. Luego del período de incubación la superficie de los frutos sanos y las heridas sin síntomas ni signos de podredumbres, se emplearon como fuentes de aislamiento de potenciales levaduras biocontroladoras.

Bloques de tejidos (5 mm de diámetro x 5 mm de profundidad) conteniendo las heridas sanas y 2 cm² de la superficie de los frutos sanos, fueron extraídos, colocados en

tubos Eppendorf con 1 mL de ADE y agitados a 150 rpm a 4°C por 1 h. Alícuotas de las aguas de lavado (AL) obtenidas de cada porción de tejido, se emplearon para llevar a cabo el *screening* primario (Figura 1).

2.1 *Screening* primario

Frutos sanos del cultivar Packham's Triumph de producción orgánica (sin tratamiento con plaguicidas desde el campo) con 2 meses de almacenamiento frigorífico (-1/0°C y 95% HR), se desinfectaron superficialmente con alcohol 70% (v/v), secados al aire y luego heridos en la región ecuatorial. Las heridas, tres por fruto, se realizaron con un sacabocado estéril de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad. Cada herida fue inoculada con 100 µL del AL obtenida de las heridas y de la superficie de los frutos que permanecieron sanos. Luego de 2 horas, se añadieron a cada herida 20 µL de una suspensión de 10⁴ conidios/ml (CMI) de *P. expansum* NPCC 2023. Se utilizaron como control, peras inoculadas inicialmente con ADE y luego el patógeno. Los frutos inoculados se colocaron en bandejas en el interior de bolsas de polietileno y éstas en cajas de cartón. Las cajas se almacenaron a 4°C, durante 60 días. El diseño fue completamente aleatorizado, utilizando a cada fruto como unidad experimental, con 5 unidades por tratamiento.

Los frutos se examinaron periódicamente, evaluando la incidencia (%I) y la severidad (como diámetro de lesión, en mm) de la enfermedad. Los parámetros de cuantificación se establecieron de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$\%I = \frac{x - b}{x} \times 100$$

Donde:

%I: Incidencia de la enfermedad en porcentaje

x: Número de frutos inoculados

b: Número de frutos inoculados y enfermos

$$RL = \frac{a - z}{a} \times 100$$

Donde:

RL: Reducción de lesión en porcentaje

a: Diámetro de podredumbre del tratamiento control (sólo patógeno)

z: Diámetro de podredumbre del tratamiento con agua de lavado y patógeno

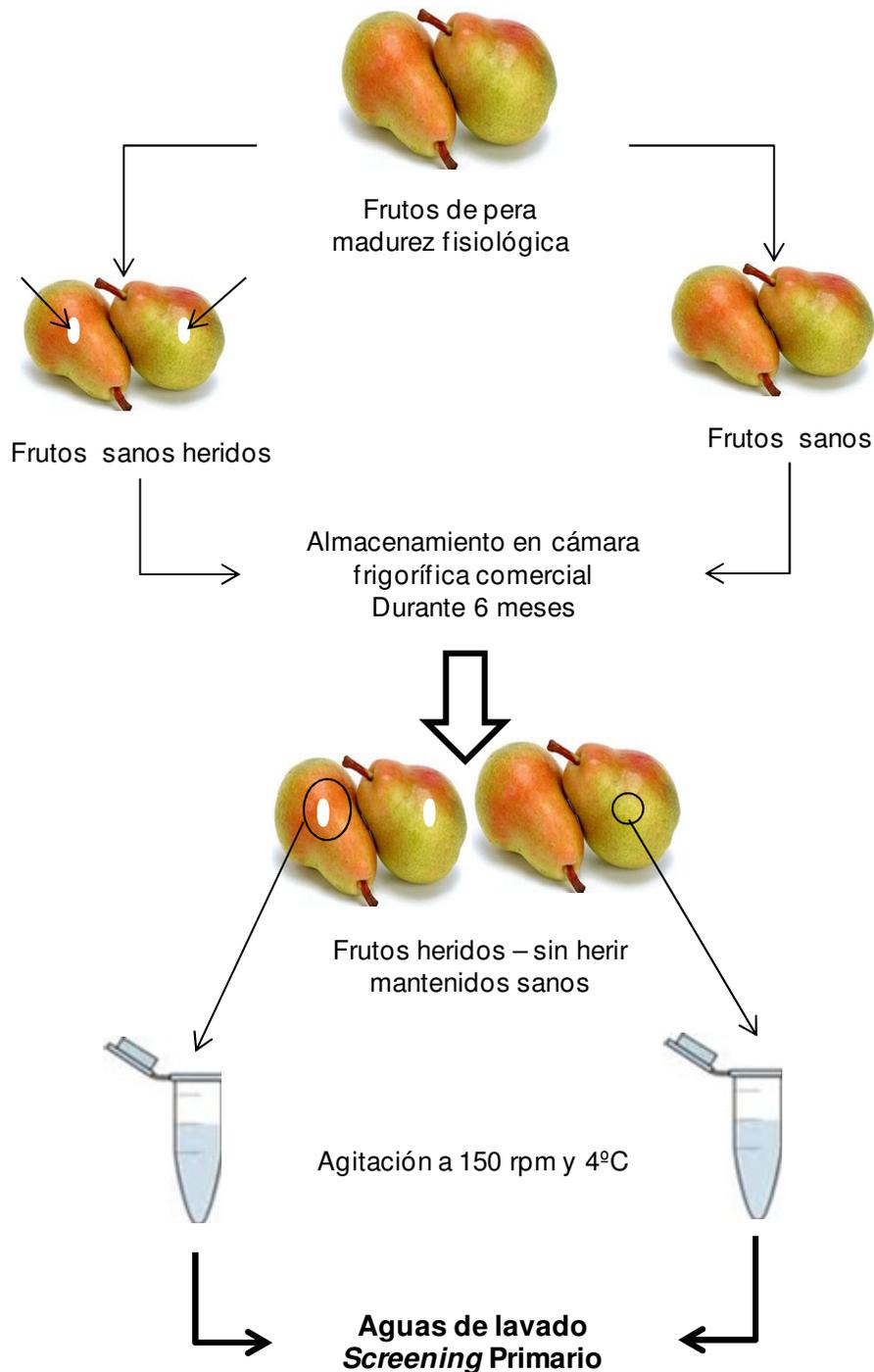


Figura 1. Esquema de *screening* primario. Obtención de aguas de lavado a partir de peras sanas y heridas artificialmente almacenadas 6 meses en conservación frigorífica.

Las aguas de lavado (AL) que lograron reducir el %I de la enfermedad causada por *P. expansum* en más del 50% y una RL mayor al 40%, se seleccionaron como fuentes de posibles levaduras antagonistas. De las heridas que se conservaron sanas se procedió de la misma manera que se describió previamente y 100 μ L del AL fueron sembradas en agar jugo de pera (AJP) suplementado con cloranfenicol (100 mg/L). Las placas se

incubaron a 4°C hasta el desarrollo de las colonias de levaduras (aproximadamente 15-20 días) (Figura 2).

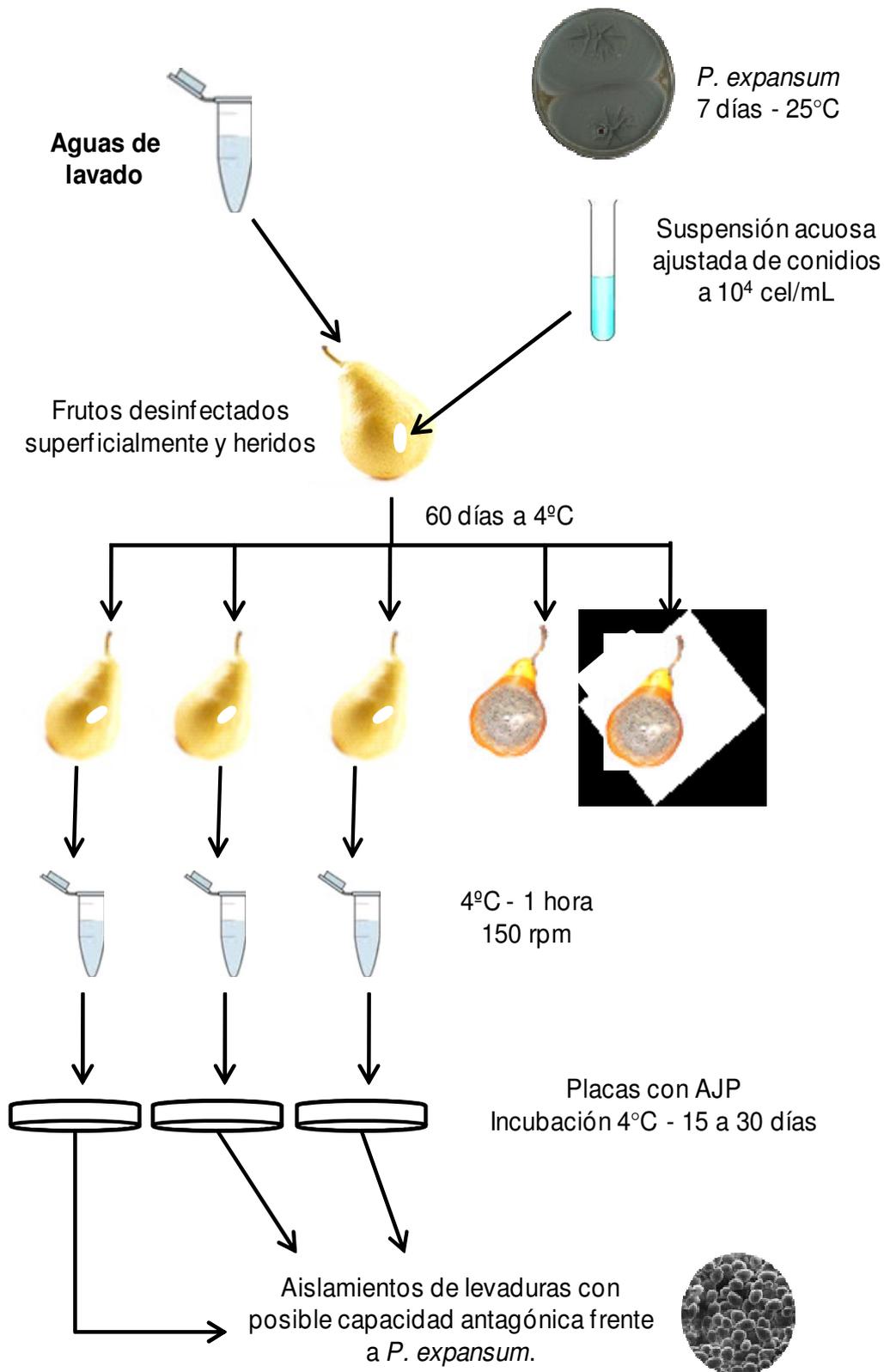


Figura 2. Esquema de obtención de levaduras con posible actividad antagonista luego del *screening* primario.

Un número representativo de colonias se seleccionaron, de acuerdo a su frecuencia de aparición y morfología, y conservados como cultivos puros. Todos los aislamientos se agruparon de acuerdo a su morfología (aspecto macro y microscópico). Cada aislamiento se conservó a -20° y -80°C , usando glicerol 20% (v/v) como agente crioprotector, en el cepario del Laboratorio (North Patagonia Culture Collection, NPCC).

3. Identificación molecular de levaduras con potencial antagonico

Se utilizó la técnica de ITS1-5.8s ADN-ITS2 PCR-RFLP propuesta por Esteve Zarzoso *et al.* (1999) y posterior confirmación por secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S del ARNr de acuerdo a Kurtzman & Robnett (1998).

3.1 Extracción de ADN

Cada uno de los aislamientos se cultivó por 24 h en placas de GPY-agar, y se procedió de acuerdo al protocolo propuesto por Querol *et al.* (1992) con modificaciones. Los pasos realizados para la extracción de ADN fueron los siguientes:

- Se cultivaron las levaduras en 10 mL de medio GPY líquido con agitación durante toda la noche a 26°C .
- Se centrifugaron los cultivos a 2450 g durante 5 min.
- El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 1 mL de ADE y centrifugado nuevamente en las condiciones anteriores.
- El paso 3 se repitió.
- El sobrenadante se descartó.
- El sedimento se resuspendió en 500 μL de la Solución 1 (Sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M).
- Se añadieron 30 μL de una suspensión de Zimoliasa (30 mg/mL) y 30 μL de Novozyma (60 mg/mL); se homogeneizó la suspensión con ayuda de una micropipeta.
- Las muestras se incubaron durante 60 min en agitación.
- Se centrifugaron a 10000 g durante 3 min y se descartó el sobrenadante.
- El sedimento se resuspendió en 500 μL de Solución 2 (Tris-HCl pH=8 50 mM, EDTA 20 mM).
- Se añadieron 13 μL de una solución de SDS al 10% (p/v) y se agitó con vortex.
- Las muestras se incubaron a 65°C durante 5 min.
- Se añadieron 200 μL de acetato potásico 5M/3M.

- Se dejó en hielo durante 10 min.
- Las muestras se centrifugaron a 20800 g durante 15 min a 4°C.
- El sobrenadante obtenido se transfirió a nuevos tubos.
- Las muestras se incubaron durante 15 min a -20°C y centrifugadas en las condiciones anteriores.
- El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf con 700 µL de isopropanol.
- Los tubos con el sobrenadante y el isopropanol, se agitaron suavemente y dejaron a temperatura ambiente 10 min.
- Luego se centrifugaron a 15300 g durante 10 min.
- El sobrenadante se descartó y sin resuspender se agregaron 500 µL de etanol al 70% (v/v) sobre el precipitado.
- Nuevamente se centrifugaron las muestras a 15300 g durante 10 min.
- El sobrenadante se descartó y sin resuspender se agregaron 500 µL de etanol al 70% (v/v) sobre el precipitado
- Las muestras se centrifugaron a 15300 g durante 10 min.
- Finalmente se descartó el sobrenadante y con ayuda de una bomba de vacío se retiró el alcohol y se dejó a 37°C durante 15 min para evaporar los posibles restos de líquido.
- A las muestras secas, se añadieron 17 µL de H₂O mQ estéril y dejaron en heladera 30-60 min y luego se resuspendieron.
- Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.2 Amplificación de segmentos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región ITS1-5.8s ADNr-ITS4 con termociclador PTC-0150 Minicycler MJ Research Incorporated. Para la amplificación de los fragmentos, se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White *et al.* (1990).

Las amplificaciones se llevaron de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo I, inciso 2.2.3.1.1

3.3 Restricción del producto de PCR

El producto de amplificación del ADN de cada muestra (15 µL o 0,5-10 µg) se digirió sin purificación previa, con las endonucleasas de restricción *Hinf* I, *Cfo* I y *Hae* III, según las especificaciones del proveedor. Las muestras con las enzimas de restricción

se incubaron a 37°C durante 12-16 h y los productos de restricción se sembraron en geles de agarosa al 3% (p/v), preparados con solución reguladora TAE. La electroforesis se realizó en la misma solución reguladora (TAE) a voltaje constante (100 V), y luego, los geles fueron revelados utilizando la misma metodología ya descrita (bromuro de etidio 5 µg/mL). Como marcador de peso molecular se utilizó una escala de fragmentos de 100-pb ADN. Los perfiles de restricción obtenidos con cada una de las tres enzimas para cada aislamiento fueron comparados con los perfiles pertenecientes a cepas de colección disponibles en la base de datos de www.yeast-id.com

3.4 Amplificación, purificación y secuenciación del 26 S ARNm

La identidad de cada especie de levadura se confirmó por secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S del ARNr de acuerdo a Kurtzman & Robnett (1998). Se procedió según el protocolo que a continuación se describe:

- La mezcla de amplificación contenía: 2 µL de solución acuosa 50 µM de cada primer, 10 µL de una solución acuosa 1mM de deoxinucleótidos, 10µL de solución reguladora para Taq ADN polimerasa, 0,8 µL de Taq ADN polimerasa (1 U/µL) y 59,2 µL de H₂O miliQ.
- 10 µL de ADN diluido (1/100) de la muestra a amplificar se añadieron a cada tubo conteniendo 90 µL de la mezcla de amplificación.
- La amplificación consistió de 1 ciclo (94°C 5 min), 40 ciclos (94°C 1 min; 55°C 2 min; 72°C 2 min) y 1 ciclo (72°C 10 min).
- Los productos de amplificación se purificaron según el procedimiento recomendado por el kit de purificación utilizado.
- Las muestras purificadas se secuenciaron en MAGROGEN (Corea).

Las secuencias obtenidas de cada levadura se compararon con las publicadas en la base de datos GenBank (disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI) utilizando la herramienta BLAST, en el programa Mega 5.1.

4. Selección de levaduras antagonistas

Un grupo representativo de levaduras aisladas a partir de las AL con potencial antagonico frente a *P. expansum*, fueron seleccionados para llevar a cabo un *screening* secundario.

4.1 Screening secundario

Las levaduras se cultivaron en placas con GPY-agar durante 24 h a 26°C. Una ansada de cada cultivo fresco se resuspendió en ADE y ajustada a una concentración de 10^6 células/mL por recuento con cámara de Neubauer. *P. expansum* NPCC 2023, seleccionado de acuerdo a su patogenicidad y resistencia a los fungicidas TBZ y captan, creció en APD durante 7 días en oscuridad y la suspensión de conidios fue ajustada a 10^4 conidios/mL, que corresponde a su concentración mínima infectiva (CMI).

La metodología utilizada fue similar a la empleada para el *screening* primario. Frutos sanos del cultivar Packham's Triumph con un mes de almacenamiento en frigorífico (-1/0°C y 95% HR), se desinfectaron superficialmente, heridos (3 mm de diámetro y 3 mm de profundidad) en la región ecuatorial e inoculados con 20 µL de la suspensión de cada aislamiento de levadura (10^6 células/mL). Luego de dos horas, 10 µL de una suspensión de conidios de *P. expansum* fue inoculada en las mismas heridas (Figura 3). Las cepas de levaduras *Aureobasidium pullullans* NPCC 1281 y *Rhodotorula mucilaginosa* NPCC 1278, seleccionadas en estudios previos (Robiglio *et al.*, 2012) y los fungicidas comerciales, TBZ y captan, fueron utilizados con fines comparativos. Los fungicidas fueron aplicados por inmersión en una solución a la concentración comercial de uso de cada uno (530 mg/L para TBZ y 660 mg/L para captan), por 30 segundos según Robiglio *et al.* (2011). Como controles se inocularon heridas con ADE y posteriormente la suspensión de conidios de *P. expansum*, y otras solo con la suspensión de las levaduras. Luego de la inoculación y secado de las heridas, los frutos se colocaron en bandejas, dentro de bolsas de polietileno y estas en cajas de cartón. Las cajas fueron almacenadas durante 200 días en condiciones de almacenamiento convencional (-1/0°C y 95% HR). Los tratamientos se dispusieron en forma completamente aleatorizados. Se utilizaron cinco frutos por tratamiento y cada tratamiento se repitió tres veces.

Los frutos se examinaron periódicamente evaluando la incidencia (%) y la severidad (mm) de la enfermedad, de acuerdo a las expresiones ya descritas.

Las levaduras que mostraron una mayor capacidad antagonica frente a *P. expansum* se evaluaron en un segundo bioensayo, en el que se determinó su capacidad de controlar a *B. cinerea*, siguiendo la misma metodología y diseño experimental descrito anteriormente. Los conidios de *B. cinerea* NPCC 2049, se obtuvieron de cultivos en APD a 26°C con períodos de 12 h de luz-oscuridad. La suspensión inoculada en las heridas fue de 5×10^3 conidios/mL (CMI).

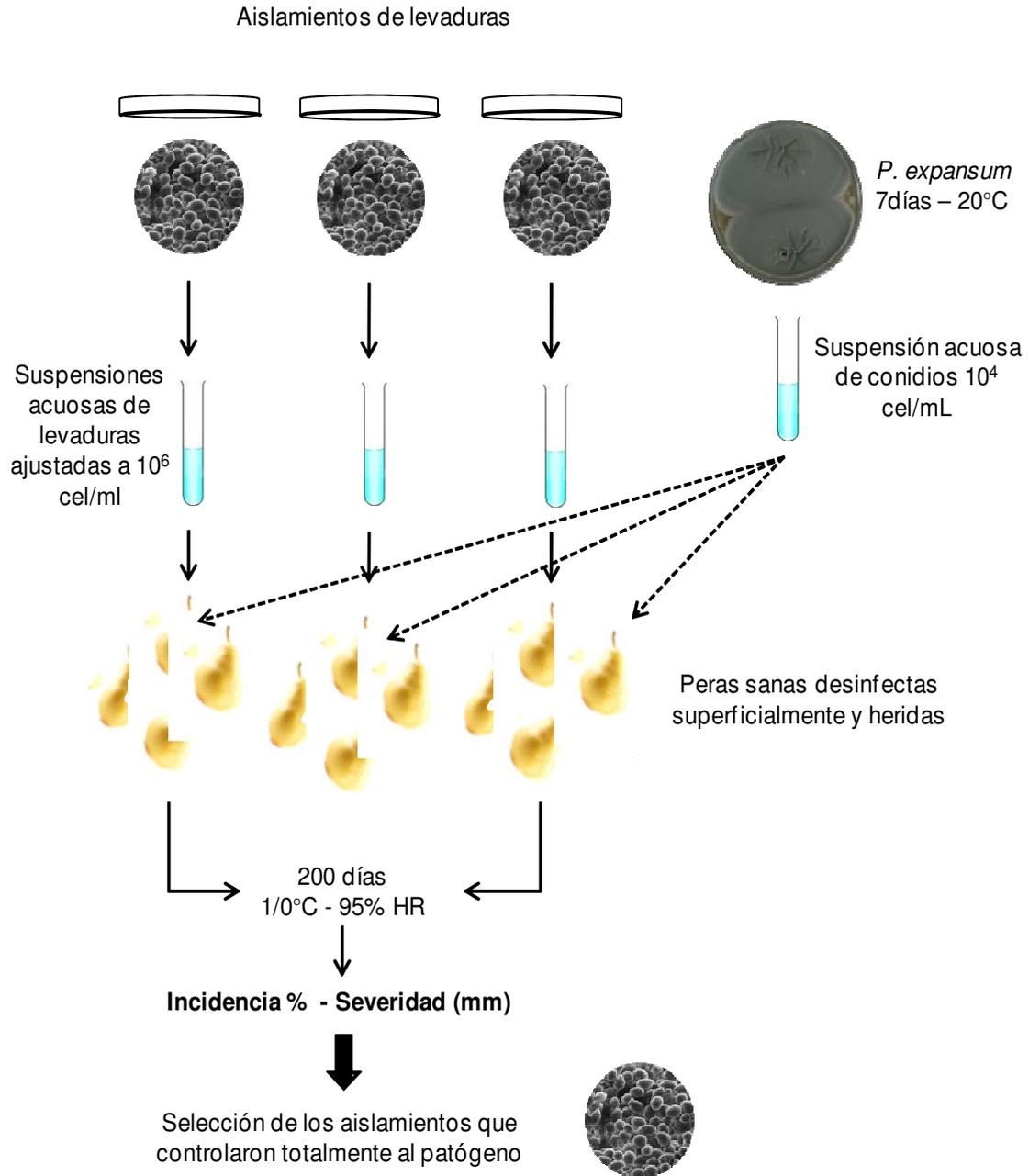


Figura 3. Esquema de metodología utilizada para la selección de levaduras antagonistas.

5. Análisis estadístico

La severidad se determinó por la medición del diámetro de lesión (mm) y los resultados se analizaron con un modelo lineal de un sólo factor, con efecto tratamiento. Comparaciones de medias fueron realizadas utilizando el test de Tukey ($p < 0,050$).

La incidencia (%I), se analizó utilizando un modelo lineal no generalizado de distribución binomial (GLM) del Sistema de Análisis Estadístico (INFOSTAT, versión 9.1. 2004).

RESULTADOS

1. Aislamiento e identificación de levaduras con capacidad antagónica

Se obtuvieron un total de 116 aguas de lavado (AL) a partir de heridas y superficie de peras que se mantuvieron sanas en las condiciones de almacenamiento comercial luego de 6 meses. En el primer *screening* las AL se evaluaron frente a *P. expansum* NPCC 2023. Del total de aguas evaluadas el 23% (27 aguas de lavado), lograron alcanzar los criterios de selección establecidos (reducción de %I en más de 50% y del %RL más de 40%). El 74% de las AL mostraron un %RL de entre el 40% y el 60%, mientras que el 15% y 11%, el rango de %RL, entre 60%-90% y 90%-100%, respectivamente. La mayoría de las AL con actividad antagónica se obtuvo a partir de heridas sanas (66,7%) que provenían de frutas con manejo de transición (72,2%) (Tabla 1).

A partir de las heridas de las peras sanas tratadas con las AL y *P. expansum*, se realizaron los aislamientos de levaduras potenciales biocontroladoras (Figura 4). A los 15-20 días de incubación a 4°C, se obtuvieron 55 aislamientos de levaduras en AJP al 85% (v/v)

Los aislamientos fueron llevados a cultivos puros y agrupados de acuerdo a las características micro y macro morfológica desarrollados en GPY-agar, y luego identificados por métodos moleculares. En primera instancia se realizó el análisis de restricción de la región ITS1-5.8S ADNr-ITS2 con las endonucleasas de restricción *Cfo* I, *Hae* III y *Hinf* I (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). (Anexo III). Posteriormente representantes de los distintos perfiles de restricción fueron confirmados por

secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S del ARNr. Las especies obtenidas se muestran en la Tabla 2 en la que se agruparon de acuerdo a su procedencia.

Tabla 1. Número y porcentaje de aguas de lavado que respondieron a los criterios de selección establecidos, de acuerdo a su origen.

Origen de las Aguas de Lavado (AL)	Transición		Orgánica		TOTAL
	Packham's Triumph	Beurré D'Anjou	Packham's Triumph	Beurré D'Anjou	
Heridas sanas	10 (37,1)	3 (11,1)	1 (3,7)	4 (14,8)	18 (66,7)
Superficie	1 (3,7)	2 (7,4)	2 (7,4)	4 (14,8)	9 (33,3)
	11 (40,8)	5 (18,5)	3 (11,1)	8 (29,6)	27 (100)

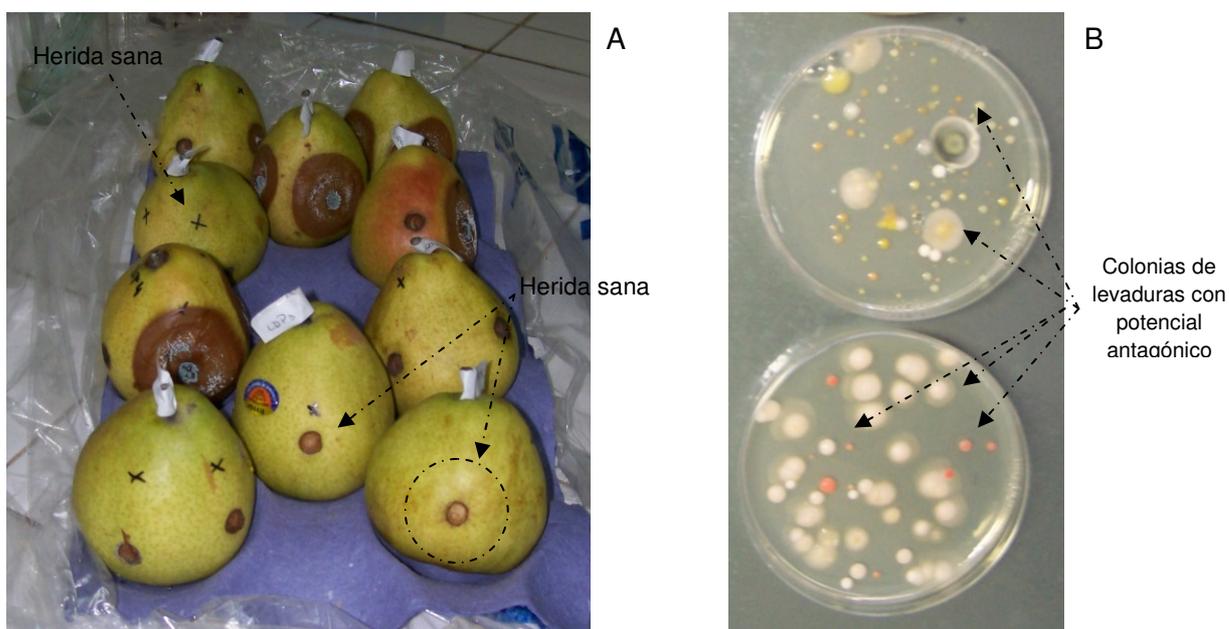


Figura 4. A) Peras inoculadas con las aguas de lavado y *P. expansum* NPCC 2023 luego del período de incubación en el *screening* primario. B) Aislamientos desde las heridas sanas de peras crecidas en AJP a 4°C.

Se identificaron 11 especies distintas de levaduras entre los 55 aislamientos obtenidos de las AL. Ocho especies diferentes fueron aisladas desde frutas con manejo orgánico, mientras que siete de frutas de manejo de transición. La especie predominante en todas las situaciones estudiadas fue *Aureobasidium pullulans*. El

género *Cryptococcus* (*Cr.*) con representantes de las especies *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus wieringae* y *Cryptococcus tephrensis*, también presentó un gran número de aislamientos en los distintos orígenes. Cuatro especies de levaduras se aislaron únicamente a partir de AL de peras bajo manejo orgánico: *Cr. tephrensis*, *Candida patagonica*, *Pichia membranifaciens* y *Rhodotorula glutinis*, mientras que *Cystofilobasidium infirmominiatum* y *Rhodotorula laryngis* fueron recuperados sólo a partir de peras almacenadas en empaque de transición (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de las especies de levaduras aisladas de las aguas de lavado con potencial antagónico.

Especies	Origen y número de levaduras				Total (%)
	Heridas		Superficie		
	Orgánico	Transición	Orgánico	Transición	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	6	5	2	17 (30,9)
<i>Cryptococcus victoriae</i>	1	7	-	2	10 (18,2)
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	2	5	1	9 (16,4)
<i>Cryptococcus wieringae</i>	1	3	-	1	5 (9,1)
<i>Cryptococcus tephrensis</i>	-	-	4	-	4 (7,3)
<i>Rhodotorula laryngis</i>	-	4	-	-	4 (7,3)
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	-	1	-	-	1 (1,8)
<i>Candida patagónica</i>	-	-	1	-	1 (1,8)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	1	-	1 (1,8)
<i>Pichia membranifaciens</i>	1	-	-	-	1 (1,8)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	1	1	2 (3,6)
Aislamientos totales	8	23	17	7	55(100)

La composición de especies de levaduras con potencial antagónico frente a *P. expansum* encontradas en las AL fue variada (Tabla 3). Se obtuvieron elevados porcentajes de reducción de lesión (%RL) y de reducción de incidencia en aguas que contenían desde una sola especie de levadura. (AL 4, Beurrè D'Anjou, *Cr. victoriae*, Tabla 3), hasta aguas que contenían hasta 3 especies (AL 7, Packham's Triumph, *A. pullulans*, *Cr. albidus* y *Cr. victoriae*, Tabla 3). Se destaca el hecho que *Cr. victoriae* sola o con otras especies (*Cr. albidus* y/o *A. pullulans*) en general estuvo presente en

la mayoría de las AL provenientes de peras del manejo de transición (Tabla 3), mientras que de fruta orgánica se encontró un sólo aislamiento de esta especie (Tabla 3). Asimismo *Cr. victoriae* se presentó en las AL que obtuvieron el mayor %RL (85% y 100%, AL 3,4 y 7).

2. Selección de levaduras antagonistas

2.1 *Screening* secundario

Se seleccionaron 26 aislamientos (11 provenientes de superficie y 15 de heridas) para ser evaluados individualmente *in situ* frente a *P. expansum* NPCC 2023 (indicados en negrita en la Tabla 3). Se seleccionaron representantes de las 11 especies de levaduras teniendo en cuenta sus frecuencias de aparición, con el fin de tener una imagen lo más completa posible de la diversidad de levaduras aisladas. Las cepas de *Aureobasidium pullulans* NPCC 1281 y *Rhodotorula mucilaginosa* NPCC 1278 (Robiglio *et al.*, 2011) fueron añadidas en este *screening* con fines comparativos, al igual que los fungicidas TBZ y captan, considerados controles químicos.

A los 100 días de incubación en cámara de almacenamiento (-1/0°C y 95% HR) todos los aislamientos de levaduras controlaron completamente la incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum* NPCC 2023, a diferencia de lo ocurrido con los controles químicos utilizados. Los dos fungicidas empleados presentaron una incidencia de 100% de la enfermedad, con reducción significativa de la severidad de podredumbre ocasionada (Tabla 4).

A los 200 días de conservación, 10 aislamientos lograron mantener el control completo de la enfermedad, es decir cero de %I (Tabla 5). Estos aislamientos fueron: *A. pullulans* NPCC 1262, 1273 y 1274; *Cr. albidus* NPCC 1248; *Cr. victoriae* NPCC 1259, 1260 y 1263; *Cy infirmominiatum* NPCC 1261; *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *R. laryngis* NPCC 1264. De estos aislamientos, 80% fueron aislados de heridas y 70% del cultivar Packham's Triumph. Algunos de los aislamientos de *A. pullulans* (NPCC 1262, 1273 y 1274) controlaron totalmente la incidencia de la enfermedad, mientras que otros (NPCC 1256 y 1277) sólo la redujeron hasta el 40% (Tabla 5). Un comportamiento similar se observó entre aislamientos de *Cr. victoriae*, *Cr. albidus* y *Rh. laryngis*.

Los niveles de protección alcanzados con los aislamientos *A. pullulans* NPCC 1281 y *R. mucilaginosa* NPCC 1278, seleccionados por Robiglio *et al.* (2011), resultaron menos eficientes que los obtenidos por muchas de las levaduras que se aislaron en este trabajo (Tabla 5).

Tabla 3. Biota de levaduras detectadas en las AL que redujeron la incidencia de la enfermedad en más del 50% y la severidad en más del 40% en el *screening* primario frente a *P. expansum*.

Origen		Proceso productivo de transición			Proceso productivo orgánico			
Sitio de aislamiento	Cultivar	AL	RL (%)	Especies de levaduras	AL	RL (%)	Especies de levaduras	
Superficie de fruto	Beurrè D'Anjou	1	60	<i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. victoriae</i>	17	52	<i>Cr. albidus</i> , <i>R. mucilaginosa</i>	
		2	53,2	<i>A. pullulans</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>Cr. wieringae</i>	18	41,3	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i>* , <i>Cr. tephrensis</i>	
					19	43,3	<i>A. pullulans</i> , <i>Ca. patagonica</i> , <i>Cr. tephrensis</i>	
					20	45,3	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. tephrensis</i>	
	Packham's Triumph	3	85	<i>A. pullulans</i>* , <i>Cr. Victoriae</i>	21	42,1	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. tephrensis</i> , <i>R. glutinis</i>	
					22	46,1	<i>A. pullulans</i>* , <i>Cr. albidus</i>	
	Heridas	Beurrè D'Anjou	4	100	<i>Cr. victoriae</i>	23	60	<i>Cr. victoriae</i>*
			5	43	<i>A. pullulans</i>	24	43	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i>
			6	40,3	<i>R. laryngis</i>	25	41,8	<i>A. pullulans</i>
		Packham's Triumph	7	100	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. victoriae</i>*	26	40,4	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. wieringae</i>
8			69	<i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. victoriae</i> , <i>R. laryngis</i>*				
9			60	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. victoriae</i> , <i>Cr. wieringae</i> , <i>R. laryngis</i>				
10			53	<i>A. pullulans</i>				
11			50	<i>A. pullulans</i>	27	43,6	<i>A. pullulans</i> , <i>P. membranifaciens</i>*	
12			50	<i>Cy. infirmominiatum</i>*				
13			49,3	<i>Cr. victoriae</i> , <i>Cr. Wieringae</i>				
14			47,2	<i>A. pullulans</i>*				
15			47	<i>Cr. victoriae</i>* , <i>Cr. wieringae</i> , <i>R. laryngis</i>				
16			45,3	<i>Cr. victoriae</i>				

Donde: AL: Agua de lavado. RL (%): Reducción de Lesión. *A.*: *Aureobasidium*; *Ca.*: *Candida*; *Cr.*: *Cryptococcus*; *Cy.*: *Cystofilobasidium*; *R.*: *Rhodotorula*; *P.*: *Pichia*. **Con negrita:** Aislamientos evaluados en el *screening* secundario frente a *P. expansum*. * Aislamientos más promisorios en el *screening* secundario frente a *P. expansum*.

Tabla 4. Eficacia de los tratamientos químicos sobre *P. expansum* a los 100 días de almacenamiento (-1/0°C y 95% HR).

Tratamiento	I%	RL (%)	Severidad (mm)
Captan	100	57,73	10,00 a
TBZ	100	29,59	16,66 b
Control ¹	100	-	23,66 c

¹*P. expansum* sin tratamiento de fungicidas. I (%): Porcentaje de incidencia. RL (%): Porcentaje de reducción de lesión. Diferentes letras luego de los valores de severidad indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey (p>0,05).

Tabla 5. Efecto de los aislamientos de levaduras indígenas y fungicidas químicos, frente a *P. expansum* NPCC 2023 luego de 200 días de almacenamiento (-1/0°C y 95% HR).

Tratamiento					<i>P. expansum</i>		
Especie de levadura	NPCC	Origen ^a			I(%) ^b	Severidad (mm ± DE)	RL (%) ^c
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1256	O	P	S	100	50,33 ± 1,5e	7
	1262	O	D	H	0*	-	100
	1269	T	D	H	60	45,66 ± 1,5d	15
	1273	O	P	S	0*	-	100
	1274	T	P	H	0*	-	100
	1277	O	D	H	100	18,00 ± 1,0a	67
	1281	T	P	S	60	38,66 ± 3,4c	28
<i>Candida patagónica</i>	1249	O	D	S	100	39,00 ± 1,0c	28
<i>Cryptococcus albidus</i>	1247	O	P	S	60	46,00 ± 2,0d	15
	1248	O	D	S	0*	-	100
<i>Cryptococcus tephrensensis</i>	1242	O	D	S	60	18,00 ± 1,0a	67
	1244	O	D	S	60	43,00 ± 1,0cd	20
<i>Cryptococcus victoriae</i>	1243	T	D	S	40*	29,50 ± 0,5b	45
	1255	T	P	H	40*	23,66 ± 0,6ab	56
	1259	O	D	H	0*	-	100
	1260	T	P	H	0*	-	100
	1263	T	P	H	0*	-	100
	1271	T	D	H	40*	28,00 ± 1,0b	48
<i>Cryptococcus wieringae</i>	1268	O	D	H	40*	12,33 ± 2,1a	76
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	1261	T	P	H	0*	-	100
<i>Pichia membranifaciens</i>	1250	O	P	H	0*	-	100
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1246	O	P	S	80	31,66 ± 1,5b	41
<i>Rhodotorula laryngis</i>	1251	T	D	H	80	45,66 ± 1,5d	15
	1253	T	P	H	60	18,66 ± 1,5a	65
	1264	T	P	H	0	-	100
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1241	O	D	S	100	51,33 ± 1,5e	5
	1270	T	D	S	80	41,00 ± 1,0c	24
	1278	T	P	S	60	18,00 ± 1,0a	67

Tabla 5. Continuación

Tratamiento	<i>P. expansum</i>		
	<i>I</i> (%) ^b	Severidad (mm ± DE)	RL (%) ^c
Fungicidas químicos			
Tiabendazol (528 µg/mL)	100	52,66 ± 0,6e	2
Captan (660 µg/mL)	100	41,66 ± 1,5c	23
<i>Penicillium expansum</i> (Control)	100	54,00 ± 1,7e	

^aOrigen **T/O**. T: Producción de transición. O: Producción orgánica. **D/P**. D: Cultivar Beurré D'Anjou. P: Cultivar Packham's Triumph. **S/H**. S: Superficie. H: Herida. ^b*I* (%): Incidencia de la enfermedad. ^cRL (%): reducción de lesión. En negrita NPCC 1281 y NPCC 1278 (Robiglio *et al.*, 2011). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas de acuerdo a Pruebas de Contraste, con respecto al tratamiento con el patógeno. Diferentes letras luego de los valores de severidad indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey (p>0,05)

2.2 Acción biocontroladora de los aislamientos de mayor potencial frente a *Botrytis cinerea*

Los 10 aislamientos que lograron un control total de *P. expansum* se evaluaron frente al aislamiento de *B. cinerea* NPCC 2049 (seleccionado por su patogenicidad), con el objetivo de establecer su potencial sobre el biocontrol del moho gris.

La evaluación de la fruta inoculada se llevó a cabo luego de 100 días de almacenamiento, se observó una incidencia de la enfermedad de 60 y 100% dependiendo del aislamiento (Tabla 6). Aún cuando estos valores fueron altos, en muchos casos se produjo una evidente reducción de la severidad de las podredumbres (Tabla 6). Los aislamientos *P. membranifaciens* NPCC 1250, *Cr. victoriae* NPCC 1259 y NPCC 1263 y *Cr. albidus* NPCC 1248, fueron los mejores antagonistas, ya que redujeron entre el 60 y 80% la incidencia de *B. cinerea*, con una reducción del diámetro de podredumbre que fue entre el 55 al 68%, con respecto al control sin levaduras.

Se puede destacar que tres de los cinco aislamientos que presentaron menor incidencia de la enfermedad y los mayores porcentajes de reducción de la podredumbre fueron aislados de AL provenientes de heridas.

Tabla 6. Efecto biocontrolador de los aislamientos de levaduras seleccionados sobre *B. cinerea* a los 100 días de almacenamiento (-1/0°C y 95% HR).

Tratamiento		<i>B. cinerea</i>		
Especie de levadura	NPCC	I (%) ^a	Severidad (mm±DE)	RL (%) ^b
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1273	100	73,33±0,57d	17,14
	1274	100	71,00±3,46d	19,77
	1262	100	71,33±1,15d	19,40
<i>Cryptococcus albidus</i>	1248	80*	30,33±9,07a	65,72
<i>Cryptococcus victoriae</i>	1259	60*	35,00±2,00ab	60,45
	1263	80*	40,66±1,15b	54,05
	1260	100	66,33±2,08cd	25,05
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	1261	100	54,16±4,70c	28,80
<i>Pichia membranifaciens</i>	1250	60*	29,09±1,52a	67,13
<i>Rhodotorula laryngis</i>	1264	100	71,33±4,04d	19,40
<i>Botrytis cinerea</i>		100	88,50±5,46e	

^a I (%) Incidencia de la enfermedad. ^b RL (%): Porcentaje de reducción de lesión. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas de acuerdo a Pruebas de Contraste, con respecto al tratamiento con el patógeno. Diferentes letras luego de los valores de severidad indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey ($p>0,05$)

DISCUSIÓN

Las levaduras son un grupo versátil de microorganismos eucariotas que exhiben perfiles nutricionales heterogéneos y una sorprendente capacidad de sobrevivir en una amplia gama de hábitats naturales y artificiales (Shivaji & Prasad, 2009; Starmer & Lachance, 2011; Buzzini *et al.*, 2012). Estas características hacen que sean herramientas biotecnológicas con un elevado potencial para distintos fines. Como ACB de las enfermedades de postcosecha las levaduras tienen ventajas sobre otros microorganismos, ya que son la comunidad más abundante cuando los frutos están maduros y están más adaptadas a las bajas temperaturas que las bacterias (Margesin *et al.*, 2003; Turkiewicz *et al.*, 2003). La adaptación de las levaduras a las bajas temperaturas está determinada por la

formación de cápsulas de polisacáridos y por cambios en la composición lipídica de membrana celular. En general, esta característica se presenta mayoritariamente en las levaduras basidiomicéticas (Rossi *et al.*, 2009; Shivaji & Prasad, 2009).

Los procesos de aislamiento y selección son etapas claves en las distintas estrategias de búsqueda de antagonistas de enfermedades. En este sentido, de acuerdo al objetivo de este trabajo de Tesis, la hipótesis de partida se basa en que la mejor estrategia de aislamiento de potenciales antagonistas frente a un patógeno específico, es la búsqueda en los sitios propicios para el desarrollo de los mismos (Baker & Cook, 1974; Slininger *et al.*, 2003). La metodología aquí adoptada se centra en la búsqueda y selección de antagonistas en heridas y superficie de la fruta que, luego del período de almacenamiento en condiciones comerciales (-1/0°C y 95% HR) y con la presión natural de inóculo de los patógenos, se mantuvieron sanas. La selección de microorganismos antagonistas en estos sitios y condiciones específicas, representa una ventaja adaptativa de estos sobre los patógenos que causan podredumbres de peras (Wilson & Wisniewsky, 1989). Sin embargo, diferentes autores han evaluado aislamientos de distintos orígenes, con resultados variados frente a diversos patógenos de fruta (Borras & Aguilar, 1990; Arras, 1993; Testoni *et al.*, 1993; Adikaram & Karunatne, 1998; Guinebretiere *et al.*, 2000; Vero *et al.*, 2012).

El aislamiento y selección fue desarrollado empleando como fuente de antagonistas los frutos de pera (sustrato específico), los cuales se incubaron en condiciones de almacenamiento comercial, es decir bajas temperaturas (-1/0°C) y elevada HR (95%). En la mayoría de los trabajos realizados por otros autores el aislamiento de los potenciales antagonistas se realiza a temperatura ambiente, condición en la cual resulta difícil encontrar levaduras adaptadas al frío, capaces de crecer y competir en las condiciones de almacenamiento frigorífico (Chand-Goyal & Spotts, 1996; Lima *et al.*, 1998; Viñas *et al.*, 1998; Sugar & Basile, 2008). En estos estudios, obtienen un elevado número de microorganismos pero sólo el 2,5-10% conservan la capacidad biocontroladora cuando se evalúan en fruta a 1°C y 4°C (Lima *et al.*, 1998; Viñas *et al.*, 1998; Sugar & Basile, 2008). Aquí, de 116 aguas de lavado (AL) evaluadas en el *screening* primario (*in situ*), 23% fueron preseleccionadas por su capacidad de biocontrol frente a *P. expansum* a 4°C.

La mayor parte de los aislamientos con potencial antagónico obtenidos correspondió a los géneros *Aureobasidium*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. Estos géneros coinciden con los informados por otros autores que evaluaron la microbiota de superficie de algunos cultivares de peras, manzanas y nectarines almacenados (Chand-Goyal & Spotts, 1996b;

Granado *et al.*, 2008; Janisiewicz *et al.*, 2010;) y ya han sido reportados como eficaces ACB sobre varios patógenos de postcosecha de fruta en distintas condiciones (Robert, 1990; Chand-Goyal & Spotts, 1996a y b; Yu *et al.*, 2007; Sugar & Basile, 2008; Vero *et al.*, 2009). Como géneros minoritarios, se encontraron *Cystofilobasidium*, *Candida* y *Pichia*. Todos los géneros encontrados ya han sido previamente informados con capacidad de reducir la incidencia de *P. expansum*, *B. cinerea* y *Mucor sp.* en peras y manzanas (Chand-Goyal & Spotts, 1996a; Jijakli & Lepoive, 1998; Viñas *et al.*, 1998; Fiori *et al.*, 2008).

El uso de levaduras psicrófilas y psicrotolerantes, determinarían el éxito de un ACB para el control de las enfermedades de postcosecha de frutos. En este sentido, la metodología utilizada permitió el aislamiento especies de psicrófilas frecuentemente reportadas en ambientes fríos. De las 11 especies aisladas a partir de heridas y superficie de peras sanas, el 81 % resultaron especies psicrófilas. Los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Pichia* incluyen varias especies aisladas de ambiente frío (Scorzetti *et al.*, 2000; Starmer *et al.*, 2005; Turchetti *et al.*, 2008). Aislamientos de *A. pullulans*, *Cy. infirmominiatum* y *Rh. mucilaginoso* han sido obtenidos de glaciares (Tosi *et al.*, 2002; Starmer *et al.*, 2005; D'Elia *et al.*, 2009). Sin embargo *A. pullulans*, *P. membranifaciens* y *Rh. mucilaginoso* son especies ubicuas en alimentos y diversos entornos naturales (Querol & Flett, 2006; Sangorrín *et al.*, 2007; Gholamnejad *et al.*, 2010). Por otra parte, la especie *Ca. patagonica* fue aislada por primera vez asociada a superficies de bodegas del norte de la Patagonia (Sangorrín *et al.*, 2007), y parece que sería una especie típica de esta región.

Más de 30 especies de levaduras han sido reportados como buenas antagonistas para el CB de enfermedades postcosecha de frutos almacenados a bajas temperaturas (Sangorrín *et al.*, 2013). Catorce de estas especies también han sido aisladas de los ambientes naturales fríos junto con aproximadamente otras 100 especies psicrófilas (Brandao *et al.*, 2011; Buzzini *et al.*, 2012). De estas 14 especies, 12 se han descrito como ACB en varios *reviews* (Wisniewski *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009; Teixido *et al.*, 2011); mientras que otras especies de levaduras como *Leucosporidium scottii* desde suelo de la Antártida (Vero *et al.*, 2011), *Rhodospiridium paludigenum* de agua de mar a bajas temperaturas (Wang *et al.*, 2009) y *Cr. diffluens* de la superficie de peras en conservación (Robiglio *et al.*, 2011), han sido reportadas más recientemente ya que los métodos utilizados en estos trabajos favorecen el aislamiento de un mayor número de levaduras psicrófilas. De las especies psicrófilas con potencial biocontrolador que se obtuvieron en este trabajo se encuentran *Cr. victoriae*, *Cr. tephrensensis*, *Cr. wieringae* y *Rh. laryngis*; todas ellas son habituales en ambientes fríos (suelo de la Antártida, agua, sedimentos y hielo de glaciar), y el método de

aislamiento de levaduras utilizado permitió su obtención. En este sentido, Droby *et al.* (2009) sugieren que nuevos microorganismos antagonistas podrían ser aislados y seleccionados cambiando la estrategia de aislamiento y selección. Por su parte, Robiglio *et al.* (2011), en su trabajo llevado a cabo en el mismo laboratorio y utilizando fruta de los mismos empaques, reportan solo algunas especies en común: *A. pullulans*, *Cr. albidus*, *P. membranifaciens* y *Rh. mucilaginoso*, dado que se empleó una estrategia de selección diferente. En esta Tesis se reportan por primera vez como especies de levaduras con potencial antagonista a *Cr. victoriae*, *Cr. wieringae*, *Cr. tephrensis*, *Rh. laryngis* y *Ca. patagónica* frente a *P. expansum* y *B. cinerea*.

Aún cuando algunos trabajos previos usan las AL con actividad antagónica como fuente de levaduras, este es el primer estudio, en el cual se identifica la microbiota completa de levaduras presente en ellas. En este sentido, las interacciones entre los microorganismos que constituyen cada AL, podrían estar implicadas en la actividad biocontroladora de cada una de ellas. Este es un aspecto importante, ya que se podría tener en cuenta para el desarrollo futuro de cultivos mixtos de levaduras como ACB (Viljoen, 2006; Sharma *et al.*, 2009). En las aguas evaluadas las combinaciones más frecuentes estaban constituida por las especies *A. pullulans*, *Cr. albidus* y *Cr. victoriae*.

De acuerdo a Vero *et al.* (2002), en el proceso de aislamiento y selección, utilizar cepas de patógenos locales favorecería la obtención de cepas de ACB más eficaces respecto de los que podrían seleccionarse utilizando patógenos provenientes de otras regiones geográficas. El enfrentamiento de los posibles ACB con las cepas patógenas locales seleccionadas por su patogenicidad y resistencia a los fungicidas de síntesis tradicionalmente utilizados, esta es otra de las ventajas que presenta la metodología de selección propuesta en este trabajo. Los aislamientos *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049 (Capítulo I), utilizados para los *screenings* fueron obtenidos en los empaques regionales en los cuales se llevó a cabo la búsqueda de los ACB. Muchos de los trabajos publicados, utilizan las cepas patógenas más patogénicas conservadas en colecciones de cultivos (Chand-Goyal & Spotts, 1996b; Yu *et al.*, 2007); mientras que otros usan patógenos locales obtenidos de frutos enfermos sin evaluar ni considerar parámetros como la patogenicidad y/o comportamiento frente a fungicidas (Janisiewicz & Marchi, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2008).

Las heridas de la fruta son ricas en especies reactivas del oxígeno (ROS), lo cual implica que al aplicar las levaduras antagónicas sobre la superficie de la fruta, estas deben ser tolerantes a estos factores oxidativos que pueden afectar su viabilidad y/o rendimiento

(Castoria *et al.*, 2003; Macarisin *et al.*, 2010). Otro efecto de las ROS es que estas también influyen en la producción y señalización de las defensas en los tejidos del fruto. Algunos autores indican que un estallido oxidativo por el incremento en la producción de ROS, resulta en las primeras respuestas del hospedante al ataque de los patógenos (Mellersh *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2010). En este sentido, Xu *et al.* (2008) reportaron que cuatro levaduras antagonicas (*P. membranifaciens*, *Cr. laurentii*, *Ca. guilliermondii* y *Rh. glutinis*) fueron capaces de estimular tanto la expresión génica antioxidante, como la actividad de enzimas antioxidantes en los tejidos de frutas de durazno. La estrategia de aislamiento y selección propuesta en esta Tesis a través de los *screenings in situ*, favorecería la selección de levaduras tolerantes a las ROS.

En los experimentos *in situ* se observó una gran diversidad en la capacidad biocontroladora frente a *P. expansum* de los distintos aislamientos de levaduras. Estas diferencias no sólo fueron a nivel de especie, sino que también a nivel de cepa. Particularmente los aislamientos de *A. pullulans*, *Cr. victoriae*, *Rh. laryngis* y *Rh. mucilaginosa* presentaron un amplio rango de efectividad entre las diferentes cepas evaluadas, característica que también fue observada por otros autores (Robert, 1990; Chand-Goyal & Spotts, 1997; Lima *et al.*, 1998; Janisiewicz *et al.*, 2001; Robiglio *et al.*, 2011). En el mismo sentido, pero con respecto al patógeno a controlar, los resultados obtenidos indican que el potencial antagonico de las distintas cepas de levaduras fue diferente según se tratase de *P. expansum* o *B. cinerea*. De los diez aislamientos que controlaron totalmente el desarrollo de *P. expansum* durante los 200 días de almacenamiento, sólo 4 de ellos (*Cr. albidus* NPCC 1248, *Cr. victoriae* NPCC 1259 y NPCC 1263, y *P. membranifaciens* NPCC 1250) lograron reducir en 40% incidencia de *B. cinerea*. Estas diferencias en los niveles de control sobre los dos patógenos, podrían explicarse por la presión selectiva ejercida por el empleo *P. expansum* durante el desarrollo de la estrategia de selección (*screening* primario).

El comportamiento antagonico de las levaduras seleccionadas frente a *P. expansum* fue superior al obtenido con los fungicidas químicos y a las cepas *A. pullulans* NPCC 1281 y *R. mucilaginosa* NPCC 1278, reportadas como mejores biocontroladoras por Robiglio *et al.* (2011). La ineficacia del tratamiento con TBZ era esperable ya que la cepa *P. expansum* NPCC 2023 fue seleccionada por su resistencia a este compuesto de acuerdo a los ensayos efectuados *in vitro*. Sin embargo, de acuerdo los resultados con captan (*in vitro* CIM de 83 mg/L) se esperaba que sobre la fruta, la concentración comercial fuese efectiva, no obstante no logró ser eficaz. En lo que respecta a *A. pullulans* NPCC 1281 y *Rh.*

mucilaginoso NPCC 1278, estas levaduras mostraron porcentajes de control mayor que los fungicidas, pero inferiores a las levaduras aisladas en esta Tesis. Los resultados, indican la mayor eficacia de las levaduras indígenas obtenidas a partir de esta metodología de aislamiento y selección, ya que acentúa la capacidad de crecer y biocontrolar en frío, permitiendo la selección de mejores ACB. Es así que en un futuro, sería posible el desarrollo de un sistema de control biológico en base a estos organismos seleccionados, como una herramienta para el manejo orgánico o MIP de las producciones regionales.

De los cuatro aislamientos que presentaron los mejores resultados frente a ambos patógenos, *Cr. albidus* NPCC 1248, *Cr. victoriae* NPCC 1259 y NPCC 1263, y *P. membranifaciens* NPCC 1250, tres de ellos se obtuvieron a partir de AL de heridas (NPCC 1263; NPCC 1259, y NPCC 1250), específicamente de las AL7, AL23 y AL27, las cuales en el *screening* primario mostraron una reducción de lesión de 100%, 60% y 43,6%, respectivamente. Interesantemente el aislamiento NPCC 1263 mostró la misma capacidad de control que el AL en la cual estaba combinado con *A. pullulans* y *Cr. albidus*, lo cual estaría indicando que la aptitud biocontroladora superior se deba justamente a su presencia. Una situación opuesta ocurrió con los aislamientos de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. albidus* NPCC 1248, los cuales en la AL de origen estaban combinados con otras especies (*A. pullulans* y/o *Cr. tephrensis*) y en el *screening* primario alcanzaron una reducción de lesión de 43,6% y 41,3%, respectivamente, mientras solos (en el *screening* secundario) controlaron 100% la incidencia del patógeno. Es esta última situación, la combinación de especies en las AL podrían ser antagónicas entre ellas (por competencia de nutrientes, producción de toxinas *killer*, por ejemplo).

De este modo, en este Capítulo se pone en evidencia que la estrategia de aislamiento y selección de levaduras indígenas con potencial antagónico, a partir de heridas de peras sanas, conservadas a bajas temperaturas (-1/0°C) por prolongados períodos y con enfrentamiento a cepas regionales de patógenos, resulta ventajosa sobre otras estrategias propuestas. Esta metodología supera algunas de las limitaciones de otros protocolos de selección descritos anteriormente (Wilson *et al.*, 1993; Viñas *et al.*, 1998). Enumerando, los aspectos que hacen a la mejora de la metodología propuesta se encuentran:

1. Como fuente de antagonistas se empleó la microbiota total de las heridas y superficie de peras sanas almacenadas (6 meses a -1/0°C); la cual fue enfrentada *in situ* a *P. expansum*.

2. Se utilizaron cepas regionales de *P. expansum* y *B. cinerea*, seleccionadas por su nivel de patogenicidad en fruto y resistencia a los fungicidas.

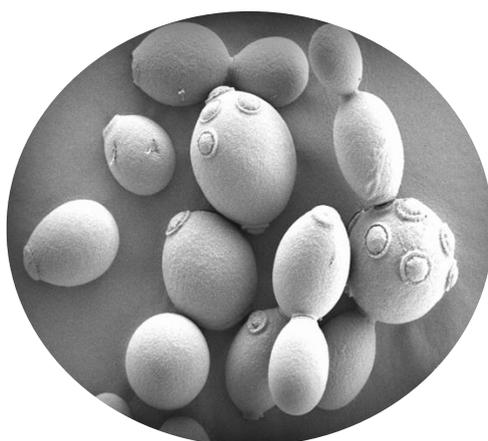
3. Las levaduras antagonistas fueron seleccionadas por experimentos *in situ* en condiciones frigoríficas para la conservación de los frutos de pera (-1/0°C y 95% HR).

4. El aislamiento de las levaduras a partir de las heridas sanas de los experimentos *in situ*, se llevó a cabo en placas con AJP a 4°C.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS ANTAGÓNICOS

SELECCIÓN DE LEVADURAS BIOCONTROLADORAS



Los resultados de este Capítulo fueron publicados como: Efficacy & putative mode of action of native & commercial antagonistic yeasts against postharvest pear pathogens. *International Journal Food Microbiology* 164:166–172.

INTRODUCCIÓN

Varios son los mecanismos descritos por los cuales los microorganismos pueden ejercer su actividad biocontroladora (Sharma *et al.*, 2009; Jamalizadeh *et al.*, 2011). En general, estos mecanismos responden a las complejas interacciones ecológicas, donde están involucrados: hospedante, patógeno y antagonista. Mecanismos como la competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, micoparasitismo y la inducción de las defensas están reportados como principales responsables del antagonismo (Janisiewicz & Kortenz, 2002; Wisniewski *et al.*, 2007; Saravanakumar *et al.*, 2009; Vero *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010). Muchos autores coinciden en afirmar que es raro que un sólo mecanismo opere en la represión de un patógeno (Gerhardson, 2002). Más aún, se cree que un ACB exitoso está comúnmente equipado con varios mecanismos que a menudo pueden actuar en conjunto y que esta acción conjunta resultaría clave en el resultado final (Jamalizadeh *et al.*, 2011). Hoy en día es escasa la metodología adecuada para estudiar las interacciones microbianas en las heridas de la fruta, que permita individualizar y determinar claramente los modos de acción de los antagonistas frente al patógeno y en relación con hospedante donde se producen las interacciones.

El conocimiento de los modos de acción de los antagonistas es muy importante para el desarrollo de medios de cultivos, procedimientos de formulación y mejoramiento de los biocontroladores. En el mismo sentido, para registrar los formulados comerciales y recomendar los métodos más apropiados de aplicación, el conocimiento de los mecanismos antagónicos, es de gran relevancia para la obtención de la aprobación y registro de uso por parte de los organismos oficiales.

Particularmente para el control de las enfermedades postcosecha, sólo algunos de los mecanismos han sido sugeridos. Entre ellos, la colonización y la competencia por nutrientes y espacio, es considerado como uno de los principales modos de acción empleados por las levaduras en el control de los patógenos en las heridas de la fruta (Droby *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993; Filonow, 1998; Ippolito *et al.*, 2000; Jijakli *et al.*, 2001). De acuerdo a Wisniewski *et al.* (2007), esta acción podría estar relacionada con la capacidad de adherirse a las heridas de la fruta, sitios específicos de su acción biocontroladora. Para otros autores como Jijakli *et al.* (1998) y Grevesse *et al.* (2008), el principal mecanismo antagónico en heridas se basa en la capacidad de secreción

de enzimas líticas, capaces de destruir la estructura celular de los patógenos. Mientras que otros autores hacen referencia particular a la capacidad de los biocontroladores de inducir resistencia de la fruta hospedante como mecanismo de biocontrol (Droby *et al.*, 2002; Yao & Tian, 2005). Por otro lado, para algunos ACB para postcosecha de fruta se han descrito otros mecanismos como la secreción de metabolitos antimicrobianos (solubles en agua o volátiles) (Jamalizadeh *et al.*, 2011), la producción de sideróforos (Riquelme, 1996; Calvente *et al.*, 1999) y la capacidad de formar biofilms o biopelículas en las heridas (Ortu *et al.*, 2005, Giobbe *et al.*, 2007).

En este Capítulo se caracterizaron por estudios *in vitro* e *in situ* los mecanismos potencialmente involucrados en la acción biocontroladora de las cuatro levaduras indígenas más promisorias como ACB frente a las cepas regionales de *P. expansum* y *B. cinerea*.

MATERIALES

1. Material vegetal

Frutos de peras producción orgánica del cultivar Packham's Triumph cosechados con madurez fisiológica, y conservados en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95%HR) hasta el momento de su utilización (aproximadamente dos meses).

2. Microorganismos

2.1 Patógenos (Hongos filamentosos). Aislamientos de *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049, seleccionados por su patogenicidad y resistencia a los fungicidas utilizados en postcosecha (Capítulo I).

2.2. Levaduras

2.2.1. Aislamientos seleccionados: *Cr. albidus* NPCC 1248. *P. membranifaciens* NPCC 1250, *Cr. victoriae* NPCC 1259 y NPCC 1263, de acuerdo su comportamiento antagónico *in situ* frente a *P. expansum* y *B. cinerea* (Capítulo II).

2.2.2 Cepa sensible a toxinas *killer*. *Candida glabrata* NPCC 106

2.2.3 Levadura productora de biofilms. *Candida albicans* NPCC 1367.

2.3 Bacteria productora de sideróforos. *Phyllobacterium ifrigiyense*.

3. Medios de cultivo utilizados

Todos los medios de cultivo utilizados en este Capítulo se realizaron con agua destilada (AD) y esterilizados por vapor saturado a presión en autoclave (120°C, 2 atmósferas por 20 min). En los casos en que se utilizó otro procedimiento se aclarará explícitamente.

3.1. Crecimiento de hongos filamentosos y levaduras. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: APD y GPY-Agar, los cuales fueron descritos en los Materiales del Capítulo II, inciso 3.

3.2. Producción de compuestos antifúngicos

Agar jugo de pera (AJP): De acuerdo a lo descrito en Materiales del Capítulo II, inciso 3.

Agar YEPD-MB: Extracto de levadura 10 g/L; Peptona 20 g/L; Glucosa 20 g/L; Agar 20 g/L; Azul de metileno 0,003 g/L. Amortiguado a pH 4,5 con buffer fosfato-citrato 0,5 M.

3.3. Producción de enzimas extracelulares

Agar-quitina (Sousa *et al.*, 2009): Quitina coloidal (pH 7) 30 g/L; Base nitrogenada para levaduras (YNB yeast nitrogen base) 0,67 g/L; Agar 15 g/L.

Agar-glucano. Se evaluaron tres glucanos distintos en la misma concentración: curdulano, laminaria y pustulano (Renwick *et al.*, 1991): Glucano 5 g/L; Base nitrogenada para levaduras (YNB) 0,67 g/L; Agar 15 g/L.

Agar-pectina. Fueron utilizadas pectinas de origen cítrico y de manzana, en los dos casos ajustados a pH 7 (Buzzini & Martini, 2002): Pectina 10 g/L; Base nitrogenada para levaduras (YNB) 0,67 g/L; Agar 15 g/L.

Agar-leche: Leche descremada en polvo 10 g/L; Base nitrogenada para levaduras (YNB) 0,67 g/L; Agar 15 g/L.

3.4. Producción de sideróforos

Medio CAS (Chrome Azurol S) (Milagres *et al.*, 1999): Cromo azurol S 60,5 mg/50 mL; Solución A 10 mL; Hexadecyltrimethylammonium 72,9 mg/40 mL; Solución B 850 mL; Casamino Acidos al 10% (p/v) 30 mL; Glucosa 20% (p/v) 20 mL.

4. Nutrientes

- **Azúcares:** Fructosa (Britania); Glucosa (Britania); Lactosa (Sigma); Maltosa (Sigma); Sacarosa (Britania)
- **Amino ácidos:** Ácido aspártico; Ácido glutámico; Alanina; Arginina; Cisteína; Fenilalanina; Glicina; Histidina; Isoleucina; Leucina; Lysina; Metionina; Prolina; Serina; Tirosina; Treonina; Triptofano; Valina. (Sigma)
- **Sales nitrogenadas:** Nitrato de amonio (NH_4NO_3); Nitrato de sodio (NaNO_3); Molibdato de amonio ($\text{NH}_4\text{Mo}_2\text{O}_7$). (Sigma)
- **Fuente de hierro:** Cloruro de hierro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) (Sigma)

5. Soluciones y Tampones

- **Solución A.** Utilizada para la preparación del medio CAS (10 mL): 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 10 mM HCl.
- **Solución B.** Utilizada para la preparación del medio CAS (850 mL): Medio MM9 100 mL, 15 g agar, 30,24 g Pipes en 750 mL agua destilada.
- **Tampón fosfato-citrato 0,5 M.** Utilizado para la preparación de medio YEPD-MB 100 mM, pH 4,5.
- **Rojo Congo.** Utilizado para revelado de actividad glucanasa: 0,6 gr/L
- **Bromuro de de Hexadeciltrimetilamonio.** Utilizado para revelado de la actividad pectinasa: 10 gr/L

6. Enzimas comerciales

- **Zymolyasa.** Seikagaku Corporation
- **Lafase fruit.** Scott Laboratories
- **Glucanex.** Novozymes

7. Reactivos varios

- **Quitina.** Sigma
- **Pustulano.** Sigma

- **Curculano.** Sigma
 - **Laminarina.** Sigma
 - **Pectina de manzana.** Sigma
 - **Pectina cítrica.** Sigma
 - **Leche descremada.** La Serenísima
 - **Tween 80%.** Sigma
 - **Triton X-100.** Sigma
 - **Cristal violeta.** Sigma
 - **Cloranfenicol.** Farmacéuticos unidos
-

MÉTODOS

1. Crecimiento de microorganismos

1.1 Crecimiento y producción de inóculo de hongos patógenos

Se procedió con la misma metodología descrita en el Capítulo II, Métodos, inciso 1. Las concentraciones empleadas se detallan para cada experimento.

1.2 Crecimiento de levaduras

Las cuatro levaduras con potencial antagónico preseleccionadas y las levaduras *C. albicans* NPCC 1367 y *C. glabrata* NPCC 106 se hicieron crecer en GPY-agar a partir de 5 μ L de la suspensión de levaduras de la Colección de Cultivos (NPCC) conservadas en glicerol (20% v/v) e incubadas por 48 h a 26°C. Una ansada del cultivo fresco de cada levadura se utilizó para realizar las suspensiones, las cuales se ajustaron utilizando cámara de Neubauer a la concentración necesaria para cada experimento.

2. Evaluación de actividad antagónica *in vitro*

Los posibles mecanismos antagónicos utilizados por las levaduras se evaluaron frente a *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049.

2.1 Producción de compuestos difusibles en agar

La capacidad de producir compuestos antifúngicos difusibles en agar se evaluó en placas de Petri con 15 mL de AJP (85% v/v). Donde 20 μ L de 10^6 células/mL de cada levadura se sembró en el extremo de cada placa formando una estría. Sobre el extremo opuesto de la placa se sembraron 10 μ L de una suspensión de conidios ajustada a 10^4 conidios/mL (Figura 1). Placas inoculadas sólo con el patógeno se utilizaron como tratamiento control. Todos los enfrentamientos se incubaron a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR durante 27 días. El experimento se realizó por triplicado. El diámetro de crecimiento (mm) de las colonias de los patógenos se midió, y la inhibición del crecimiento (In %) por parte de la levadura se determinó de acuerdo a la siguiente expresión (Etebarian *et al.*, 2005):

$$\text{In \%} = \frac{a-\emptyset}{a} \times 100$$

Donde:

In %: Porcentaje de inhibición del crecimiento

a: diámetro de la colonia del patógeno en ausencia de la levadura

\emptyset : diámetro de la colonia del patógeno enfrentado con la levadura

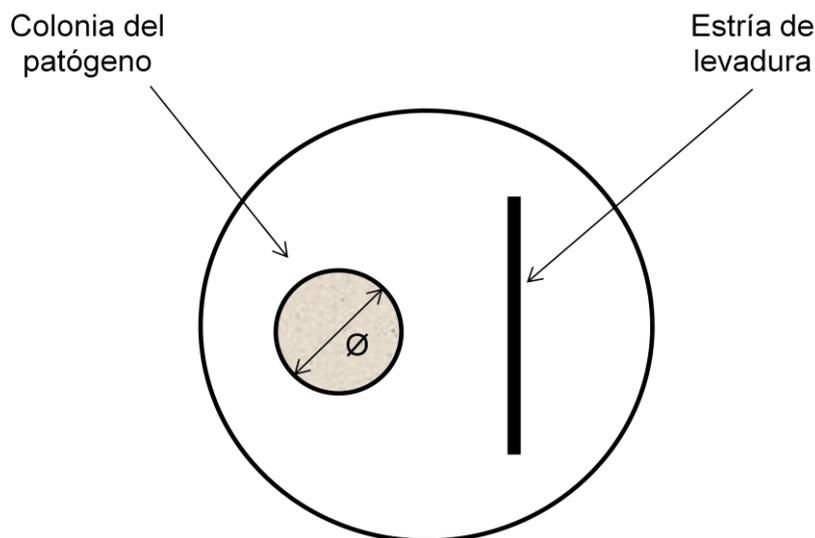


Figura 1. Esquema de placa de Petri con cultivo dual patógeno levadura.

2.2 Producción de compuestos volátiles

La producción de compuestos volátiles se llevo a cabo mediante el método de placas enfrentadas (Lillbro *et al.*, 2005). Placas con AJP se sembraron con 100 μ L de una suspensión de 10^5 células/mL de la levadura antagonica a evaluar y enfrentadas con placas de APD inoculadas en la zona central con 10 μ L de una suspensión de 10^4 conidios/mL de *P. expansum* o *B. cinerea* (Figura 2). Las placas enfrentadas se sellaron con parafilm e incubadas a $-1/0^\circ\text{C}$ durante 27 días. Placas de cada patógeno enfrentadas a placas sin levaduras, se utilizaron como control. El porcentaje de inhibición (In %) se determinó de la misma manera descrita en el ítem anterior (2.1). El experimento se realizó por triplicado.

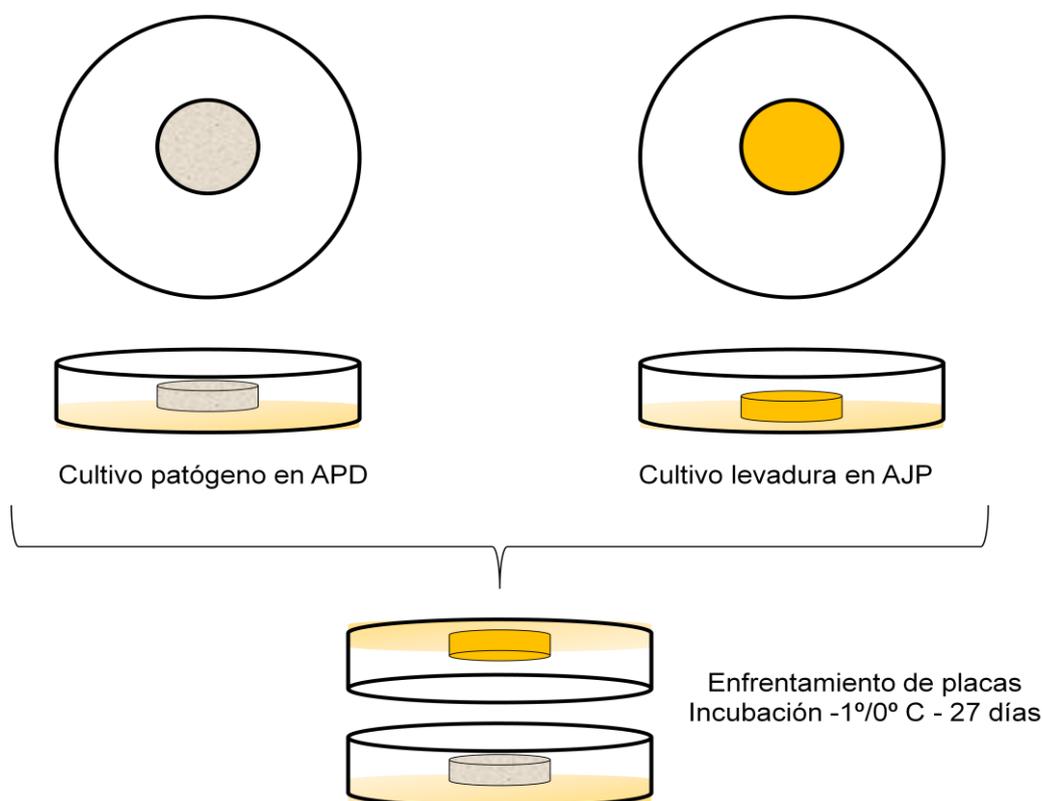


Figura 2. Esquema de la evaluación de la producción de compuestos volátiles por enfrentamiento de placa.

2.3 Efecto de las levaduras antagonicas en la germinación de las esporas

La capacidad de las levaduras de producir compuestos que inhiban la germinación y/o desarrollo de los conidios de *P. expansum* y *B. cinerea* se evaluó en JP (85% v/v). Las suspensiones de cada levadura (100 μ L, 10^8 células/mL) y el patógeno (100 μ L, 10^6

conidios/mL) se adicionaron a tubos estériles con 4,8 mL de JP (85% v/v). Los tubos se incubaron en posición inclinada (45°) en agitador orbital a 150 rpm y a 20°C durante 16 h para los cultivos con *B. cinerea* y 24 h para los cultivos con *P. expansum*. Tubos en idénticas condiciones pero sin levaduras se utilizaron como controles. El porcentaje de germinación se determinó por conteo de 100 conidios por tratamiento, utilizando microscopio óptico. Se consideró conidio germinado, cuando el tubo germinativo fuese del doble de longitud respecto al tamaño del conidio (Yao *et al.*, 2004). Cada tratamiento se realizó por triplicado y todo el experimento se repitió dos veces.

2.4 Producción de toxinas *killer*

La producción de toxinas *killer* se evaluó utilizando la metodología descrita por Sangorrín *et al.* (2001). Los aislamientos con potencial antagónico se evaluaron sobre la cepa sensible de *Candida glabrata* NPCC 106 y las dos cepas de hongos patógenos seleccionados. Una suspensión de 1 mL de 10^6 células/mL de *C. glabrata* o de conidios de cada hongo fue mezclada con 10 mL de YEPD-MB agar fundido (45°C) y posteriormente colocados en placas de Petri. Sobre el medio solidificado se sembraron las levaduras en forma de estrías sobre cada placa. Las placas se incubaron a dos temperaturas: 20°C y -1/0°C. Las cepas se consideraron *killer* cuando alrededor de la estría se observó un halo de inhibición del crecimiento de la cepa sensible, o bien cuando esta se rodeaba por una franja de color azul por la presencia de células muertas. En ensayo se realizó por triplicado.

2.5 Inhibición de la germinación

La competencia se evaluó como la inhibición de la germinación en cultivos co-inoculados con conidios de *P. expansum* o *B. cinerea* y las levaduras, en presencia o ausencia de nutrientes agregados al JP. Alícuotas de 100 μ L de suspensiones de 10^8 células/mL de la levadura y 10^6 conidios/mL del patógeno, se añadieron a tubos conteniendo 4,8 mL de JP (85% v/v) suplementado con diferentes nutrientes. Las fuentes de carbono que se evaluaron fueron: glucosa (3% p/v), fructosa (10% p/v) y sacarosa (10% p/v). Las fuentes nitrogenadas se utilizaron a una concentración final de 0,1% (p/v) (Nunes *et al.*, 2001) e incluyeron NH_4NO_3 , NaNO_3 y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. Como control de la germinación del hongo se incubaron conidios sin levaduras. Los tubos fueron incubados en agitación (150 rpm) en posición inclinada (45°) y a una temperatura de 20°C, 16 h para *B. cinerea* y 24 h para *P. expansum*. Por cada tratamiento 100 conidios fueron observados con microscopio para determinar el

porcentaje de germinación, tal como se describió en el ítem 2.3. El ensayo se realizó por duplicado y el ensayo completo se repitió dos veces.

2.6 Producción de sideróforos

La capacidad de las levaduras de producir sideróforos se estableció en medio sólido utilizando la solución de Cromo Azurol S (CAS), de acuerdo a la metodología propuesta por Milagres *et al.* (1999). Placas de Petri con 15 mL de medio CAS, se sembraron con 10 μ L de una suspensión ajustada a 10^6 células/mL de cada levadura. Las placas se incubaron a $-1/0^\circ\text{C}$ y a 20°C , durante 30 y 5 días, respectivamente. La producción de estos compuestos fue evidenciada por la presencia de un halo rojizo-naranja alrededor de la colonia. La bacteria *Phyllobacterium ifrigiyense*, se empleó como control positivo.

2.7 Capacidad de formación de biofilms

En placas de poliestireno de 96 pocillos, conteniendo 190 μ L de medio de cultivo se inocularon con 10 μ L de una suspensión de levaduras (10^6 células/mL). Se evaluaron dos medios de cultivo: GPY y JP. Las placas se incubaron a 4°C por 30 días. Finalizada la incubación el contenido de las placas se descartó y 25 μ L de cristal violeta (0,1% de etanol) se adicionaron a cada pocillo (Figura 3). Luego de 5 minutos el cristal violeta se removió y la placa se lavó con agua estéril. El cristal violeta retenido en cada pocillo fue extraído con 125 μ L de Triton X-100 (0,25% de etanol) y la adherencia de las células se cuantificó por densidad óptica (DO) a 640 nm (Giobbe *et al.*, 2007). *Candida albicans* NPCC 1367 se utilizó como control positivo. Se estableció el porcentaje de adherencia con respecto al control positivo (O'Toole *et al.*, 1999). El experimento se realizó empleando cuatro pocillos por placa para cada levadura.

2.8 Producción de enzimas extracelulares

La capacidad de producir y secretar al medio enzimas líticas de los polímeros de pared celular de los hongos se evaluó en medio sólido (agar 20 g/L) adicionando los sustratos específicos. Las placas se inocularon con 10 μ L de suspensiones de 10^6 células/mL de cada levadura e incubadas a 20°C durante 7 días y $-1/0^\circ\text{C}$ durante 30 días. El experimento se realizó por triplicado para cada temperatura.

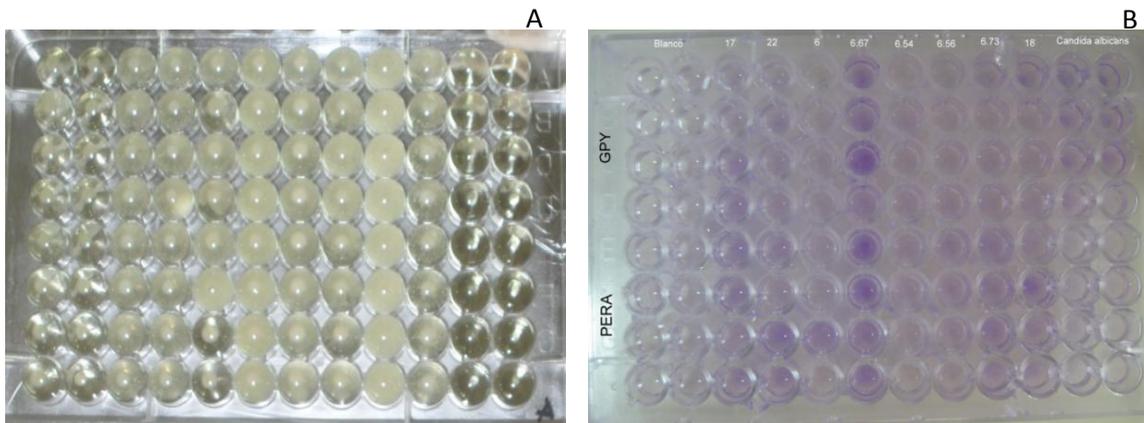


Figura 3. Placa de 96 pocillos vista desde abajo, con aislamientos de levaduras crecidos en GPY y jugo de pera luego de 30 días de incubación a 4°C (A) y luego de la extracción del cristal violeta (B).

2.8.1. Actividad glucanasa

Se evaluó de acuerdo al método descrito por Renwick *et al.* (1991), utilizando los sustratos curdulano, laminarina y pustulano, que permitieron evidenciar las actividades enzimáticas β -1,4-Glucanasa, β -1,3 y β -1,6-Glucanasa y β -1,6-Glucanasa, respectivamente. La actividad glucanasa se detectó mediante el agregado de una solución de Rojo Congo sobre la placa (10 gr/L). Luego de 15 min de incubación, la solución se removió y el exceso de lavado con agua (Brizzio *et al.*, 2007). Halos claros alrededor de las colonias fueron indicativos de la hidrólisis de los sustratos por la actividad de la/s enzima/s correspondiente/s. Como control positivo se utilizó el complejo enzimático Glucanex.

2.8.2 Actividad pectinasa

La metodología descrita por Buzzini & Martini (2002) se utilizó para establecer la actividad pectinasa de las levaduras. Como sustrato se empleó pectina de manzana y cítrica ajustando el medio a pH 7. Una solución acuosa de bromuro hexadecyltrimetilamonio (10 g/L) se utilizó para cubrir las placas y evidenciar la presencia de actividad pectinasa por la aparición de halos de hidrólisis alrededor de las colonias en el medio opaco (Brizzio *et al.*, 2007). Como control positivo se utilizó una pectinasa comercial, empleada en la producción enológica (Lacase fruit).

2.8.3 Actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Brizzio *et al.* (2007) utilizando agar-leche. La formación de un halo transparente en el

medio oscuro alrededor de la colonia indicó la presencia de enzimas degradadoras de proteínas.

2.8.4 Actividad quitinasa

Se adoptó la metodología descrita por Souza *et al.* (2009) utilizando agar-quitina como medio, ajustado a pH 7. La quitina coloidal se obtuvo por el método de Skujins *et al.* (1965). Los aislamientos positivos producen un halo transparente alrededor de las colonias. Como control positivo se utilizó el complejo enzimático Glucanex.

3. Evaluación de la actividad antagónica *in situ*

3.1 Colonización del sitio de la herida

La capacidad de las cuatro levaduras para colonizar y establecerse en las heridas de pera se estableció en condiciones de conservación postcosecha. Frutos con 2 meses de almacenamiento en cámara frigorífica fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70% (v/v), secados al aire y posteriormente heridos con un elemento punzante estéril en la zona ecuatorial (herida de 3 mm y 3 mm de profundidad). Las heridas fueron inoculadas con 20 μ L de una suspensión de 10^6 células/mL de cada levadura. La fruta inoculada se colocó en bandejas, en el interior de bolsas plásticas y éstas en cajas de cartón, las mismas fueron almacenadas 120 días en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95% HR) (Figura 4). La dinámica poblacional de las levaduras se evaluó a los 0, 7, 15, 30, 60 y 120 días de incubación. En cada tiempo, las heridas inoculadas fueron extraídas de los frutos utilizando un sacabocado estéril y el bloque de tejido colocado en 1 mL de ADE, macerado y finalmente agitado a 200 rpm por una hora, según la metodología propuesta por Vero *et al.* (2003). De la suspensión obtenida, se realizaron diluciones decimales seriadas y alícuotas de 100 μ L se sembraron en placas de GPY-agar con cloranfenicol. Luego de 15 días de incubación a 4°C se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). La densidad poblacional de cada levadura se expresó como $\ln(UFC_f/UFC_0)$ por herida (siendo f: final y 0: inicial).

Para cada tratamiento se inoculó una herida por fruto, con 4 frutos como repeticiones. Las diluciones se sembraron en placa por duplicado.



Figura 4. Peras heridas e inoculadas con una suspensión de 10^6 células/mL de la levadura antagonista.

3.2 Actividad antagonica de las levaduras en heridas. Bioensayos

Las cuatro levaduras, *C. albidus* NPCC 1248, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1259 y NPCC 1263, se inocularon en heridas y enfrentadas a las cepas *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049, utilizando la misma metodología descrita en Capítulo II para el *screening* secundario, inciso 4.1.

4. Interacción de las levaduras antagonicas seleccionadas - hongos patógenos

4.1 Perfil metabólico de las levaduras y los patógenos

La capacidad de crecimiento *in vitro* de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, y de *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049, se determinó en JP enriquecido con diferentes nutrientes en función de la composición de los tejidos de pera (U.S.D.A., 2009). Se utilizaron veintiséis diferentes fuentes de nutrientes incluyendo cinco azúcares, 18 aminoácidos, tres compuestos nitrogenados inorgánicos y uno de hierro (Anexo IV). Los azúcares evaluados (en mg/mL) fueron: glucosa (110,4), fructosa (99,68), sacarosa (18,72), lactosa (0,8) y maltosa (0,8). Los aminoácidos se utilizaron 10 veces más concentrados de los informados (en mg/mL): ácido aspártico (8,4), ácido glutámico (2,4), alanina (1,12), arginina (0,8), cisteína

(0,16), fenilalanina (0,88), glicina (1,04), histidina (0,16), isoleucina (0,88), leucina (1,52), lisina (1,36), metionina (0,16), prolina (1,68), serina (1,2), tirosina (0,16), treonina (0,88), triptófano (0,16) y valina (1,36). La fuente de hierro fue FeCl_3 , y se evaluó en concentraciones 2,5, 5 y 10 veces mayores a los reportados para los tejidos de pera: 3,4 mg/mL, 6,8 mg/mL y 13,6 mg/mL, respectivamente. Los tres compuestos nitrogenados: NH_4NO_3 , NaNO_3 y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, se evaluaron a una concentración de 1000 mg/mL de acuerdo a lo reportado por bibliografía (Chanchaichaovivat *et al.*, 2008).

Multiplacas de 96 pocillos se emplearon con 170 μL de JP, 20 μL de una solución del nutriente y 10 μL de una suspensión de 10^6 células/mL de cada microorganismo (levaduras antagonistas y patógenos). Las placas se incubaron a 20°C y el crecimiento fue medido por $\text{DO}_{640\text{ nm}}$, hasta alcanzar fase estacionaria. El experimento se realizó empleando cuatro pocillos por placa para cada compuesto-microorganismo y se repitió dos veces.

4.2 Competencia por nutrientes en heridas

De acuerdo a los resultados del experimento detallado en el inciso anterior (4.1), aquellos nutrientes que estimularon simultáneamente el crecimiento de ambos microorganismos se evaluaron *in situ*. Bioensayos en heridas de peras Packham's Triumph, se realizaron utilizando la misma metodología ya descrita (Capítulo II, inciso 4.1). Las heridas de los frutos se inocularon con el nutriente (3 μL), la levadura (20 μL de una suspensión de levaduras de 10^6 células/mL) y el patógeno (2 h después con 10 μL de la suspensión ajustada a la CMI correspondiente), e incubadas en condiciones de almacenamiento con el objetivo de establecer la posible competencia por cada nutriente como mecanismo de biocontrol.

Los tratamientos efectuados fueron heridas inoculadas con:

1. Control: Sólo el patógeno (*B. cinerea* y *P. expansum*)
2. Con el patógeno y nutriente
3. Con patógeno - levadura y nutriente
4. Con patógeno - levadura sin nutrientes

Los frutos inoculados se colocaron en bandejas, en el interior de bolsas de polietileno en cajas de cartón, las cuales se incubaron $-1/0^\circ\text{C}$ y 95% HR por 60 días. Se determinó el porcentaje de incidencia (I%) y severidad (mm) de cada enfermedad. Se utilizaron diez frutos por tratamiento, con dos repeticiones. Los tratamientos se dispusieron en diseño completamente al azar.

5. Análisis estadístico

5.1 Mecanismos antagónicos

Los resultados se analizaron usando el análisis de la varianza (ANOVA) y las medias separadas de acuerdo al test de Tukey ($p < 0.05$) usando el programa Statistica versión 8 (Stat-Soft, 2007, France). Los datos obtenidos de los diferentes mecanismos de antagónicos (actividad enzimática, colonización de heridas, inhibición de la germinación, competencia por nutrientes, producción de compuestos difusibles y volátiles, producción de biofilms, sideróforos y toxinas *killer*) se transformaron en 0 y 1, indicando ausencia o presencia, para construir una matriz de datos binarios que se utilizó para realizar un análisis de coordenadas principales (ACoP). La relación entre los aislamientos se representó por un gráfico de dispersión 2D, por el Numerical Taxonomy System program (NTSYS) (Rohlf, 2005). Con los coeficientes simples de las matrices obtenidas se calcularon árboles de espaciamento con la longitud mínima (MST) y fueron superpuestos con el ACoP para detectar distorsiones.

5.2 Colonización de heridas

Los parámetros de crecimiento se calcularon para cada levadura con los datos de recuento de UFC en heridas para cada tiempo de muestreo y reparametrizados de acuerdo al modelo de Gompertz, propuesto por Zwietering *et al.* (1990):

$$y = A * \exp \{ -\exp \mu_{\max} [(\mu_{\max} * e) / D] * (\lambda - t) + 1 \}$$

Donde $y = \ln (N_t/N_0)$, N_0 es la población inicial (CFU/mL) y N_t es la población en el tiempo t ; $A = \ln (N_{\infty}/N_0)$ es el valor máximo de la población con N_{∞} como asíntota máxima, μ_{\max} es el crecimiento específico máximo (h^{-1}), y λ el período de fase lag (días). Los datos de crecimiento de cada levadura en heridas se ajustaron con un procedimiento de regresión no lineal, que minimiza la suma de cuadrados de la diferencia entre los datos experimentales y los ajustados por el modelo, a través de la herramienta Quasi-Newton del programa Statistica 8.0.

5.3 Severidad e Incidencia

De acuerdo a lo descrito en el Capítulo II, Métodos, inciso 5.

RESULTADOS

1. Evaluación de mecanismos *in vitro*

1.1 Producción de compuestos antifúngicos

Con el objetivo de conocer los posibles mecanismos por los cuales los ACB preseleccionados realizan el antagonismo frente a los patógenos, inicialmente se determinó de manera cuantitativa la inhibición del crecimiento micelial del patógeno por la liberación al medio sólido de sustancias antifúngicas producidas por las levaduras. *P. expansum* NPCC 2023 no presentó inhibición por compuestos difusibles por ninguna de las levaduras en las condiciones evaluadas. En cambio *B. cinerea* NPCC 2049 fue parcialmente inhibido por *Cr. albidus* NPCC 1248 y *P. membranifaciens* NPCC 1250, 32% y 17% respectivamente (Tabla 1).

A través de la técnica de cultivos en placas enfrentadas, se determinó la capacidad de las levaduras de producir compuestos volátiles que inhiban el desarrollo de los patógenos. El porcentaje más alto de inhibición sobre *P. expansum* fue alcanzado con *Cr. victoriae* NPCC 1259 (62%, Tabla 1, Figura 5). Ninguno de los aislamientos fue capaz de inhibir el desarrollo de *B. cinerea* (Tabla 1).

La mayoría de las levaduras redujeron parcialmente la germinación de los conidios de ambos patógenos en medio líquido, con excepción de *Cr. victoriae* NPCC 1259 y NPCC 1263 que no lograron reducir la germinación de *B. cinerea* y *P. expansum*, respectivamente (Tabla 1). Para *B. cinerea*, la mayor inhibición de la germinación se logró con *Cr. victoriae* NPCC 1259 (59%), mientras que el resto de las levaduras mostró valores significativamente menores (9-40% de inhibición). Frente a *P. expansum* la levadura *Cr. victoriae* NPCC 1263 logró un 71% de inhibición de la germinación mientras que las demás levaduras lograron valores de inhibición menores, entre 7% (*Cr. victoriae* NPCC 1259) y 59% (*Cr. albidus* NPCC 1248).

Tabla 1. Evaluación de actividad antagonica de las levaduras preseleccionadas frente a *B. cinerea* y *P. expansum*, en jugo de pera a -1/0°C.

Especie de levadura	NPCC	Inhibición del crecimiento del patógeno (%)					
		Compuestos difusibles ¹		Compuestos volátiles ¹		Conidios germinados ²	
		<i>B. c.</i>	<i>P. e.</i>	<i>B. c.</i>	<i>P. e.</i>	<i>B. c.</i>	<i>P. e.</i>
<i>Cr. albidus</i>	1248	32c	-	-	12a	37b	59c
<i>P. membranifaciens</i>	1250	17b	-	3a	12a	40b	23b
<i>Cr. victoriae</i>	1259	3a	-	3a	62b	59bc	7a
<i>Cr. victoriae</i>	1263	-	-	-	-	9a	71d

B.c.: *B. cinerea*. *P. e.:* *P. expansum*. ¹ In (%) fue calculada como % de la relación de la diferencia entre el diámetro del tratamiento control y el con levadura y el diámetro del control (sólo con el patógeno). ² La inhibición de la germinación: calculada como el porcentaje entre la relación de los conidios germinados de cada tratamiento (levadura y patógeno) y control sin levaduras, en JP (85% v/v). Los valores de la misma fila seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0,05$) para cada mecanismo analizado.



Figura 5. Placas enfrentadas de levaduras y patógeno, incubadas a $-1/0^{\circ}\text{C}$ durante 27 días. **Control:** sólo con el patógeno; **Placas enfrentadas:** *P. expansum* en la placa inferior y en la superior la levadura antagonista.

Ninguna de las levaduras evaluadas presentó actividad *killer* a 20°C ni frente a la levadura sensible, ni a los patógenos. Sin embargo, realizando las incubaciones a $-1/0^{\circ}\text{C}$, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, mostraron actividad *killer* frente a la cepa sensible de *C. glabrata* NPCC 106, como así también frente a ambos patógenos (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de toxinas *killer*, frente a *C. glabrata* y a los dos patógenos a distintas temperaturas.

Especie de Levadura	NPCC	<i>C. glabrata</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>	
		20°C	$-1/0^{\circ}\text{C}$	20°C	$-1/0^{\circ}\text{C}$	20°C	$-1/0^{\circ}\text{C}$
<i>Cr. albidus</i>	1248	-	-	-	-	-	-
<i>P. membranifaciens</i>	1250	-	+	-	+	-	+
<i>Cr. victoriae</i>	1259	-	+	-	-	-	-
<i>Cr. victoriae</i>	1263	-	+	-	+	-	+

+: Presencia de halo de inhibición. - : Ausencia de halo de inhibición.

1.2 Producción de enzimas extracelulares

Para evaluar la capacidad de las levaduras de producir enzimas extracelulares se llevaron a cabo cultivos *in vitro* con sustratos específicos para cada enzima. Todos los aislamientos, excepto *Cr. victoriae* NPCC 1259, presentaron actividad glucanasa a las dos temperaturas evaluadas. *Cr. albidus* NPCC 1248, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 mostraron actividad quitinasa y proteasa a $-1/0^{\circ}\text{C}$, pero no

a 20°C. Ninguno de los aislamientos presentó actividad pectinasa en las condiciones evaluadas (Tabla 3).

Tabla 3. Producción de enzimas a 20°C y -1/0° C de las levaduras preseleccionadas.

Especie de levadura	NPCC	Actividad enzimática							
		Glucanasa ^a		Pectinasa ^b		Proteasa ^c		Quitinasa ^d	
		20°C	-1/0°C	20°C	-1/0°C	20° C	-1/0°C	20°C	-1/0°C
<i>Cr. albidus</i>	1248	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>P. membranifaciens</i>	1250	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>Cr. victoriae</i>	1259	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cr. victoriae</i>	1263	+	+	-	-	-	+	-	+

^aSustratos que utilizados: curdulano, laminarina y pustulano. ^bSustratos: pectina cítrica y de manzana. ^cSustrato: leche descremada. ^dSustrato: quitina coloidal. +: Halo de degradación de sustrato. -: Sin producción de halo de degradación de sustrato.

1.3 Capacidad de formación de biofilms

La capacidad de formar biofilms fue evaluada a través de la técnica de adhesión de las levaduras a una superficie de poliestireno. Los aislamientos de *Cr. victoriae* (NPCC 1259 y NPCC 1263) presentaron la mayor capacidad de formación de biofilms. Esta capacidad se evidenció tanto en JP (52% y 88%, respectivamente) como en GPY (36% y 45%). *Cr. albidus* NPCC 1248 y *P. membranifaciens* NPCC 1250 presentaron porcentajes de adhesión similares en ambos medios, aunque en ningún caso superaron el 30% (Figura 6).

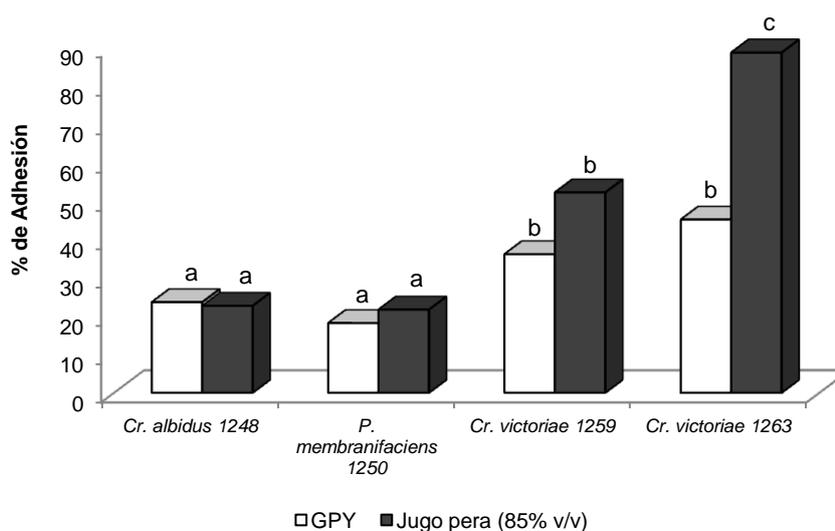


Figura 6. Porcentaje de adhesión de levaduras a la superficie.

1.4 Evaluación de competencia por nutrientes

En este estudio, la competencia de nutrientes fue evaluada *in vitro* sobre la capacidad de germinación de los conidios de los hongos en presencia de las levaduras. Fueron evaluados compuestos carbonados (glucosa, fructosa y sacarosa) y nitrogenados (NH_4NO_3 , NaNO_3 y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$). La competencia del agente antagónico con el patógeno por un nutriente específico, se evidenció por la reducción de la capacidad de biocontrol del antagonista en presencia de dicho compuesto (Piano *et al.*, 1997; Scherm *et al.*, 2003; Chanchaichaovivat *et al.*, 2008). Las combinaciones de las levaduras *Cr. victoriae* NPCC 1259 y NPCC 1263 con *P. expansum* y *B. cinerea*, respectivamente, no fueron ensayadas en este ítems, ya que no mostraron capacidad de inhibición de la germinación (Tabla 1).

Las tres fuentes carbonadas evaluadas generaron por sí mismas una importante inhibición de la germinación de los conidios de ambos patógenos, que fue entre 23-55% con respecto al tratamiento control (Tabla 4). Los conidios de *P. expansum* en presencia de glucosa mostraron una inhibición del 54% la germinación respecto al control sin glucosa ni antagonista, mientras que para la fructosa del 77% (Tabla 4). Debido al efecto inhibitorio causado por las fuentes de carbono resulta difícil determinar que la competencia por los nutrientes pueda influir entre cada una de las levaduras y el patógeno. Por este motivo, para el análisis de competencia, sólo se consideran los casos en que los porcentajes de germinación del patógeno con el azúcar, en ausencia de la levadura antagónica, fueron superiores a los porcentajes en presencia de la levadura. Los datos sombreados en gris en la Tabla 4 no fueron analizados, debido a que no cumplieron con esta pauta.

Frente a los conidios de *B. cinerea*, ninguno de los compuestos evaluados en los co-cultivos con las levaduras antagonistas produjeron inhibición significativa de la germinación.

Frente a los conidios de *P. expansum*, la combinación de *Cr. albidus* NPCC 1248 con agregado de NH_4NO_3 y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ redujo notoriamente la inhibición de la germinación de los conidios lograda sólo con la levadura. El mismo efecto se observó con *Cr. victoriae* NPCC 1263, con el agregado de glucosa, sacarosa, NaNO_3 y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la adición de distintos compuestos carbonados y nitrogenados sobre la germinación de conidios de *B. cinerea* y *P. expansum*.

Tratamiento ¹		Porcentaje de germinación (%) [#]						
		Control*	Fuentes carbonadas			Fuentes nitrogenadas		
Patógeno	Levadura			Glucosa	Fructosa	Sacarosa	NaNO ₃	NH ₄ NO ₃
<i>B. cinerea</i>		89,5c	68,5b	41,0a	67,0b	92,0c	88,5c	89,5c
<i>B. cinerea</i>	+ NPCC 1248	56,5c	33,0b	20,5a	12,0a	56,0c	50,0c	51,5c
<i>B. cinerea</i>	+ NPCC 1250	54,0b	1,0a	2,0a	4,0a	53,5b	50,5b	51,5b
<i>B. cinerea</i>	+ NPCC 1259	37,0bc	34,0b	30,5b	19,5a	40,5bc	47,0c	33,5b
<i>P. expansum</i>		70,0c	32,0b	16,0a	69,0c	84,0d	81,5d	67,5c
<i>P. expansum</i>	+ NPCC 1248	29,0ac	27,0ac	22,5ab	23,0ab	15,0a	35,0c	48,0d
<i>P. expansum</i>	+ NPCC 1250	54,0d	33,5ab	31,0a	43,0bc	28,0a	37,0ac	45,5cd
<i>P. expansum</i>	+ NPCC 1263	20,5a	47,0bc	64,0c	41,0b	52,5bc	35,5ab	49bc

*Los controles en JP (85% v/v) sin suplemento de nutrientes. ¹ Tratamientos: JP suplementado con cada uno de los nutrientes de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. [#] Datos sombreados en gris no fueron analizados de acuerdo a lo explicado en el texto. Los resultados son la media de dos experimentos independientes. Los valores en cada fila seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Con el fin de evaluar si las levaduras compiten por el hierro produciendo sideróforos, se evaluó la producción de esta sustancia por el ensayo de competencia por el hierro entre el complejo férrico del colorante indicador (CAS) y el posible sideróforo producido por la levadura en estudio. Los resultados obtenidos, indican que ninguna de las levaduras antagonistas produjo moléculas secuestradoras de hierro del tipo hidroxamato.

2. Evaluación de comportamiento *in situ*

2.1 Colonización de heridas

La habilidad para colonizar las heridas de pera en condiciones de almacenamiento (-1/0°C) fue evaluada *in situ*. Los datos obtenidos de UFC/herida en el tiempo del experimento fueron utilizados para modelar el crecimiento de cada levadura utilizando el modelo de Gompertz (Figura 7). Fueron determinados los parámetros de rango específico de crecimiento máximo (μ_{max}), período de fase *lag* (λ) y máximo nivel poblacional alcanzado (A) para cada levadura (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de crecimiento de las levaduras preseleccionadas de acuerdo a la ecuación de Gompertz

	NPCC 1248	NPCC 1250	NPCC 1259	NPCC 1263
A (lnCFU/herida)	5,2803b	5,2905b	0,6340a	5,8984c
μ_{max} (h ⁻¹)	0,4091c	0,1585ab	0,1314a	0,1973b
λ (días)	2,3087c	2,7233d	1,1987b	0,7649a
R ²	0,9959	0,9945	0,8736	0,9938

A: máximo nivel poblacional. **μ_{max} :** valor máximo de crecimiento específico. **λ :** duración fase *lag*. Los tratamientos con la misma letra en la misma fila no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test de Tukey (P < 0,05).

A los 7 días de inoculación las mayores densidades poblacionales fueron alcanzadas por *Cr. albidus* NPCC 1248 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 (1,5-2x10⁴ UFC/herida), lo cual equivale a un crecimiento de 4-6 veces mayor con respecto a las UFC inoculadas, mostrando una velocidad de crecimiento específico de 0,4 h⁻¹ y 0,19 h⁻¹, respectivamente (Tabla 5). Al mismo tiempo, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1259, alcanzaron un menor número de células (5x10⁵ y 8x10³ UFC/herida, respectivamente), logrando un incremento de 1,5 veces las UFC iniciales.

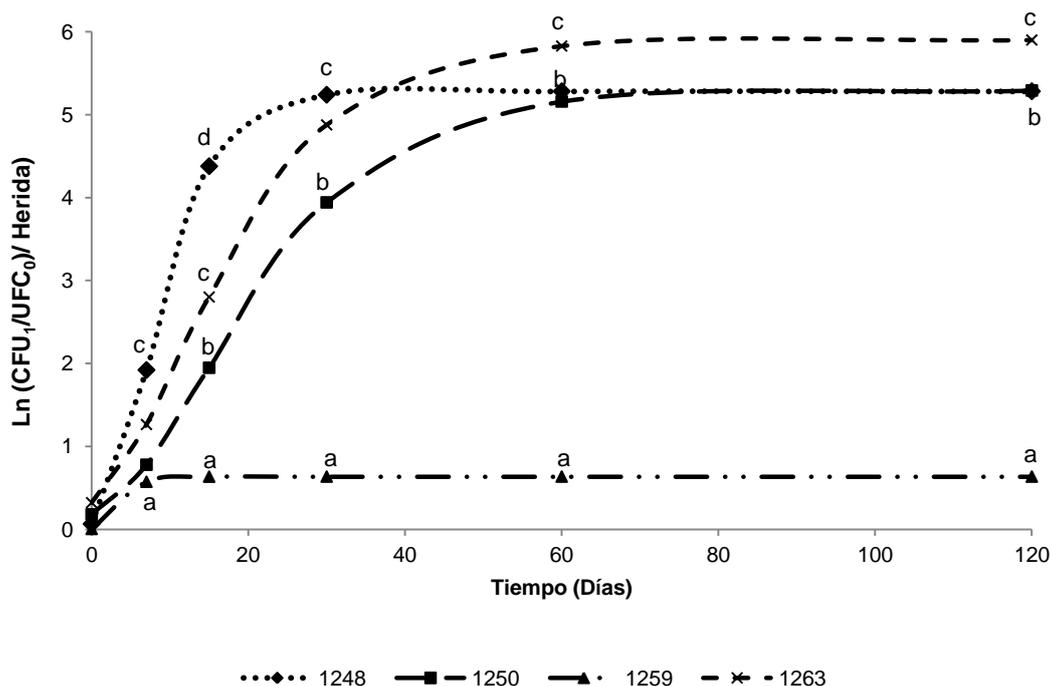


Figura 7. Dinámica poblacional de las levaduras en las heridas de pera utilizando el modelo de Gompertz. **1248:** *Cr. albidus* NPCC1248, **1250:** *P. membranifaciens* NPCC 1250, **1259:** *Cr. victoriae* NPCC 1259, **1263:** *Cr. victoriae* NPCC 1263. Letras diferentes sobre punto de las curvas, indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey ($p > 0,05$) para cada tiempo de evaluación.

A los 30 días de incubación, los niveles poblacionales de *Cr. albidus* NPCC 1248 y *Cr. victoriae* NPCC 1259 llegaron a su nivel máximo, estabilizándose hasta el tiempo final de evaluación. Asimismo, a los 30 días *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 se encontraron en plena fase exponencial, alcanzando el mayor número de células a los 60 días, cuyo nivel se mantuvo hasta los 120 días.

Los parámetros de crecimiento obtenidos (Tabla 5), indican que *Cr. victoriae* NPCC 1263 fue el aislamiento que mayor nivel poblacional alcanzó y el que menor fase *lag* presentó, mientras que *Cr. albidus* NPCC 1248 se caracterizó por presentar mayor valor de crecimiento específico.

Cr. victoriae NPCC 1248 y *P. membranifaciens* NPCC 1250 mostraron similares niveles de población máximos (Figura 7), con una fase *lag* relativamente más corta que la del aislamiento NPCC 1248.

2.2 Actividad antagónica de las levaduras *in situ* frente dos patógenos

La capacidad de biocontrol de las levaduras fue reevaluada en heridas de pera frente a *B. cinerea* y *P. expansum* en condiciones de almacenamiento comercial de la fruta.

Con los tratamientos con las cuatro levaduras se alcanzaron diferentes porcentajes de incidencia y severidad para cada una de las enfermedades (Figura 8).

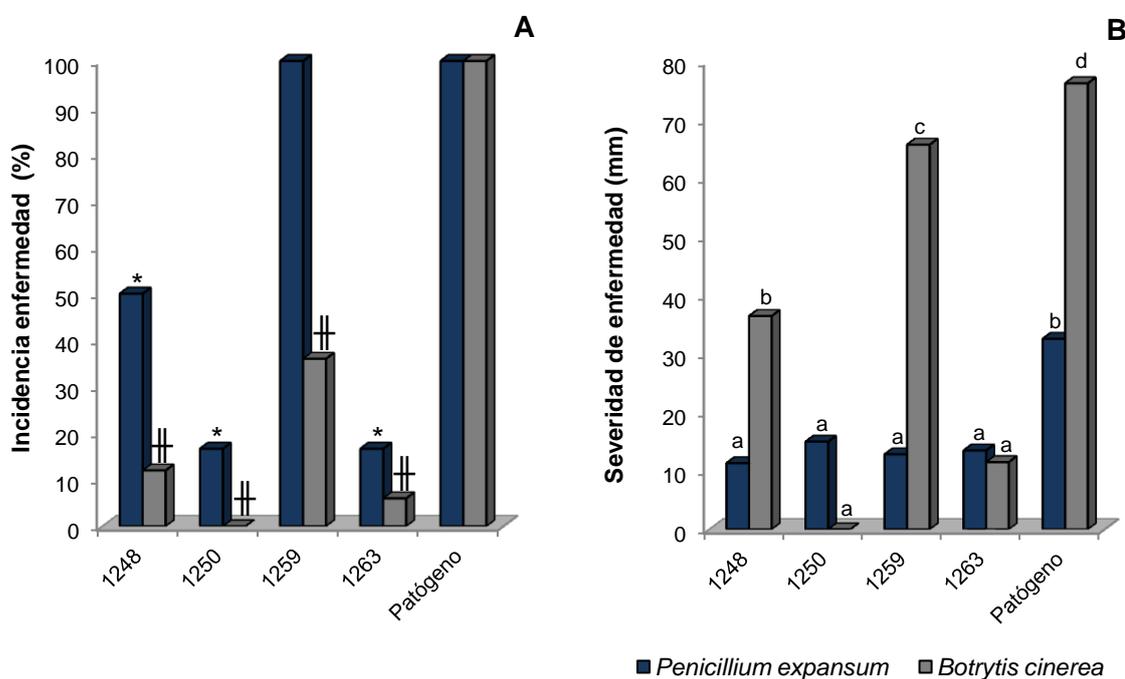


Figura 8. Eficacia de biocontrol a los 120 días de levaduras frente a *P. expansum* (barras azules) y *B. cinerea* (barras grises). Incidencia (A) y severidad (B).

1248: *Cr. albidus* NPCC 1248; 1250: *P. membranifaciens* NPCC 1250; 1259: *Cr. victoriae* NPCC 1259 y 1263: *Cr. victoriae* NPCC 1263.

Para la incidencia, los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al tratamiento inoculado con *P. expansum*, mientras que las cruces (†) con respecto al tratamiento inoculado con *B. cinerea*. Las letras iguales sobre las barras no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test de Tukey (P = 0,05).

Los resultados muestran que frente a ambos patógenos, *Cr. albidus* NPCC 1248, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 fueron las levaduras más efectivas, presentando diferencias significativas tanto en la incidencia como en la severidad.

3. Relación entre los mecanismos de acción y la actividad antagonista *in situ*

Se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) para evaluar la potencial relación entre las levaduras preseleccionadas y sus posibles mecanismos de acción *in vitro* e *in situ*. Con los resultados de todas las variables evaluadas se construyó una matriz de datos binarios (1/0) de acuerdo a la presencia/ausencia de cada propiedad.

El análisis de coordenadas principales (ACoP), generó un gráfico 2D que explica el 79,1% de la variabilidad de los datos (Figura 9). El gráfico muestra el distanciamiento entre los aislamientos: *Cr. victoriae* NPCC 1259, constituye el cluster I y *Cr. albidus*

NPCC 1248, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, conforman el cluster II. El aislamiento NPCC 1259 fue el que menos mecanismos antagónicos presentó. En contraposición, los aislamientos del cluster II son los que resultaron positivos a varios de los mecanismos evaluados: capacidad de colonización de heridas, inhibición de la germinación de los conidios, producción de toxinas *killer*, producción de enzimas hidrolíticas y competencia por $\text{NH}_4\text{Mo}_24\text{O}_7$ frente a *P. expansum*.

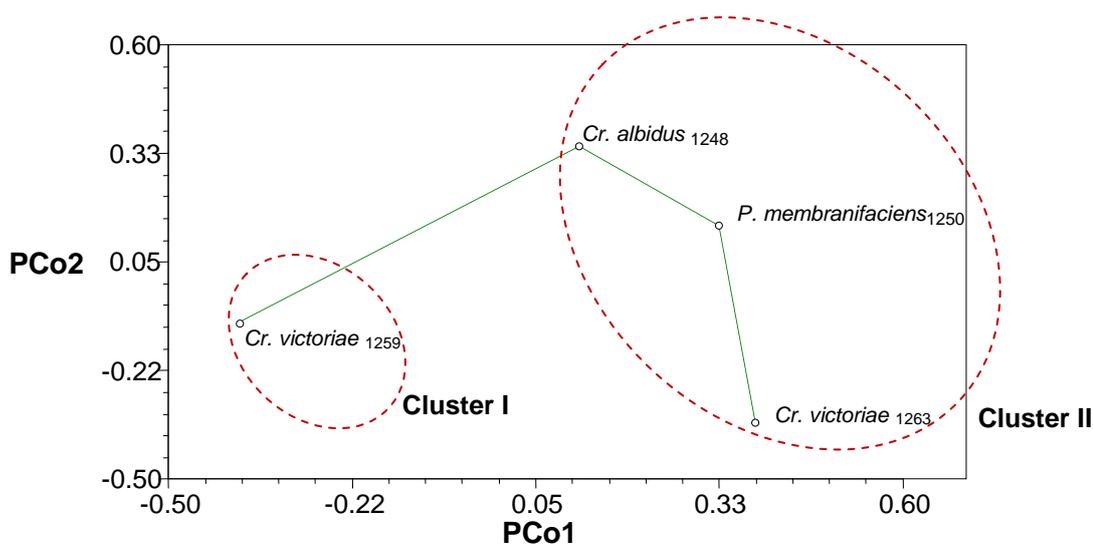


Figura 9. Análisis de coordenadas principales (ACoP). Mecanismos de acción analizados: compuestos difusibles en agar y volátiles, producción de toxinas *killer*, inhibición de la germinación, competencia por nutrientes, producción de biofilms, actividad enzimática y capacidad de colonización de heridas.

Para establecer la existencia o no de relación entre la actividad biocontroladora *in situ* y los ensayos de mecanismos de acción, se comparó la distribución por ACoP (Figura 9) y la reevaluación de las cuatro levaduras en el bioensayo frente a los patógenos (Figura 8). En la evaluación de la capacidad de biocontrol de cada una de las levaduras *in situ* se observó que *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, ambas del cluster II, fueron las más prometedoras, reduciendo significativamente la incidencia de enfermedad y la severidad de la lesión causada por dos patógenos (Figura 8). Es interesante observar que el ACoP agrupa las mejores antagonistas frente a ambos patógenos *in situ*, separándolas de *Cr. victoriae* NPCC 1259, aislamiento con bajos porcentajes de control. Sin embargo, aunque los tres mejores antagonistas del cluster II, comparten similares actividades antagónicas, *Cr. albidus* NPCC 1248 se diferencia por no producir toxinas *killer* frente a los patógenos.

De acuerdo al AcoP, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC pertenecen al mismo cluster pero se encuentran distanciados entre ellos. *Cr. victoriae* NPCC 1263 se destaca con respecto a *P. membranifaciens* NPCC 1250 ya que la primera alcanzó una mayor tasa de crecimiento (A), una fase lag (λ) más corta, el % de adherencia fue elevado en GPY como en JP y presentó la mayor inhibición de la germinación de *P. expansum*.

4. Interacción levaduras antagonicas seleccionadas-hongos patógenos

El crecimiento de las dos levaduras antagonistas seleccionadas *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 y de los dos patógenos fue evaluado *in vitro* en JP enriquecido con los principales nutrientes descritos en los frutos de peras (Anexo IV). De los 27 compuestos evaluados, 14 estimularon el crecimiento de *P. membranifaciens* NPCC 1250, 10 a *Cr. victoriae* NPCC 1263, 9 a *P. expansum* y 5 a *B. cinerea* (Tabla 6).

4.1 Efecto de los nutrientes sobre las levaduras antagonistas y los patógenos

Las dos levaduras incrementaron su crecimiento con el agregado de ácido aspártico, cistina, isoleucina, prolina, FeCl_3 y NH_4NO_3 desde un 10% hasta 173% con respecto al control (Tabla 6); por su parte, ninguno de los cinco azúcares añadidos mostró incrementos significativos en el crecimiento con respecto al control.

P. membranifaciens NPCC 1250 incrementó su crecimiento entre el 10-43% con el agregado de 13 de los 18 aminoácidos evaluados, con tres concentraciones de FeCl_3 en un 14% y con NH_4NO_3 el 34%. En cambio *Cr. victoriae* NPCC 1263, respondió positivamente con 8 de los 18 aminoácidos (incrementos de entre 10% y 173%), con FeCl_3 2.5X y 5X, y con NH_4NO_3 y $\text{NH}_4\text{Mo}_24\text{O}_7$, en un 33% y 23%, respectivamente.

Ambos hongos patógenos incrementaron su crecimiento con el agregado de ácido aspártico, ácido glutámico, glicina y NaNO_3 , para *B. cinerea* estos aumentos fueron de 116%, 95%, 104% y 11% para cada compuesto (Tabla 6), mientras que para *P. expansum* los incrementos fueron del 94%, 90%, 41% y 12%, respectivamente (Tabla 6). A su vez, el crecimiento de *P. expansum* fue incrementado con el agregado de alanina, arginina, y serina; lactosa y maltosa; dos concentraciones de FeCl_3 y NH_4NO_3 (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de los distintos nutrientes sobre el crecimiento de las levaduras antagónicas y hongos patógenos

Compuestos	Levaduras antagónicas				Hongos patógenos			
	<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250		<i>C. victoriae</i> NPCC 1263		<i>B. cinerea</i> NPCC 2049		<i>P. expansum</i> NPCC 2023	
	DO ^a	% ^b	DO ^a	% ^b	DO ^a	% ^b	DO ^a	% ^b
Amino ácidos								
Ácido Aspárico	1,8015d	143	1,4042c	130	1,5858b	216‡†	1,5655c	194 §£
Ácido Glutámico	1,6970d	135	1,0914a	101	1,4273b	195‡	1,5276c	190§
Alanina	1,0781a	86	0,6048a	56	0,6553a	89	0,9133b	113
Arginina	1,5331c	122	0,6504a	60	0,7733a	105	1,94560c	242§
Cistina	1,4606b	116	1,3410b	124	0,7426a	101	0,6689a	83
Fenilalanina	1,4822bc	118	0,7465a	69	0,6469a	88	0,7839a	97
Glicina	1,0018a	80	1,5977c	148	1,4988b	204†	1,1334b	141£
Histidina	1,4207b	113	0,6504a	60	0,6749a	92	0,8093a	100
Isoleucina	1,4225b	113	2,9502d	273	0,6957a	95	0,8559a	106
Leucina	1,5259c	121	1,1881ab	110	0,7823a	107	0,6678a	83
Lisina	1,5253c	121	0,8904a	82	0,7270a	99	0,7155a	89
Metionina	1,4793bc	117	0,6919a	64	0,4668a	64	0,8071a	100
Prolina	1,5516c	123	1,8751d	173	1,8727b	255‡†	0,8961a	111
Serina	1,0552a	84	1,9102d	177	0,5231a	71	1,2446b	155£
Tirosina	1,3810a	110	0,6884a	64	0,6801a	93	0,8559a	106
Treonina	1,1315a	90	1,0165a	94	0,6650a	91	0,8840a	110
Triptofano	1,2582a	100	1,3405b	124	0,5010a	68	0,8140a	101
Valina	1,5793c	125	1,0343a	96	0,7751a	106	0,8640a	107
Azúcares								
Fructosa	1,3092a	104	1,1308a	105	0,5470a	75	0,6820a	85
Glucosa	1,3442a	106	1,0775a	100	0,6105a	83	0,7690a	96
Lactosa	1,3544a	107	1,1315a	105	0,7012a	96	0,9767ab	121
Maltosa	1,0293a	82	1,1061a	102	0,6805a	93	1,1308b	140
Sacarosa	1,3765a	109	1,1710a	108	0,7190a	98	0,6007a	74
Minerales								
FeCl ₃ . 2,5X	1,4288b	114	1,0735a	99	0,7313a	100	1,4280b	177§ £
FeCl ₃ . 5X	1,4342b	114	1,4635b	135	0,7333a	100	1,4353c	178§ £
FeCl ₃ . 10X	1,4332b	114	1,4682b	136	0,6825a	93	0,8280a	103
N₂ inorgánico								
NaNO ₃	1,3062a	103	1,1775a	109	0,8150b	111	0,9000a	112
NH ₄ NO ₃	1,6975c	134	1,4358c	133	0,5850a	80	1,4360c	178§ £
NH ₄ Mo ₇ O ₂₄	1,3845ab	110	1,3295b	123	0,5253a	72	0,7233a	90
Control	1,2582a	100	1,0808a	100	0,7333a	100	0,8050a	100

^a DO: densidad óptica a 640 nm. ^b %: Porcentaje de crecimiento de las levaduras y los hongos, con el agregado de distintos nutrientes, con respecto al control, con JP. ‡ Nutriente que incrementa el crecimiento de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *B. cinerea*. § Nutriente que incrementa el crecimiento de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *P. expansum*. † Nutriente que incrementa el crecimiento de *Cr. victoriae* NPCC 1263 y *B. cinerea*. £ Nutriente que incrementa el crecimiento de *Cr. victoriae* NPCC 1263 y *P. expansum*.

Las letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test de Tukey (P<0,05).

4.2 Competencia de nutrientes *in situ*

De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro* sobre el crecimiento de los microorganismos con la adición de distintos nutrientes, aquellos que estimularon simultáneamente a las levaduras y hongos patógenos, fueron utilizados para evaluarlos en ensayos de biocontrol en fruta. En la Tabla 7, se muestran las combinaciones resultantes del ítem 4.1, a partir de los cuales se llevó a cabo dicho bioensayo.

Tabla 7. Nutrientes que incrementan el crecimiento de las levaduras y patógenos.

Antagonista	<i>B. cinerea</i>	<i>P. expansum</i>
<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	Ácido aspártico	Ácido aspártico
	Ácido glutámico	Ácido glutámico
	Prolina	Arginina
		FeCl ₃ 2,5 y 5X
		NH ₄ NO ₃
<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	Ácido aspártico	Ácido aspártico
	Glicina	Glicina
	Prolina	Serina
		FeCl ₃ 2,5 y 5X
		NH ₄ NO ₃

La adición de ácido aspártico y prolina por si sola provoca un efecto inhibitorio sobre *B. cinerea*, reduciendo la incidencia de la enfermedad en un 50 y 20%, respectivamente (Figura 10). En el caso de *P. expansum* el mismo efecto inhibitorio fue observado con la adición de ácido aspártico, ácido glutámico, FeCl₃, glicina y serina en la herida, sin presencia de levaduras (Figura 10). La evaluación de la competencia por nutrientes en el fruto de las dos levaduras seleccionadas como ACB y *B. cinerea*, no fue posible ya que no hubo diferencia en la incidencia de la enfermedad del control (sólo patógeno) y los tratamientos con las levaduras antagónicas.

Por otro lado, las dos levaduras redujeron la incidencia de *P. expansum* en un 80% (Figura 10). La adición de ácido glutámico, arginina y FeCl₃ no tuvieron efecto sobre el biocontrol ejercido por *P. membranifaciens* NPCC 1250 (Figura 10); en cambio, la capacidad antagónica de esta levadura se redujo en presencia de ácido aspártico y NH₄NO₃, con incremento de %I de la enfermedad en 30% y 50%, respectivamente.

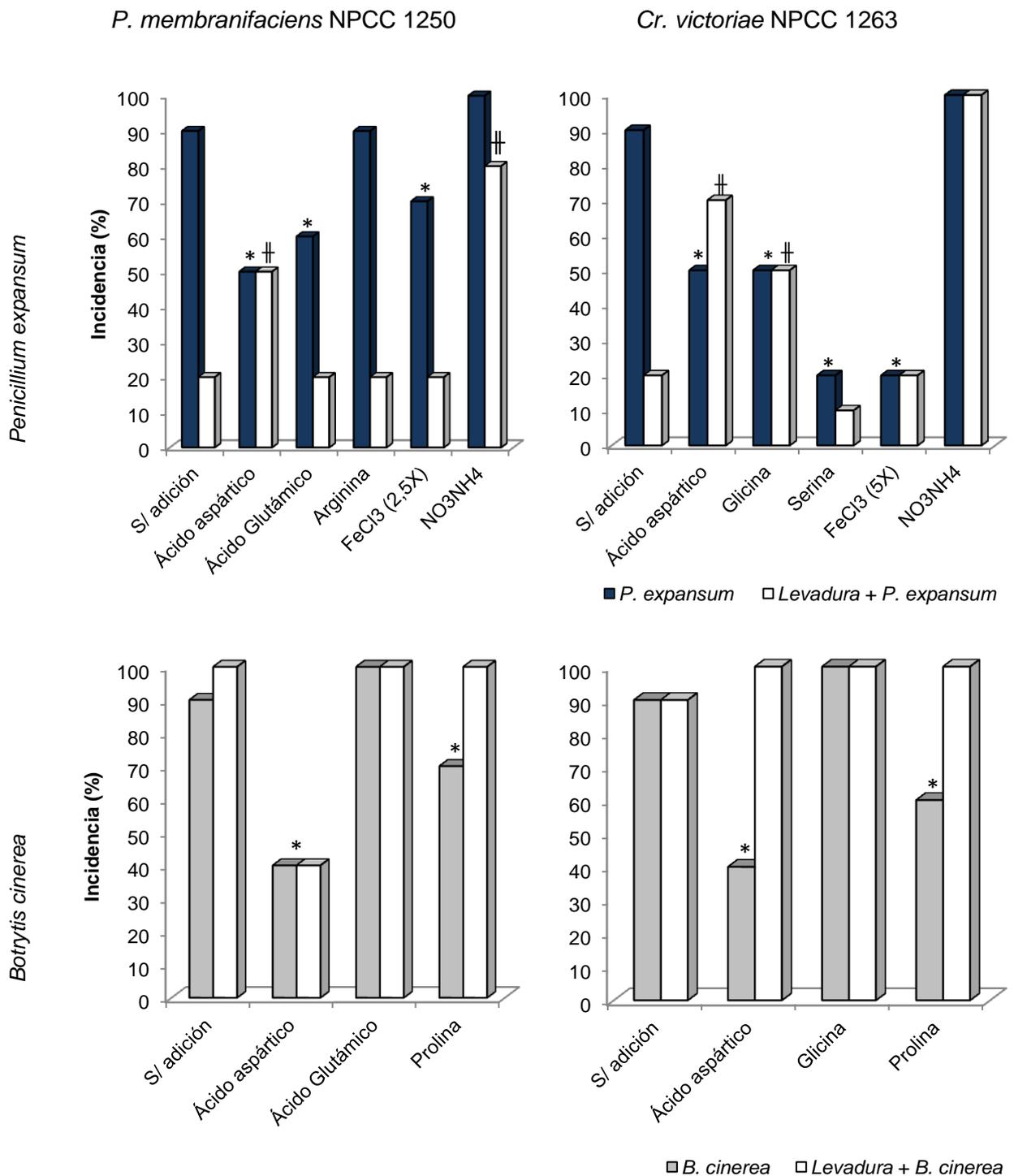


Figura 10. Efecto de la aplicación exógena de nutrientes en heridas de pera en la incidencia de *P. expansum* y *B. cinerea*, aplicando o no *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263. La fruta inoculada fue incubada en cámara frigorífica (-1/0°C – 95% HR) 60 y 45 días de acuerdo al patógeno. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas de la incidencia del patógeno crecido en JP con la obtenida con el agregado de los distintos nutrientes, mientras que las cruces (†) a la diferencia de incidencia del tratamiento de levadura + patógeno en JP con la obtenida con la adición de los nutrientes.

Por su parte, *Cr. victoriae* NPCC 1263 mejoró su capacidad biocontroladora frente a *P. expansum* con adición de serina, y se redujo significativamente con el agregado de ácido aspártico, glicina y NH_4NO_3 (Figura 10).

DISCUSIÓN

Conocer los mecanismos asociados con la actividad antagónica de los ACB es esencial para incrementar las posibilidades de éxito de los organismos seleccionados y facilitar el registro para uso comercial.

Las cuatro levaduras presentaron múltiples actividades antagónicas en las condiciones en las cuales fueron evaluadas. Estos resultados son interesantes, ya que estudios previos sugieren que los ACB con múltiples modos de acción suelen ser mejores que aquellos que presenten uno sólo (Sharma *et al.*, 2009; Janisiewicz *et al.*, 2010; Jamalizadeh *et al.*, 2011).

La producción de compuestos volátiles con capacidad antifúngica puede ser una propiedad importante como mecanismo antagónico, especialmente en las condiciones de almacenamiento. De acuerdo a Mercier & Jimenez (2004), las condiciones de almacenaje de la fruta en postcosecha podrían favorecer la acción de estos compuestos, dado que las mismas se conservan en bolsas y cajas cerradas donde la acción de compuestos volátiles podría ser potenciada. *In vitro*, esta característica fue solo detectada en el aislamiento de *Cr. victoriae* NPCC 1259. En general, esta es una propiedad raramente estudiada entre los microorganismos con actividad antagónica, existiendo reportes para ACB de géneros de hongos filamentosos como *Trichoderma* (Dennis & Webster, 1971) y *Muscodora* (Mercier & Jimenez, 2004) y bacterianos como *Bacillus* (Strobel *et al.*, 2001).

La capacidad *killer* de las levaduras ha sido informada en reiteradas ocasiones en bibliografía sobre los efectos inhibidores frente a varias especies de hongos (Walker *et al.*, 1995; Santos & Marquina, 2004; Blevé *et al.*, 2006; Friel *et al.*, 2007; Jijakli, 2011; Plantaria *et al.*, 2012), por lo cual poseer esta capacidad resultaría positivo para los ACB. La actividad *killer* de las levaduras preseleccionadas fue evaluada a dos temperaturas, pero sólo *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263

fueron capaces de producir toxinas frente a los dos patógenos a baja temperatura. Es promisorio que esta característica se manifieste en las condiciones de almacenamiento de la fruta en postcosecha.

Por otro lado, dentro de la capacidad de antibiosis de las levaduras, la secreción de enzimas que degradan las paredes celulares o que reducen la patogenicidad ha sido propuesta como otro posible mecanismo (Droby *et al.*, 1990; Wisniewski *et al.*, 1990; Elad & Stewart, 2004; Fan, 2009; Hashem & Alamri, 2009). Los resultados indican que *Cr. albidus* NPCC 1248, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, presentan un amplio espectro de actividades enzimáticas hidrolíticas difusibles: β 1-3 glucanasas, proteasas y quitinasas. Estas actividades fueron únicamente detectadas a la temperatura de almacenamiento de la fruta (-1/0°C), mientras que no se evidenciaron a 20°C. Estos resultados, al igual que lo ocurrido con la producción de toxinas *killer*, confirman la necesidad de evaluar las actividades de interés en las condiciones similares a las de conservación. En este sentido, Kaur *et al.* (2005) afirman que la simple disponibilidad del sustrato no es suficiente para inducir la síntesis de estas enzimas, ya que el microorganismo puede requerir algunos otros factores o condiciones específicas para producirlas, es así que para las levaduras preseleccionadas en esta Tesis, la temperatura constituiría una condición necesaria para la secreción de estas enzimas. El hecho de que los ACB originen a bajas temperaturas sus herramientas antagónicas, confirma que el proceso de aislamiento y selección desarrollado fue exitoso, y presentan un buen pronóstico para ser ACB en postcosecha, ya que están adaptadas al frío.

La evidencia experimental sobre el papel de la competencia por nutrientes en la actividad antagónica es escasa, no obstante varios estudios sugieren que podría ser muy importante (Droby *et al.*, 1989; Wilson & Wisniewski, 1989; Janisiewicz & Korsten, 2002; Jijakli & Lepoivre, 2004). Para muchos patógenos de tipo necrotróficos, la competencia por azúcares y otros nutrientes podría ser uno de los mecanismos más eficaces para su control, ya que estos requieren nutrientes exógenos para la germinación de sus conidios e inicio del proceso infectivo (Elad, 1996; Janisiewicz *et al.*, 2000; Chanchaichaovivat *et al.*, 2008). Diversos compuestos nitrogenados y carbonados han sido evaluados para comprobar la capacidad de suprimir el potencial antagonista de las levaduras seleccionadas como ACB (Piano *et al.*, 1997; Scherm *et al.*, 2003; Chanchaichaovivat *et al.*, 2008). El nitrógeno es el factor más limitante para el crecimiento de los conidios, ya que el medio ambiente de las heridas de las frutas es rico de compuestos carbonados y deficiente en éste (Janisiewicz & Korsten, 2002). En el caso de las peras, según los reportes de U.S.D.A. (2009) cada 100 g de tejido fresco de pera, 9,8 g son de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa,

fundamentalmente), 15,46 g de carbohidratos totales y sólo 0,304 g de amino ácidos, estos últimos principales fuentes de nitrógeno para los microorganismos.

Los resultados experimentales obtenidos sobre la germinación conidial de *P. expansum* indican que algunas levaduras compiten tanto por compuestos nitrogenados como carbonados. La capacidad biocontroladora de *Cr. albidus* NPCC 1248 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, frente a conidios de *P. expansum* en JP fue suprimida con la adición de compuestos nitrogenados ($\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, NaNO_3 y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), lo cual indicaría que las levaduras compiten por estos nutrientes como mecanismo antagónico frente a este patógeno *in vitro*. Frente a *B. cinerea* ningún compuesto fue capaz de reducir la actividad biocontroladora de las cuatro levaduras, lo que indicaría que las levaduras no antagonizan al patógeno por competencia de estos nutrientes.

Curiosamente se observó una importante inhibición de la germinación *P. expansum* y *B. cinerea* en presencia de varios azúcares. Este mismo efecto inhibitor en la germinación por el agregado de fructosa, glucosa y 2-desoxi-D-glucosa sobre *P. expansum* ya ha sido reportada en algunos trabajos (Piano *et al.*, 1997; Scherm *et al.*, 2003). Asimismo, Card *et al.* (2009) demostraron efectos similares con la glucosa, la fructosa y la sacarosa sobre la germinación de los conidios de *B. cinerea*. Posiblemente las concentraciones evaluadas en los experimentos aquí desarrollados fueron muy elevadas y resultaron inhibitorias.

La capacidad de crecimiento de las levaduras en las heridas de peras es una característica importante para lograr un efectivo biocontrol de los patógenos en el ambiente de conservación (Ippolito & Nigro, 2000), dado que se pretende controlar patógenos psicrófilos que invaden las heridas. Si el antagonista tiene la capacidad de colonizar rápidamente las heridas, alcanzando una densidad elevada, evita el ingreso de los patógenos por ocupación del espacio, la competencia por nutrientes y la exclusión del nicho (Tian *et al.*, 2002, Gholamnejad *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). *Cr. albidus* NPCC 1248, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 alcanzaron elevados y estables niveles poblacionales en las heridas de las peras en condiciones de almacenamiento, lo que indica que tienen la capacidad de multiplicarse y sobrevivir en tales condiciones. Estos datos muestran que están bien adaptadas al ambiente de la herida. En el mismo sentido, y analizando su aplicación en los sistemas postcosecha, los resultados muestran que una sola aplicación temprana de las levaduras (inmediatamente de producidas las heridas, en el momento de cosecha de la fruta) sería suficiente para prevenir las infecciones fúngicas hasta los 120 días de almacenamiento, ya que los niveles poblacionales se mantienen constantes.

El modelo de Gompertz desarrollado para el crecimiento de microorganismos en medio líquido (Zwietering *et al.*, 1990) fue utilizado para modelar el comportamiento de las levaduras en las heridas. Todos los valores de R^2 obtenidos con el modelo fueron cercanos a 1, lo cual indica que este modelo puede transferirse para el estudio del crecimiento de levaduras en heridas. De acuerdo a los datos obtenidos, *Cr. victoriae* NPCC 1263 fue la mejor colonizadora, mostrando la mayor μ_{max} , una λ reducida y una alto nivel de colonización ($A=5,89$).

Los resultados obtenidos, prueban que los aislamientos de *Cr. victoriae*, NPCC 1259 y NPCC 1263, fueron los que presentaron la mayor adherencia (producción de biofilms) de las levaduras seleccionadas. La formación de los biofilms en los tejidos colonizados por las levaduras, se produce por un cambio en la expresión génica y del metabolismo de la levadura en el sitio de la herida, donde se produce un cambio estructural en la morfología de la población, y esto es lo que inhibiría el desarrollo de las podredumbres, por la ocupación del espacio y el consumo de los nutrientes (Droby *et al.*, 2009). En tal sentido, Liu *et al.* (2013a) establecen que la capacidad de alcanzar una densidad celular específica en el sitio de la infección (colonización y establecimiento en las herida), y la capacidad de las levaduras para adherirse al tejido del hospedante como así también a las estructuras fúngicas, son los dos atributos que juegan el papel más importante en la eficacia como ACB. A su vez, algunos autores indican que la capacidad de formar biofilms sobre la superficie de las heridas mejoraría la colonización de las levaduras (Ortu *et al.*, 2005; Droby *et al.*, 2009; Vero *et al.*, 2013). Los bioensayos con *Cr. victoriae* NPCC 1263 muestran un eficaz comportamiento antagónico *in situ* frente a los dos patógenos y se destacó en el crecimiento y establecimiento en las heridas de peras (A elevado y λ corta fase *lag*), por lo cual, la capacidad de este aislamiento de formar biofilms constituya posiblemente un mecanismo involucrado con la capacidad de colonización, y en su conjunto sean los responsables de la actividad biocontroladora del organismo. Por su parte, el aislamiento NPCC 1259 si bien presentó niveles significativos de adherencia, los resultados no muestran correlación con la colonización y biocontrol sobre los patógenos. Posiblemente ocurra una situación similar a la reportada para *Pichia fermentans* en durazno, en donde al ser inoculada en heridas, produce biofilms pero resulta patógena para el fruto ocasionando la podredumbre de este, la producción de pseudohifas en el hospedante sería la causa a tal situación; la misma levadura inoculada en manzana, controla el desarrollo de *P. expansum* (Giobbe *et al.*, 2007; Fiori *et al.*, 2012). Esta última situación indicaría la estrecha asociación del hospedante y la levadura, en el desarrollo de dicho mecanismo.

El ACoP con los mecanismos evaluados agrupó los aislamientos que evidenciaron mayor cantidad de mecanismos antagónicos positivos, los cuales coincidieron con los que presentaron mayor potencial antagónico en los bioensayos *in situ*. Los tres mejores aislamientos de acuerdo a su capacidad de biocontrol (*Cr. albidus* NPCC 1248, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263) se agruparon en la parte derecha de la gráfica, cluster II. Los mecanismos que caracterizaron a este cluster fueron: la producción de enzimas hidrolíticas, la capacidad para colonizar las heridas, la producción de toxinas *killer*, la inhibición de la germinación de los conidios de *P. expansum* y la competencia por molibdato de amonio frente a *P. expansum*. Aún cuando otros mecanismos también fueron observados en las levaduras estudiadas, sólo los anteriormente mencionados diferencian a las cuatro levaduras antagonistas. *Cr. albidus* NPCC 1248, situado en el grupo II, posee prácticamente las mismas actividades que *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, sin embargo la capacidad biocontroladora de estos últimos resultó superior sobre los patógenos en los experimentos *in situ*. De acuerdo a los mecanismos evaluados, esta diferencia podría ser debido a la falta de producción de toxinas *killer* de *Cr. albidus* NPCC 1248. En cuanto a *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, los dos fueron igualmente efectivos en el control de las dos enfermedades, sin embargo, cuantitativamente este último fue el que alcanzó mayor crecimiento en los experimentos de colonización, mayor adherencia en JP y mayores porcentajes de inhibición de la germinación de *P. expansum*.

En este estudio, los bioensayos desarrollados fueron determinantes para la selección de los aislamientos de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 como los ACB con mayor potencial biocontrolador, con perspectivas para desarrollar un sistema de biocontrol eficaz a partir de levaduras indígenas de la región. Para ello se llevaron a cabo experimentos relacionados con los requerimientos nutricionales *in vitro* para luego ampliar los estudios de competencia, como mecanismo antagónico *in situ*.

El análisis *in vitro* sobre el perfil de asimilación de los principales amino ácidos, azúcares, fuentes nitrogenadas inorgánicas y hierro, presentes en los tejidos de pera, muestra que tanto para las levaduras como para los patógenos, los compuestos nitrogenados incrementan significativamente el crecimiento de ambos. Curiosamente ninguno de los cinco azúcares evaluados produjo incrementos significativos ni en levaduras ni hongos. Liu *et al.* (2013c) en un estudio similar con *Kloeckera apiculata* y *Penicillium italicum*, obtienen que todos los azúcares (dextrosa, fructosa, celobiosa y xilosa) (10 g/L) estimulan el crecimiento de ambos microorganismos. En lo que respecta a la utilización de compuestos nitrogenados, se observa que las dos

levaduras y *B. cinerea*, incrementan en mayor medida su crecimiento a partir de fuentes orgánicas de nitrógeno. En cambio *P. expansum* mejora su crecimiento con NH_4NO_3 . El FeCl_3 incrementó significativamente el crecimiento de *Cr. victoriae* NPCC 1263 (35%) y de *P. expansum* (38%), y en menor medida (14%) a *P. membranifaciens* NPCC 1250. Los experimentos de producción de sideróforos tipo hidroxamatos indican que las levaduras no los sintetizan, por lo cual quizás exista otro mecanismo que permita la utilización del hierro por las células.

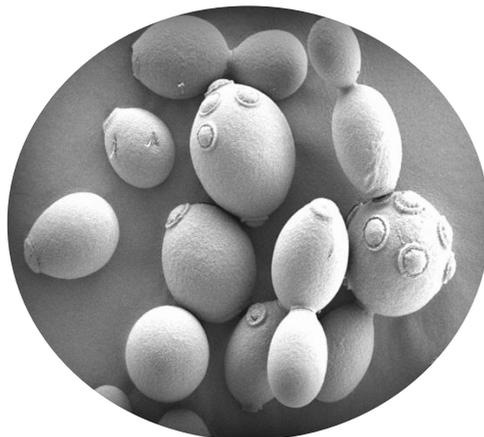
La especie de levadura *P. membranifaciens* ya ha sido descrita como agente de biocontrol de patógenos postcosecha de frutas (Santos & Marquina, 2004; Cao *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008) y el modo de acción reportado fue la competencia de nutrientes y producción de β 1-3 glucanasa y quitinasas (Fan *et al.*, 2002), actividades que también fueron detectadas con el aislamiento regional seleccionado. Por su parte, *Cr. victoriae* NPCC 1263 presentó niveles de biocontrol *in situ* muy similares a los de *P. membranifaciens* NPCC 1250, sin embargo en esta Tesis se observó que este aislamiento presenta un mayor número de mecanismos antagónicos activos (*in vitro*): inhibe la germinación de los conidios de *P. expansum*, es productor de biofilms y es un eficaz competidor por el molibdato de amonio frente a *P. expansum*. La especie *Cr. victoriae* nunca ha sido reportada como ACB, no obstante varias especies del género *Cryptococcus* que han sido reportadas, tal es el caso de *Cr. albidus* y *Cr. laurentii* (Kufferath) Skinner (Lima *et al.*, 1998; Helbig *et al.*, 2002; Chan & Tian, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

Uno de los aspectos más destacables de esta investigación lo constituye la evidencia de la posible utilización de *Cr. victoriae* como ACB de enfermedades de postcosecha de frutas. Por otra parte, si bien existen reportes de *P. membranifaciens* como biocontrolador para enfermedades de postcosecha de fruta (Masih & Paul, 2002; Santos & Marquina, 2004; Cao *et al.*, 2010), esta es la primera vez que se la propone para su uso potencial en peras.

CAPITULO IV

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE PATOGENICIDAD EN
HUMANOS.

MEJORAMIENTO DEL BIOCONTROL



INTRODUCCIÓN

Numerosas son las ventajas sobre el uso de las levaduras como ACB. En general no son patógenas para humanos y son más aceptadas que las bacterias por los consumidores para su empleo sobre la fruta. Es así que la utilización de levaduras en biotecnología, en especial en la industria alimenticia, está ampliamente difundida. El ejemplo más emblemático es el de *Saccharomyces cerevisiae*, especie empleada desde hace miles de años por el hombre para la elaboración de pan y bebidas fermentadas. Esta especie de levadura se ha convertido con el tiempo en la especie más estudiada y en modelo eucariota para estudios celulares y moleculares.

No obstante, en los últimos años se han reportado numerosos casos de infecciones en humanos ocasionadas por diferentes especies de levaduras, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Casadevall & Pirofski, 2001; Okawa & Yamada, 2002; De Llanos *et al.*, 2006); en estos casos se las denomina levaduras oportunistas.

Por lo expuesto, en todo proceso de selección de levaduras antagonistas para ser utilizadas en alimentos, se deben evaluar algunas particularidades fisiológicas con las cuales es posible establecer el potencial patogénico de las mismas. Algunas de las propiedades que se asocian con los factores de virulencia y patogenicidad en humanos de las levaduras son: la capacidad de crecer a 37°C (temperatura corporal normal de un individuo), la capacidad de crecer en las condiciones del estómago (pH 1,2) y la capacidad de producir enzimas proteasas y fosfolipasas (que producen la degradación celular) (Barret-Bee *et al.*, 1985; Mitchell & Perfect, 1995; Ibrahim *et al.*, 1995; Usall, 1995; Chen *et al.*, 1997; van Burik & Magge, 2001). Algunas de estas propiedades serán evaluadas a lo largo del presente Capítulo, con el objetivo de asegurar la inocuidad de las dos levaduras antagonistas, para futuras aplicaciones a escala comercial en frutas.

El control biológico reduce en gran medida las enfermedades de postcosecha en frutas tanto en bioensayos en condiciones controladas de laboratorio como en condiciones semicomerciales (Droby *et al.*, 1998; Janisiewicz & Petersen, 2005; Janisiewicz *et al.*, 2008; Manso & Nunes, 2010). Sin embargo, dado su carácter preventivo, su uso comercial no siempre arroja los resultados observados en laboratorio (Droby *et al.*,

1998; Usall *et al.*, 2001; El-Ghaouth *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2007; Janisiewicz *et al.*, 2008). Autores como Brow & Chambers (1996), Wilson *et al.* (1996) y Droby *et al.* (1998), afirman que en condiciones comerciales, los microorganismos antagónicos a menudo confieren un nivel de control más bajo que los fungicidas sintéticos. Esta situación es atribuida a la incapacidad de erradicar las infecciones que ocurren previamente a la aplicación de los antagonistas (Droby *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1996; Droby *et al.*, 2006; Jijalki & Lepoivre, 2011). Varias técnicas de mejoramiento del biocontrol han sido desarrolladas para aumentar la eficacia de estos ACB, que incluyen: la inoculación con antagonistas con diferente mecanismo de acción, el aumento en el número de células del inóculo, la adición de compuestos orgánicos o inorgánicos, o la adición de nutrientes. En general, el objetivo de todas las estrategias está relacionado con la mejora en la capacidad de colonización de los antagonistas, la potenciación de sus mecanismos antagónicos frente a los patógenos o la generación de una respuesta de defensa en la fruta.

En casi todos los sistemas de control biológico se aplica un único ACB; sin embargo, algunos autores han sugerido que la combinación de diferentes antagonistas compatibles podría mejorar el control de las enfermedades (Cook, 1999).

Otra de las estrategias utilizadas es el enriquecimiento nutricional, mecanismo basado en la adición de sustancias químicas que favorecen el desarrollo del antagonista - y no del patógeno - incrementando su capacidad de colonización y sus mecanismos de acción sobre el patógeno. En este sentido, es sabido que la superficie y heridas de los frutos son sitios ricos en azúcares y escasos en fuentes nitrogenadas, es así que la aplicación exógena de compuestos nitrogenados ha sido propuesta como mecanismo para favorecer el desarrollo de los antagonistas (Janisiewicz *et al.*, 1992; Druvefors *et al.*, 2005; Conway *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2008; Droby *et al.*, 2009; Bonaterra *et al.*, 2012). A su vez, la aplicación de algunos compuestos podría tener efecto negativo directo sobre el patógeno, reduciendo su capacidad patogénica (Nunes *et al.*, 2001).

Del mismo modo, diferentes sustancias (aditivos orgánicos e inorgánicos) han sido aplicados en combinación con ACB para lograr efectos beneficiosos (El-Ghaouth *et al.*, 2000; Janisiewicz *et al.*, 1994). Entre los más reportados se encuentran: compuestos nitrogenados como el molibdato de amonio ($\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), el cloruro de calcio (CaCl_2), el quitosano y 2-desoxi-D-glucosa, los cuales poseen actividad antimicrobiana y se ha demostrado que son capaces de controlar las podredumbres de postcosecha de frutas de manera eficiente (Conway *et al.*, 1991; El-Ghaouth *et al.*, 1992; El-Ghaouth *et al.*, 1997). El CaCl_2 es uno de los más difundidos por los resultados satisfactorios en los niveles de control de las podredumbres postcosecha en condiciones comerciales (Wisniewski *et al.*, 1995; Janisiewicz *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 2003; Zhang *et al.*,

2005; Cao *et al.*, 2008). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el calcio reduce la infección por hongos no se conoce con certeza; se cree que puede desempeñar un rol importante en la resistencia estructural de los frutos, ya que puede interferir en la actividad de las enzimas pectolíticas (Conway *et al.*, 1992) y disminuir la maceración de las paredes celulares debido a la mejora en la integridad estructural por un aumento del contenido de calcio (Conway *et al.*, 1988). Algunos estudios indican que el CaCl₂ puede también tener efectos inhibitorios directos sobre los patógeno al reducir la actividad poligalacturonasa, por ejemplo de *P. expansum* (Conway *et al.*, 1988; Wisniewski *et al.*, 1995; Saftner *et al.*, 1997). Asimismo, podría inducir resistencia sobre los hospedantes (Bastiaanse *et al.*, 2010; Janisiewicz & Conway, 2010).

De acuerdo a las limitaciones demostradas del CB en condiciones comerciales, el objetivo de este Capítulo fue evaluar la posible mejora de la acción biocontroladora de las dos levaduras seleccionadas, a través de algunas de las estrategias ya reportadas: diferentes concentraciones de inóculo, combinación de antagonistas y empleo de sustancias con probado efecto potenciador.

MATERIALES

1. Material vegetal

Frutos de peras del cultivar Packham's Triumph cosechadas con madurez fisiológica y conservados en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95 %HR) hasta su utilización.

2. Microorganismos

2.1 Patógenos. Aislamientos de *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049 seleccionados por su patogenicidad y resistencia a los fungicidas de postcosecha (Capítulo I).

2.2 Levaduras antagónicas. Aislamientos seleccionados por sus mecanismos de biocontrol y su comportamiento antagónico *in situ* frente a *P. expansum* y *B.*

cinerea: *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 (Capítulo II y III).

3. Medios de cultivo

3.1 Para el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras. Los medios de cultivo utilizados fueron: APD y GPY - Agar, los cuales fueron descritos en los Materiales del Capítulo II, inciso 3.

3.2 Para pruebas preliminares de toxicología

3.2.1 Producción de fosfolipasas

Agar yema de huevo-NaCl₂: Cloruro de sodio 58 g/L; Agar 15 g/L; Yema de huevo. El cloruro de sodio y el agar fueron disueltos en agua y esterilizados en autoclave a 2 atmósferas por 20 min. Posteriormente, cuando la solución se enfrió y alcanzó los 50°C, se agregó 100 mL de yema de huevo.

Agar Sabouraud dextrosa-Yema de huevo-Calcio: Pluripeptona 10 g/L; Glucosa 40 g/L; Cloranfenicol 50 mg/L; Cloruro de sodio 58 g/L; Cloruro de calcio 0,5 g/L; Agar 15 g/L; Yema de huevo. Los compuestos sólidos fueron disueltos en agua y esterilizados en autoclave. Posteriormente, cuando la solución se enfrió y alcanzó los 50°C, se agregó 100 mL de yema de huevo.

3.2.2 Simulación jugo gástrico. Cloruro de sodio 2 g/L; Pepsina 3,2 g/L. La solución de cloruro de sodio y pepsina se lleva a pH 1,2 con ácido clorhídrico.

4. Otras sustancias utilizadas

- **Cloruro de calcio:** 20 g/L (Anedra)
- **Glucosa:** 20 g/L (Anedra)
- **Molibdato de amonio:** 1 g/L (Anedra)

MÉTODOS

1. Crecimiento de hongos filamentosos y levaduras antagonistas

La producción de inóculo de levaduras y hongos, se realizó utilizando la metodología descrita en el Capítulo II, inciso 1, y Capítulo III, inciso 1.2.

2. Pruebas preliminares de patogenicidad de las levaduras seleccionadas en humanos

2.1. Crecimiento de las levaduras a 37°C

Se evaluó el crecimiento de las levaduras antagónicas en medio de cultivo completo (GPY-agar). Las levaduras se inocularon mediante estrías de cultivos frescos y las placas inoculadas se incubaron durante 7 días a 37°C. Como control se evaluó el crecimiento de las levaduras a 20°C utilizando el mismo medio de cultivo.

2.2. Producción de fosfolipasas

La capacidad de las levaduras de producir fosfolipasas *in vitro* se evaluó en dos medios de cultivo sólidos: agar yema de huevo - NaCl₂ y en agar Sabouraud dextrosa - yema de huevo (Rigby, 1981; de Llanos *et al.*, 2006). Los medios fueron inoculados con estrías de cultivos de levaduras frescas crecidas en GPY-agar, e incubadas durante 10 días a dos temperaturas: 20°C y 37°C.

2.3. Evaluación del comportamiento de las levaduras en las condiciones del jugo gástrico

Se utilizó el procedimiento propuesto por Usall (1995) con algunas modificaciones. En frascos Erlenmeyers de 50 mL conteniendo 10 mL del medio de cultivo con las condiciones de simulación del estómago (NaCl₂ - Pepsina; pH 1,2) fueron inoculados con 100 µL de las suspensiones de levaduras (10⁸ células/mL) e incubados a 20°C y 37°C con agitación (100 rpm). A las 24, 48 y 120 h de incubación, se sembraron 100 µL de cada cultivo en placas con GPY-agar. Las placas se incubaron a 20°C durante 48 h y se determinó el número de UFC/mL.

3. Mejoramiento del biocontrol

3.1. Efecto de las concentraciones de levaduras

El efecto de la concentración de las levaduras antagonistas se estableció en bioensayos en heridas de peras frente a los dos patógenos: *B. cinerea* y *P. expansum*, utilizando la misma metodología descrita para la evaluación de la eficacia biocontroladora de las levaduras en capítulos previos. Las concentraciones de levaduras evaluadas fueron: 10^6 , 10^8 y 10^{10} células/mL. Dos horas después de la inoculación de las levaduras, se inoculó el patógeno a la CMI (*B. cinerea* 5×10^3 conidios/mL y *P. expansum* 10^4 conidios/mL). Se utilizaron cinco frutos por cada combinación y el experimento fue repetido dos veces. Los frutos inoculados se almacenaron dentro de bolsas de polietileno en cajas de cartón e incubados en condiciones comerciales ($-1/0^\circ\text{C}$ y 95% HR). Se realizaron evaluaciones periódicas durante 45 y 75 días para determinar incidencia (%I) y severidad (en mm) de cada enfermedad.

3.2 Efecto de la combinación de levaduras

Ensayos de biocontrol *in situ* fueron realizados utilizando la misma metodología descrita anteriormente. Las suspensiones de cada levadura fueron ajustadas para obtener concentraciones finales de 10^6 ; 10^8 y 10^{10} células/mL de cada combinación de *P. membranifaciens* NPCC 1250:*Cr. victoriae* NPCC 1263 en las proporciones 1:1, 2:1 y 1:2. Se utilizaron cinco frutos por cada combinación y el experimento fue repetido dos veces. La fruta inoculada con *B. cinerea* se incubó durante 45 días en condiciones de almacenaje comercial, mientras que la inoculada con *P. expansum* durante 75 días. Se determinaron los parámetros incidencia (%I) y severidad (en mm) de cada una de las enfermedades. Los resultados fueron expresados como % Control, a los fines de poder establecer relaciones con el Efecto esperado (Ee).

$$\% \text{ Control} = 100 \% - I (\%)$$

Donde:

% Control: Número de frutos tratados y mantenidos sanos.

I (%): Incidencia de la enfermedad

La fórmula de Limpel's (Limpel's *et al.*, 1962; Richer, 1987) adaptada fue utilizada para determinar la presencia de interacciones sinérgicas o antagonistas entre las mezclas de levaduras. La expresión es la siguiente:

$$Ee = x + y - \frac{x * y}{100}$$

Donde:

Ee: Efecto esperado de las respuestas aditivas del tratamiento con *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 sobre el control de un patógeno específico.

x: Porcentaje de control de *P. membranifaciens* NPCC 1250

y: Porcentaje de control de *Cr. victoriae* NPCC 1263.

Si la combinación de los dos agentes produce un control mayor que el *Ee*, existe sinergia; mientras que si el efecto antagónico observado es menor que el *Ee* existe antagonismo.

3.3 Efecto de la combinación de levaduras con sustancias potenciadoras

Se evaluó el efecto de la adición de tres sustancias consideradas GRAS (en inglés: generalmente consideradas como seguras) y reportadas como mejoradoras del biocontrol: cloruro de calcio (CaCl_2) (2% p/v), glucosa (2% p/v) y molibdato de amonio ($\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) (0,1% p/v). Las tres sustancias se evaluaron en combinación con las levaduras mediante ensayos *in situ* en heridas de pera frente a *P. expansum* y *B. cinerea*, de acuerdo con la metodología ya descrita. Las heridas fueron inoculadas con 3 μL de la sustancia potenciadora, 20 μL de la suspensión de levaduras correspondiente ajustada a 10^6 UFC/mL y finalmente 10 μL de conidios de cada patógeno a su CMI. Como control se utilizaron frutas inoculadas con la sustancia enriquecedora y el patógeno. Los tratamientos fueron asignados al azar, utilizando cinco frutos por tratamiento y todo el ensayo fue repetido dos veces. La fruta fue almacenada por 60 días en cámara frigorífica y se determinó la incidencia (%I) y severidad al finalizar el almacenamiento.

La fórmula de Limpel's (Limpel's *et al.*, 1962; Richer, 1987) fue utilizada para determinar la presencia de interacciones sinérgicas entre las levaduras y las sustancias evaluadas. La misma fórmula descrita en el ítems 3.2 fue utilizada. Además se determinó la interacción (aditiva, sinérgica o antagonista), a través del Factor de Sinergia (FS). Este factor fue calculado de acuerdo a la fórmula de Abbott (Levy *et al.*, 1986):

$$FS = \frac{Y_{obs}}{Y_{esp}}$$

Donde:

FS: Factor de sinergia

Yobs: % de control obtenido

Yesp: Ee

Si $FS = 1$, la interacción entre los dos tratamientos es aditivo, si $FS < 1$, la interacción es antagónica; si $FS > 1$, la interacción es sinérgica.

4. Análisis estadístico

La incidencia (%I) y severidad se determinaron de acuerdo a lo descrito en el Capítulo II, Métodos, inciso 5.

R E S U L T A D O S

1. Pruebas preliminares sobre la posible patogenicidad en humanos

Se llevaron a cabo tres pruebas relacionadas con la posible patogenicidad de las levaduras seleccionados sobre los humanos: capacidad de crecimiento a 37°C, crecimiento en condiciones simulación gástrica y producción de enzimas fosfolipasas. Ninguna de las dos cepas fue capaz de crecer a 37°C ni en las condiciones de simulación gástrica. Tampoco se detectó actividad fosfolipasa en las condiciones evaluadas.

2. Mejoramiento del biocontrol

2.1 Efecto de las concentraciones de antagonista sobre el biocontrol

El efecto de diferentes concentraciones de las dos levaduras antagonistas seleccionadas sobre la actividad antagónica fue evaluado en ensayos *in situ* en condiciones de almacenamiento comercial.

El efecto antagónico de *P. membranifaciens* NPCC 1250 fue significativamente mayor frente a *B. cinerea*, cuando se incrementaron las concentraciones de células, reduciendo la incidencia de la enfermedad al 60% con 10^8 y 10^{10} cel/mL; mientras que utilizando 10^6 cel/mL se lograron valores de incidencia de 78,6%. Contrariamente, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de incidencia de *P. expansum* con las concentraciones de células evaluadas (Tabla 1).

Para *Cr. victoriae* NPCC 1263, el incremento del número de células inoculadas produjo una reducción significativa en la incidencia de ambos patógenos. Frente a *B. cinerea*, la incidencia se redujo del 71% con la menor concentración de antagonista, hasta 20% con la mayor concentración (Tabla 1). La misma levadura frente a *P. expansum* presentó un mayor efecto antagónico, observándose una incidencia de 26,6% con 10^6 cel/mL y un completo control de la incidencia con 10^{10} cel/mL (Tabla 1).

En cuanto a la severidad, para las lesiones provocadas por *B. cinerea* no se encontraron diferencias significativas con el control, sin embargo, si se observaron diferencias con el control, de los tratamientos con las levaduras.

Tabla 1. Efecto antagónico de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 a diferentes concentraciones frente a los dos patógenos.

Tratamiento	Concentración	<i>Botrytis cinerea</i> ^a		<i>Penicillium expansum</i> ^b	
		Incidencia (%I) ^c	Severidad (mm) ^d	Incidencia (%I) ^c	Severidad (mm) ^d
Control	CMI	100,0	23,41a	80,00	18,33b
<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	10^6 cel/mL	78,6*	21,09a	53,30*	9,00a
	10^8 cel/mL	60,0*	16,22a	46,60*	9,62a
	10^{10} cel/mL	60,0*	22,09a	46,60*	9,62a
<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	10^6 cel/mL	71,4*	16,40a	26,60**	8,50a
	10^8 cel/mL	38,6**	15,75a	6,66**	6,00a
	10^{10} cel/mL	20,0**	15,66a	0*	-

^aLectura a los 45 días de almacenamiento a $-1^{\circ}/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR. ^bLectura a los 75 días de almacenamiento. ^c Los asteriscos (*) indican diferencias significativas para cada levadura, respecto al control con patógeno. ^d Los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

2.2 Efecto de la combinación de levaduras antagonistas

Se realizaron ensayos *in situ* con mezclas de las dos levaduras y a distintas concentraciones en condiciones de almacenamiento comercial para evaluar el efecto

de la mezcla en la capacidad biocontroladora sobre los patógenos. Para determinar el tipo de relación que se establece entre las dos levaduras los resultados se compararon con efecto esperado (Ee) empleando la fórmula de Limpel's.

El Ee de las distintas combinaciones se incrementó con la concentración de células utilizada, pero en la mayoría de los casos resultó ser mayor que el porcentaje experimental obtenido de la combinación de las levaduras (Tabla 2). Estos resultados sugieren que en general existiría un efecto antagónico entre las levaduras de acuerdo a la teoría de Limpel's. Los resultados indican que, independientemente de la combinación de levaduras utilizada, el mayor control se produjo sobre *P. expansum*, con valores entre 45% a 100%. Puntualmente frente a este patógeno, la combinación de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 en proporción 1:2, arrojó resultados superiores al esperado (100% de control respecto a 96,9% del Ee (Tabla 2). Adicionalmente, las combinaciones de las dos levaduras a una concentración final de 10^{10} cel/mL controlaron totalmente la enfermedad, independientemente de la combinación utilizada (1:1, 2:1 y 1:2). Sin embargo, a la misma concentración de células, el efecto fue igual cuando se utilizó la levadura *Cr. victoriae* NPCC 1263 sola (Tabla 2).

3.3 Efecto de la combinación de las levaduras con sustancias potenciadoras en el biocontrol

Las levaduras fueron evaluadas en condiciones de almacenamiento comercial en bioensayos *in situ* con sustancias reportadas como potenciadoras del biocontrol: CaCl_2 , glucosa y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. En reglas generales, las levaduras combinadas o no con los diferentes compuestos químicos, presentaron solamente acción biocontroladora frente a *P. expansum*, no logrando antagonizar a *B. cinerea* bajo ninguna condición.

En ausencia de levaduras el agregado de glucosa en la herida incrementó la incidencia de la enfermedad ocasionada por *P. expansum*, mientras que el agregado de $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ y CaCl_2 causa el efecto contrario (Figura 1).

La capacidad antagonista de *P. membranifaciens* NPCC 1250 frente a *P. expansum* se incrementó significativamente con la presencia de CaCl_2 , glucosa y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, reduciendo la incidencia de la enfermedad entre 60% (CaCl_2) y 80% (glucosa y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$).

Por su parte, la capacidad antagónica de *Cr. victoriae* NPCC 1263 fue potenciada con la adición de CaCl_2 ; mientras que la misma se reduce con el agregado de glucosa y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (Figura 1).

Tabla 2. Efecto antagónico de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 combinadas en distintas proporciones y concentraciones frente a los dos patógenos de postcosecha.

Concentración	Tratamiento	<i>B. cinerea</i> ^a			<i>P. expansum</i> ^b		
		%Control	Ee	Severidad (mm) ^c	%Control	Ee	Severidad (mm) ^c
10 ⁶ cel/mL	NPCC 1250	21,4	43,88	21,1b	46,7	85,8	9,0a
	NPCC 1263	28,6		16,4a	73,4		8,5a
	NPCC 1250 + NPCC 1263 1:1	0,0		18,5b	80,0		10,6ab
	NPCC 1250 + NPCC 1263 2:1	35,7		20,3b	60,0		8,6a
	NPCC 1250 + NPCC 1263 1:2	14,3		18,8b	66,7		12,2ab
10 ⁸ cel/mL	NPCC 1250	40,0	76,84	16,2a	53,4	96,9	11,8ab
	NPCC 1263	61,4		15,7a	93,3		6,0a
	NPCC 1250 + NPCC 1263 1:1	61,5		21,4b	93,4		4,0a
	NPCC 1250 + NPCC 1263 2:1	46,7		18,7b	80,0		9,0a
	NPCC 1250 + NPCC 1263 1:2	40,0		17,7b	100,0		-
10 ¹⁰ cel/mL	NPCC 1250	40,0	88,00	22,1b	53,4	100	9,6a
	NPCC 1263	80,0		15,7a	100,0		-
	NPCC 1250 + NPCC 1263 1:1	23,1		14,7a	100,0		-
	NPCC 1250 + NPCC 1263 2:1	20,0		16,7a	100,0		-
	NPCC 1250 + NPCC 1263 1:2	66,7		21,8b	100,0		-
CMI	Patógeno	-		23,4b	-		18,3b

^a Lectura a los 30 días de almacenamiento a -1^o/0^oC y 95% HR. ^b Lectura a los 75 días de almacenamiento a -1^o/0^oC y 95% HR.

%Control = 100% - %I. Ee: Efecto esperado, calculado de acuerdo a la formula detallada en métodos. CMI: Concentración mínima infectiva.

^c Los valores de la misma fila seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por la prueba de Tukey (p <0,05).

El efecto esperado (Ee) y el factor de sinergia (FS) de la combinación de las levaduras con las distintas sustancias se calcularon para definir el tipo de interacción (Tabla 3). La combinación de *P. membranifaciens* NPCC 1250 con glucosa y CaCl_2 , resultó ser de tipo sinérgica, mientras que la combinación de con $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ se clasifica como una adición (Tabla 3). Finalmente, la relación que se estableció en la combinación de *Cr. victoriae* NPCC 1263 con glucosa y $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ resultó antagónica (Tabla 3).

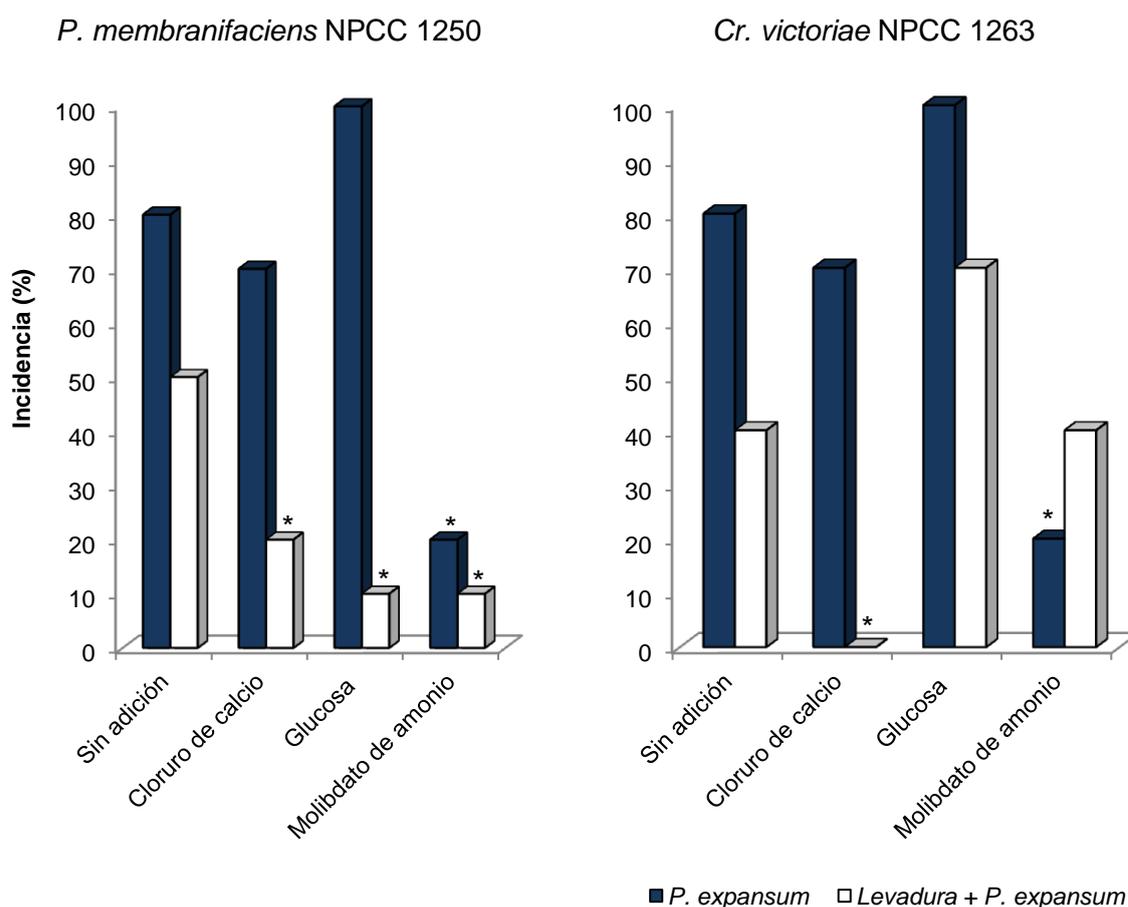


Figura 1. Incidencia de *P. expansum* en heridas de peras inoculadas con sustancias potenciadoras y co-inoculadas con las levaduras seleccionadas, a los 60 días de almacenamiento en condiciones comerciales (-1/0° C - 95%RH).

Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al control del patógeno sin adición de compuestos con los tratamientos de las levaduras adicionadas.

Tabla 3. Efecto antagónico, efecto esperado (Ee) y factor de sinergia (FS) de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 de las combinaciones con las distintas sustancias evaluadas frente a *P. expansum*.

Sustancia	Tratamiento	<i>P. expansum</i> ^a			Factor de sinergia (FS)
		%Control	Ee	Severidad (mm) ^b	
	<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	50		5,6a	-
	<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	60		7,0a	-
Cloruro calcio (CaCl ₂)	Sin Levadura	30		11,4a	-
	<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	80	65	4,0a	1,23
	<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	100	72	0,0a	1,39
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sin Levadura	0		20,5b	-
	<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	90	50	7,0ab	1,80
	<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	30	60	7,6a	0,50
Molibdato de amonio (NH ₄ Mo ₇ O ₂₄)	Sin Levadura	80		8,5a	-
	<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	90	90	4,0a	1,00
	<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	60	92	8,0a	0,65

^aLectura a los 75 días de almacenamiento a -19°C - 95% HR. % Control: 100%- %I. Ee: Efecto esperado, calculado de acuerdo a la fórmula detallada en métodos. ^bLos valores de la misma fila seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes por la prueba de Tukey (p <0,05).

Frente a *B. cinerea* con todas las sustancias evaluadas la incidencia fue del 100%, por esta razón no se muestran figuras ni es considerada en las tablas presentadas de resultados.

DISCUSIÓN

Aun cuando las levaduras son organismos tradicionalmente utilizados en biotecnología por sus diferentes cualidades y por su inocuidad, algunas especies son capaces de

generar infecciones particularmente en personas inmunodeprimidas (Mc Cusker *et al.*, 1994; Hanzen, 1995; Murphy & Kavanagh, 1999). De las especies de levaduras reportadas como agentes causales de enfermedad en humanos se encuentran algunas especies del género *Candida*, siendo *Candida albicans* la más estudiada (Emmons *et al.*, 1963 Rinaldi, 1993). Otras especies como *Cryptococcus neoformans* o incluso *Saccharomyces cerevisiae* (Okawa & Yamada, 2002; De Llanos *et al.*, 2006) y algunas especies del género *Rhodotorula* (Nunes *et al.*, 2013) también han sido asociadas a algunos tipos de infecciones en humanos.

El análisis de la posible capacidad patogénica de un microorganismo que será propuesto como ACB es fundamental, particularmente para casos en que estos se deban aplicar en alimentos. Las levaduras seleccionadas, *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, se aplicarían como células vivas sobre la fruta, las cuales tienen como destino final el consumo fresco para humanos. Las pruebas llevadas a cabo sobre el crecimiento a 37°C, la producción de enzimas fosfolipasas y la capacidad de crecimiento en las condiciones del jugo gástrico, resultaron negativas para las dos cepas de levaduras seleccionadas. Aunque los experimentos presentados corresponden a estudios preliminares de la posible patogenicidad en humanos, los resultados demuestran en gran medida la inocuidad de estas levaduras. No obstante, la estrategia de aislamiento y selección empleada en esta Tesis, aseguraría *per se* que las levaduras antagonistas serían inocuas, ya que como factor de selección se utilizó la temperatura de conservación (-1/0°C). Asimismo hasta el momento ninguna de las dos especies seleccionadas están reportadas como agentes causales de infecciones en seres humanos.

El control de las enfermedades de postcosecha basado en el uso de antagonistas microbianos es altamente dependiente de la concentración inicial de células aplicadas en el sitio de la herida y de la capacidad del antagonista para colonizarla rápidamente (Janisiewicz & Roitman, 1988; Wisniewski *et al.*, 1989; McLaughlin *et al.*, 1990). De acuerdo a los resultados expuestos en el Capítulo III, tanto *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, poseen la capacidad de colonizar eficazmente las heridas de pera. Estas levaduras no solo se encuentran presentes durante los 120 días de conservación, sino que también crecen en número alcanzando valores del orden de 10⁶ UFC/mL. La rápida colonización de las heridas de la fruta por los ACB es crítica para el control de las podredumbres y las manipulaciones que conducen a la mejora de este proceso pueden hacer más eficaz el control biológico (Janisiewicz *et al.*, 1992; Mercier & Wilson, 1994). En este sentido, la aplicación inicial de un elevado número de células debería ser una estrategia exitosa para asegurar que la cepa inoculada actúe efectivamente en el sitio de la herida. De acuerdo a distintos reportes

bibliográficos, los antagonistas microbianos son eficaces cuando se aplican a una concentración de 10^7 - 10^9 UFC/mL y rara vez son necesarias concentraciones más elevadas (McLaughlin *et al.*, 1990; Droby *et al.*, 1997; El-Ghaouth *et al.*, 2004). Así, un atributo importante de un ACB exitoso es que sea eficaz a bajas concentraciones (Wisniewski & Wilson, 1992). En este trabajo, los porcentajes de incidencia de las dos enfermedades son afectados en distinta manera por la cantidad de células, siendo la acción antagónica de *Cr. victoriae* NPCC 1263 notoriamente incrementada con la inoculación de 10^8 y 10^{10} células/mL, ya que alcanza porcentajes de control entre 80% (frente a *B. cinerea*) y 100% (frente a *P. expansum*). En estudios realizados en uvas con *Candida oleophila* (Droby *et al.*, 2002), los autores muestran también un incremento del biocontrol frente a *P. digitatum* con 10^9 UFC/mL de antagonista respecto a 10^6 UFC/mL; indicando que la alta concentración de levaduras produce una inducción de la resistencia en la fruta. Por su parte, *P. membranifaciens* NPCC 1250 a concentraciones de 10^8 y 10^{10} células/mL reduce la incidencia en un 20% sobre el control de *B. cinerea* con respecto a 10^6 células/mL. El efecto de incrementar la cantidad del antagonista (*P. membranifaciens* NPCC 1250) para mejorar el control sobre *P. expansum* fue menor al 10% comparando la menor cantidad aplicada y la mayor. Algo similar muestra Viñas *et al.* (1998) con *Candida sake* CPA-1, ya que de tres concentraciones del ACB evaluadas, la concentración más baja controló efectivamente a *B. cinerea* ($7,5 \times 10^5$ UFC/mL) y una concentración intermedia alcanzó para controlar a *P. expansum* ($1,6 \times 10^6$ UFC/mL). La evaluación del número de células necesarias para el eficaz control de las enfermedades es un factor importante para el desarrollo a escala comercial de los antagonistas (Janisiewicz, 1997), y en este caso particular, los resultados indicarían que incrementar la concentración de *Cr. victoriae* NPCC 1263 sería una interesante estrategia de mejoramiento del biocontrol, sin embargo, para *P. membranifaciens* NPCC 1250 el incremento de la concentración no sería una estrategia adecuada. El comportamiento diferencial de las dos levaduras podría estar relacionado con los mecanismos utilizados por cada una para su acción antagónica.

Los niveles de control alcanzados a escala laboratorio con *Cr. victoriae* NPCC 1263, estarían indicando que la inoculación de las heridas de fruta con 10^8 células/mL logra un aceptable biocontrol, resultados que coinciden con los informados por otros autores (Droby *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Una estrategia adicional para mejorar el biocontrol es la adición de distintos compuestos químicos exógenos junto con los microorganismos. Estos compuestos podrían mejorar su actividad biocontroladora al activar las defensas de la fruta, o bien que su presencia influya perjudicando a los patógenos (Nunes *et al.*, 2001; Druvefors

et al., 2005; Bencheqroun *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010). Se ha demostrado ampliamente que el agregado de CaCl_2 puede mejorar la capacidad de biocontrol de diversas levaduras, tales como *Candida oleophila* (Wisniewski *et al.*, 1995; Droby *et al.*, 2003 Bastiaanse *et al.*, 2010), *C. sake* (Nunes *et al.*, 2001), *C. saitoana* (McLaughlin *et al.*, 1990; Wisniewski *et al.*, 1995); *Cr. laurentii* (Zhang *et al.*, 2005), *Pichia guilliermondii* (Droby *et al.*, 1993; Tian *et al.*, 2002; Gholamnejad *et al.*, 2009), *Pichia membranifaciens* (Tian *et al.*, 2002; Gholamnejad *et al.*, 2009), *Rhodotorula glutinis* (Wan & Tian, 2005) y *Rhodospiridium paludigenum* (Wang *et al.*, 2010). Los resultados de este trabajo indican que la combinación con CaCl_2 mejora significativamente el control de *P. expansum* por parte de las dos levaduras en heridas inoculadas de pera, produciéndose una interacción sinérgica entre ellos, con Factor de sinergia de 1,23 y 1,39, para *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 respectivamente. La adición de CaCl_2 sin agregado de ACB no tuvo efecto significativo en el control de *P. expansum*. Esto sugiere que podría existir una interacción del calcio con las levaduras en las heridas de la pera, más que una mejora de la resistencia del hospedante o una inhibición directa del patógeno. Droby *et al.* (1997), indica que con el agregado de 68-136 mM de CaCl_2 *P. guilliermondii* alcanza valores de reducción similares a los aquí presentados. Asimismo, Bastiaanse *et al.* (2010) y McLaughlin *et al.* (1990), reportan una situación similar con *C. oleophila* y *C. guilliermondii*, las cuales mejoran la capacidad antagonica por el agregado de CaCl_2 , indicando un efecto sinérgico de la combinación. Por su parte, Droby *et al.* (1997) indican que el efecto sinérgico de la combinación de antagonista y CaCl_2 , sería el resultado de complejas interacciones diferentes entre los iones de calcio y el hospedante, el patógeno y la levadura. De este modo, son necesarios más estudios para analizar lo que ocurre con la presencia del calcio en el crecimiento y supervivencia de las levaduras en las heridas para establecer la existencia de algún efecto a nivel fisiológico que se exprese en alguno de los tres componentes del patosistema en respuesta al desarrollo de la enfermedad (Droby *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2008; Bastianse *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos con el CaCl_2 , son muy interesantes no solo por el efecto que produce sobre el biocontrol de ambas levaduras, sino que también desde el punto de vista práctico, ya que puede ser una estrategia de fácil adopción. En las plantas de empaque regionales se suele utilizar en la postcosecha CaCl_2 para prevenir la enfermedad vulgarmente conocida como *Bitter pit*, y también como sal de flotación (agregada al hidroiinmensor) para el procesamiento de los frutos de pera (Dobra *et al.*, 2007). Asimismo, es utilizado como un fertilizante foliar en los cultivos de peras y manzanas, inocuo para el medio ambiente y de bajo costo (Sana *et al.*, 2000). De este

modo, constituye una medida de manejo acorde al MIP y la producción orgánica (Jijalki & Lepoivre, 2002; Droby, 2006).

Por otro lado, las dos levaduras respondieron de manera opuesta al agregado de glucosa como mejorador del biocontrol: *P. membranifaciens* NPCC 1250 incrementó el antagonismo frente a *P. expansum*., mientras que *Cr. victoriae* NPCC 1263 redujo su capacidad antagónica frente al mismo patógeno. La glucosa es un nutriente que puede ser metabolizado eficientemente tanto por levaduras como hongos filamentosos, sin embargo de acuerdo a las concentraciones empleadas puede resultar toxica, inhibiendo el desarrollo de los microorganismos. Este efecto inhibitorio no fue observado, dado que el patógeno produjo una incidencia de 100% con su agregado, en el tratamiento que no se inoculó con levadura. En cuanto a la combinación de *P. membranifaciens* NPCC 1250 con este azúcar se evidencia un efecto sinérgico, con un valor de FS=1,8. Esta levadura también presentó sinergia en la combinación con CaCl₂. Estos efectos sinérgicos podrían deberse a una mejora en la composición nutricional que favorecería la capacidad de colonización de la herida, reduciendo el nicho para el establecimiento del patógeno. En el mismo sentido, otras explicaciones posibles señalan que la composición nutricional influye en la síntesis de enzimas que degradan la pared celular de los hongos y en la producción de metabolitos antagónicos, que actuarían inhibiendo el desarrollo de los patógenos (Gueldner *et al.*, 1988; Wisniewski *et al.*, 1991). De acuerdo a los resultados de Druvefors *et al.* (2005) el biocontrol del patógeno *Penicillium roqueforti* con el ACB *Pichia anomala* mejora debido a la acción de los productos del metabolismo de la glucosa.

Por el contrario, con *Cr. victoriae* NPCC 1263 el agregado de glucosa no mejoró el biocontrol, y presentó un FS de 0,5, el cual indica que se estaría produciendo una competencia por el compuesto en la herida; este fenómeno ya había sido observado en los experimentos *in vitro* desarrollados en el Capítulo III. A diferencia de la situación anterior, esta levadura, estaría siendo afectada por el agregado de este azúcar, en lo que respecta a sus mecanismos antagónicos.

De lo expuesto resulta que solo *P. membranifaciens* NPCC 1250, mejora su actividad biocontroladora sobre *P. expansum* con el agregado de glucosa. Como estrategia de mejora del potencial de biocontrol, la aplicación de este compuesto resultaría improbable a escala comercial por los costos de la glucosa, con el riesgo de que si no es utilizada en las concentraciones adecuadas podría incrementar el desarrollo de las podredumbres y la proliferación de otros organismos no deseables, como algunas bacterias.

Otro de los compuestos evaluados para el mejoramiento del biocontrol fue el NH₄Mo₇O₂₄. Existen en bibliografía reportes de la mejora del biocontrol con esta sal

para distintos ACB (*Cr. laurentii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rh. glutinis*, *C. sake*, *P. agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*) y sobre distintos hospedantes (Nunes *et al.*, 2002a y b; Hamid *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2003; Wan & Tian, 2005; Liu *et al.*, 2010). Particularmente los frutos de las pomáceas (manzanas y peras) son pobres en compuestos nitrogenados (Nunes *et al.*, 2001) y aplicaciones exógenas de este tipo de sustancias combinadas con el ACB pueden resultar en la mejora del biocontrol (Janisiewicz, 1994; Nunes *et al.*, 2001). A diferencia de otros compuestos nitrogenados, el $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, se caracteriza por tener una actividad antifúngica *per se* (Nunes *et al.*, 2002a), aunque los resultados obtenidos *in vitro* en el Capítulo III no reflejan esta capacidad sobre ninguno de los dos patógenos estudiados. Sin embargo, el $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ *in situ* controló el 80% de la incidencia de *P. expansum per se*, en concordancia con los datos reportados por Nunes *et al.* (2002a y b) y Hamid *et al.* (2003), los cuales afirman que el $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ reduce las infecciones por hongos patógenos por la inhibición directa de la germinación de las esporas.

P. membranifaciens NPCC 1250 con el agregado de $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ mostró una mejora del 40% en su capacidad antagónica frente a *P. expansum*. Resultados similares en cuanto a la mejora del antagonismo de los ACB con la combinación de $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ fueron obtenidos con *C. sake* frente a *P. expansum* (Nunes *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2002a) en peras y manzanas, con *Rh. glutinis* frente a *P. expansum* y *Alternaria alternata* en pera (Wan & Tian, 2005), con *H. uvarum* en uva (Liu *et al.*, 2010) y con *P. membranifaciens* frente a *P. expansum* en durazno (Cao *et al.*, 2010). En los trabajos antes enumerados hay diferente evidencia experimental: para los ACB *C. sake* y *Rh. glutinis* la mejora de la eficacia de biocontrol con el agregado de $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, no está acompañado por un aumento de la población de las levaduras en las heridas (Nunes *et al.*, 2002a y b; Wan & Tian, 2005; Liu *et al.*, 2010); mientras que para Cao *et al.* (2010) el $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ mejora la colonización de *P. membranifaciens* en las heridas durazno. Por su parte, *P. membranifaciens* NPCC 1250 mostró con que el agregado de $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ produce un efecto aditivo, el cual podría ser un efecto antifúngico *per se*, como también a la mejora nutricional de la levadura, lo cual podría propiciar a ser más eficiente en los procesos de colonización y establecimiento en las heridas. El mecanismo exacto por el cual este compuesto mejora la actividad biocontroladora de los antagonistas no está muy clara; Nunes *et al.* (2002a) indican que a mejora se produce por un efecto sinérgico entre el ACB y el compuesto, mientras que Liu *et al.* (2010) reconocen el efecto antifúngico (por la inhibición de las esporas) y no descartan que se produzca un efecto indirecto de mejorar la resistencia del hospedante. Para *P. membranifaciens* NPCC 1250 el efecto mejorador del $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ podría ser una interesante alternativa de mejora. Al igual que el CaCl_2 , el $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, es una sal que

puede ser utilizada como fertilizante foliar y si bien, no es usualmente utilizada en la postcosecha, luego de algunos estudios de factibilidad técnica de las condiciones de las plantas de empaque, podría constituir una opción más.

La combinación de *Cr. victoriae* NPCC 1263 con $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, presentó un efecto antagónico (FS 0,65) frente a *P. expansum*, al igual que lo ocurrido con el agregado de glucosa. Esto pone en evidencia que el mecanismo de acción de esta levadura podría ser la competencia por nutrientes, entre ella y el patógeno, ya que la presencia del nutriente en exceso revierte la acción biontroladora del ACB. De acuerdo a estos resultados, este compuesto no mejoraría el biocontrol de la levadura.

En este Capítulo se confirmó a través del análisis de algunos de los factores de virulencia, que las dos levaduras seleccionadas son inocuas para los seres humanos, por lo cual su uso sobre la superficie de la fruta no constituiría un riesgo potencial para la salud. En lo que respecta al mejoramiento, la estrategia con mayor potencial para las dos levaduras fue el agregado de CaCl_2 , sin necesidad del incremento de células inoculadas, ya que a escala laboratorio *Cr. victoriae* NPCC 1263 con 10^8 y 10^{10} células/mL controló más del 90% la incidencia de *P. expansum*, mientras que la misma levadura en una concentración de 10^6 células/mL con 2% (p/v) de CaCl_2 controló totalmente la enfermedad. Por su parte, *P. membranifaciens* NPCC 1250 combinado con CaCl_2 , muestra el mismo efecto: con 10^8 y 10^{10} células/mL el porcentaje de control fue de 53,4% versus 80% con 2% (p/v) de CaCl_2 . La evidencia del mejoramiento del biocontrol con CaCl_2 en los experimentos a escala laboratorio y la posibilidad de ser una estrategia de sencilla adopción en el manejo postcosecha, son la razones por las cuales este compuesto fue seleccionado para los ensayos a escala semicomercial con los biocontroladores *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263.

CAPITULO V

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ENSAYOS A ESCALA
SEMICOMERCIAL DE LAS LEVADURAS ANTAGÓNICAS
SELECCIONADAS



INTRODUCCIÓN

Las levaduras antagonistas seleccionadas a escala de laboratorio, a través de bioensayos en heridas de peras, fueron *Pichia membranifaciens* NPCC 1250 y *Cryptococcus victoriae* NPCC 1263. Con el objetivo de evaluar su comportamiento general como ACB, son necesarios estudios de eficacia en condiciones semicomerciales, los cuales requieren de la producción suficiente de biomasa de levadura para ser aplicada sobre grandes volúmenes de fruta, dado que la incidencia natural de las enfermedades de postcosecha ronda entre 1-3%.

El proceso de producción de biomasa es una de las etapas más importantes en el desarrollo comercial de un ACB, ya que los factores involucrados en dicho proceso pueden condicionar la eficacia antagónica de los microorganismos. Como aspectos destacables en dicha etapa se pueden enumerar: la selección de la composición medio de cultivo, el sistema de producción (sólido o líquido) y la optimización de las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, aireación, agitación, inóculo inicial, etc.) (Papavizas *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1991; Kennedy & Krouse, 1999; Tari *et al.*, 2007; Bhima *et al.*, 2012).

El empleo de un medio de cultivo económico y la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento para cada microorganismo son necesarios para establecer la factibilidad comercial y obtención de biomasa de calidad del microorganismo (Patiño-Vera *et al.*, 2005; Teixidó & Torres, 2011). El medio de cultivo brinda los nutrientes necesarios para la producción de biomasa, ya que provee a las células los elementos necesarios para los procesos de biosíntesis, mantenimiento celular y reproducción (Stanbury *et al.*, 1995). Los medios de cultivo deben contener sustancias carbonadas (azúcares asimilables) y nitrogenadas (urea, amonio en sales, etc.), para que las levaduras puedan realizar sus funciones metabólicas y alcanzar altos niveles poblacionales. Son numerosos los sustratos que se han empleado y evaluado para la producción de biomasa de levaduras. Entre los más utilizados se encuentra un subproducto la industria azucarera: la melaza de caña, por su composición rica y casi completa de nutrientes, es ideal para ser utilizada para el crecimiento de las levaduras (Arevalo, 1998; Abadias *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2007; Peighami-Ashnaei *et al.*, 2009; Manso *et al.*, 2010).

La producción de biomasa a escala semicomercial de levaduras no-*Saccharomyces*, esta poco descrita y requiere de la caracterización fisiológica y nutricional particular de cada especie para establecer las condiciones más óptimas en las cuales deban producirse, a diferencia de lo que ocurre con la especie de *Saccharomyces cerevisiae* (Schnierda *et al.*, 2014). En este contexto, para la producción de biomasa de *P. membranifaciens* son escasos reportes bibliográficos sobre la temática, siendo una de las más concretas, la publicada por Wan & Tian (2004), donde se optimizan las condiciones de cultivo en función de los azúcares y fuentes nitrogenadas sintéticas, sin considerar fuentes comerciales, de bajo costo que podrían hacer factible el proceso a nivel industrial. En el caso de *Cr. victoriae*, por tratarse de una especie descrita recientemente como ACB, aun no existen reportes sobre la producción de biomasa de esta levadura.

Los medios de cultivo líquidos son los más adecuados para la producción de biomasa microbiana. En estos sistemas de producción es muy importante la composición del medio de cultivo, como también la cantidad de oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y el tamaño del inóculo, ya que pueden afectar a la calidad y la cantidad de biomasa producida. Todas estas variables deben ser exhaustivamente estudiadas a escala de laboratorio para generar la información necesaria para el escalado a mayores volúmenes (Churchill, 1982; Kennedy & Krouse, 1999; Lih *et al.*, 2002). En el caso particular de la producción de un microorganismo que será utilizado como ACB es importante también asegurar que las células desarrolladas conserven la viabilidad y la capacidad de colonización sobre la superficie de la fruta, en definitiva que continúen siendo buenas antagonistas (Droby, 2006).

En la mayoría de los casos, los ensayos a escala semicomercial constituyen una de las últimas fases del proceso del desarrollo del producto, ya que permite evaluar a los antagonistas utilizando los métodos de producción y de aplicación que se emplearían en los tratamientos postcosecha (Janisiewicz & Korsten, 2002). Los resultados obtenidos a escala semicomercial sobre la eficacia de un ACB están condicionados por varios factores (Barkai-Golan, 2001; Droby, 2006). Entre los principales se pueden enumerar:

- Proceso de producción y formulación. Los procesos que implican la producción masiva y el acondicionamiento de los microorganismos pueden cambiar la capacidad biocontroladora de los ACB (Connick *et al.*, 1996; Mari *et al.*, 2003).
- Método de aplicación. Estos pueden ser: por inmersión (tanque hidromersor), por lluvia (*drencher*) y/o rociado o pulverizado (aspersores). Los últimos son los utilizados habitualmente, que pulverizan directamente a los ACB sobre

la fruta a través de boquillas o toberas del tipo cono, por impulso hidráulico o presión de aire.

- Dosis de aplicación. En general se recomienda utilizar las dosis más bajas posibles y que el ACB se multiplique sobre la superficie de la fruta (Viñas *et al.*, 1998; Usall *et al.*, 2001; Bonaterra *et al.*, 2012). Los valores medios de levaduras aplicados rondan entre las 10^7 - 10^8 UFC/mL (Janisiewicz & Peterson, 2005; Janisiewicz *et al.*, 2008; Saravanakumar *et al.*, 2008; Manso & Nunes, 2011).

- Presión de inóculo del patógeno. En muchos sistemas de CB en postcosecha el factor que determina la eficacia del ACB es el estado higiénico del empaque y la cámara de almacenamiento. Las principales fuentes de inóculo del patógeno son los sistemas de agua, rodillos de cintas, cepillos, etc. Algunos autores han reportado la reducción de la eficacia del biocontrol cuando se incrementan la concentración de esporas de los patógenos (Janisiewicz & Roitman, 1988; Chalutz & Wilson, 1990; McLaughlin *et al.*, 1990; Roberts, 1994;).

- Estado fisiológico de la fruta. La madurez del fruto al momento de aplicación del antagonista afecta la eficacia de los antagonistas. La fruta demasiado madura es mucho más susceptible al ataque de patógenos que fruta cosechada en la madurez óptima (Boonyakiat *et al.*, 1987). Droby (2006), en un estudio sobre cítricos, asegura que se puede mejorar la eficacia del CB cuando los ACB se aplican dentro primeras 24 h posteriores a la cosecha.

- Mejoramiento del biocontrol con aditivos. Son varios los aditivos disponibles para mejorar la acción biocontroladora. Entre los más difundidos se encuentran: la adición de sales como el CaCl_2 o el bicarbonato de sodio; la adición de sustancias orgánicas como el quitosano o el ácido salicílico; o bien, bajos niveles de fungicidas compatibles con el biocontrolador. En este sentido, los resultados del Capítulo IV de esta Tesis evidenciaron que el CaCl_2 es un eficaz mejorador de biocontrol, por lo cual será la estrategia de mejoramiento utilizado en este Capítulo para los ensayos a escala semicomercial.

El objetivo del presente Capítulo fue evaluar el potencial biocontrolador de las dos levaduras seleccionadas en condiciones semicomerciales, para lo cual fue necesario establecer en una primera instancia los parámetros de crecimiento más adecuados de ambas levaduras para obtener la biomasa necesaria.

MATERIALES

1. Material vegetal

1.1 Fruta

Para la evaluación de la efectividad de los ACB en heridas a nivel de laboratorio se utilizaron peras orgánicas del cultivar Packham's Triumph cosechados con madurez fisiológica y conservadas dos meses en cámara frigorífica (-1/0°C y 95% HR). Los índices de madurez de la fruta al ingreso del almacenamiento fueron: 11 lb de firmeza media de la pulpa y 12°Brix de sólidos solubles.

Para los ensayos a escala semicomercial se emplearon peras de los cultivares Beurrè D'Anjou y Packham's Triumph, provenientes de dos montes comerciales de producción orgánica localizados en proximidades a la Ciudad de San Patricio del Chañar (Empaque A) y Centenario (Empaque B), con los parámetros de madurez indicados en la Tabla 1. La fruta del empaque A fue utilizada inmediatamente luego de ser cosechada (28 de febrero); mientras que la del Empaque B fue almacenada en cámara frigorífica durante al menos un mes hasta el momento de la aplicación de los agentes antagonistas (Beurrè D'Anjou 17 de marzo y Packham's Triumph 22 de marzo).

Tabla 1. Parámetros de madurez al momento de aplicación de los antagonistas.

Parámetros	Empaque A	Empaque B	
	Packham's Triumph	Packham's Triumph	Beurrè D'Anjou
Firmeza media de la pulpa (lb)	11,4	11,8	12,0
Contenido Sólidos Solubles (°Brix)	11,6	12,0	13,8

1.2 Melaza

Para la producción de biomasa de levaduras se utilizó melaza de caña de azúcar, procedente de un ingenio azucarero tucumano, de la zafra 2011-2012. El contenido de azúcares totales de la melaza utilizada fue de 78°Brix, con un contenido de sacarosa de 68,23% (p/p), 6,23% (p/p) de fructosa y 3,54% (p/p) de glucosa, con pH neutro.

2. Microorganismos

2.1 Patógenos. *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049 seleccionados en esta Tesis (Capítulo I).

2.2 Levaduras antagonicas. *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, seleccionados por su comportamiento antagonico *in situ* frente a *P. expansum* y *B. cinerea* en esta Tesis (Capítulos II y III).

3. Medios de crecimiento de hongos filamentosos y levaduras. Los medios de cultivo utilizados fueron: APD y GPY-Agar, los cuales fueron descritos en los Materiales del Capítulo II, inciso 3.

4. Líneas de procesamiento y cámaras de almacenamiento comercial de frutos

Los ensayos a escala semicomercial fueron realizados en dos empaques regionales. Se utilizaron las líneas de procesamiento comercial para la aplicación de las levaduras antagonistas y las cámaras frigoríficas para la conservación de los frutos hasta el momento de evaluación de incidencia (I%).

La estructura general de las dos líneas de empaques fue similar, excepto el sistema de aplicación; en el empaque A presentaba dos picos pulverizadores con desplazamiento longitudinal (Figura 1A) y en el empaque B una cañería doble con ocho picos pulverizadores (Figura 1B).



Figura 1. Sistemas de aplicación utilizados en los empaques. A) Toberas de aplicación corredizas, adaptación del sistema aplicador de cera, empaque A. B) Conductos tradicionales de aplicación con toberas pulverizadoras, empaque B.

5. Sustancias adicionales

- **Cloranfenicol.** Farmacéuticos Unidos.
 - **Urea.** Sigma
 - **Cloruro de calcio.** Formulación comercial granulada, utilizada como fertilizante.
-

M E T O D O S

1. Medios de crecimiento para las levaduras antagonistas

Se utilizó melaza de caña de azúcar suplementada con urea como fuente nitrogenada. Se evaluaron tres concentraciones de melaza y tres concentraciones de urea. La melaza fue diluida con agua destilada (AD) y los medios se esterilizaron en autoclave a 120°C y 2 atmósferas por 20 minutos. En todos los casos el pH fue de 6,5-7.

2. Determinación de condiciones de crecimiento a escala de laboratorio

2.1 Determinación de la concentración óptima de melaza y temperatura de producción

Las levaduras antagonistas se cultivaron en frascos Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo. El medio fue preparado con 25,6 g/L, 128,2 g/L y 312,0 g/L de melaza de caña de azúcar y 1,2 g/L de urea, tomando rangos similares a los reportados por Arevalo (1998). Los ensayos se realizaron a 20°C y 28°C con agitación orbital (150 rpm). Para todas las condiciones evaluadas los cultivos se iniciaron con una concentración de 10^5 células/mL a partir de cultivos frescos provenientes de GPY-agar. El crecimiento fue seguido por densidad óptica a 640 nm (DO_{640nm}). Una vez alcanzada la fase estacionaria, los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min y las células obtenidas se lavaron tres veces con ADE y se almacenaron en ADE a 4°C. Se determinaron las UFC de levaduras por siembra de diluciones seriadas en placas de GPY-agar e incubación a 26°C.

2.2 Determinación de la concentración óptima de urea

Las levaduras se cultivaron en frascos Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo conteniendo 128,2 g/L de melaza, variando las concentraciones de urea: 0,6 g/L; 1,2 g/L y 2,4 g/L. Los cultivos se inocularon con 10^5 células/mL de levaduras frescas. El crecimiento, la recolección de las células, la conservación y cuantificación de UFC, fue realizada siguiendo la misma metodología descrita en el inciso anterior.

2.3 Determinación de la actividad acuosa (a_w) del medio de cultivo

La actividad acuosa (a_w) del medio de cultivo más óptimo para la producción de biomasa se determinó mediante el método oficial (AOAC, 1990). Las determinaciones de a_w se realizaron a 25°C, empleando un higrómetro de punto de rocío modelo Series 3 (Aqua-Lab, Decagon Devices Inc., Pullman, WA) con sensibilidad de $\pm 0,003$, el cual se calibró previamente con disoluciones saturadas de sales.

3. Efecto del medio de cultivo sobre la eficacia de las levaduras en el biocontrol

Se evaluó el efecto de las condiciones de producción sobre la capacidad antagónica de las levaduras en ensayos *in situ*. Para ello se comparó la eficacia de las levaduras crecidas en medio sólido y en medio líquido a base de melaza. Las levaduras crecidas en medio sólido (GPY-agar) a 26°C durante 48 h fueron resuspendidas en ADE y ajustadas a la concentración establecida. Las suspensiones de conidios de *P. expansum* NPCC 2023 y *B. cinerea* NPCC 2049 se ajustaron a las CMI correspondientes.

Para los bioensayos se emplearon frutos sanos del cultivar Packham's Triumph con un mes de almacenamiento frigorífico (-1/0°C y 95%HR), y se procedió siguiendo la metodología descrita en los Capítulos previos. Los frutos se desinfectaron superficialmente y heridos en la región ecuatorial. Las heridas se inocularon con 20 μ L de cada levadura (10^6 células/mL) producidas en el medio en base a melaza o en GPY-agar y luego de 2 h, se inocularon con 10 μ L de la suspensión de cada patógeno a su CMI. Como control se utilizaron frutas inoculadas únicamente con los conidios de cada patógeno. Se utilizaron cinco frutos por tratamiento y cada tratamiento se repitió tres veces. Luego de la inoculación y secado de las heridas, los frutos se colocaron en bandejas, dentro de bolsas de plástico y éstas en cajas de cartón, de acuerdo a la metodología de rutina del empaque.

Las cajas se conservaron durante 60 días en condiciones de almacenamiento frigorífico convencional (-1/0°C y 95% HR). La fruta tratada se dispuso en diseño completamente aleatorio. Los frutos se examinaron periódicamente evaluando la incidencia (%I) y la severidad cada enfermedad.

4. Viabilidad de las levaduras durante el almacenaje

Las células producidas se almacenaron en ADE ó en una solución isotónica de glicerol al 20% (v/v) a 4°C. A distintos tiempos se evaluó el número de células viables para cada una de las levaduras y solución de conservación, mediante siembra de diluciones seriadas en GPY-agar e incubación a 26°C. La evaluación se llevo a cabo por triplicado. La viabilidad de las levaduras en las distintas condiciones se expresó como Log_{10} de las UFC/mL, en función del tiempo de almacenamiento.

5. Producción de biomasa

Los cultivos frescos de cada levadura se cultivaron en frascos Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio en agitación (150 rpm) a 20°C. El crecimiento de los cultivos se evaluó a través de DO_{640} . Al alcanzar la fase exponencial, los cultivos se transfirieron a frascos Erlenmeyers de 2 L con 900 mL del mismo medio, e incubados a 20°C con agitación (150 rpm).

Finalmente, dos litros de los cultivos de levaduras en fase exponencial fueron transferidos a reactor de acero inoxidable de 22 L (Anexo V) con 18 L de medio de cultivo estéril (Figura 3). La temperatura de cultivo fue de 20°C y la agitación se logró a través de un sistema de agitación por paletas: para *P. membranifaciens* de 100 rpm, mientras que para *Cr. victoriae* de 130 rpm. En ambos casos se utilizó un sistema de aireación. El crecimiento de las levaduras se evaluó mediante medición de la DO_{640} .

5.1 Modelado del crecimiento microbiano

Los parámetros de crecimiento (rango de crecimiento específico medio y duración de la fase *lag*) fueron calculados para cada levadura de acuerdo a la DO medida y reparametrizada según el modelo de Gompertz, propuesto por Zwietering *et al.* (1990). La expresión de cálculo empleada es la descrita en el Capítulo III, inciso 5.2 para el modelado del crecimiento microbiano.

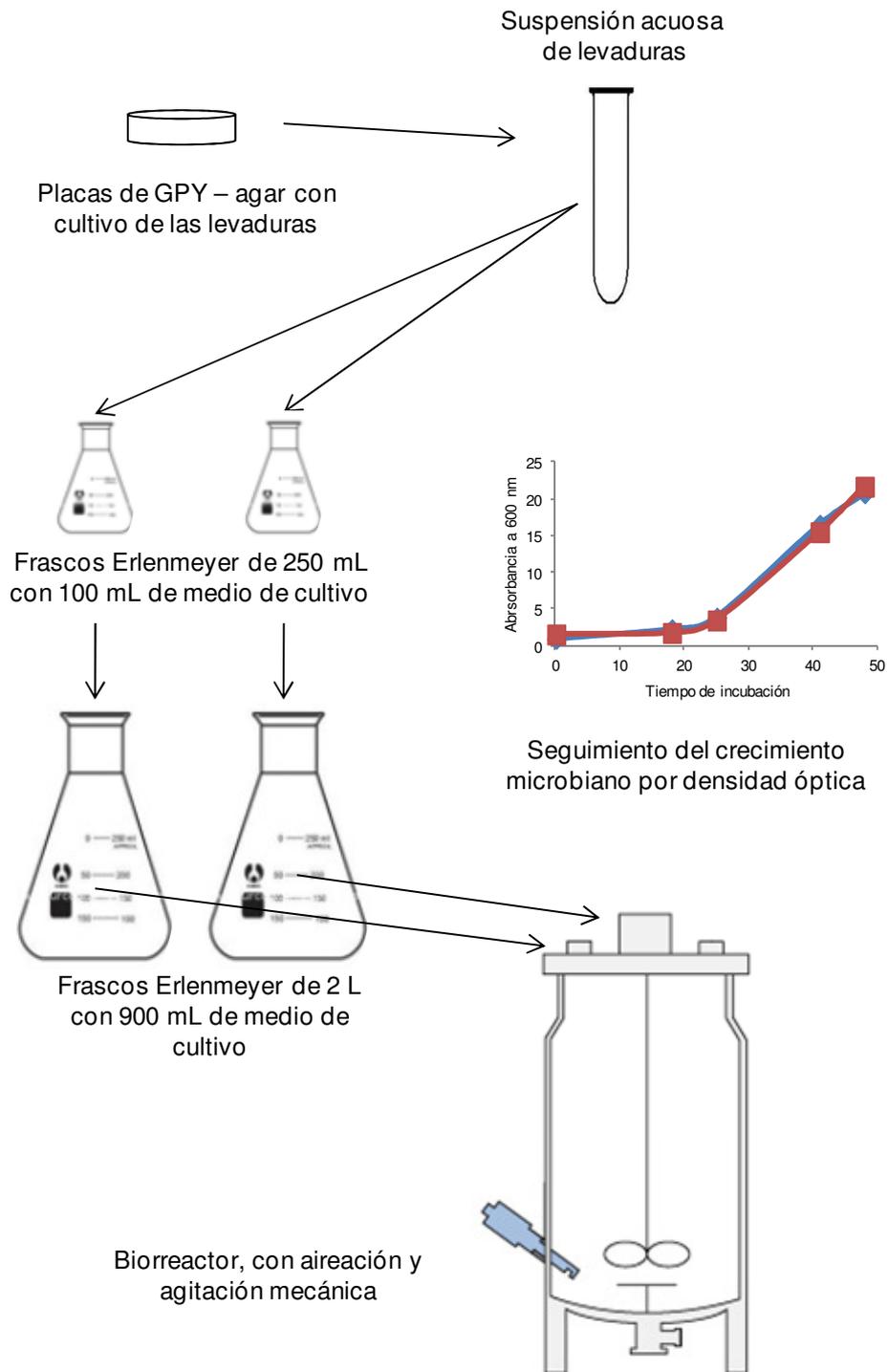


Figura 3. Esquema de escalado para producción de biomasa.

5.2 Obtención de biomasa de levaduras a escala reactor

Una vez alcanzada la fase estacionaria del crecimiento de las levaduras, se detuvo el crecimiento de los cultivos en el reactor suprimiendo la aireación y agitación, manteniendo el mismo a 4°C durante 12 h con el objetivo de lograr la precipitación de las células. Luego de este período se descartó el sobrenadante y un volumen de

aproximadamente 4 L, conteniendo las células precipitadas, se centrifugó (4000 rpm por 10 min a 4°C) para obtener la biomasa. Las levaduras se lavaron ocho veces con ADE para eliminar restos de medio de cultivo y se almacenaron a 4°C en ADE hasta su empleo en los ensayos en línea de empaque. Se realizó el recuento de UFC/mL de la biomasa obtenida en GPY-agar.

6. Ensayos a escala semicomercial

La evaluación a escala semicomercial de los ACB seleccionados se llevo a cabo en dos empaques regionales, incluyendo línea de procesamiento y cámaras de almacenamiento frigorífico.

6.1 Aplicación de antagonistas

En ambos empaques la fruta ingresó a la línea de procesamiento en cajones (bins) de 400 Kg. Los cajones se sumergieron en el hidroiinmersor que contenía una solución de hipoclorito del sodio (100 ppm) siguiendo la metodología habitual de los empaques (Figura 4). Luego del hidroiinmersor la fruta se lavó con una cortina de agua, y las levaduras se pulverizaron en el sector de aplicación de productos inmediatamente después del lavado. La suspensión de cada levadura se preparó con agua de red. Se utilizaron 25 L de preparación de levaduras conteniendo 10^{11} UFC/mL (Figura 5). Posteriormente al tratamiento con levaduras, la fruta se secó en el túnel de secado, constituido por un sistema de ventiladores, hasta llegar al sector de clasificación manual de la fruta. La fruta tratada y clasificada continuó la rutina clásica de una planta de empaque hasta el embalado y posterior almacenamiento.

Las levaduras *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 se aplicaron solas y con el agregado de 2% (p/v) de CaCl_2 , de acuerdo a los resultados obtenidos en el Capítulo IV. Se llevaron a cabo seis tratamientos, en cada uno se pulverizaron 400 Kg de fruta con 25 L del tratamiento correspondiente:

1. Tratamiento 1. Control. Agua
2. Tratamiento 2: *P. membranifaciens* NPCC 1250
3. Tratamiento 3. *P. membranifaciens* NPCC 1250 + CaCl_2 2% (p/v)
4. Tratamiento 4: *Cr. victoriae* NPCC 1263
5. Tratamiento 5: *Cr. victoriae* NPCC 1263 + CaCl_2 2 % (p/v)
6. Tratamiento 6. CaCl_2 2% (p/v)

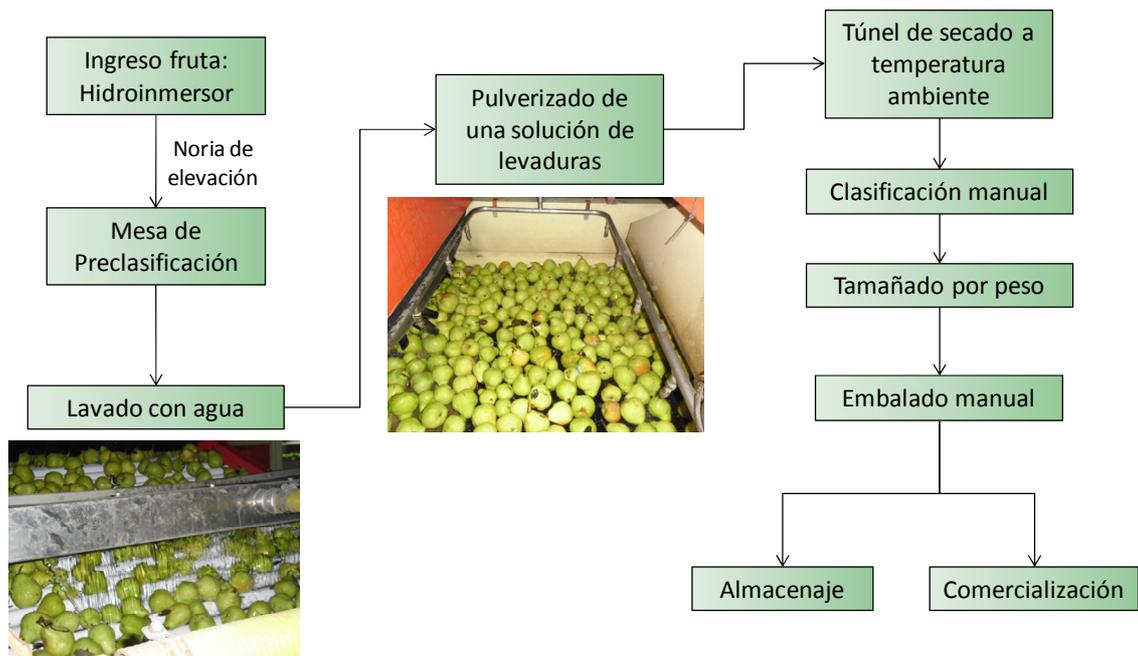


Figura 4. Etapas del procesamiento de la fruta tratada con las levaduras seleccionadas.

La fruta se almacenó en cajas de cartón (entre 16 y 20 cajas tamaño 100), siguiendo las prácticas tradicionales del manejo postcosecha y se conservó en atmósfera convencional a $-1/0^{\circ}\text{C}$ - 95% HR (Tabla 2).



Figura 5. Detalle de tanque de aplicación, sistema impulsor y conexión al sistema de pulverización.

Las cajas obtenidas de los seis tratamientos, se almacenaron en partes iguales en dos *pallets*, para realizar las evaluaciones a los dos tiempos propuestos de conservación. Luego de los períodos de incubación correspondientes (Tabla 2), se evaluó el porcentaje de incidencia (I%) natural de *P. expansum* y *B. cinerea*.

Tabla 2. Número de cajas obtenidas para cada variedad y período de conservación para cada cultivar de pera.

Línea de empaque	Cultivar de Pera	Nº cajas	Conservación (días)
A	Packham's Triumph	20	60 - 150
	Beurré D'Anjou	20	45 - 90
B	Packham's Triumph	16	90 - 150

6.2 Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las levaduras

Se tomaron muestras de las suspensiones de levaduras pulverizadas por las toberas que se emplearon en la aplicación en línea, con el objetivo de establecer el efecto del sistema de aplicación sobre el número de células aplicadas para cada tratamiento. Se determinaron las UFC/mL de cada tratamiento en GPY-agar y cloranfenicol (100 mg/L) luego de 15 días de incubación a 4°C. La determinación se realizó por triplicado.

6.3 Eficacia de aplicación de las levaduras sobre la superficie la fruta y capacidad de colonización

Se realizó un recuento de UFC a partir de la superficie de los frutos (diez frutos por cada tratamiento) antes del embalaje y luego del período de conservación correspondiente en frío. Para ello, se colocó cada fruto en una bolsa con 100 mL de ADE, se sometieron a agitación y fricción manual de superficie por 2 min. Se realizaron diluciones seriadas de las aguas de lavado (AL) y se realizó la siembra de alícuotas en GPY-agar con cloranfenicol (100 mg/L). Las placas se incubaron a 4°C durante 15 días. Se determinó el número de UFC, y los resultados se expresaron como log UFC/cm² de fruto.

6.4 Análisis estadístico

La incidencia de cada enfermedad (moho azul y moho gris) en los ensayos de biocontrol se analizó utilizando un modelo lineal no generalizado, de distribución

binomial (GLM) del Sistema de Análisis Estadístico (INFOSTAT, versión 9.1. 2004). La sobrevivencia y establecimiento de las levaduras sobre la superficie de la fruta, se expresaron como log UFC/cm² de fruto, donde para cada tiempo se realizó el Test de Tukey ($p > 0,05$) para establecer las diferencias significativas.

RESULTADOS

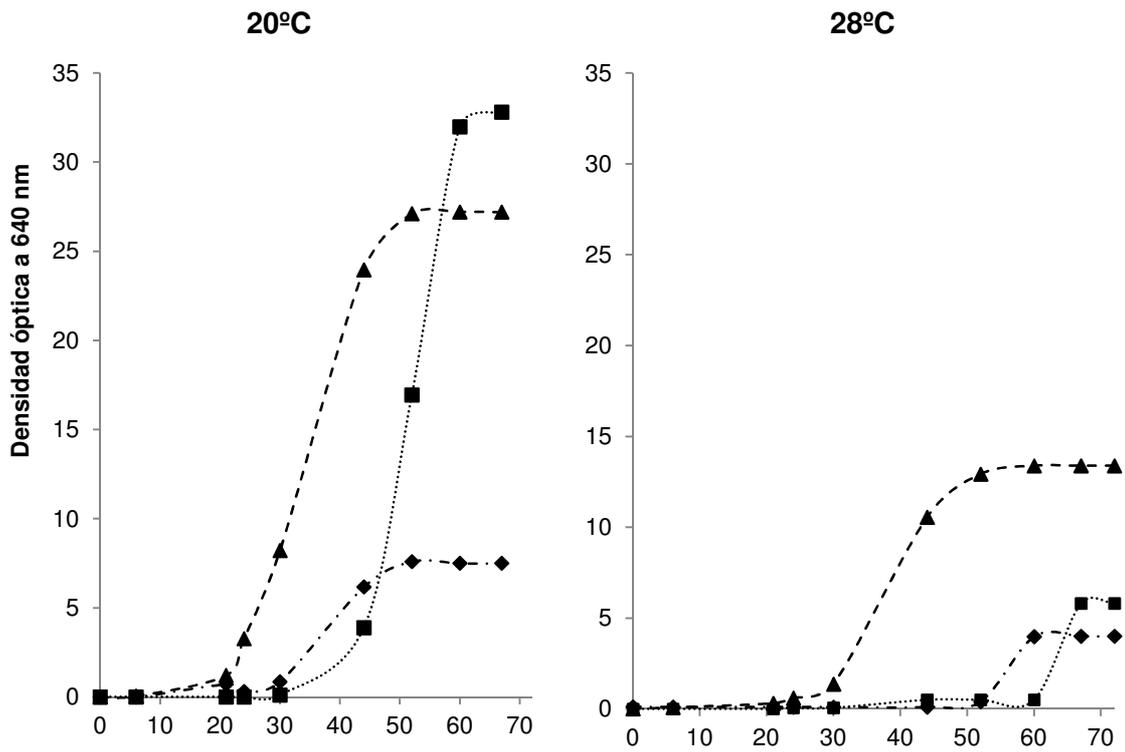
1. Condiciones de cultivo a escala de laboratorio

1.1 Determinación de la concentración de melaza y temperatura óptima de producción de las levaduras

Se evaluó el crecimiento de las dos levaduras seleccionadas (*P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263) en medios de cultivo conteniendo distintas concentraciones de melaza utilizando diferentes temperaturas de incubación (Figura 6). Los dos factores afectaron significativamente el crecimiento de ambas levaduras. En reglas generales, los valores máximos de biomasa se obtuvieron a 20°C independientemente de la concentración de melaza y la especie de levadura utilizada (Figura 6A y B), aunque para *Cr. victoriae* NPCC 1263 el efecto fue más significativo, evidenciándose un 60% menos de crecimiento a 28°C que a 20°C (Figura 6B) (Tabla 3). El efecto de la concentración de este sustrato fue significativo en el crecimiento de las levaduras. Los valores máximos de biomasa alcanzados por ambas especies a 20°C se obtuvieron a la concentración intermedia de melaza (128,2 g/L) (Tabla 3).

Para *P. membranifaciens* NPCC 1250, el mayor crecimiento a 20°C y 128,2 g/L de melaza se logró a las 60 h de cultivo, aunque la duración de la fase *lag* en estas condiciones fue 18 h mayor que la obtenida cuando el cultivo se realizó con 312 g/L de melaza a la misma temperatura. Así, aunque se obtuvo menos biomasa con 312 g/L de melaza, el cultivo pudo recolectarse en menos tiempo (45 h vs 60 h) (Figura 6A). Cuando esta misma levadura se cultivó a 28°C, el máximo crecimiento y el mínimo tiempo de recolección se lograron con la concentración más alta de melaza (Figura 6A).

P. membranifaciens NPCC 1250 (A)



Cr. victoriae NPCC 1263 (B)

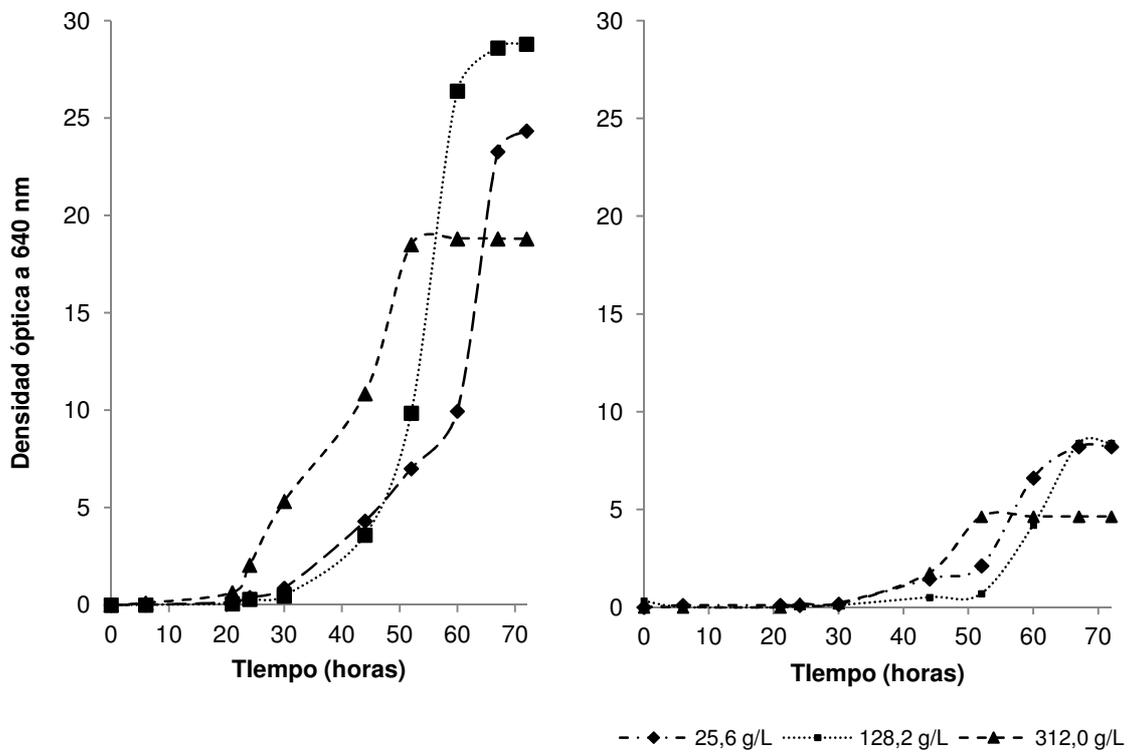


Figura 6. Crecimiento de las levaduras seleccionadas con distintas concentraciones de melaza (1,2 g/L de urea) a distintas temperaturas.

La levadura *Cr. victoriae* NPCC 1263 (Figura 6B), al igual que *P. membranifaciens* NPCC 1250 presentó el mayor crecimiento con 128,2 g/L de melaza a 20°C (Tabla 3). La duración de la fase *lag* de los cultivos con 128,2 g/L y 25,6 g/L a 20°C fue de 30 h (Figura 6B), con tasas de crecimiento semejantes. En los cultivos crecidos a 28°C la duración de la fase *lag*, en las tres condiciones evaluadas, fue mayor a 40 h (Figura 6B), sin presentar diferencias significativas en el crecimiento máximo obtenido. Para una misma concentración de melaza (128,2 g/L y 312 g/L), la levadura *P. membranifaciens* NPCC 1250 produce entre 2 y 5 órdenes de magnitud más de biomasa a 20°C que a 28°C (Tabla 3). Por su parte, *Cr. victoriae* NPCC 1263 a 20°C, sigue el mismo comportamiento, produciendo entre 3 y 5 órdenes de magnitud más de células que a 28°C, para cada concentración de melaza evaluada (Tabla 3).

Tabla 3. Biomasa obtenida en los ensayos a pequeña escala de las dos levaduras seleccionadas en diferentes condiciones de cultivo.

Levadura	Melaza (g/L)	UFC finales	
		20°C	28°C
<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	25,6	5,4x10 ⁵	3,6x10 ⁵
	128,2	3,3x10 ¹⁰	7,0x10 ⁵
	312,0	3,3x10 ⁸	5,6x10 ⁶
<i>Cr. victoriae</i> NPCC1263	25,6	2,2x10 ⁸	4,0x10 ⁵
	128,2	6,0x10 ¹⁰	4,8x10 ⁵
	312,0	2,0x10 ⁷	3,0x10 ⁴

1. 2 Determinación de la concentración óptima de urea

Para determinar la concentración óptima de urea se mantuvieron constantes los otros factores: 128,2 g/L de melaza, 150 rpm y 20°C durante el crecimiento. Las dos levaduras en las concentraciones evaluadas presentaron los rendimientos más altos con la concentración más baja de urea (0,6 g/L) (Figura 7).

El desarrollo de *P. membranifaciens* NPCC 1250 fue similar con 0,6 g/L y 1,2 g/L de urea, evidenciado una fase *lag* de aproximadamente 25 h y alcanzando la fase estacionaria a las 80 h estimativamente. No obstante, el rendimiento de biomasa fue de aproximadamente 1,5 órdenes de magnitud mayor con 0,6 g/L que con 1,2 g/L (Tabla 4). La fase *lag* fue más prolongada (50 h) se observó cuando se empleó 2,4 g/L de urea, llegando a fase estacionaria con un rendimiento de 3x10⁷ UFC/mL.

El crecimiento máximo de *Cr. victoriae* NPCC 1263 también se obtuvo con 0,6 g/L de urea, con una fase *lag* de 20 h y alcanzando la fase estacionaria entre las 50 y 70 h. El rendimiento en biomasa en estas condiciones fue de $2,6 \times 10^{11}$ UFC/mL (Tabla 4).

El medio de cultivo en base a melaza de caña de azúcar (128,2 g/L) y urea (0,6 g/L) de acuerdo a los resultados obtenidos mostró una actividad acuosa (a_w) de 0,9873.

Tabla 4. Rendimientos de las levaduras (UFC/mL) utilizando distintas cantidades de urea en el medio de crecimiento a 20°C.

Concentración de Urea (g/L)	UFC/mL de Levaduras*	
	<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263
0,6	$8,0 \times 10^{11}$	$2,6 \times 10^{11}$
1,2	$3,0 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{10}$
2,4	$3,0 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$

* Producidas en frascos Erlenmeyers de 250 mL, con 100 mL de medio de cultivo y 128,2 g/L de melaza.

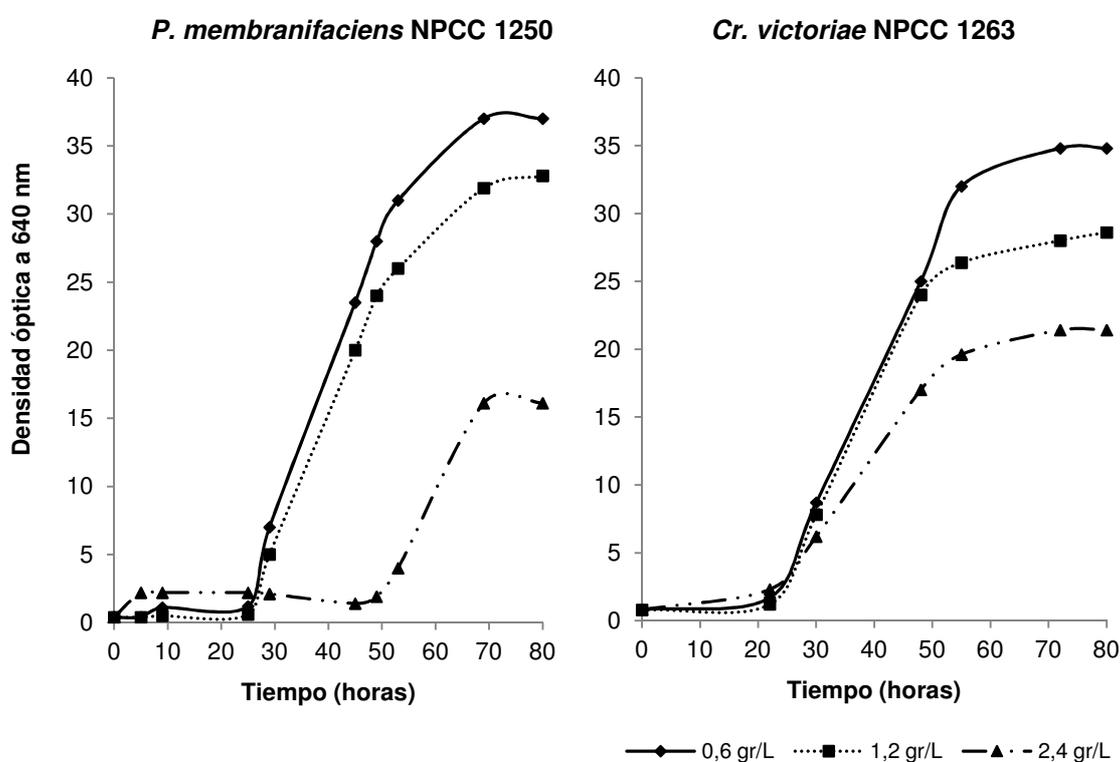


Figura 7. Crecimiento de las dos levaduras seleccionadas con distintas concentraciones de urea a escala de frasco Erlenmeyer a 20°C.

2. Efecto del medio de cultivo sobre la eficacia en el biocontrol de las levaduras

Determinadas las condiciones óptimas de producción para las dos antagonistas (128,2 g/L de melaza y 0,6 g/L de urea, a 150 rpm a 20°C), en la siguiente etapa se evaluó la capacidad biocontroladora de las levaduras producidas en el medio optimizado con melaza, con respecto a las producidas en GPY-agar. La evaluación se realizó en frutas enfrentando a las levaduras con los patógenos (Tabla 5).

No se observaron diferencias significativas en la incidencia y la severidad para las dos levaduras y los dos medios de producción evaluados (Tabla 5). Estos resultados indican que el medio de cultivo basado en la melaza de caña de azúcar y urea, no tiene efectos sobre la capacidad biocontroladora de los antagonistas seleccionados.

Tabla 5. Efectividad de las levaduras antagónicas producidas en diferentes medios sobre *P. expansum* y *B. cinerea*

Tratamiento	Medio de crecimiento	<i>P. expansum</i>		<i>B. cinerea</i>	
		Incidencia (%) ¹	Severidad (mm) ²	Incidencia (%) ¹	Severidad (mm) ²
Sin levadura (Control)		100	7,73c	100	13,8a
<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	GPY	20*	5,07ab	60*	10,6a
	Melaza	20*	6,14bc	60*	12,3a
<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	GPY	30*	4,25a	50*	12,5a
	Melaza	25*	5,75ab	50*	12,1a

¹ Los asteriscos (*) indican diferencias significativas de acuerdo a Pruebas de Contraste, con respecto al tratamiento control. ² Diferentes letras luego de los valores de severidad indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey (p>0,05).

3. Viabilidad de los ACB durante el almacenamiento

La biomasa obtenida de cada levadura en la condición óptima de cultivo se conservó en ADE, o en una solución de glicerol al 20% (v/v), a 4°C. Con el objetivo de evaluar la viabilidad en estas condiciones de almacenamiento se tomaron muestras periódicamente durante 45 días.

Para *P. membranifaciens* NPCC 1250 el número de las células viables se mantuvo en el mismo orden de magnitud durante todo el período de conservación a 4°C en ADE, mientras que en glicerol se redujo 6 órdenes de magnitud durante los primeros 30 días (de 8x10¹¹ UFC/mL a 5x10⁵ UFC/mL) (Figura 8). La viabilidad de *Cr. victoriae* NPCC

1263 cayó en un orden de magnitud con respecto al inicial ($2,6 \times 10^{11}$ UFC/mL) a partir de los 30 y 45 días de almacenamiento en agua ($3-2 \times 10^{10}$ UFC/mL); mientras que en la solución isotónica de glicerol, la viabilidad a los 45 días de conservación se redujo (5×10^7 UFC/mL) en 4 órdenes de magnitud (Figura 8).

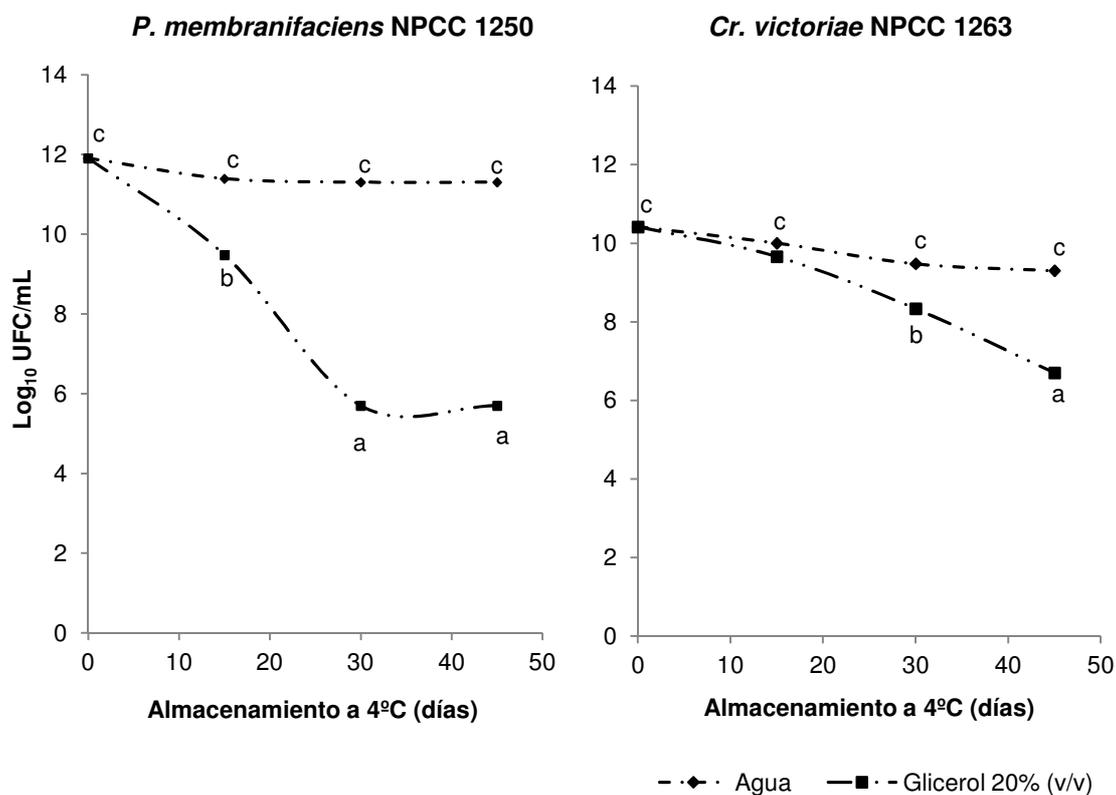


Figura 8. Células viables de las dos levaduras seleccionadas, en agua o en la solución isotónica de glicerol al 20% (v/v), conservadas a 4°C. Los tratamientos con diferentes letras a lo largo del tiempo indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey ($p > 0,05$).

4. Producción de biomasa a escala reactor

El crecimiento de las dos levaduras antagonistas *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 a escala reactor de 20 L se realizó en las condiciones óptimas obtenidas a escala de frasco Erlenmeyer. Las curvas de crecimiento se modelaron utilizando el modelo de Gompertz modificado (Figura 9).

P. membranifaciens NPCC 1250 inició su desarrollo exponencial más rápido que *Cr. victoriae* NPCC 1263, con una fase lag de menos de 1,5 h, alcanzando fase estacionaria a las 40 h, con una producción total de $2,5 \times 10^{13}$ UFC/mL, con un máximo de crecimiento específico de la fase exponencial de $0,139 \text{ h}^{-1}$ (Figura 9). Por su parte, *Cr. victoriae* NPCC 1263, presentó una fase lag más prolongada (4 h), al igual que su

fase exponencial (20 h) con un crecimiento específico de $0,063 \text{ h}^{-1}$, logrando fase estacionaria a las 60 h de iniciado el cultivo y con un rendimiento final de $5,75 \times 10^{12}$ UFC/mL (Figura 9).

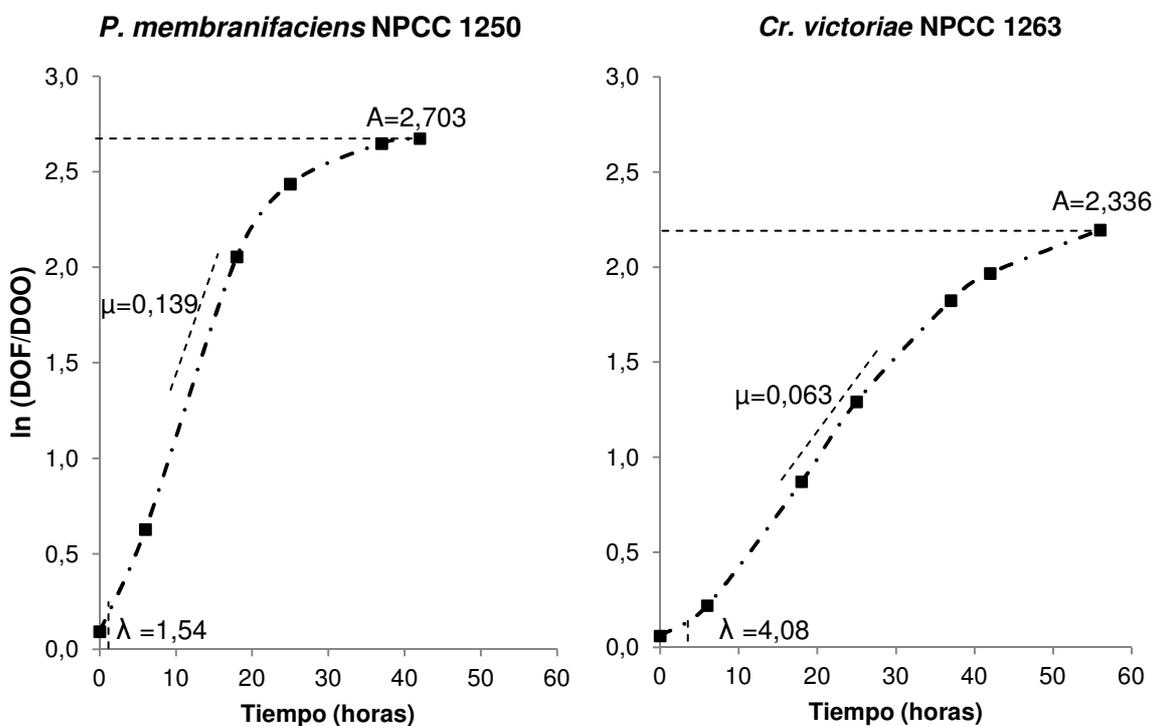


Figura 9. Curvas de crecimiento en reactor de 20 L de las dos levaduras seleccionadas a 20°C. Evolución predicha por el modelo de Gompertz modificado. A: crecimiento máximo ($\ln(DO_f/DO_i)$). μ : μ_{\max} (h^{-1}): velocidad máxima de crecimiento. λ : duración fase lag (hs).

5. Efectividad de las levaduras antagonistas en condiciones semicomerciales

La biomasa producida de las dos levaduras a escala reactor (20 L) se utilizó en los ensayos a escala semicomercial. Los ensayos se realizaron sobre dos variedades de pera (Beurré D'Anjou y Packham's Triumph), en dos empaques regionales (A y B) en las condiciones habituales de procesamiento y almacenamiento de la fruta.

Los tratamientos en las peras del cultivar Beurré D'Anjou se realizaron en el empaque B y evaluados a los 45 y 90 días de conservación, respondiendo al manejo del empaque de acuerdo al potencial de conservación del cultivar. Los tratamientos se llevaron a cabo cuando la fruta tenía un mes de almacenamiento en cámara frigorífica. La incidencia (%I) natural de *P. expansum* a los 45 días en el control (fruta tratada solo con agua) fue de 0,22%; mientras que la incidencia de *B. cinerea* fue de 0,29%

(Figura 10A). El agregado de CaCl_2 , redujo totalmente la incidencia de *B. cinerea*, mientras que la incidencia de *P. expansum* fue reducida en un 36,4%, sin resultar significativa con respecto al tratamiento control. Las levaduras solas, o combinadas con CaCl_2 , mostraron un control total sobre los dos patógenos en esta primera evaluación (Figura 10A).

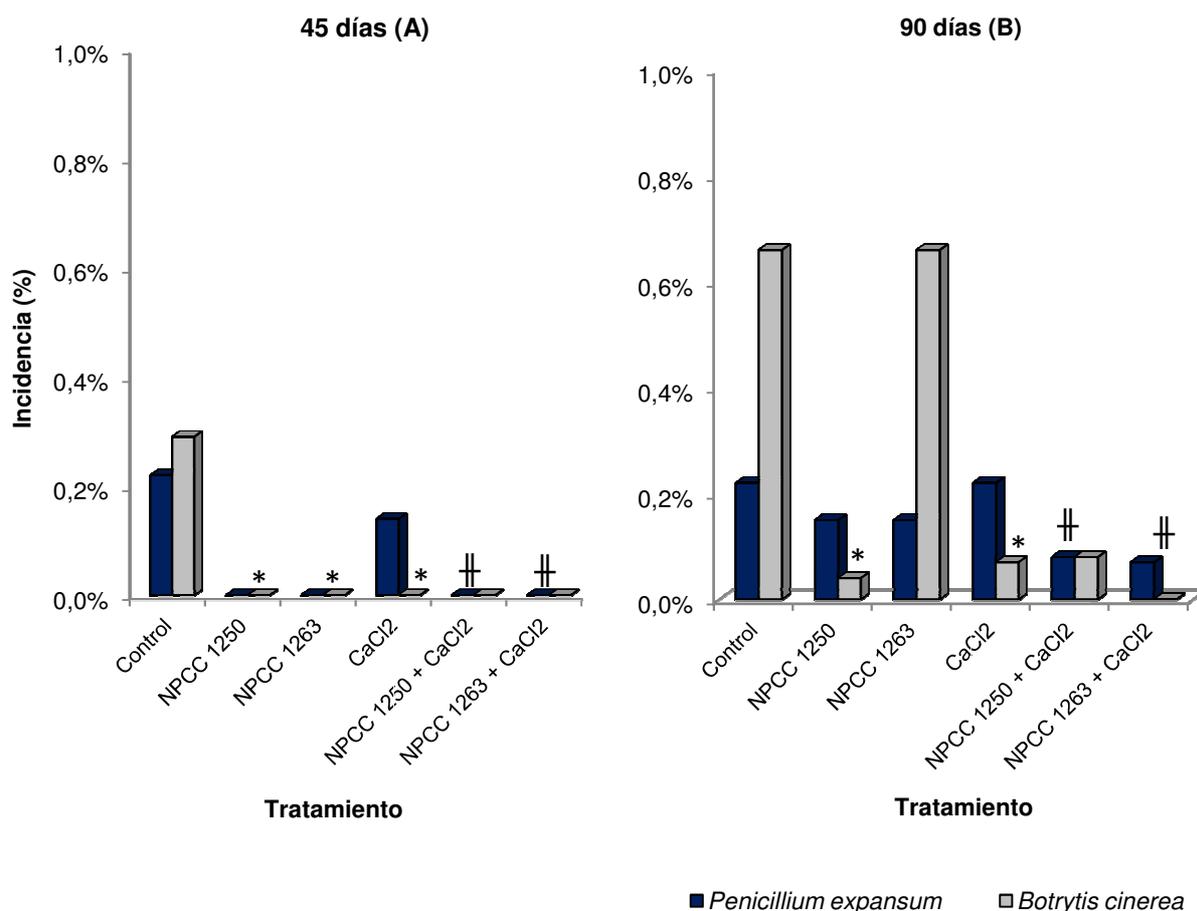


Figura 10. Incidencia de *P. expansum* y *B. cinerea* para cada tratamiento sobre peras Beurré D'Anjou, almacenadas a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en el empaque B. NPCC 1250: *P. membranifaciens* NPCC 1250. NPCC 1263: *Cr. victoriae* NPCC 1263. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al control con Agua. Las cruces (‡) indican diferencias significativas con respecto al tratamiento Agua + CaCl_2 .

A los 90 días de aplicación de los tratamientos, la incidencia de *P. expansum* en la fruta control fue la misma que a los 45 días (Figura 10A y B), mientras que la incidencia de *B. cinerea* fue más del doble (de 0,29% a 0,66%). El CaCl_2 aplicado solo redujo la incidencia de la enfermedad causada por *B. cinerea* en más de un 90%, mientras que sobre *P. expansum* no tuvo diferencias con respecto al control (Figura

10B). Ambas levaduras con el agregado del CaCl_2 redujeron significativamente la incidencia de *P. expansum* en más de 60%, no obstante, solo la combinación con *Cr. victoriae* NPCC 1263 redujo la de *B. cinerea* significativamente (100% control) (Figura 10B).

Por su parte, la capacidad biocontroladora de las levaduras sobre el cultivar Packham's Triumph se evaluó en los dos empaques comerciales (A y B), aunque cada uno presentó particularidades en el sistema de pulverización de los antagonistas (Figura 1) y en el momento de aplicación.

En el empaque A, las levaduras se aplicaron sobre la fruta inmediatamente luego de cosechada y la primera evaluación se llevó a cabo a los tres meses de almacenamiento. En este tiempo, no se encontraron podredumbres en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, a los cinco meses de conservación la incidencia de podredumbres por *P. expansum* fue de 0,90% y por *B. cinerea* de 0,57% (Figura 11C). Todos los tratamientos redujeron entre el 78% y 100% la incidencia de los dos patógenos con respecto al control (Figura 11C). La combinación de *Cr. victoriae* NPCC 1263 con CaCl_2 controló la incidencia de los dos patógenos.

En el empaque B, los tratamientos sobre Packham's Triumph se llevaron a cabo después de un mes de cosechada la fruta y conservada hasta ese momento en cámara frigorífica. A los tres meses de realizados los tratamientos la incidencia natural de podredumbres por *P. expansum* fue de 0,62% y 0,36% para *B. cinerea* (Figura 11A). Las levaduras solas redujeron significativamente la incidencia de *B. cinerea*, con valores de control de 77,8% y 100% para *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, respectivamente (Figura 11A). Con el agregado de CaCl_2 la condición antagónica de las levaduras no mostró mejoras con respecto a utilizarlas solas, sobre el control de los patógenos (Figura 11A).

Luego de 5 meses de almacenamiento, el tratamiento con *P. membranifaciens* NPCC 1250 redujo significativamente la incidencia de los dos patógenos (de 1,49% a 0,66% a *P. expansum*, y de 1,04% a 0,53% a *B. cinerea*), representando un 55,7-49% de control (Figura 11B). Por su parte, *Cr. victoriae* NPCC 1263 controló el 72% de la incidencia de *B. cinerea* y no controló a *P. expansum*. De los tratamientos con CaCl_2 , el único que mostró diferencias significativas, fue la combinación con *Cr. victoriae* NPCC 1263 frente a *B. cinerea* (de 1,04% a 0,38%) (Figura 11B); el biocontrol alcanzado para este patógeno con este antagonista, solo o con CaCl_2 , fue similar: 72% la levadura sola y 64% con el agregado de CaCl_2 (Figura 11).

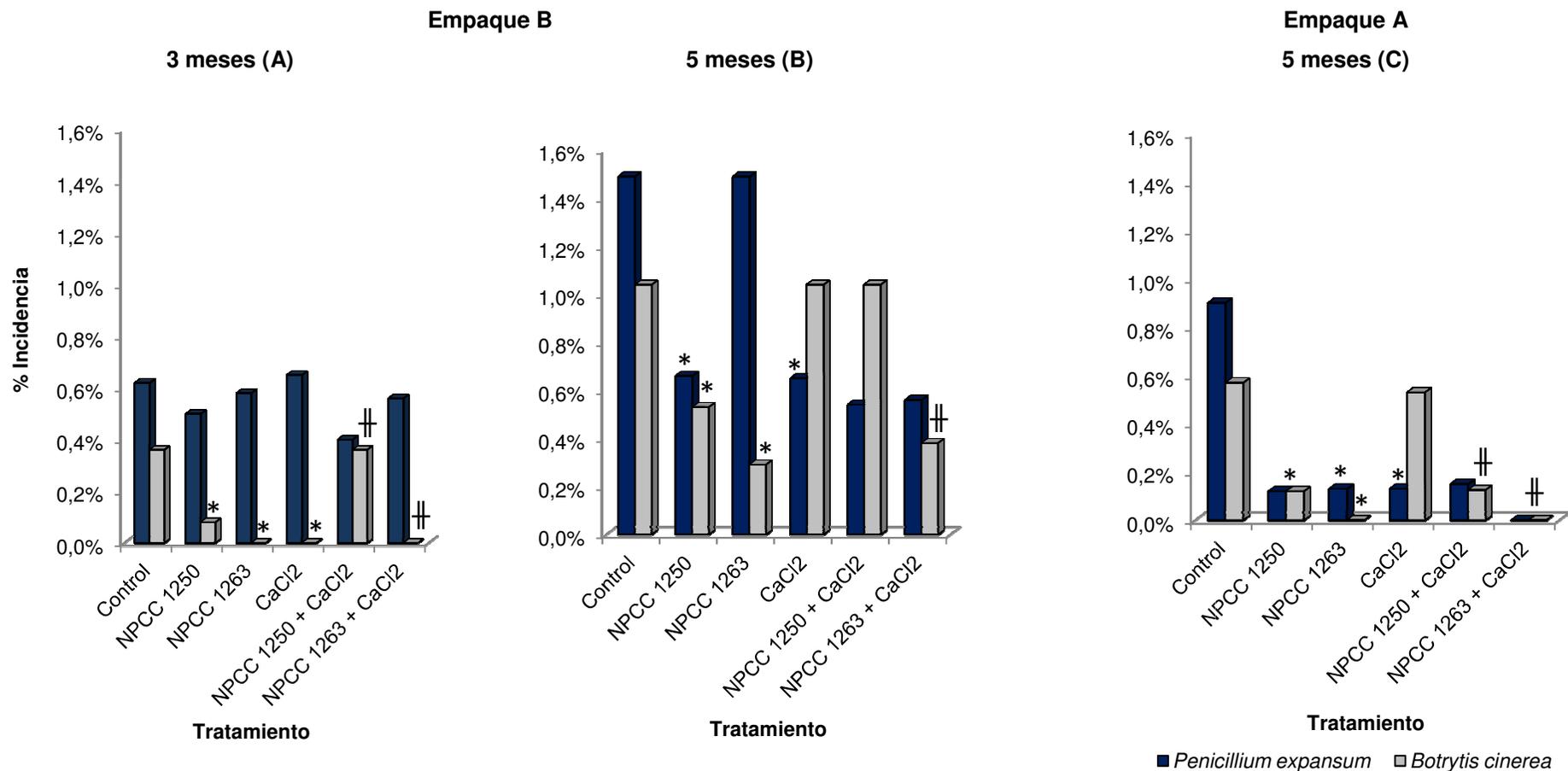


Figura 11. Incidencia de *P. expansum* y *B. cinerea*, para los tratamientos aplicados sobre peras Packham's Triumph a los 3 y 5 meses de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR. NPCC 1250: *P. membranifaciens* NPCC 1250. NPCC 1263: *Cr. victoriae* NPCC 1263. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al control con Agua. Las cruces (†) indican diferencias significativas con respecto al tratamiento Agua + CaCl₂.

5.1 Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las levaduras antagonistas

Para evaluar si el sistema de aplicación de las levaduras a través de los picos pulverizadores podría tener algún efecto sobre el número total de células viables, se tomaron muestras de la suspensión de los ACB a la entrada y a la salida de las toberas de pulverización (Tabla 6).

Los resultados indican que el número de levaduras aplicadas se redujo 3 y 2 órdenes de magnitud, con respecto a la cantidad inicial contenida en el tanque de aplicación (aproximadamente 10^{11} UFC/mL), independientemente del sistema de aplicación utilizado.

Tabla 6. Efecto de las toberas de pulverización sobre la viabilidad de las levaduras

Levaduras	Empaque A		Empaque B			
	Packham's Triumph		Beurre D'Anjou		Packham's Triumph	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	1×10^{11}	4×10^8	$1,5 \times 10^{11}$	1×10^9	$1,7 \times 10^{11}$	3×10^9
<i>Cr. victoriae</i> NPCC 1263	$1,3 \times 10^{11}$	3×10^8	$1,2 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{11}$	5×10^9

5.2 Capacidad colonización de las levaduras en la superficie de las peras en el almacenamiento frigorífico

En la línea de procesamiento se tomaron muestras de frutos para el recuento de UFC/superficie de fruto, tanto antes como después de la pulverización de cada uno de los tratamientos. Además se evaluaron las UFC en los momentos de muestreos establecidos para cada variedad (45, 60, 90 y/o 150 días). La superficie del fruto contenía una carga inicial de levaduras totales de 5×10^2 UFC/cm² (10^5 UFC/fruto) para Packham's Triumph $3,5 \times 10^2$ UFC/cm² (7×10^4 UFC/fruto) para Beurrè D'Anjou (Figura 12). Considerando la cantidad de células obtenidas de la salida de las toberas de pulverización (Tabla 6) y la microbiota natural de levaduras presente en la fruta, se deduce que de las células pulverizadas solo un bajo porcentaje (2,5-10%) se adhirió a la superficie de la fruta.

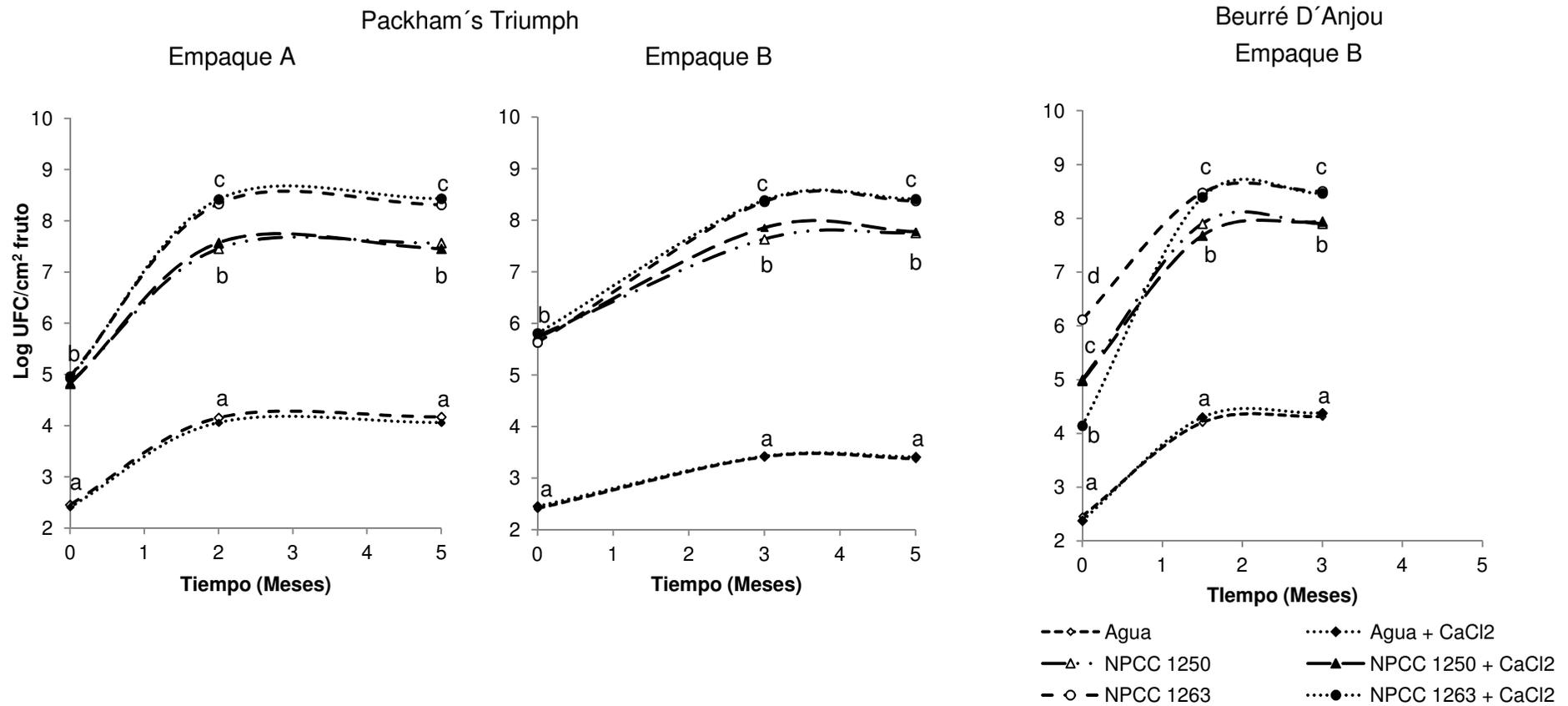


Figura 12. Dinámica poblacional de levaduras sobre la superficie de peras en almacenamiento comercial (-1^o/0^oC y 95% HR). NPCC 1250: *P. membranifaciens* NPCC 1250. NPCC 1263: *Cr. victoriae* NPCC 1263. Los tratamientos con diferentes letras a para un mismo tiempo indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey (p>0,05).

En todos los tratamientos con levaduras (solas o combinadas con CaCl_2) las mismas lograron establecerse y colonizar la superficie de la fruta (Figura 12). Se destaca que el nivel poblacional alcanzado con el agregado de CaCl_2 no presentó diferencias significativas con respecto al alcanzado con las levaduras solas.

El comportamiento de ambas levaduras, solas y combinadas con CaCl_2 sobre los dos cultivares fue similar para los dos empaques (Figura 12). No obstante, las dos levaduras antagonistas presentaron diferencias significativas entre ellas en la capacidad establecimiento y colonización sobre la superficie de los dos cultivares, siempre siendo más alta la capacidad de colonización de *Cr. victoriae* NPCC 1263, ya que alcanzó una media de $4,18 \times 10^8$ UFC/cm² luego de 5 meses de almacenamiento, mientras que *P. membranifaciens* NPCC 1250 llegó a niveles poblacionales de $5,75 \times 10^7$ UFC/cm² (Figura 12). La fruta control tratada con agua y con CaCl_2 presentó 2 y $2,4 \times 10^4$ UFC/cm² de levaduras luego a los 2 y 5 meses de conservación respectivamente.

DISCUSIÓN

El control biológico de las enfermedades de frutas en postcosecha constituye un desafío único y de crecimiento constante. El ambiente controlado en temperatura y humedad de las cámaras de conservación de frutas puede ayudar a alterar el equilibrio en las interacciones entre el hospedante, el patógeno y el antagonista a favor de este último. Los ACB presentan claras ventajas, ya que son más seguros que los fungicidas de síntesis para su uso en los alimentos, son capaces de persistir sobre la superficie por largos de tiempo y producen un efecto insignificante en el equilibrio ecológico, ya que no destruyen a los enemigos naturales, y son compatibles con otras medidas de manejo (Passaro *et al.*, 2012).

En las etapas finales de selección de un ACB, es necesario comprobar su eficacia en ensayos a escala semicomercial, para evaluar su efectividad considerando todos los factores intervinientes en el sistema (Nunes, 2012). El cambio de la escala requiere una mayor cantidad de biomasa, la cual debe ser producida en reactores utilizando medios de cultivo económicos, con altos rendimientos y con la simultánea

conservación de la capacidad antagónica las levaduras. Las condiciones de producción de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, se estudiaron y optimizaron a escala de frasco Erlenmeyer, y luego se aplicaron en un reactor de 22 L.

La temperatura de crecimiento fue un factor determinante en el crecimiento de las dos levaduras, las cuales crecieron mejor a 20°C por presentar características psicrófilas. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los microorganismos ha sido ampliamente estudiado. Torija *et al.* (2003) reporta la reducción de la viabilidad de aislamientos de *Saccharomyces cerevisiae* al someterlas a temperaturas elevadas (hasta 35°C). Sin embargo, varios autores han sugerido que algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* tienen una mejor eficiencia de crecimiento a bajas temperaturas que *Saccharomyces* (Sharf & Margalith, 1983; Heard & Fleet, 1988). Margesin (2009) estudió el comportamiento de *Rh. glacialis* y *Leucosporidiella creatinivora* (levaduras psicrófilas) para ellas el crecimiento es afectado a temperaturas superiores a los 30°C, mientras que entre los 20°C y 1°C se obtienen los mayores rendimientos de biomasa (10^8 UFC/mL y 10^9 UFC/mL a 20°C, mientras que a 1°C 10^{10} UFC/mL y 5×10^9 UFC/mL respectivamente). De manera similar, los resultados aquí obtenidos muestran que mientras el crecimiento de ambas especies de levaduras a 28°C fue sumamente restringido, los rendimientos más elevados de biomasa se produjeron a 20°C. Estas propiedades en el crecimiento de las dos antagonistas seleccionadas, posiblemente este relacionado con el origen de los aislamientos y el método de selección utilizado (desde heridas de pera conservadas a -1/0°C y seleccionadas en bioensayos realizados en frío).

Las levaduras durante el crecimiento en general consumen inicialmente la glucosa, luego la fructosa, y finalmente otras fuentes de azúcares disponibles (Abadias *et al.*, 2003). Al utilizar melaza de caña como sustrato para la producción de biomasa, se debe considerar que la sacarosa será la fuente principal de carbono, por lo cual el consumo de este disacárido por las levaduras es un requisito crítico. *Cr. victoriae* es una especie que asimila sacarosa, no así *P. membranifaciens*, sin embargo, ambos aislamientos seleccionados fueron capaces de crecer en melaza, dado que había suficiente cantidad de monosacáridos presentes (1,2% p/v en la dilución intermedia de melaza). Posiblemente el desarrollo inicial de las levaduras estaría asociado al consumo de los monosacáridos, para posteriormente crecer a expensas de la hidrólisis de la sacarosa, obtenida química o enzimáticamente (presencia de invertasas). En este sentido, con particular énfasis en lo que podría ocurrir con la producción de biomasa de *P. membranifaciens* NPCC 1250, es interesante el análisis que Schnierda *et al.* (2014) realizan para el aislamiento de *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1337

(de baja actividad invertasa), en el cual comparan el crecimiento sin y con el agregado de una invertasa comercial al medio de producción en base a melaza, donde obtienen que la producción de biomasa solo se incrementa levemente con el agregado de la enzima. Por su parte, Abadias *et al.* (2003) indican que el consumo de glucosa y fructosa de *Candida sake* se produce durante fase exponencial, mientras que el de sacarosa en fase estacionaria. La mayor producción de biomasa para las dos levaduras se logró a una concentración intermedia de melaza (128,2 g/L). En el medio con mayor concentración de melaza (312 g/L), se evidencia una reducción muy significativa en la producción de biomasa independientemente de la levadura evaluada. Este comportamiento podría explicarse la alta concentración de sustancias o elementos tóxicos de la melaza en el medio de cultivo, con una alta relación C/N que produce un efecto tóxico provocado y/o, la menor capacidad de disolver oxígeno de un medio más concentrado en solutos (Zhang & Greasham, 1999; Goksungur *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012).

La urea es una de las fuentes de nitrógeno más utilizadas para enriquecer los medios de cultivo basados en melaza de caña de azúcar. Esta fuente de nitrógeno, es recomendada porque permite obtener buenos rendimientos y ser económica para su empleo en la industria (Beudeker *et al.*, 1989; Reed & Nagodawithana, 1991; Crueger & Crueger, 1993; Walker, 1998). Existen otras fuentes de nitrógeno que han sido utilizadas en la optimización y producción de ACB, tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio o nitrato de amonio (entre las fuentes inorgánicas), o bien extracto de levadura, extracto de malta, peptona, triptona, asparragina (entre las orgánicas) (Costa *et al.*, 2002; Kaur & Satyanarayan, 2005; Melin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Manso *et al.*, 2010). Varios autores sugieren que el extracto de levadura es un buen sustrato para el crecimiento de muchos microorganismos (Smith *et al.*, 1975; Jackson *et al.*, 1998), ya que contiene aminoácidos y péptidos (solubles en agua), vitaminas y carbohidratos (Pepler, 1982; Crueger & Crueger, 1993).

Los resultados obtenidos en este Capítulo indican que el empleo de urea como fuente de nitrógeno permite obtener elevados rendimientos de ambas levaduras, donde los mejores rendimientos se obtuvieron con la concentración más baja (0,6 g/L) con la cual se lograron 8×10^{11} UFC/mL con *P. membranifaciens* NPCC 1250, y $2,6 \times 10^{11}$ UFC/mL de *Cr. victoriae* NPCC 1263 en cultivos de 100 mL. Con las concentraciones más altas de urea evaluadas se produce una reducción del crecimiento de ambos antagonistas. Resultados similares obtuvo Arevalo (1998) con *C. sake*, donde para concentraciones crecientes de melaza de caña de azúcar (5 a 630 g/L) y urea (0,3 a 6 g/L) optimiza la producción con un medio con 40 g/L de melaza y 1,2 g/L de urea.

La conservación a bajas temperaturas y en soluciones adecuadas es aconsejable para mantener en óptimas condiciones los microorganismos (Torres *et al.*, 2003; Abadias *et al.*, 2003; Melin *et al.*, 2006; Kinay & Yildiz, 2008). La relación entre la mortalidad y la temperatura de almacenamiento está bien establecida, y es sabido que las bajas temperaturas mantienen la actividad metabólica en un nivel bajo, y aumenta la estabilidad del microorganismo en el tiempo (Lievensen & Van't Riet, 1994; Selmer-Olsen *et al.*, 1999). Por su parte, el medio de conservación que se utilice debe mantener la viabilidad celular del ACB (Abadias *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos con *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263, indican que la conservación en agua es mejor con respecto a una solución de 20% de glicerol, ya que mantiene la mayor viabilidad de las células en el tiempo. Abadias *et al.* (2003) evaluaron distintas soluciones isotónicas y agua para la conservación de *C. sake*, obteniendo mejores resultados con el agente protector trehalosa y para la misma levadura Torres *et al.* (2003) demostraron que el glicerol y el polietilenglicol, son adecuados para la conservación de las levaduras en una formulación líquida a 4°C. Por su parte, Patiño Vera *et al.* (2005) definen como la mejor solución conservante a la combinación de glicerol 20% (v/v) con 5 g/L de xantano, con los que mantuvieron sin contaminaciones y sin sedimentación al biocontrolador *Rh. minuta* a 4°C por 6 meses. De acuerdo a estos reportes, serían necesarias más pruebas sobre el uso de glicerol, azúcares (como la trehalosa, sorbitol), u otros agentes protectivos y posibles combinaciones entre ellos, para indicar el método de conservación más adecuado para las dos levaduras seleccionadas en esta Tesis. Sin embargo, resulta muy promisorio que *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 conservadas en agua presentaran altas tasas de viabilidad celular a los 45 días de conservación a 4°C.

En el desarrollo de esta Tesis la optimización del medio de cultivo se realizó variando de un factor a la vez, mientras los otros se mantuvieron a un nivel constante. Este es un método sencillo donde la interacción entre los factores no es tomada en cuenta, sin embargo las cantidades de biomasa obtenidas siguiendo esta metodología fueron muy satisfactorias respecto con las reportadas para otros ACB (Costa *et al.*, 2002; Spadaro *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Probablemente, el uso de técnicas de diseño experimental, puedan proporcionar modelos estadísticos que ayuden a comprender mejor las interacciones entre los factores intervinientes en la formulación del medio de cultivo y permitan establecer condiciones óptimas para producir biomasa (Sarra *et al.*, 1993).

Las dos levaduras seleccionadas alcanzaron rendimientos similares o ligeramente superiores a los reportados para otras levaduras utilizando como sustrato melaza de

caña y urea. Abadias *et al.* (2003) obtienen 8×10^8 UFC/mL de *C. sake* después de 30 h de crecimiento en un reactor de 5 L a escala de laboratorio, nuestros resultados indican que en reactor de 20 L, se obtienen $2,5 \times 10^{13}$ UFC/mL y $5,75 \times 10^{12}$ UFC/mL para *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263. Patiño Vera *et al.* (2005), en fermentador de 100 L *Rh. minuta* alcanza en el medio de menor costo (medio mineral enriquecido) $1,35 \times 10^9$ UFC/mL.

La productividad como un parámetro de crecimiento que indica cantidad de biomasa producida en determinado tiempo, es dependiente del diseño del reactor, donde el principal factor es el coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_{L,a}$), el cual responde de manera directa al rendimiento final obtenido. Para las dos levaduras el recuento de UFC en el reactor (biomasa producida) fue ligeramente superior al alcanzado en los frascos Erlenmeyers, probablemente este incremento este asociado a la mayor oxigenación (tasa de transferencia de oxígeno) y transferencia de materia dentro del reactor, lo cual permitiría que el sustrato sea utilizado de manera óptima por las células (Stanbury *et al.*, 1995). En el escalado de *Rh. minuta* desde frascos Erlenmeyers, a reactor de 10 L y posteriormente a 100 L, se observa una diferencia notoria en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_{L,a}$), cuantificándose en las tres escalas 50 h^{-1} , 77 h^{-1} y 88 h^{-1} , respectivamente (Patiño Vera *et al.*, 2005) y relacionan que la mayor oxigenación influye en la tasa de crecimiento específico de la levadura.

Respecto a la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), las dos levaduras mostraron valores ($0,139 \text{ h}^{-1}$ y $0,063 \text{ h}^{-1}$) inferiores a los reportados como normales para las levaduras en general ($0,45$ y $0,60 \text{ h}^{-1}$) (Acevedo *et al.*, 2002); sin embargo, dichos valores son comparables a cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en panificación y producción de etanol, producidas en melaza de caña de azúcar (con μ de $0,0693$ a $0,13 \text{ h}^{-1}$), en distintas condiciones como el hambreado por pulso y bajo distintas concentraciones de sacarosa y glucosa en el medio de cultivo (Galvagno & Cerrutti, 2004; Peña & Arango, 2008).

La recolección de la biomasa producida se realizó en fase estacionaria, ya que fisiológicamente es el momento en el que las células se encuentran en una condición fisiológica deseable para que puedan sobrevivir mejor a posteriores condiciones de estrés (Jackson *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 1988; Abadias *et al.*, 2001; Wraight *et al.*, 2001). Tanto la cosecha en fase estacionaria, como el medio de cultivo en que se producen, podrían tener un efecto significativo en el producto final de la formulación. Este fenómeno es lo que algunos autores denominan tolerancia cruzada o co-tolerancia (Galvagno & Cerrutti, 2004; Dunlap *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011). La obtención de células fisiológicamente más resistentes a los procesos de secado,

lío-filizado o secado en lecho fluido, sería una ventaja para la producción comercial de los ACB (Bayrock & Ingledew, 1997; Melin *et al.*, 2007).

En la literatura disponible si bien se presentan resultados sobre el comportamiento de antagonistas a escala semicomercial sobre frutos de pepita, carozo y cítricos, la mayoría no alcanza la magnitud de fruta ensayada en este trabajo (Chand-Goyal & Spott, 1997; Long *et al.*, 2007; Janisiewicz *et al.*, 2008). Los resultados de biocontrol presentados en este Capítulo, corresponde al procesamiento de 400 kg de fruta para cada tratamiento. El volumen de fruta involucrado en los ensayos permitió evaluar a las dos levaduras en las condiciones reales de procesamiento comercial, considerando la presión natural de inóculo los patógenos. En el desarrollo de un ACB, la etapa de evaluación a escala semicomercial, es una de las determinantes para comprobar la eficacia y aplicabilidad de tal tecnología dentro del proceso productivo.

Luego del almacenamiento frigorífico de las peras, Beurrè D'Anjou (3 meses) o Packham's Triumph (5 meses), se observaron claras diferencias en la incidencia natural de las enfermedades postcosecha. Si bien en ambos varietales la mayor incidencia fue de *P. expansum* y *B. cinerea*, otras podredumbres ocasionadas por *Alternaria sp.* y *Cladosporium sp.*, estuvieron presentes (datos no mostrados). La diversidad de hongos filamentosos encontrados como causales de podredumbres postcosecha en este trabajo, fueron similares a los reportados por Sugar & Basile (2008) en peras del cultivar Beurrè Bosc.

Droby (2006a) asegura que el sistema de aplicación utilizado para los ACB es un factor importante en el rendimiento final de los mismos, indicando que los sistemas de pulverización en línea y *drencher* son los más adecuados. Los resultados obtenidos en este Capítulo muestran que el sistema de aplicación utilizado en cada empaque redujo el número total de células en al menos 3 y 2 órdenes de magnitud. Posiblemente la presión impulsora y el paso a través de las boquillas de aplicación generaron la ruptura de las células reduciendo su número y viabilidad. En este sentido, para el biocontrolador *C. sake*, Viñas *et al.* (1998) destacan como cualidad la resistencia de las células a la fuerza de corte de las bombas y boquillas de aplicación. Sería interesante en un futuro evaluar como varía la integridad celular de ambas levaduras a diferentes presiones del sistema impulsor y establecer la condición más beneficiosa para mantener la viabilidad de las levaduras.

El monitoreo de la población de las dos levaduras sobre la fruta tratada en estos ensayos a escala semicomercial muestra que ambas son capaces de sobrevivir, crecer y colonizar a -1/0°C sobre la superficie de las dos variedades de peras durante todo el período de conservación. En el Capítulo III se evaluó la capacidad de colonización de las heridas realizadas artificialmente en condiciones de

almacenamiento, donde las dos levaduras alcanzaron similares niveles poblacionales ($2,15 \times 10^5$ UFC/cm² para *P. membranifaciens* NPCC 1250 y $2,12 \times 10^6$ UFC/cm² para *Cr. victoriae* NPCC 1263). En condiciones semicomerciales, se observó que inicialmente la cantidad de células que se adhirió sobre la superficie de la fruta es muy inferior a la aplicada; no obstante, los tratamientos con las levaduras antagonistas muestran buenos niveles de control de las enfermedades. Los niveles poblacionales alcanzados en todos los tratamientos en línea con levaduras, superan en 2 o 3 órdenes de magnitud a los obtenidos en las heridas inoculadas artificialmente (Capítulo III) esto indicaría la capacidad de las levaduras de no solo colonizar las heridas (sitios ricos en nutrientes) sino también la superficie de la fruta.

Si bien la cantidad de levaduras aplicadas fue elevada (10^{11} UFC/mL) en los tratamientos en línea, solo un bajo porcentaje logró adherirse a la superficie de la fruta, comparando las UFC/mL a la salida de los picos de aspersión (entre 10^8 y 10^9 UFC/mL). Posiblemente la alta tensión superficial entre el ABC y la superficie de la fruta impidieron la adherencia de las células; no obstante, también pudo haber afectado la viabilidad de las células el efecto de la temperatura en el túnel de secado (aire a presión con una temperatura de entre 30 - 38°C). Sin embargo hay que destacar que a pesar de bajo número inicial de levaduras viables, éstas fueron capaces de crecer a lo largo del período de postcosecha y logran altos niveles de control de las enfermedades.

En la combinación de las levaduras con CaCl₂ no se encontraron diferencias en la capacidad de establecimiento y colonización sobre la superficie de las peras. Resultados similares se encontraron con *P. membranifaciens* aplicada sola o con 2% (p/v) de CaCl₂ en níspero, donde ambos tratamientos alcanzaron 10^7 UFC/herida (Cao *et al.* 2008). Por su parte, el comportamiento antagónico de las levaduras mostró en general una mejora en el antagonismo cuando se combinaron con el CaCl₂. Se destacó *Cr. victoriae* NPCC 1263 con CaCl₂ en el empaque A sobre el cultivar Packham's Triumph, ya que a los 5 meses de almacenamiento este tratamiento controló totalmente la incidencia de las enfermedades producidas por *P. expansum* y *B. cinerea*, con respecto al control. Sin embargo, para la misma combinación (antagonista y CaCl₂) en el empaque B, el nivel de control alcanzado por el tratamiento fue del 70% para cada una de las enfermedades. Esta diferencia entre los porcentajes de control en los dos empaques sobre el mismo varietal, estaría fundamentalmente influenciada por el momento de aplicación del antagonista (un mes más tarde que en el empaque A) y las condiciones fisiológicas del fruto. En este sentido, Creemers (1998), reporta que la resistencia interna de la fruta frente a las enfermedades fúngicas disminuye a medida que la madurez se incrementa. En cuanto a la eficacia de los

antagonistas Roberts (1990) demostró que el antagonismo de *Cryptococcus sp.* fue afectado por el grado de madurez de la fruta, obteniendo los mejores resultados de control cuando las aplicaciones se realizaron en fruta recién cosechada. En cuanto al momento de aplicación de los ACB Droby (2006a) establece para cítricos que la eficacia puede mejorar cuando estos se aplican dentro de las 24 h después de la cosecha.

El rol del CaCl_2 en los ensayos en línea indican que esta sal disminuye el desarrollo de enfermedades; esta situación se contrapone a lo observado en el Capítulo IV, donde el agregado de esta sal de calcio por sí sola no mostró efecto sobre el control de *P. expansum* y *B. cinerea*. El CaCl_2 está reportado como inductor de resistencia de las defensas del fruto (Conway *et al.*, 1988), por lo que no se descarta que este efecto se produzca.

Es sabido que una de las principales limitaciones del control biológico es la alta variabilidad en la eficacia de control, que puede atribuirse factores bióticos (especies hospedantes, el estado nutricional de patógenos, etc.) y abióticos (temperatura y humedad) (Johnson *et al.*, 2000; Lugtenberg & Leveau, 2007; Sundin *et al.*, 2009). Por otro lado, Droby (2006b) indica que la variabilidad de la eficacia de los ACB está determinada fundamentalmente por: el medio de crecimiento del microorganismo y la formulación de la biomasa obtenida, el método de aplicación, la presión de inóculo, el estado fisiológico del hospedante al momento de la aplicación, y la combinación con otras sustancias como aditivos. En el trabajo desarrollado en este Capítulo se mantuvieron constantes: la cantidad de antagonista aplicado, el medio de fermentación (melaza de caña 128,2 g/L; urea 0,6 g/L), formulación utilizada (líquida en agua conservada a 4°C) y el aditivo utilizado (CaCl_2 2% p/v). Por otro lado, es posible establecer que los factores pudieron influir en la eficacia de los ACB fueron: la presión de inóculo (según las tareas de limpieza y sanitización), el sistema de aplicación (pulverización, con sistema impulsor a presión), la fecha de aplicación de los antagonistas y los parámetros de madurez de la fruta, muchas de estas diferencias se deben a las prácticas de manejo de cada empaque.

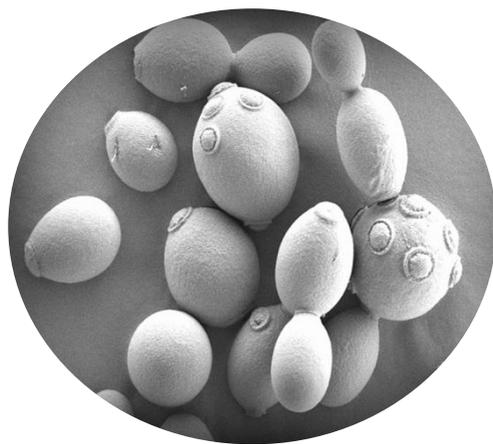
En función de todos los resultados obtenidos, para el control de las podredumbres ocasionadas por *B. cinerea* y *P. expansum*, la combinación más promisoría es *Cr. victoriae* NPCC 1263 con CaCl_2 , ya que alcanza entre 70-100% de control de las respectivas enfermedades. El tratamiento aumenta su eficacia cuando se realiza en las fechas próximas a la cosecha de la fruta. El efecto preventivo de las levaduras de esta manera mejora, ya que se favorece la colonización y establecimiento en los sitios de entrada de los patógenos, evitando el ingreso de los mismos.

El creciente interés por los alimentos libres de residuos de plaguicidas, el número limitado de principios activos disponibles y la restricción de su uso provoca el crecimiento del mercado que demanda de antagonistas microbianos para el tratamiento de enfermedades postcosecha (Nunes, 2012). Al mismo tiempo, Droby *et al.* (2009) destacan que el desarrollo de productos biológicos para el manejo de las enfermedades de postcosecha, representa una ventaja sobre el desarrollo de nuevos fungicidas, ya que no presentan problemas de toxicidad, por lo cual el registro es relativamente más sencillo y menos costoso que los productos de síntesis química. Estas consideraciones indican el gran potencial del desarrollo de ACB regionales para el uso en la postcosecha de pomáceas. La reducción de la incidencia de las enfermedades alcanzada por los ACB (de más del 50%), representa a nivel comercial una considerable reducción en las pérdidas económicas ocasionadas en la postcosecha de la producción de la región. Los resultados de los experimentos a escala semicomercial presentados en este Capítulo corresponden a una sola temporada, la comprendida entre 2012-2013 y en dos empaques regionales, por lo cual son necesarias más evaluaciones para confirmar su eficacia dentro de las variaciones anuales y desarrollar a futuro un producto comercial disponible en el mercado.

Los resultados obtenidos en esta Tesis, constituyen un aporte fundamental a la Región, ya que actualmente no existen desarrollos locales en la temática, y es una demanda concreta del sector productivo-agroexportador para el manejo postcosecha de peras y manzanas. El desarrollo e implementación de uso de ACB en los sistemas productivos del tipo orgánico y bajo MIP, resultaría una importante herramienta de manejo para la fruticultura, ya que permitiría reducir las pérdidas postcosecha con una práctica “amigable” con el consumidor y el ambiente, sumándole valor agregado a la producción e incrementando los mercados compradores de los *commodities*.

Como resultado de este trabajo, a través de la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Comahue, se registró una patente de invención denominada: **“Cepas de levaduras para el biocontrol de frutas postcosecha, composiciones que las contienen, métodos de aplicación de las composiciones y usos”** (INPI. Nº 20120101053).

CONCLUSIONES



En este trabajo de Tesis se aislaron e identificaron las levaduras *Pichia membranifaciens* NPCC 1250 y *Cryptococcus victoriae* NPCC 1263 a partir de peras conservadas en cámaras frigoríficas de la Nor-patagonia Argentina, y se seleccionaron por su comportamiento antagónico frente a *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en ensayos *in situ*.

La estrategia de aislamiento y selección se realizó teniendo en cuenta los principales factores intervinientes en el desarrollo de las enfermedades. La presión selectiva ejercida mediante la evaluación *in situ* sobre peras, utilizando cepas locales de patógenos y temperaturas de conservación, permitió la selección exitosa de los biocontroladores. Las cepas seleccionadas fueron identificadas como especies psicrófitas, lo cual las hace adecuadas para su utilización en las condiciones de almacenamiento (-1/0°C).

Parte de la estrategia de selección desarrollada se fundamentó en la utilización de cepas de patógenos locales para llevar a cabo los enfrentamientos con las potenciales levaduras antagonistas. A partir de frutas con síntomas de la enfermedad, con 6-7 meses de almacenamiento, se obtuvieron 28 aislamientos de *B. cinerea* y 32 de *P. expansum*, los cuales fueron identificados por métodos morfológicos y morfofisiológicos y moleculares, y caracterizados por su patogenicidad y resistencia a fungicidas. *P. expansum* NPCC 2023 presentó una patogenicidad de 26,20 mm, resistente a TBZ, mientras que para captan la CIM fue de 83 mg/L. *B. cinerea* NPCC 2049 desarrollo un diámetro de podredumbre de 71,60 mm, sensible a TBZ y creció hasta 41 mg/L. Para los *screenings*, se determinó la concentración mínima infectiva que resultó de 10^4 conidios/mL para *P. expansum* NPCC 2023 y 5×10^3 conidios/mL para *B. cinerea* NPCC 2049. Los estudios realizados sobre estos dos patógenos en pera son de de importancia regional, ya que no hay reportes alguno sobre pera hasta el momento.

Las aguas de lavado de superficie de fruta o heridas sanas de peras conservadas, se emplearon como fuente de las levaduras con potencial antagónico. Se obtuvieron 55 aislamientos de levaduras en total, agrupados en 11 géneros de las cuales los mayoritarios fueron *Aureobasidium*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. El 81% de las levaduras aisladas correspondieron a especies psicrófilas.

De los 55 aislamientos obtenidos, 26 se evaluaron *in situ* sobre *P. expansum* NPCC 2023 y comparados con dos fungicidas de síntesis química (tiabendazol y captan), siendo estos 26 aislamientos de levaduras más eficaces que los tratamientos

químicos. Diez aislamientos, a los 200 días de almacenamiento en cámara frigorífica (-1/0°C y 95%HR), controlaron totalmente el moho azul y fueron seleccionados para enfrentarlos a *B. cinerea* NPCC 2049 en las mismas condiciones. Cuatro de los aislamientos redujeron la incidencia en un 40% y fueron los preseleccionados a partir de los cuales finalmente se seleccionaron *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263.

P. membranifaciens NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 se caracterizaron por su elevada capacidad de colonización de las heridas y superficie de los frutos de los cultivares de pera Packham's Triumph y Beurré D'Anjou en las condiciones de conservación frigorífica. Las dos levaduras compitieron por ácido aspártico y nitrato de amonio frente a *P. expansum*; y *Cr. victoriae* NPCC 1263 compitió además por glicina. En ensayos *in vitro*, ambas se caracterizaron por su capacidad de producir toxinas *killer* frente a los dos patógenos postcosecha y secretar enzimas hidrolíticas de compuestos de pared, particularmente quitinasas, glucanasas y proteasas, a -1/0°C. Asimismo *Cr. victoriae* NPCC 1263 se destacó por inhibir el 70% de la germinación de los conidios de *P. expansum* y por la producción de biofilms en jugo de pera (>90%) y medio de cultivo artificial.

De acuerdo a los resultados de las prueba de patogenicidad efectuadas, las levaduras seleccionadas no son potencialmente patógenas para los humanos, ya que no crecen a 37°C, no producen enzimas fosfolipasas y no son capaces de desarrollarse en las condiciones del estómago. Estas características asegurarían la inocuidad de las mismas para los seres humanos.

La producción a escala semicomercial se realizó en reactor de 22 L utilizando como medio de cultivo la melaza de caña de azúcar (128,2 g/L) y urea (0,6 g/L). Los rendimientos obtenidos fueron de $2,5 \times 10^{13}$ UFC/mL para *P. membranifaciens* NPCC 1250 y $5,75 \times 10^{12}$ UFC/mL para *Cr. victoriae* NPCC 1263. Las células producidas conservaron su potencial antagónico, y almacenadas en agua destilada estéril a 4°C mantuvieron una viabilidad elevada.

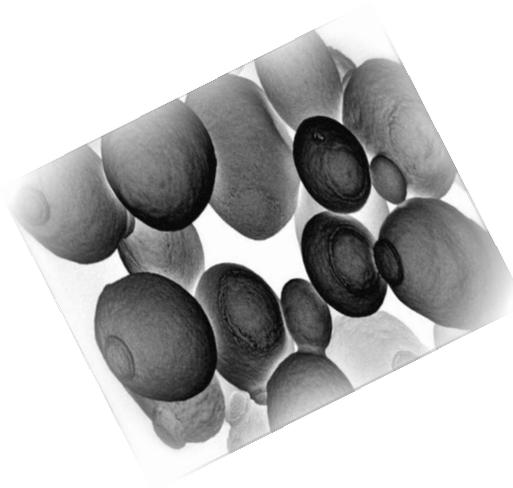
En ensayos a escala semicomercial el comportamiento antagónico de las levaduras logró entre el 50-100% de control de las principales enfermedades postcosecha, demostrando que se adaptan a la tecnología de aplicación disponible en los empaques de procesamiento de fruta fresca y que crecen sobre la superficie del fruto durante el período de almacenamiento, logrando controlar las enfermedades durante 3-5 meses de conservación de acuerdo al varietal de pera que se trate: Beurré D'Anjou o

Packham's Triumph. La combinación de las levaduras con cloruro de calcio en la línea de empaque (como a escala laboratorio) mejoró su aptitud biocontroladora.

En líneas generales, las dos levaduras seleccionadas reúnen todas las características deseables de un agente de control biológico para el control de patógenos postcosecha y podrían constituir una herramienta sustentable para el manejo postcosecha de las producciones orgánicas y bajo manejo integrado de plagas (MIP). Es así que, las levaduras seleccionadas podrían formar parte de un formulado comercial desarrollado localmente.

Actualmente el uso de *P. membranifaciens* NPCC 1250 y *Cr. victoriae* NPCC 1263 combinadas con cloruro de calcio, y producción de biomasa para el control biológico en postcosecha se encuentra patentado en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

ANEXOS

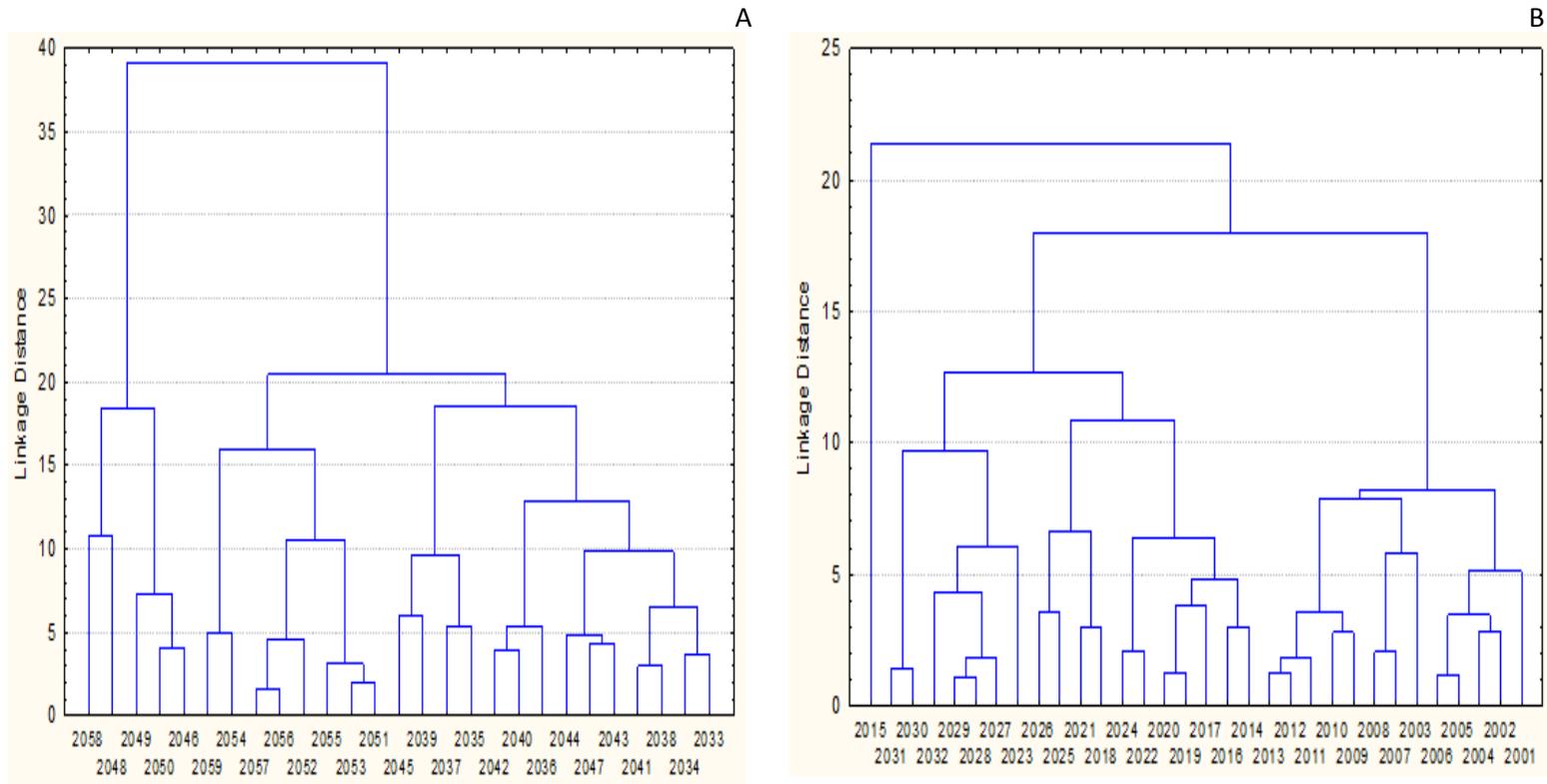


Anexo I. Valle productivo provincias de Neuquén y Río Negro.



Imagen satelital del Alto Valle desde Vista Alegre y Senillosa (Provincia de Neuquén), al oeste (izquierda), hasta Chichinales (Provincia de Río Negro) al este (derecha). Se observa el contraste entre la meseta árida y la zona cultivada. Se destacada el lago Pellegrini. También se ven las ciudades más grandes. Tomada de http://es.wikipedia.org/wiki/Alto_Valle_del_R%C3%ADo_Negro. 11 de marzo 2014

Anexo II



Análisis Cluster de los aislamientos de *B. cinerea* (A) y *P. expansum* (B) con respecto a la patogenicidad en peras inoculadas y almacenadas 30 días a $-1/0^{\circ}\text{C}$. Contrucción de dendrogramas basados en el método UPGMA con los diámetros, utilizando el programa, StatSoft, Inc. (2007) STATISTICA (data analysis software system), versión 8.0. www.statsoft.com

Anexo III. Identificación molecular de una levadura de cada grupo por el método ITS1- 5,8S-ITS2PCR- RFLP según Esteve-Zarzoso *et al.* (1999).

<i>Especie</i>	Amplificado ¹	Patrón de restricción de enzimas (pb)		
		<i>CFO</i>	<i>HAE III</i>	<i>HINF</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	600	190+180+100	450+150	290+180+130
<i>Candida patagonica</i>	550	280+90+90+90	550	320+280
<i>Cistofilobasidium infirmonimatum</i>	620	280+250+90	500+70+50?	270+180+160
<i>Cryptococcus albidus</i>	630	370+280	500+130?	250+230
<i>Cryptococcus tephrensis</i>	530-550	280+250	380+90+70	270+270
<i>Cryptococcus victoriae</i>	500-530	280+260	380+130	270+270
<i>Cryptococcus weringae</i>	610 - 630	350+280	480+90	260+240+150
<i>Pichia membranefaciens</i>	480-500	240+160+110	330+100+50	270+210+?
<i>Rhodotorula laryngis</i>	600	500+100	580+20	330+220+?
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	640	320+220+100	410+220	380+220+?
<i>Rodosporidium babjjevae, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula graminis</i>	600	300+230+100	600	220+130+130+90

¹Fragmento ITS1-5.8S-ITS2 rDNA.

Anexo IV. Concentraciones de nutrientes en tejidos de pera y evaluados en el análisis del perfil metabólico de levaduras antagonistas y patógenos.

Nutriente	Cada 100 gr fruta		g/mL*	µg/µL	Concentración evaluada (µg/µL)
		Unidades			
Amino ácidos					
Ácido aspártico	0,105	g	0,00084	0,84	8,4
Ácido glutámico	0,03	g	0,00024	0,24	2,4
Alanina	0,014	g	0,00011	0,112	1,12
Arginina	0,01	g	0,00008	0,08	0,8
Cistina	0,002	g	1,6E-05	0,016	0,16
Fenilalanina	0,011	g	8,8E-05	0,088	0,88
Glicina	0,013	g	0,0001	0,104	1,04
Histidina	0,002	g	1,6E-05	0,016	0,16
Isoleucina	0,011	g	8,8E-05	0,088	0,88
Leucina	0,019	g	0,00015	0,152	1,52
Lisina	0,017	g	0,00014	0,136	1,36
Metionina	0,002	g	1,6E-05	0,016	0,16
Prolina	0,021	g	0,00017	0,168	1,68
Serina	0,015	g	0,00012	0,12	1,2
Tirosina	0,002	g	1,6E-05	0,016	0,16
Treonina	0,011	g	8,8E-05	0,088	0,88
Triptofano	0,002	g	1,6E-05	0,016	0,16
Valina	0,017	g	0,00014	0,136	1,36
Azúcares					
Fructosa	6,23	g	0,04984	49,84	99,68
Glucosa	2,76	g	0,02208	22,08	110,4
Lactosa	0,01	g	0,00008	0,08	0,8
Maltosa	0,01	g	0,00008	0,08	0,8
Sacarosa	0,78	g	0,00624	6,24	18,72
Hierro					
Fe	0,17	mg	0,00136	1,36	-

*Volumen de una pera de 100 gr, corresponde a 125 mL, aproximadamente.

Anexo V



Figura. Biorreactor de acero inoxidable utilizado para la producción de biomasa de las levaduras antagonistas.

Características:

Capacidad: 22 litros;

Recipiente: vaso de acero inoxidable

Tapa superior: Acero inoxidable, con cerrado hermético y entrada de aireador, y sensores de medición. Con visor de vidrio.

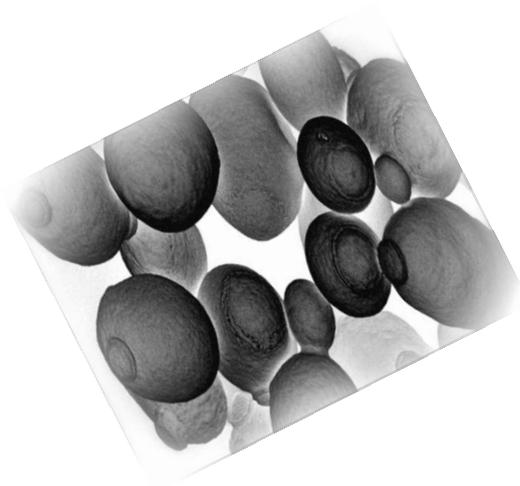
Agitación: eje central con 3 pares de paletas perpendiculares, accionadas por motor eléctrico.

Otras:

Aireador: Aquarium. Precisión SR – 8500. 3 Velocidades. Caudal 4,5 litros/min.

Registro de temperatura: dispositivo electrónico que de registro.

BIBLIOGRAFIA



- Abadias M., Benabarre A., Teixidó N., Usall J. and Viñas I. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* 65: 173-182.
- Abadias M., Teixidó N., Usall J. and Viñas I. 2003. Optimization of growth conditions of postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *Journal of Applied Microbiology* 95: 301-309.
- Abadias M., Teixidó N., Usall J., Viñas I. and Magan N. 2000. Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Journal of Applied Microbiology* 89: 1009-1017.
- Abano E., Sam-Amoah L.K. 2012. Application of antagonistic microorganisms for the control of postharvest decays in fruits and vegetables. *International Journal of Agriculture and Biology* 2: 1-8
- Acevedo B., Gentina J.C y Illanes A. 2002. *Fundamentos de ingeniería bioquímica*; Ediciones universitarias de Valparaíso, Universidad católica de Valparaíso.
- Adaskaveg J.E., Foster H., Thompson D., Driever G. and Wade L. 2006. Evaluation of postharvest treatments for management of gray mold, blue mold and other decays of stored pears in California. *Annual Report California Pear Board*.
- Adaskaveg J. E. and Förster H. 2010. New developments in postharvest fungicide registrations for edible horticultural crops and use strategies in the United States. In D. Prusky & M. L. Gullino (Eds.), *Post-harvest pathology Series: Plant pathology in the 21st century*. 2: 107-111.
- Adikaram N. y Karunaratne A. 1998. Suppression of avocado anthracnose and stem-end rot pathogens by endogenous antifungal substances and a surface inhabiting *Pestalotiopsis* sp. *See Ref. 101: 72–77*.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, Estados Unidos. 922 pp.
- Amiri A. and Bompeix G. 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology* 54: 74-81.
- Andrews J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635.
- Andrews J.H. and Harris R.F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38:145-80.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists *Official Methods of Analysis*, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists, Inc.; Virginia.
- Arevalo Chávez S. 1998. Optimización de la producción del Agente de control *Candida Sake* (CPA-1). Tesis doctoral. Universidad de Llerida.
- Arras G. 1993. Inhibition of postharvest fungal pathogens by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit. *Advances in Horticultural Science* 7: 123-27.
- Arras G. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruit. *Postharvest Biology and Technology* 8: 191-198.

- Arras G. and Arru S. 1997. Mechanisms of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Annual Microbiology Enzymology* 47: 97-120.
- Arras G., Scherm B. and Migheli Q. 2002. Improving biocontrol activity of *Pichia guillermondii* against postharvest decay oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. *Biocontrol Science and Technology* 12: 547-553.
- Baker K.J. and Cook R.J. 1974. *Biological control of plant pathogens*, San Francisco: Freeman.
- Baraldi E., Mari M., Chierici E., Pondrelli M., Bertolini P. and Pratella G.C. 2003. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology* 52: 362-370.
- Barkai-Golan R. 1974. Species of *Penicillium* causing decay of stored fruits and vegetables in Israel. *Mycopathol Mycol Appl* 54: 141-145.
- Barkai-Goland R. 2001. Biological control. In: Barkai-Goland R (ed) *Postharvest diseases of fruit, vegetables: development and control*. Elsevier Sciences, Amsterdam, pp 221-255.
- Barnett J.A., Payne R.W. and Yarrow D. (Eds). 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification* (2nd Edition), Cambridge University Press, New York, 1002 pp.
- Barrett-Bee K., Hayes Y., Wilson R.G. and Ryley. J.F.. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of General Microbiology* 131: 1217-1221.
- Bar-Shimon M., Yehuda H., Cohen L., Weiss B., Kobeshnikov A., Daus M., Wisniewski M. and Droby S. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genet* 45: 140-148.
- Bayrock D. and Ingledew W.M. 1997. Fluidized bed drying of baker's yeast: moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. *Food Research International* 30, 6: 407-415.
- Beever R.E., Laracy E.P. and Pak H.A. 1989. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathology* 38: 427-437.
- Bèlanger R.R., Dufour N., Caron J. and Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence of sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol science and technology*. 5: 41-53.
- Bellows T.S., Fisher T.W., Caltagirone L.E., Dahlsten D.L., Gordh G. and Huffaker C.B. 1999. *Handbook of Biological Control, Principles and Applications of Biological Control*, San Diego, New York: Academic Press, pp. 1046.
- Benbow J. M. and Sugar, D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease* 83: 839-844.
- Bencheqroun S.K., Bajji M., Massart S., Labhilili M., El Jaafari S. and Jijakli, M.H. 2007. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology* 46: 128-135.

- Benitez C.E. 2001. Cosecha y postcosecha de peras y manzanas en los valles irrigados de la Patagonia. INTA, EEA Alto Valle pp. 126.
- Berg L. van den and Lentz C.P. 1968. The effect of relative humidity and temperature on survival and growth of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Botany 46: 1477-1481.
- Beudeker A., Van Dan H. W., Van der Plaat J.B. and Vellenga K. 1989. Developments in baker's yeast production. In: Yeast Biotechnology and Biocatalysis. Verachtert H y de Mot R. Ed. Marcel Dekker Inc. New York. 103-146
- Bevilacqua M. y Storti L.M. 2011. Complejo Frutícola: Manzana y Pera. "Producción Regional por Complejos Productivos". Ministerio de Economía y Finanzas Pública. Secretaría de Política Económica. Subsecretaría de Programación Económica. Dirección Nacional de Programación Económica Regional. Disponible on line: http://www.mecon.gov.ar/peconomica/docs/Complejo_pepitas.pdf
- Bhima B., Sudhakara Reddy M. and Venkateswar Rao L. 2012. Optimized Biomass Production of Probiotic Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by *Taguchi* Methodology .International Conference on Biological, Biomedical and Pharmaceutical Sciences (ICCEPS'2012) July 28-29, 2012 Pattaya (Thailand). 118-121.
- Biggs A.R. and Rosenberger D.A. 2001. Fruit Pest News. <http://web.utk.edu/~extepp/fnp/fnp-8-20-01.htm>
- Blakeman J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: Biological Control on the Phylloplane. Eds. Windels C.E. and Lindow S.E. American Phytopathological Society. St. 6-30.
- Blakeman J.P. 1991. Foliar bacterial pathogenic: epiphytic growth and interactions on leaves. Journal Applied Bacteriology Symposium 70: 49S-59S.
- Blakeman J.P. and Fokkema N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20: 167-92.
- Blanpied G.D. and Purnasiri A. 1968. *Penicillium* and *Botrytis* rot of McIntosh apples handled in water. Plant Disease Reports. 52: 865-867.
- Bleve G.F., Grieco G., Cozzi A., Logrieco A. and Visconti A. 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. International Journal Food Microbiology 108, 204-209.
- Boller E.F., El Titi A., Gendrier J.P., Avilla J., Jörg E. and Malavolta C. 1999. Integrated production. Principles and technical guidelines. 2nd edition. IOBC wprs Bulletin. 37 p.
- Bonaterra A., Badosa E., Cabrefiga J., Francés C. and Montesinos E. 2012. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. Trees 26: 215- 226.
- Bondoux P. 1992. Maladies de conservation des fruits à pépins, pommes et poires. INRA and PHM (revue horticole). Paris, France, 173 pp.
- Borras A.D. and Aguilar R.V. 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. International Journal of Food Microbiology 11: 179-184.

- Brent K.J. and Hollomon D.K. 2007. In: Fungicide Resistance Action Committee (Ed.), Fungicide Resistance, the Assessment of Risk, 2 revised edition. Borecka H. 1977. Fungi of genus *Penicillium* on apples and pears during the storage period. *Acta Agrobotanica* 30: 213-227.
- Brizzio S., Turchetti B., de García V., Libkind D., Buzzini P., Gasparetti C. and van Broock M. 2007. Extracellular enzymatic activities (EEA) in basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*. 53: 519-525.
- Brown G.E. and Chambers M. 1996. Evaluation of biological products for the control of postharvest diseases of Florida citrus. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 109: 278-282.
- Budroni M. and Quirico M. 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 Research*. 7: 1389-1398.
- Burik van J.H. and Magee P. 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual Reviews Microbiology* 55: 743-772.
- Buzzini P. and Margesin R. (eds.) 2014. *Cold-Adapted Yeasts*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 549.
- Buzzini P. and Martini A. 2001. Large scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii*, and *Pichia anomala* toxin activity against pathogenic yeasts. *Medical Mycology* 39: 479-482.
- Buzzini P. and Martini A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology* 93: 1020-1025.
- Buzzini P., Branda E., Goretti M. and Turchetti B. 2012. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology* 82: 217-241.
- Cabañas R., Castella G., Abarca M. L., Bragulat M. R and Cabañas F.J. 2009. Thiabendazole resistance and mutations in the β tubulin gene of *Penicillium expansum* strains isolated from apples and pears with blue mold decay. *FEMS Microbiology Letters* 297: 189-195.
- Caiazza R., Kim K.Y. and Xiao C.L. 2014. Occurrence and Phenotypes of Pyrimethanil Resistance in *Penicillium expansum* from Apple in Washington State. *Plant Disease* 98, 7: 924-928.
- Calvente V., Benuzzi D. and de Tosetti M.I. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 43: 167-72.
- Campana B.M.R. 2007. Índices de madurez, cosecha y empaque de frutas. In: Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Editor: Sozzi G. O. 1ra. Edición. Editorial Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires. 805 pp.

- Cao S., Yuan Y., Hu Y. and Zheng Y. 2010. Combination of *Pichia membranifaciens* and ammonium molybdate for controlling blue mould caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology* 141: 173-176.
- Cao S., Zheng Y., Tang S. and Wang K. 2008. Improved control of anthracnose rot in loquat fruit by a combination treatment of *Pichia membranifaciens* with CaCl₂. *International Journal of Food Microbiology* 126: 216-220.
- Card S. D., Walter M., Jaspers M. V., Szejnberg A. and Stewart D. 2009. Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 38: 183-192.
- Casadevall A. and Pirofski L. 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *Journal of Infectious Diseases* 184: 337-344.
- Castañeda R. 2004. Actualización en los sistemas de clasificación e identificación de hongos hifomicetes. INIFAT-Cuba. MCT, INIA, Maracaibo, Venezuela. 61 pp.
- Castoria R., Caputo L., De Curtis F. and De Cicco V. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. *Phytopathology* 93: 564-572.
- Castoria R., De Curtis F., Lima G. and 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.
- Castoria R., de Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S. and de Cicco V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30), antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its mode of action. *Postharvest Biology and Technology* 32: 717-724.
- Chan Z. 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.
- Chanchaichaovivat A., Panijpan B. and Ruenwongsa P. 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biological Control* 47: 207-215.
- Chand-Goyal T. and Spotts R.A. 1996a. Control of Postharvest Pear Diseases Using Natural Saprophytic Yeast Colonists and Their Combination With a low Dosage of Thiabendazole', *Postharvest Biology and Technology* 7: 51-64.
- Chand-Goyal T. and Spotts, R.A. 1996b. Enumeration of bacterial and yeast colonists of apple fruits and identification of epiphytic yeasts on pear fruits in the Pacific Northwest United States. *Microbiological Research* 151: 427-432.
- Chand-Goyal T. and Spotts R.A. 1997. Biological control of post harvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biological Control* 10: 199-206.
- Charoenchai C., Fleet G. and Henschke P.A. 1998. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 283-288.

- Chen S., Muller M., Zhou Z., Wright L. and Sorrell T. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *Journal of Infectious Diseases* 175: 414-420.
- Chen X., Romaine Q., Tan Q., Schlaghauger B., Ospira – Giraldo M., Royse D. and Huff D. 1999. PCR-Based genotyping of epidemic and preepidemic *Trichoderma* isolates associated with green mold of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2674-2678.
- Chet I., Benhamou N. and Haran S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. Vol. 2. G. E. Harman and C. P. Kubicek, eds. Taylor and Francis, London 137-160 pp.
- Chiririboga M.A., Soria Y., Larrigaudière C. and Recasens I. 2008. Aplicación poscosecha de 1-metilciclopropeno en pera. *ITEA* 104, 1:12-30. Disponible on line: http://citarea.citaaragon.es/citarea/bitstream/10532/1230/1/10532-1074_2.pdf
- Churchill B.W. 1982. Mass production of microorganisms for biological control. In R. Charudattan & H. L. Walker (Eds.), *Biological control of weeds with plant pathogens* (pp. 139–156). New York: Wiley.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F. and Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- Coley-Smith J.R., Verhoeff K. and Jarvis W. R. 1980. *The Biology of Botrytis*. Academic Press.
- Colodner A., Araque L. y Satragni D. 2013. Productos fitosanitarios para poscosecha de peras y manzanas. Temporada 2013-2014. Informe elaborado por INTA Alto Valle, CIATI y CAFI. Disponible on line: <http://inta.gob.ar/documentos/productos-fitosanitarios-para-poscosecha-de-peras-y-manzanas/> (17 de marzo de 2014)
- Connick W.J., Daigle D.J., Boyette C.D., Williams K.S., Vinyard B.T. and Quimby P.C. Jr. 1996. Water activity and other factors that affect the viability of *Colletotrichum truncatum* conidia in wheat flour-kaolin granules. *Pest* 6: 277-84.
- Conway W. 1982. Effect of postharvest calcium treatment on decay of Delicious apples. *Plant Systematic*. 66: 402-403.
- Conway W., Gross K.C., Boyer C. D. And Sams C. E. 1988. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology* 78: 1052-1055.
- Conway W., Sams J., Abbott J. and Bruton B. D. 1991. Postharvest treatment of apple fruit provides broad-spectrum protection against postharvest pathogens. *Plant Disease* 75: 620-622.
- Conway W.S., Sams C.E., McGuire R.G. and Kelman A. 1992. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay. *Plant. Disease* 76: 329-334.
- Costa E., Usall J., Teixidó N., Garcia N. and Viñas I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* 89: 793-800.

- Costa E., Teixidó N., Usall J., Atarés E. and Viñas I. 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* Strain CPA-2 using comercial products and by-products. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 367-371.
- Costa E., Teixidó N., Usall J., Fons E., Gimeno V., Delgado J. and Viñas I. 2002. Survival of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 in a spray-drying process. Journal of Food Protection 65: 185-191.
- Creemers P. 1998. Lutte contre les maladies de conservation: situation actuelle et perspectives nouvelles. Le Fruit Belge 49: 472-37.
- Cross J.V. (ed) 2002. Guideline for integrated production of pome fruits in Europe. 3rd edition. IOBC wprs Bulletin. 45 pp.
- Crueger W. Y Crueger A. 1993. Biotecnología: manual de microbiología industrial. Editorial Acribia, Zaragoza. 413 pp.
- Cruickshank R.H. and Pitt J.I., 1987. Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* by enzyme electrophoresis. Mycology 79: 614-620.
- D'Elia T., Veerapaneni R., Theraisnathan V. and Rogers S.O. 2009. Isolation of Fungi From Lake Vostok Accretion Ice. Mycology 1016: 751-763.
- Davenport R.R. 1976. Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. In: Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Eds. Dickerson C. H. and Preece T. F. Academic Press, London. pp. 325-359.
- Davidse L.C. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. Annual Review Phytopathology 24: 43-65.
- de Llanos R., Fernández - Espinar M. T and Querol A. 2006 A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. Antonie van Leeuwenhoek 90: 221-231.
- Deak T. 2009. Ecology and Biodiversity of Yeasts with Potential Value in Biotechnology. In: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Eds. Satyanarayana T. and Kunze G. Springer Science + Business Media 199-214.
- Dennis C. and Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. Part II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41-48.
- Dhamankar V.S. 1992. Molasses, a source of nutrients for *in vitro* sugar cane culture. Sugar cane 4: 14-15.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dobra A. y Rossini M. 1993. Patógenos postcosecha, aspectos epidemiológicos, resistencia a fungicidas y su control. Pp 1 - 22. In: Curso Internacional de Sanidad en Frutales de Pepita. Editorial INTA Alto Valle. General Roca, Río Negro.
- Dobra A., Di Masi S., Rossini M. and Engler D. 1995. *Penicillium* Species of Postharvest Diseases of Pome Fruit in Argentine. European Journal of Plant Pathology. Abs, 1345.

- Dobra A., Rossini M., Barnes N and Sosa M. C. 2007. In: Árboles Frutales. Ecología, cultivo y aprovechamiento. Editor: Sozzi G. Editorial Facultad de Agronomía. UBA. Manejo Integrado de enfermedades de los frutales de Pepita. 599-608.
- Dobra A.C., Sosa M.C. and Dussi, M.C. 2008. Low Incidence of Fungal and Bacterial Diseases in the Pear Production of North Patagonia, Argentina. *Acta Horticulturae* 800: 907-912.
- Doores S. 1983. The microbiology of apples and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 19:133-149.
- Drake S.R., Elfving D.C., Drake S.L. and Visser D.B. 2004. Quality of modified atmosphere packaged 'bartlett' pears as influenced by time and type of storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 28, 5: 348-358.
- Droby S. 2006. Yeast *Metschnikowia fructicola* NRRL Y-30752 for inhibiting deleterious microorganisms on plants. US Patent 6994849.
- Droby S. 2006a. Biological Control Of Postharvest Diseases Of Fruits And Vegetables: Difficulties And Challenges. *Phytopathology Poland*. 39: 105-117.
- Droby S. and Lichter A. 2004. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Editors: Elad Y. et al, 349-367.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C. and Wisniewski M. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal Microbiology* 35: 794-800.
- Droby S., Chalutz E. and Wilson C.L. 1991. Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News Information* 2: 169-173.
- Droby S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlendercohen, B., Weiss, B., and Daus, A. 1993. Pilot Testing of *Pichia guilliermondii*, A Biocontrol Agent of Postharvest Diseases of Citrus Fruit. *Biological Control* 3: 47-52.
- Droby S., Cohen L., Daus A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., Keren-Tzur M. and Shachnai A. 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control* 12: 97-101.
- Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., and 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., Macarasin D. and Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52: 137-145.
- Dunlap C.A., Evans K.O., Theelen B., Boekhout T. and Schisler D.A. 2007. Osmotic shock tolerance and membrane fluidity of cold-adapted *Cryptococcus lavescens* OH182.9, previously reported as *C.nodaensis*, a biocontrol agent of *Fusarium* head blight. *FEMS Yeast Research* 7: 449-458.

- Dunne C., Crowley J.J, Moenne-Loccoz, Y., Dowling, D.N., de Bruijn, F.J. and O'Gara F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143: 3921-3931.
- Dupont J., Magnin S., Marti A. and Brousse M. 1999. Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in food industry. *International Journal Food Microbiology* 49: 109-118.
- Eckert J.W. and Ogawa J.M. 1988. The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruit, berries, vegetables and root/tuber crops. *Annual Reviews Phytopathology* 26: 433-469.
- El-Ghaouth A., Wilson C.L. and Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88: 282-291.
- El-Ghaouth A., Smilanick J.L., Brown G., Ippolito A. and Wilson C.L. 2001. Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Biological Control* 20: 96-102.
- El-Ghaouth A., Wilson C.L. and Wisniewski M.E. 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi S.A.M.H. (Ed.), *Diseases of Fruit and Vegetables*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 511-535 pp.
- Ellis M. 2004. *Botrytis* Fruit rot Gray Mold of strawberry, raspberry and blackberry. Extension factsheet. HYG 3017-94. Ohio state Univ. 2 pp.
- Emmons C.W., Binford C.H. and Utz J.P. 1963. *Medical mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Enfors S.O. 2001. Baker's yeast. In: Ratledge, C. and Kristiansen, B. (Eds.), *Basic Biotechnology*, 2nd Ed., Cambridge University Press, UK, pp. 377-389.
- Errampalli D., Wainman L.I. and DeEll J.R. 2012. Reduced risk control options for apple postharvest diseases in long-term storages. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 934:313-318.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. and Querol A. 1999. Identification of Yeasts by RFLP Analysis of the 58S rRNA Gene and Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers. *International Journal Systematic Bacteriology* 49: 329-337.
- Etebarian H.R., Sholberg P.L., Eastwell K.C. and Sayler R.J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal Microbiology* 51: 591-598.
- Falconi C.J. and Mendgen K. 1994. Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum*. *Journal Plant Pathology* 101: 38-47.
- Fallahi E., Conway W., Hickey K. and Sams C. 1997. The role of calcium and nitrogen in postharvest quality and disease resistance of apple. *HortScience*. 35, 5: 831-835.
- Fan Q. and 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.
- FAO/WHO: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations: In. London Ontario, Canada: World Health Organization; 2002.

- Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P. and Rossman A.Y. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Filonow A.B. 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science Technology* 8:243–56.
- Filonow A.B., Vishniac H.S., Anderson J.A. and Janisiewicz W.J. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control* 7: 212-220.
- Fiori S., Fadda A., Giobbe S., Berardi E. and Migheli Q. 2008. *Pichia angusta* is an effective biocontrol yeast against postharvest decay of apple fruit caused by *Botrytis cinerea* and *Monilia fructicola*. *FEMS Yeast Research* 8: 961-963.
- Fiori S., Scherm B., Liu J., Farrell R., Mannazzu I., Budroni M., Maserti B.E., Wisniewski M.E. and Migheli Q. 2012. Identification of differentially expressed genes associated with changes in the morphology of *Pichia fermentans* on Apple and peach fruit. *FEMS Yeast Research* 12: 785-795.
- Floréz A.B, Álvarez-Martín P., López-Díaz M.T. and Mayo B. 2007. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. *International Dairy Journal* 17: 350-357.
- Fonseca Á. and Inácio J. 2006. Phylloplane yeasts. *In* The yeasts handbook. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Edts Rosa C.A. and Péter G. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 263-302.
- Food and Drug Administration U.S.; Protecting and Promoting Your Health. 2013. Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm> Consultado 8 de abril 2014.
- FRAC Code List 2013: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Fungicide Resistance Action Committee. 10 pp. Disponible on line: <http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC%20Code%20List%202013-update%20April-2013.pdf>
- Freudlund E., Druvefors U., Boysen M.E., Lingsten K. and Schnürer J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research* 2: 395-402.
- Friel D., Gomez Pessoa N.M., Vandenbol M. and Jijakli M.H. 2007. Separate and combined disruptions of two exo-β-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Molecular Plant – Microbe Interaction* 20: 371-379.
- Frisvad J.C. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric penicillia. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 568-579.
- Frisvad J.C. and Filtenborg O. 1989. Terverticillate Penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycology* 81: 837-861.

- Frisvad J.C. and Samson, R.A. 2004. Polyphasic Taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A Guide to Identification of Food and Air-borne terverticillate Penicillia and Their Mycotoxins, in Studies in mycology, 49: 1-174.
- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O. and Samson R.A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Studies in mycology. 49: 201-241.
- Galvagno M. y Cerrutti P. 2004. Aumento de la actividad panificante de levaduras comerciales por aplicación de condiciones de estrés durante su propagación. Revista Argentina. Microbiologia 34: 41-46.
- Gerhardson B. 2002. Biological substitutes for pesticides. TRENDS in Biotechnology 20, 8: 338-43.
- Gholamnejad J., Etebarian H.R. and Sahebani N. 2010. Biological Control of Apple Blue Mold With *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal Food Science 4: 1-7.
- Gibbins L.N. 1978. *Erwinia herbicola*: a review and perspective. In Proceedings of International Conference of Plant Pathology Bacteria 2: 403-431.
- Gildemacher P., Heijne B., Silvestri M., Houbraken J., Hoekstra E., Theelen B. and Boekhout T. 2006. Interactions between yeasts, fungicides and apple fruit russetting. FEMS Yeast Research 6: 1149-1156.
- Giobbe S., Marceddu S., Scherm B., Zara G., Mazzarello V., Budroni M. and 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 Research 7: 1389-1398.
- Giraud M. and Fauré J. 2000. Assessment of *Penicillium* risk on pome fruit in storage. In: Proceedings of the 5th Workshop on Integrated Control of Pome Fruit Diseases, Fontevraud (France). 24–27 August 1999. Bordeaux: EFPP Group, 153–8. (International Organisation for Biological Control/ WPRS Bulletin 23.)
- Goksungur Y., Mantzouridou F. and Roukas T. 2002. Optimization of b-Carotene From Molasses by *Blakeslea tripora*: A Statistical Approach. Journal Chemical Technology 77: 33-943.
- Gómez-Pastor R., Pérez-Torrado R., Garre E. and Matallana E. 2011. Recent Advances in Yeast Biomass Production. In: Biomass - Detection, Production and Usage. Ed. Darko Matovic, Publisher: InTech. 201-222.
- Granado J., Thürig B., Kieffer E., Petrini L., Fließbach A, Tamm L., Weibel F. P. and Wyss G.S. 2008. Culturable Fungi of Stored 'Golden Delicious' Apple Fruits: A One-Season Comparison Study of Organic and Integrated Production Systems in Switzerland. Microb Ecol. 56: 720-732.
- Grevesse C., Lepoivre F. and Jijakli M.H. 2003. Characterization of the Exoglucanase-Encoding Gene aEXG2 and Study of Its Role in the Biocontrol Activity of *Pichia anomala* Strain K. Phytopathology 93: 1145-1152.

- Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y., Fischer E. and Dinor A. 2002. Improving Biological Control by Combining Biocontrol Agents Each with Several Mechanisms of Disease Suppression. *Phytopathology* 92: 976-985.
- Guinebretiere M., Nguyen-The C., Morrison N., Reich M. and Nicot P. 2000. Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal Food Protection* 63: 386-394.
- Hanzen K.C. 1995. New and Emerging Yeast Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 462-478.
- Hashem M. and Alamri S. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biology and Technology* 53: 123-130.
- Heard G.M. and Fleet G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 23-28.
- Helbig J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *BioControl* 47: 85-99.
- Heungens K. and Parke J.L. 2001. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMD. *Phytopathology* 91: 383-391.
- Hollier C.A. and King S.B. 1985. Effects of temperature and relative humidity on germinability and infectivity of *Puccinia polysora* uredospores. *Plant Disease* 69: 937-939.
- Holmes R. 1990. An Analysis of post-harvest losses in the Victorian Pomefruit Industry. Victoria Dep. Ag. & Rurl Affairs Rept. 115.
- Howard C., Mass J., Chandler C. and Albregts E. 1992. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease*. 76: 976-981.
- Ibrahim A.S., Mirbod F., Filler S.G., et al. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 63: 1993-1998.
- Ingraham J.L. 1962. Temperature relationships. In: Gunsalus, I.C., Stanier, R.Y (Eds). *The Bacteria*. IV, 265-296. New York and London, Academic Press.
- Ippolito A. and Nigro F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19: 715-723.
- Irfan P.K., Vanjakashi V., Keshava Prakash M.N., Ravi R. and Kudachikar V.B. 2013. Calcium Chloride extends the keeping quality of fig fruit (*Ficus carica*) during storage and shelf-life. *Postharvest Biology and Technology* 82: 70-75.
- Izgu D.A., Kepekci R.A. and Izgu F. 2011. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *in vitro* and *in planta* with *Panomyocin*, a novel exo-b-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 85-91.
- Jackson M.A., Frymier J.S., Wilkinson B.J., Zorner P. and Evans S. 1998. Growth requirements for production of stable cell of the bioherbicidal bacterium *Xanthomonas campestris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21: 237-241.

- Jamalizadeh M., Etebarian H.R., Aminian H. and Alizadeh A. 2011. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Bulletin OEPP/EPPO* 41: 65-71.
- Janisiewicz W.J. and 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. and Marchi A. 1992. Control of Storage Rots on Various Pear Cultivars with a Saprophytic Strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease* 76: 555-560.
- Janisiewicz W.J., Usall J. and Bors B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology* 82: 1364-1370.
- Janisiewicz W.J. 1994. Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D- glucose on apples and pears. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2671-2676.
- Janisiewicz W.J. and Bors B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3261-3267.
- Janisiewicz W.J. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology* 86: 473-479.
- Janisiewicz W.J. 1997. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruit. In: G. J. Boland & L. D. Kuykendall (Eds.), *Plant-microbe interactions and biological control*. New York: Marcel Dekker. 171-198.
- Janisiewicz W.J. 1998. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits challenges and opportunities. In: *Plant-Microbe Interactions and Biological Control* (eds.) G.J. Boland and L.D. Kuykendall, Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 171-197.
- Janisiewicz W.J. 1999. Blue mold, *Penicillium spp.* *Fruit Disease Focus*, [<http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/>]
- 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., Tworkoski T.J. and Kurtzman C.P. 2001. Biocontrol Potential of *Metchnikowia pulcherrima* Strains Against Blue Mold of Apple'. *Phytopathology* 91: 1098-1108.
- Janisiewicz W.J. and Korsten L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annual Review Phytopathology* 40: 411-441.
- Janisiewicz W.J., Peterson D.L., Yoder K.S. and Miller S.S. 2005. Experimental bin drenching system for testing biocontrol agents to control postharvest decay of apples. *Plant Disease* 89: 487-490.
- Janisiewicz W.J., Saftner R.A., Conway W.S. and Yoder K.S. 2008. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology* 49: 374-378.

- Janisiewicz W.J and Conway W.S. 2010. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. Stewart Postharvest Solutions (UK) Ltd. Online ISSN: 1945 - 9656
- Janisiewicz W.J., Kurtzman C.P. and Buyer J.S. 2010. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast* 27: 389-398.
- Janisiewicz W.J. 2010. Quo vadis of biological control of postharvest diseases. In: *Postharvest Pathology*, Prusky D. and Gullino M.L (Eds.), Springer Science, New York 137-148.
- Janisiewicz W.J. and Buyer J.S. 2010. Culturable bacterial microflora associated with nectarine fruit and their potential for control of brown rot. *Canadian Journal of Microbiology* 56, 6: 480-486.
- Janisiewicz W.J. Pimenta, R.S. and Jurick W.M. 2011. A Novel Method for Selecting Antagonists Against Postharvest Fruit Decays Originating From Latent Infections. *Biological Control* 59: 384-389.
- Jarvis W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species; taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15, Canadian Department of Agriculture, Ottawa.
- Jijakli M.H., Lepoivre P. and Grevesse C. 1999. Yeast Species for Biocontrol of Apple Postharvest Diseases: an Encouraging Case of Study for Practical Use. In: *Biotechnological Approaches in Biocontrol of Plant Pathogens*. Eds. Mukerji, K.G., Chamola, B.P. and Upadhyay, R.K. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 31-49.
- Jijakli M.H. and Lepoivre P. 1998. Characterization of an exo 1,3 glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology* 88: 335-343.
- Jijakli M.H. and Lepoivre P. 2004. State of the Art and Challenges of Post-harvest Disease Management in Apples. In: *Disease Management of Fruits and Vegetables*. Ed. K.G. Mukerji. Kluwer Academic Publishers. Netherlands 59-94.
- Jijakli H.M. 2011. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 93-105.
- Jiménez M., Mateo R., Querol A., Mateo J. and Hernandez E. 1990. Differentiation of *Penicillium griseofulvum* Dierckx isolate by enzyme assays and by patulin and griseofulvin analyses. *Appl. Environ Microbiol* 56: 3718-3722.
- Johnson K.B., Stockwell V.O., Sawyer T.L. and Sugar D. 2000. Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple. *Phytopathology* 90: 1285-1294.
- Jones A.L. and Aldwinckle H.S. (eds.) 1990. *Compendium of apple and pear diseases*. APS Press, pp 100.
- Jurick W.M., Vico I., McEvoy J.L., Whitaker B.D., Janisiewicz W. and Conway W.S. 2009. Isolation, purification, and characterization of a polygalacturonase produced in *Penicillium solitum*-decayed 'Golden Delicious' apple fruit. *Phytopathology* 99: 636-641.
- Kader A.A. 1985. Postharvest biology and technology: An overview. In: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Published by University of California 5-25.

- Kamel S. M. and Kawano, T. 1986. Studies on mass culture of marine yeast *Candida* sp. for feeding zooplankton and shrimp larvae. Proc. Symp. Coastal. Aquaculture. 4: 1217-1227.
- Kanapathipillai V.S. 1988. Nonchemical control of *Colletotichum musae*, the anthracnose pathogen of banana. Proceedings 5th International Congress of Plant Pathology 422 pp.
- Kang C.K., Park H.Y., Kim M.C. and Lee W.J. 2006. Use of marine yeasts as an available diet for mass cultures of *Moina macrocopa*. Aquaculture Research. 37: 1227-1237.
- Karabulut O.A., Smilanick J.L., Gabler F.M., Mansour M. and Droby S. 2003. Nearharvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. Plant Disease 87, 11: 1384-1389.
- Kaur P. and Satyanarayana T. 2005. Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. Process Biochemistry 40: 3095-3102.
- Kennedy M. and Krouse D. 1999. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 23: 456-475.
- Khazaeli P., Zamanizadeh H., Morid B. and Bayat H. 2010. Morphological and Molecular Identification of *Botrytis cinerea* Causal Agent of Gray Mold in Rose Greenhouses. In Central Regions of Iran. International Journal of Agricultural Science and Research 1: 19-24.
- Kinay P. and Yildiz M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. Biological Control 45: 433-40.
- Koomen I. and Jeffries P. 1993. Effects of antagonistic microorganisms on the postharvest development of *Colletotichum gloeosporioides* on mango. Plant Pathology 42: 230-237.
- Korsten L. 2006. Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. International Journal of Postharvest Technology and Innovation 1: 48-61.
- Kurtzman C.P. and Robnett C.J. 1998. Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts From Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences. Antonie van Leeuwenhoek 73: 331-371.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. and Boekhout T. 2011. The Yeasts: a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, pp 2080
- Larena I., Torres R., De Cal A., Liñán M., Melgarejo P., Domenichini P., et al. 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia spp.*) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. Biological Control 32: 305-310.
- Las cadenas de valor de manzanas, peras y limones en Argentina. Documento de trabajo Año 17 – Edición n° 110. Instituto de Estudios sobre la Realidad Argentina y Latinoamericana (IERAL) de Fundación Mediterránea. Dirección Marcelo L. Capello. Dirección Nacional del Derecho de Autor Ley N° 11723 - N° 2328, Registro de Propiedad Intelectual (en trámite). ISSN N° 1667-4790.
- Lazazzera B.A. 2005. Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. Current Opinion in Microbiology 8: 222-227.

- Lee I.Y., Kim J.H., Seo W.T., Jung J.K, Lee H.W. and Park Y.H. 1991. Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess engineering* 20: 283-287.
- Lennox C.L. and Spotts R.A. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 87: 645-649.
- Lennox C.L., Spotts R.A. and Cervantes L.A. 2003. Populations of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* spp on Pear Fruit, and in Orchards and Packinghouses, and Their Relationship to Postharvest Decay. *Plant Disease* 87: 639-644.
- Leroux P. 2007. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad et al. (eds.). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides 195-222.
- Leroux P. and Clerjeau M. 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Protection* 4:137-160.
- Leroux P., Fritz R., Debieu Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M. and Chapeland F. 2002. Mechanism of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58: 876-888.
- Lewis J.A. 1991. Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. *Beltsville Symposia in Agricultural Research* 14: 279-287.
- Lewis J.A. and Papavizas G.C. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Protection* 10: 95-102.
- Li H.X. and Xiao C.L. 2008. Characterization of Fludioxonil-Resistant and Pyrimethanil-Resistant Phenotypes of *Penicillium expansum* from Apple. *Phytopathology* 94, 4: 427-435.
- Lievensen L.C. and van't Riet K. 1994. Convective drying of bacteria. II. Factors influencing survival. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 51: 72-89.
- Lillbro M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roquefortii* on grain a comparison of mode of action of several yeast species. Master thesis for the Agriculture Programme, animal science, performed at the Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Sciences, 21 pp.
- Lima G., De Curtis F., Castoria R. and de Cicco V. 1998. Activity of Two Yeast *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* Against Postharvest Rots on Different Fruits. *Bioscience Science Technology* 8: 257-267.
- Lima G., De Curtis F., Piedimonte D., Spina A. M. and De Cicco V. 2006. Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 40:301-307.
- Lima J.R., Gondim D.M.F., Oliveira J.T.A., Oliveira F.S.A., Goncalves L.R.B. and Viana F.M.P. 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology* 83: 58-64.
- Lindow S.E. and Brandl M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4: 1875-1883.

- Liu H.M., Guo J.H., Luo L., Liu P., Wang B.Q., Cheng Y.J., Deng B.X. and Long C.A. 2010. Improvement of *Hanseniaspora uvarum* biocontrol activity against gray mold by the addition of ammonium molybdate and the possible mechanisms involved. *Crop Protection* 29: 277-282.
- Liu J., Michael W., Droby S., Vero S., Tian S. and Hershkovitz V. 2011. Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatum*. *International Journal of Food Microbiology* 146: 76-83.
- Liu J., Tian S. P, Li B. Q. and Qin G.Z. 2009. Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *BioControl* 54: 817-824.
- Liu J., Wisniewski M., Droby S., Norelli J., Hershkovitz V., Tian S. and Farrell R. 2012. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 578-590.
- Liu J., Sui Y., Wisniewski M., Droby S. and Liu Y. 2013a. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit, *International Journal of Food Microbiology* 167, 2:153-160.
- Liu J., Wisniewski M., Artlip T., Sui Y., Droby S. and Norelli J. 2013b. The potential role of PR-8 gene of apple fruit in the mode of action of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, in postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 85: 203-209.
- Liu P., Luo L. and Long C. 2013c. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. *Biological Control* 67: 157-162.
- Long C.A., Deng B.X. and Deng X.X., 2006. Pilot testing of *Kloeckera apiculata* for the biological control of postharvest diseases of citrus. *Annals of Microbiology* 56: 13-17.
- Long C.A., Deng B.X. and Deng X.X., 2007. Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34-9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. *Annals of Microbiology* 57: 203-207.
- López-García B., Veyrat A. and Pérez-Payá E. 2003. Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 89: 163-170.
- Lorenz G. 1988. Dicarboximide fungicides: History of resistance development and monitoring methods. In: *Fungicide Resistance in North America*. C. J. Delp, ed. American Phytopathological Society, St Paul, MN. 45-51.
- Lorito M., Hayes C.K., Di Pietro A., Woo S.L., and Harman G.E. 1994. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an *N*-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 398-405.
- Lugtenberg B. and Leveau J. 2007. Biocontrol of plant pathogens: principles, promises, and pitfalls. In: Pinton R, Varanini Z., Nannipieri P. (eds) *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, pp 267-296.

- Lund F. 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology* 20: 228-231.
- Macarasin D., Droby S., Bauchan G. and Wisniewski M. 2010. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biology and Technology* 58: 194-202.
- Mackenzie K.F., Singh K.K. and Brown A.D. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 134: 1661-1666.
- Magan N. 2001. Physiological approaches to improving ecological fitness of biocontrol agents. Chapter 9 in *Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, eds. T. Butt, C. Jackson & N. Magan. Cabi BioSciences 239-252.
- Manso T. and Nunes C. 2011. *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 61: 64-71.
- Manso T., Nunes C., Raposo S. and Costa M. E. 2010. Carob pulp as raw material to produce the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* PBC-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 11: 1145-1155.
- 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.
- Margesin R. 2009. Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles* 13: 257-262.
- Margesin R., Gander S., Zacke G., Gounot A.M. and Schinner F. 2003. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles* 7:451-458.
- Mari M., Bertolini P. and Pratella G.C. 2003. Non-conventional Methods for the Control of Post-harvest Pear Diseases. *Journal Applied Microbiology* 94: 761-766.
- Mari M., Guizzardi M. and Pratella G. C. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biological Control* 7: 30-37.
- Marmé D. and Dieter P. 1983. Role of Ca and calmodulin in plants. In: W. Y. Cheung (ed). *Calcium and cell function*. Academic, New York. 264-311.
- Masih E.I. and Paul B. 2002. Secretion of β -1,3-glucanase by the Yeast *Pichia membranifaciens* and Its Possible Role in the Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Grey Mould of Grapevine. *Current Microbiology* 44: 391-395.
- Masih E.I., Slezack-Deschaumes S., Marmaras I., Ait Barka E., Vernet G., Charpentier C., Adholeya A. and Paul B. 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters* 202: 227-232.
- Mass J. Ed. 1998. *Compendium of strawberry diseases*. 2 nd ed. St. Paul. The American Phytopathological Society. 138 pp.

- Mateles R.I. 1971. Calculation of oxygen required for cell production. *Biotechnology and Bioengineering* 13: 581-582.
- McCusker J.H., Clemons K.V., Stevens D.A. and Davis R.W. 1994. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics* 136: 1261-1269.
- McLaughlin R.J., Wilson C.L., Chalutz E., Kurtzman W.F., Osman S.F. 1990. Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 56: 3583-3586.
- Melin P., Hakansson S., Eberhard T.H. and Schnurer J. 2006. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology* 100: 264-271.
- Melin P., Schnurer J. and Hakansson S. 2011. Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 1: 107-112.
- Melin P., Sundh I., Hakansson S. and Schnurer J. 2007. Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal organisms: safety and formulation aspects. *Biotechnology Letters* 298: 1147-1154.
- Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J., Heath, M.C. 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant Journal* 29: 257-268.
- Mercier J. and Jiménez J.I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology* 31: 1-8.
- Mercier J. and Wilson C.L. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control* 4: 138-144.
- Milagres A. M., Machuca A. and Napoleão D. 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.
- Mitchell T.G. and Perfect J.R. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 Years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 515-548.
- Mossel D.A. and Moreno G. 1982. Alteraciones de los alimentos por microorganismos. In: *Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y calidad de los alimentos*. 3ra. Edición. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Muhlschlegel F.A. and Fonzi W.A. 1997. *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Molecular Cellular Biology* 17: 5960-5967.
- Nanda A.K., Andrio E., Marino D., Pauly N. and Dunand C. 2010. Reactive oxygen species during plant–microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 195-204.
- Nash G., Foley F.D., Goodwin M.N. Jr., Bruck H.M., Greenwald K.A. and Pruitt B.A. Jr. 1971. Fungal burn wound infection. *JAMA* 215: 1664-1666.

- Nigan N. and Mukerji K. G. 1988. Biological control. Concepts and practice. *In: Biocontrol of Plant Diseases*. Vol. 1. Mukerji K. G. and Garg K. L. (Eds.). CRC Press Boca Ratón. EE.UU. 1-13.
- Nobile C.J. and Mitchell A.P. 2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm Formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Current Biology* 15: 1150-1155.
- Nunes C., Usall J., Teixidó N., Miro M. and Vinas I. 2001. Nutritional enhancement of biocontrol activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears. *European Journal of Plant Pathology* 107: 543-551.
- Nunes C., Usall J., Teixidó N., Abadias M. and Vinas I. 2002a. Improved control of postharvest decay of pears by the combination of *Candida sake* (CPA- 1) and ammonium molybdate. *Phytopathology* 92: 281-287.
- Nunes C., Usall J, Teixidó N and Vinas I. 2002b. Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against post-harvest decay by the addition of ammonium molybdate. *Journal of Applied Microbiology* 92: 927-935.
- Nunes C.A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal Plant Pathology* 133: 181-196.
- Nunes J.M., Bizerra F. C., Carmona R. and Colombo A. L. 2013. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 382-389.
- Ortu G., Demontis M. A., Budroni M., Goyard S., d'Enfert C. and Migheli Q. 2005. Study of biofilm formation in *Candida albicans* may help understanding the biocontrol capability of a flor strain of *Saccharomyces cerevisiae* against the phytopathogenic fungus *Penicillium expansum*. *Journal Plant Pathology* 87: Special issue: 300 (abstract).
- Oura E. 1974. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. *Factors affecting the type of metabolism*. *Biotechnology and Bioengineering* 16, 9:1197-1212.
- Palou L. 2009. Control of citrus postharvest diseases by physical means. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 3: 127-142.
- Papavizas G.C., Dunn M.T., Lewis J.A. and Beagle - Ristaino J. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74: 1171-1175.
- Parker K.C. and Sutton T.B. 1993. Effect of temperature and wetness duration on apple fruit infection and eradicant activity of fungicides against *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 77: 181-185.
- Parry R.T. 1995. *Envasado de los alimentos en atmósferas modificada*. Madrid, España; Madrid Vicente Ediciones 15-150 pp.
- Pássaro Carvalho C.P., Nunes C. and Palou L. 2012. Control de enfermedades de poscosecha. Pp 285 – 305. Disponible on line: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/567/1/CAPITULO%2010.pdf> (20 de marzo de 2014).

- Patiño-Vera M., Jiménez B., Balderas K., Ortiz M., Allende R., Carrillo A., and Galindo E. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology* 99, 3: 540-550.
- Peigham-Ashnaei S., Sharifi-Tehrani A., Ahmadzadeh M. and Behboudi K. 2009. Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould apple. *Journal of Plant Pathology* 91: 65-70.
- Pelliccia C., Antonielli L., Corte L., Bagnetti A., Fatichenti F. and Cardinali G. 2011. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. *Annual of Microbiology* 61, 4: 965-972.
- Peña C. y Arango R. 2009. Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Dyna. Medellín.issn 0012-7353*. 76, 159: 153-161.
- Peppler H.J. 1982. Yeast extracts. *In Fermented foods. Edited by A.H. Rose. Academic Press, London, UK* 293-312.
- Piano S., Neyrotti V., Migheli Q. and Gullino M.I. 1997. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology* 11: 131-140.
- Pianzola M.J., Moscatelli M. and Vero S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease* 88: 23-28.
- Pimenta R.S., Morais P.B, Rosa C.A. and Corrêa Jr. A. 2009 .Utilization of Yeasts in Biological Control Programs. *In: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Eds. T. Satyanarayana, G. Kunze Springer Science + Business Media* 199-214
- Pitt J.I.1979. The Genus *Penicillium* and its Teliomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Academic Press, Inc., London*.
- Pitt J.I. 1988. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, 2 nd. CSiro Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia.
- Pitt J.I., Spotts R.A., Holmes R.J. and Cruickshank, R.H. 1991. *Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit. *Phytopathology* 81: 1108-1112.
- Ponrose L.J., Nicholls M.R. and James L. 1984. The relative importance of *Penicillium verrucosum* and *P. expansum* as the cause of mould of pome fruits and the reaction to benomil. *In: New South Wales Departament of Agriculture, Biology Brancha. Plan Disease Survey*. 15-171.
- Poovaliah B.W., Glenn G.M. and Reddy A.S.N. 1988. Calcium and fruit softening: Physiology and biochemistry. *Horticultural Reviews* 107-152.
- Prakitchaiwattana C., Fleet G. and Heard G. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4: 865-877.
- Precht H., Christophersen J., Hensel H. and Larcher W. 1973. *Temperature and life. Heidelberg, Springer*.

- Prokopy R.J. 2003. Two decades of bottom-up, ecologically based pest management in a small commercial apple orchard in Massachusetts. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 94:299–309.
- Propuestas para una Fruticultura Sustentable. 2013. Provincia de Rio Negro. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Secretaria de Fruticultura. Fundación Barrera Patagónica. On line: <http://www.funbapa.org.ar/2014/02/region-protegida-comercializo-1-381-000-tns-de-peras-y-manzanas-en-2013/> 11 de marzo de 2014.
- Pusey P.L. and Wilson C.L., 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68: 753-756.
- Qin G., Tian S. and Xu Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 31: 51-58.
- Querol A. and Fleet G.H. 2006. *The Yeast Handbook Yeasts in Food and Beverages*, Germany: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 452 pp.
- Raaska L. and Mattila-Sandholm T. 1995. Effects of iron level on the antagonistic action of siderophores from non-pathogenic *Staphylococcus* spp. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 15: 480-485.
- Reed G. and Nagodawithana T.W. 1991. *Yeast Technology*. New York: Van Nostrand Reinhold. 2da Ed. Avi. 454 pp.
- Renwick A., Campbell R. and Coe S. 1991. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology* 40: 524-532.
- Richer D.L. 1987. Synergism: a patent view. *Pesticide Science* 19: 309-315.
- Rigbi G.J. 1981. An Egg-yolk Agar Diffusion Assay for Monitoring Phospholipase C in Cultures of *Clostridium welchii*. *Journal of Applied Bacteriology* 50: 11-19.
- Rinaldi M.G. 1993. Biology and pathogenicity of *Candida* species. In G. P. Bodey (ed.), *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. p. 1-20. Raven Press, New York.
- Riquelme M. 1996. Fungal siderophores in plant-microbe interactions. *Microbiologia Sem* 12: 537-546.
- Roberts R.G. 1990a. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80: 526-530.
- Roberts R.G. 1990b. Biological control of *Mucor* rot of pear by *Cryptococcus laurentii*, *C. flavus*, and *C. albidus*. *Phytopathology* 80: 1051-1154.
- Robiglio A., Sosa M.C., Lutz M.C., Lopes C.A. and Sangorrín M.P. 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *International Journal of Food Microbiology* 147: 211-216.
- Rodov V., Ben-Yehoshua S., D'hallewin G., Castina T. and Farg, D. 1994. Accumulation of the phytoalexins, scoparone and scopoletine in citrus fruit subjected to various postharvest treatments. *Int. Symp. Nat. Phenols Plant Resist. Acta Horticultureae* 381:517-525.
- Rosenberger D.A. 2009. Fungicides, Biocides, and Sanitizers for Managing Postharvest Pathogens in Apples. *New York Fruit Quarterly* 17, 3: 3-7.

- Rosenberger D.A., Wicklow D.T., Korjagin V.A. and Rondinaro S.M. 1991. Pathogenicity and benzimidazole resistance in *Penicillium* species recovered from flotation tanks in Apple packinghouses. *Plant Disease* 75: 712-715.
- Rossi M., Buzzini M., Cordisco L., Amaretti A., Sala M., Raimondi S., Ponzoni C., Pagnoni U.M. and Matteuzzi D. 2009. Growth, lipid accumulation, and fatty acids composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiology Ecology* 69: 363-372
- Salem E.A. and Moussa Z. 2014. Improvement Shelf-Life Extension of Apple by Prestorage Thermal Treatment, CaCl₂ and Gamma Irradiation. *Arab Journal of Nuclear Science and Applications* 47, 1: 181-188.
- Saligkarias I.D, Gravanis F.T. and Eptona H.A.S. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182. *Biological Control* 25: 143-150.
- Sanderson P.G. and Spotts R.A. 1995. Postharvest decay of Winter pear and Apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology* 85: 103-110.
- Sanderson P. G. 2000. Management of decay around the world and at home. 16th Annual Postharvest Conference, Yakima, WA. <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pull.php?&article=PC2000Z&position=4>
- Sangorrín M., Zajonskovsky I., Lopes C., Rodríguez M., van Broock M. and Caballero A. 2001. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *Journal of Basic Microbiology* 41: 105-113.
- Sangorrín M.P., Lopes C.A., Giraud R.M. and Caballero A.C. 2007. Diversity and Killer Behaviour of Indigenous Yeasts Isolated From the Fermentation Vat Surfaces in Four Patagonian Wineries', *International Journal of Food Microbiology* 119: 351-357.
- Santos A. and 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.
- Santos A., Sanchez, A. and Marquina, D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159: 331-338.
- Santos A., San Mauro M., Bravo E. and Marquina D. 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155: 624-634.
- Sanzani S.M., Nigro F., Mari M. and Ippolito A. 2009. Innovations in the Control of Postharvest Diseases of Fresh Fruit and Vegetables. *Arab Journal of Plant Protection* 27: 240-244.
- Saporito-Irwin S.M., Birse C.E., Sypherd P.S. and Fonzi W.A. 1995. *PHR1*, a pH regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 15: 601-613.
- Saravanakumar D., Ciavorella A., Spadaro D., Garibaldi A. and Lodovica Gullino M. 2008. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*

- and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology* 49: 121-128.
- Sarra M., Redin I., Ochin F., Godia F. and Casas C. 1993. Application of factorial design to the optimization of medium composition in batch cultures of *Streptomyces lividans* TK21 producing a hybrid antibiotic. *Biotechnology Letters* 15: 559-564.
- Satyanarayana T. and Kunze G., Germany: Springer Science, Business Media B.V 199-214.
- Scherm B., Ortu G., Muzzu A., Budroni M., Arras G. and Migheli Q. 2003. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology* 85: 205-213.
- Schirra M., D'Aquino S., Cabras P. and Angioni A. 2011. Control of Postharvest Diseases of Fruit by Heat and fungicides: Efficacy, Residue Levels, and Residue Persistence: A Review. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 59: 8531-8542.
- Schisler D. A., Slininger P. J., Behle R. W. and Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus spp.* for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94: 1267-1271.
- Schisler D.A., Janisiewicz W.J., Boekhout T. and Kurtzman C.P. 2011. Agriculturally important yeasts: biological control of field and postharvest diseases using yeast antagonists, and yeasts as pathogens of plants. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) *The Yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam 45-52.
- SchnierdaT., Bauer F. F., Divol B., van Rensburg E. and Gorgens J. F. 2014. Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology* 58: 478-485.
- Scorzetti G., Petrescu I., Yarrow D. and Fell J.W. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp nov, a Xylanase Producing Basidiomycetous Yeast From Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 153-157.
- Seifert K.A. and Louis-Seize G. 2000. Phylogeny and species concepts in the *Penicillium aurantiogriseum* complex as inferred from partial – β -tubulin gene DNA sequences. In: Samson, R.A., Pitt, J.I. (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers, Newark, NJ. 189-198.
- Sela-Buurlage M.B., Ponstein A.S., Bres-Vloemans B., Melchers L.O., van den Elzen P. and Cornelissen B.J.C. 1993. Only specific tobacco chitinases and b-1,3 glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* 101: 857-863.
- Selmer-Olsen E., Birkeland S.E. and Sorhang T. 1999. Effect of protective solutes on leakage form and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *Journal of Applied Microbiology* 87: 429-437.
- Sharf R. and Margalith P. 1983. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 17: 311-313.
- Sharma R., Singh D. And Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50: 205-221.

- Shim J.O, Choi K.D., Hahn K.D., Lee J. H., Hyun I. H., Lee T. S., Ko K.I., Lee H.P. and Lee M.W. 2002. Blue Mold of Pear Caused by *Penicillium aurantiogriseum* in Korea. *Mycobiology* 30: 105-106
- Shiping T., Qing F., Yong X. and Yi W. 2001. Effects of *Trichosporon* sp. in combination with calcium and fungicide on biocontrol of postharvest diseases in apple fruits. *Acta Botanica Sinica* 43, 5: 501-505.
- Shivaji S. and Prasad G.S. 2009. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Eds. Satyanarayana T. and Kunze G. Springer, Berlin, 3-16.
- Sholberg P.L. 2004. Bin and storage room sanitation. Proceedings Washington Tree Fruit Postharvest Conference, Yakima, Washington, USA. <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/PC2004F.pdf>
- Sholberg P.L., Harlton C., Haag P., L'évesque C.A., Gorman D.O. and Seifert K. 2005. Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using β -tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology* 36: 41-49.
- Simon S., Bouvier J.C, Debras J.F and Sauphanor B. 2010. Biodiversity and pest management in orchard systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30:139–152.
- Sitton J. W. and Patterson M. E. 1992. Effect of high-carbon dioxide and low-oxygen controlled atmospheres on postharvest decays of apples. *Plant Disease* 76: 992-995.
- Slininger P., Behle R.W., Jackson M.A. and Schisler D.A. 2003. Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotrop. Entomology* 32: 183-195.
- Smith J.S, Hillier A.J. and Lees G.J. 1975. The nature of simulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extrac. *Journal Dairy Research* 42: 123-138.
- Smith C.M., Trivellas A.E., Johnson L.B.E. and Joshi M.M. 1991. Methods for Monitoring the Sensitivity of a Range of Fungal Pathogens to Benzimidazole Fungicides. FRAC methods for monitoring fungicide resistance. *Bulletin EPPO* 21: 336-341.
- Smith J.E. 2000. Substrates for biotechnology. In *Biotechnology*, 3rd edn pp. 19-26. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Soll D. R. 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 332-370.
- Somer N.F. 1982. Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruit. *Plant Disease* 66: 357-363.
- Sommer N.F. 1985a. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7: 331-339.
- Sommer N.F. 1985b. Principles of disease suppression by handling practices. In: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California Press. 75-82.
- Sommer N.F. 1985c. Strategies for control of postharvest disease of selected commodities. In: *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California Press 83-98.

- Souza C.P., Burbano-Rosero E.M., Almeida B.C, Martins G.G., Albertini L.S. and Rivera N.G. 2009. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25: 2079-2082.
- Spadaro D. and Gullino M.L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91: 185-194.
- Spadaro D., Ciavarella A., Dianpeng Z., Garibaldi A., and Gullino M.L. 2010. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal of Microbiology* 56: 128-137.
- Spencer F. and Spencer D. 1997. Yeasts and the life of man: Part I: helpers and hinderers. "Traditional" yeast-based industries, Spoilage yeasts. In *Yeasts in Natural and Artificial Habitats* ed. Spencer, F. and Spencer, D. pp. 226–242. Berlin, New York: Springer 381 pp.
- Spotts R.A. 1985. Effect of preharvest pear fruit maturity on decay resistance. *Plant Disease* 69: 388-390.
- Spotts R.A. and Cervantes L.A. 1986. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Disease* 70: 106-108.
- Spotts R.A. and Cervantes L.A. 2002. Involvement of *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis* in Russet of d'Anjou Pear Fruit'. *Plant Disease* 86: 625-628.
- Staats M., Baarlen van P. and Kan van A.L.J. 2005. Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22, 2: 333-346.
- Stanbury P.F., Whitaker A. and Hall S.J. 1995. Media for industrial fermentations. In P. F. Stanbury, A. Whitaker, & S. J. Hall (Eds.), *Principles of fermentation technology* (2nd ed., pp. 93–121). Oxford: Perjamon Press.
- Starmer W.T., Fell J.W., Catranis C.M., Aberdeen V., Ma L.J., Zhou S. and Rogers S.O. 2005. Yeasts in the Genus *Rhodotorula* Recovered From the Greenland Ice Sheet. In *Life in Ancient Ice*, New Jersey, eds. J.D. Castello and S.O. Rogers, Princeton: University Press 181-195.
- Starmer W.T. and Lachance M.A. 2011. Yeast ecology. In: *The yeasts: a taxonomic study*. Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W. and Boekhout T. Elsevier, Amsterdam, 65-83.
- Strobel G.A., Dirkse E., Sears J. and Markworth C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147: 2943-2950.
- Sugar D. and Basile S. R. 2008. Timing and sequence of postharvest fungicide and biocontrol agent applications for control of pear decay. *Postharvest Biology and Technology* 49: 107-112.
- Sundh I. and Melin P. 2011. Safety and Regulation of Yeasts Used for Biocontrol or Biopreservation in the Food or Feed Chain. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 113-119.
- Sundin G.W., Werner N.A., Yoder K.S. and Aldwinckle H.S. 2009. Field evaluation of biological control of fire blight in the Eastern United States. *Plant Disease* 93:386-394.

- Suntharalingam P. and Cvitkovitch D.G. 2005. *Quorum sensing* in streptococcal biofilm formation. Trends Microbiology 13: 3-6.
- Tari C., Göğüs N. and Tokatli F. 2007. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. Enzyme and Microbial Technology 40: 1108-1116.
- Teixidó N., Viñas I., Usall J. and Magan N. 1998a. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. Mycological Research 102: 1409-1417.
- Teixidó N., Viñas I., Usall J., Sanchis V. and Magan N. 1998 b. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. Journal of Applied Microbiology 84: 192-200.
- Teixidó N., Cañamás T.P., Torres R., Usall J. and Viñas I. 2010a. Is it possible to improve biocontrol agents to practical applications? The *Pantoea agglomerans* CPA-2 example. In: Environmentally friendly and safe technologies for quality of fruits and vegetables. Ed. Nunes C. ISBN: 978-989-8472-01-4. Faro: Universidade do Algarve pp. 153–161.
- Teixidó N., Usall J., Nunes C., Torres R., Abadias M. and Viñas I. 2010b. Pre-harvest strategies to control postharvest diseases in pome fruits. In D. Prusky & M. L. Gullino (Eds.), Post-harvest pathology Series: Plant Pathology in the 21st Century. 2: 89-106.
- Teixidó N. and Torres R. 2011. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. In: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Editor: Lacroix C. Editorial Woodhead Publishing Limited – Cambridge. 364-402.
- Tellez D. 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín – Industria de Licores del Valle. Universidad del Valle. Tesis pregrado Bacteriología. Facultad de Salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio clínico. Santiago de Cali, Cali, Colombia. 79 pp.
- Temple T.N., Stockwell V.O., Loper J.E. and Johnson K.B. 2004. Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* Strain A506 on flowers of pear and apple. Phytopathology. 94: 1286-1294.
- Testoni A., Aloï C., Mocioni M. and Gullino G.L. 1993. Biological control of *Botrytis* rot of kiwi fruit. Bull. Biological Control/Foliar Postharvest Disease 16: 95-98.
- Than V.N., van Dyk M.S. and Wingfield M.J. 2002. *Debaryomyces mycophilus* sp. nov., a siderophore dependent yeast isolated from woodlice. FEMS Yeast Research 2: 415-427.
- Tian S.P. 2001. Effects of low temperature on mycelial growth and spore germination of *Botrytis cinerea* *in vitro* and on its infectivity to stored chicory. Acta Phytopathologica Sinica 31: 56-62.
- Tian S.P. 2007. Management of postharvest diseases in stone and pome fruit crops. In: General Concepts in Integrated Pest and Disease Management. Editors: Ciancio A. and Mukerji K. G. Springer 131-147.

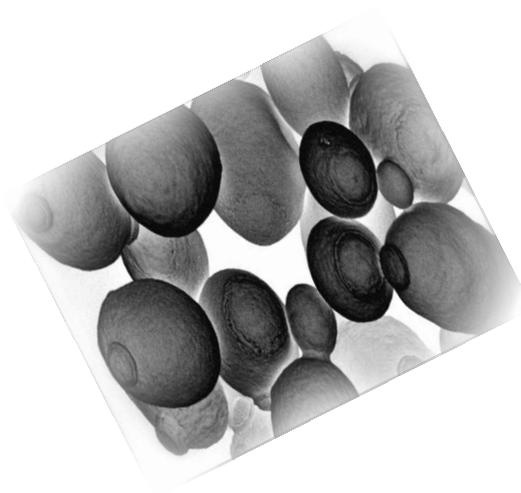
- Tian S.P. and Bertolini P. 1995. Effects of low temperature on mycelial growth and spore germination of *Botrytis allii* in culture and on its pathogenicity to stored garlic bulbs. *Plant Pathology* 44: 1008-1015.
- Tian S.P., Fan Q., Xu Y. and Jiang A.L. 2002. Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathology* 51: 352-358.
- Torija M.J., Rozés N., Poblet M., Guillamón J. M. and Mas A. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 80: 47-53.
- Torres R., Usall J., Teixidó N., Abadias M. and Viñas I. 2003. Liquid formulation of the biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology* 94: 330-339.
- Tosi S., Casado B., Gerdol R. and Caretta G. 2002. Fungi Isolated From Antarctic Mosses. *Polar Biology* 25: 262-268.
- Tripathi A., Sharma N., Sharma V. and Alam A. 2013. A review on conventional and non-conventional methods to manage post-harvest diseases of perishables. *Researcher* 5: 6-19.
- Tsantili E., Konstantinidis K., Athanasopoulos P.E. and Pontikis C. 2002. Effects of postharvest Calcium treatments on respiration and quality attributes in lemon fruit during storage. *Horticultural Science and Biotechnology* 77, 4: 479-484.
- Turchetti B., Buzzini P., Goretti M., Branda E., Diolaiuti G., D'Agata C., Smiraglia C. and Vaughan-Martini A. 2008. Psychrophilic Yeasts in Glacial Environments of Alpine Glaciers. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 73-83.
- Turkiewicz M., Pazgier M., Kalinowska H. and Bielecki S. 2003. A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Extremophiles* 7: 435-442.
- U.S.D.A. 2009. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2009. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Usall J., Teixidó N., Torres R., Ochoa de Eribe X. and Viñas I. 2001. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 21: 147-156.
- Vadkertiová R, Molnárová J., Vránová D. and Sláviková E. 2012. Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Canadian Journal of Microbiology* 58: 1344-1352.
- Vadkertiová R., Molnárová J., Vránová D. and Sláviková E. 2012. Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Canadian Journal of Microbiology* 58: 1344-1352.
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. and Valero J.R. 2007. Industrial wastewaters and dewatered sludge: rich nutrient source for production and formulation of biocontrol agent, *Trichoderma viride*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 23: 1695-1703.

- Vero S., Mondino P., Burgueños 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., Garat F. y Aurrecoechea I. 2003. Control Biológico de patógenos en poscosecha de manzanos. En *Producción Orgánica en Uruguay*. Montevideo. 207-211.
- Vero S., Garmendia G., Gonzalez M.B., Garat M.F. and Wisniewski M. 2009. *Aureobasidium pullulans* as a Biocontrol Agent of Postharvest Pathogens of Apples in Uruguay. *Bioscience Science Technology* 19: 1033-1049.
- Vero S., Garmendia G., Garat M.F., de Aurrecoechea I. and Wisniewski M. *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. 2011. International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities. *ISHS Acta Horticulturae* 905: 169-180.
- Vero S., Garmendia G., González M., Bentancur O. and Wisniewski M. 2012. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). *FEMS Yeast Research* 13: 189–199.
- Vilajeliu M., Bosch D. Lloret P., Sarasúa M.J., Costa-Comelles J. y Avila J. 2004. Control biológico de *Panonychus ulmi* (Koch) mediante ácaros fitoseidos en plantaciones de control integrado de manzano en Cataluña. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas* 20: 173-185.
- Viljoen B.C. 2006. Yeast Ecological Interactions. Yeast-Yeast, Yeast-Bacteria, Yeast-Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents. In *The Yeast Handbook*, eds. A. Querol and G.H. Fleet, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 83-110.
- Viñas I., Usall J., Teixidó N. and Sanchis V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal Food Microbiology* 40: 9-16.
- Visick K.L. and Fuqua C. 2005. Decoding microbial chatter: cell–cell communication in bacteria. *Journal Bacteriology* 187: 5507-5519.
- Walker G. M., McLeod A. H. and Hodgson V. J. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 127: 213-222.
- Walker G.M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Wan Y.K., Tian S.P. and Qin G.Z. 2003. Enhancement of biocontrol activity of yeasts by adding sodium bicarbonate or ammonium molybdate to control postharvest disease of pear fruits. *Letters Applied Microbiology* 37: 249-253.
- Wan Y. and Tian S. 2004. Optimization of Media for Production of an Effective Yeast Biocontrol Agent *Pichia membranefaciens*. *Agricultural Sciences in China* 3: 14-19.
- Wan Y. and Tian S. 2005. Integrated control of postharvest diseases of pear fruits using antagonistic yeasts in combination with ammonium molybdate. *Journal Science Food Agriculture* 85: 2605-2610.
- Wang P., Liu X., Wang Y., Ruan H. and Zheng X. 2011. Statistical media optimization for the biomass production of postharvest biocontrol yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 41, 4: 382-397.

- Weiler F. and Schmitt M.J. 2003. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Research* 3: 69-76.
- White J. 1954. *Yeast Technology*. Chapman and Hall. London. 454 pp.
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J. and White T.J. (Eds.). Academic Press, San Diego, Estados Unidos 315-322.
- Wilson C.L. and Chalutz E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae* 40: 105-112.
- Wilson C.L., Wisniewski M.E., Droby S. and Chalutz E. 1993. A Selection Strategy for Microbial Antagonists to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. *Scientia Horticulturae* 53: 183-189.
- Wilson C.L., Wisniewski M.E., El Ghaouth A., Droby S. and Chalutz E. 1996. Commercialization of antagonistic yeasts for the biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 46: 237-242.
- Wisniewski M. E., Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C. and Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 245-258.
- Wisniewski M., Droby S., Chalutz E. and Eilam Y. 1995. Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* *in vitro* and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathology* 44: 1016-1024.
- Wisniewski M., Wilson C., El-Ghaouth A. and Droby S. 2001. Non-chemical Approaches to Postharvest Disease Control. *Acta Horticulturae* 553: 407-412.
- Wisniewski M.E., Wilson C., Droby S., Chalutz E., El-Ghaouth A. and Stevens C. 2007. Postharvest Biocontrol, New Concepts and Applications. In *Biological Control, A Global Perspective*, eds. C. Vincent, M.S. Goettel and G. Lazarovits, London: CAB International 262-273.
- Woehrer W. and Roehr M. 1981. Regulatory aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 23, 3:-567-581.
- Wraight S.P., Jackson M.A. and de Kock S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In *Fungi as biocontrol agents*. Edited by T.M. Butts, C. Jackson, and N. Magan. CAB International, Wallingford, UK. 253-287.
- Xiao C.L. and Kim Y.K. 2010. Control of postharvest diseases in apples with reduced-risk fungicides. *Stewart Postharvest Review* 6, 1:1-6.
- Xiao C.L. 2006. Postharvest fruit rots in d'Anjou pears caused by *Botrytis cinerea*, *Potrebniomyces pyri*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2006-0905-01-DG

- Xu X., Qin G. and Tian S. 2008. Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. *International Journal of Food Microbiology* 126: 153-158.
- Yao H., Tian S. and Wang Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology* 93: 297-304.
- Yehuda H., Droby S., Bar-Shimon M., Wisniewski M. and Goldway M. 2003. The effect of under- and overexpressed CoEXG1-encoded exoglucanase secreted by *Candida oleophila* on the biocontrol of *Penicillium digitatum*. *Yeast* 20: 771-780.
- Yepez Y. 1995. Selección de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia 34-48.
- Yu T., Chen J., Chen R., Huang P., Liu D. and Zheng X. 2007. Biocontrol of Blue and Gray Mold Diseases of Pear Fruit by Integration of Antagonistic Yeast With Salicylic Acid. *International Journal of Food Microbiology* 116: 337-345.
- Zhang D., Spadaro D., Garibaldi A. and Gullino M.L. 2010. Selection and Evaluation of New Antagonists for Their Efficacy Against Postharvest Brown Rot of Peaches. *Postharvest Biology and Technology* 55: 174-181.
- Zhang H., Ma L., Turner M., Xu H., Dong Y. and Jiang S. 2009. Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. *Food Chemistry* 117: 621-626.
- Zhang H., Wang L., Dong Y., Jiang S., Zhang H. and Zheng X. 2008. Control of Postharvest Pear Diseases Using *Rhodotorula glutinis* and Its Effects on Postharvest Quality Parameters. *International Journal of Food Microbiology* 126: 167-171.
- Zhang H., Zheng X. and Yu T. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food control* 18: 287-291.
- Zhang H., Zheng X., Fu C. and Xi Y. 2005. Postharvest Biological Control of Gray Mould Rot of Pear With *Cryptococcus laurentii*. *Postharvest Biology and Technology* 35: 79-86.
- Zhang J. and Greasham R. 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology* 51: 407-421.
- Zhao H., Kim K.Y., Huang L. and Xiao C.L. 2010. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biology and Technology* 56, 1:12-18.
- Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M. and Van't Riet K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1875-1881.

ARTICULO DE RESPALDO



RESEARCH ARTICLE

A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases

M. Cecilia Lutz^{a,b}, Christian A. Lopes^{a,b}, M. Cristina Sosa^b and
Marcela P. Sangorrín^{a,*}

^aGrupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, Instituto Multidisciplinario de Investigación y Desarrollo de la Patagonia Norte (IDEPA, CONICET-UNCo). Dpto. de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires, Argentina;
^bFacultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Argentina

(Received 20 July 2012; returned 23 August 2012; accepted 26 September 2012)

Postharvest diseases cause considerable losses of harvested fruits during transportation and storage. Many yeast species have been reported as good antagonists against postharvest pear pathogens. In this work, we used a novel selection strategy that involves the isolation of yeasts from washing fluids, showing biocontrol activity against a regional *Penicillium expansum* strain (primary screening), originally obtained from fruit wounds after long time storage at $-1/0^{\circ}\text{C}$. About 26 isolates representative of the 11 yeast species identified in the 27 selected washing waters were chosen to be evaluated in a secondary screening against a regional *Botrytis cinerea* strain on pear wounds. Among yeasts tested, 38% showed complete control of *P. expansum*, but only 15% reduced the decay incidence of *B. cinerea* to 60–80% at $-1/0^{\circ}\text{C}$. These results reveal that some of the yeasts found can be biological alternatives to fungicides in the control of *P. expansum* and *B. cinerea* infections. Based on the data obtained, our strategy seems to be much more effective than the previously reported methods in obtaining successful biocontrol agents.

Keywords: postharvest diseases; antagonists yeast; pear; biocontrol

Introduction

Decay of pear fruits during long-term storage, caused by any of several fungal pathogens, can result in significant economic losses in Patagonia (Argentina). Postharvest diseases limit the storage period and marketing life of pears. Blue mould and grey mould decays caused by *Penicillium expansum* Link and *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., respectively, are two of the most important postharvest pear diseases in the world (Janisiewicz and Marchi 1992; Lennox, Spotts, and Cervantes 2003; Zhang, Zheng, Fu, and Xi 2005; Spotts and Cervantes 2002; Sugar and Basile 2008). In Patagonia, *P. expansum* represents the principal pathogen of pear fruit in storage conditions (Dobra, Di Masi, Rossini, and Engler 1995) while *B. cinerea* is the second most relevant pathogen on this substrate (Dobra, Sosa, and Dussi 2008). The control of postharvest mould decays has been traditionally carried out with synthetic fungicides; however, during the last decades, their effectiveness decreased due to the appearance of resistant strains (Mari, Bertolini, and Pratella 2003). A public demand

*Corresponding author: Email: sangorrimarcela@conicet.gov.ar

to reduce the use of synthetic fungicides, stimulated by a growing awareness in environmental and health issues, also limits the postharvest application of these and other chemicals to agricultural products. In the last decades, research efforts have focused on developing alternative control methods against postharvest diseases of fresh commodities (Baker and Cook 1974; Janisiewicz and Roitman 1988; Wilson, Wisniewski, Droby, and Chalutz, 1993; Sharma, Singh, and Singh 2009).

The use of biocontrol agents (BCAs) occurring naturally on fruit surface has become one of the most preferred ways of controlling postharvest diseases (Wisniewski et al. 2007). Among them, six BCAs based on different yeast species have been registered for pears postharvest application: Aspire, based on the active ingredient (a.i.) *Candida oleophila* (Ecogen Inc. Langorne, USA); Yield Plus a.i. *Cryptococcus albidus* (Lallemand, Montreal, Canada), Shemer a.i. *Metschnikowia fructicola* (AgroGreen, Asgdod, Israel); Candifruit a.i. *Candida sake* (Sipcam-Inaagri, SA Valencia, Spain); Nexy a.i. *C. oleophila* (Lesaffre-Bionext, France) and Boni-Protect a.i. *Aureobasidium pullulans* (Biofa, Münsingen, Germany) (Janisiewicz, Pimenta, and Jurick 2011; Jijalki 2011). The legal permits required for the transfer of beneficial organisms and the financial costs involved in its registration have inhibited the widespread availability of these products in several countries (Sundh and Melin 2011). These restrictions, as well as the fact that BCAs isolated from and adapted to specific geographic areas and target fruits are generally more effective than foreign BCAs, make it necessary the isolation and development of new BCAs from each particular region (Pimenta, Morais, Rosa, and Corrêa 2009).

Many different strategies, directed to select potential BCAs against postharvest pathogens in fruits, have been reported (Wilson et al. 1993; Chand-Goyal and Spotts 1996; Lima, De Curtis, Castoria, and de Cicco 1998; Viñas, Usall, Teixido, and Sanchis 1998). A typical selection strategy for BCAs is constituted by the following steps: (1) the isolation of potential BCAs in a general medium at room temperature from fruit collected in the orchard; (2) the *in vitro* screening of properties of interest in the potential candidates and (3) a final *in situ* assay using individual isolates against the pathogens to be controlled in fruit wounds (Janisiewicz and Roitman 1988; Droby et al. 1999; Bleve, Grieco, Cozzi, Logrieco, and Visconti 2006; Zhang, Spadaro, Garibaldi, and Gullino 2010). However, one of the most relevant problems in the majority of these studies is the fact that the BCA isolation and bioassays are generally performed at room temperature (Viñas et al. 1998; Droby et al. 1999; Zhang et al. 2005; Zhang et al. 2010). In a previous work, we proposed a BCA selection protocol in which both yeast isolation and *in situ* assays of each yeast isolate against the pathogens were performed at the same cold storage conditions ($-1/0^{\circ}\text{C}$) (Robiglio, Sosa, Lutz, Lopes, and Sangorrin 2011). The results of that study indicated that the microbiota associated with pear fruits exhibited a better biocontrol efficacy against spoilage fungi than a commercial BCA based on *Cr. albidus* (Robiglio et al. 2011).

A strategy proposed by Wilson et al. (1993) and employed by several researchers, used fruit wounds to screen the biocontrol potential of washing waters obtained from fruit surfaces and containing a mix of unidentified yeast populations (Wisniewski, Droby, Chalutz, and Eilam 1995; Lima et al. 1998; Scherm et al. 2003; Zhang et al. 2010). Potential antagonist isolates were then obtained from active waters. This strategy allows the rapid selection of potential antagonists, with a minimal cost of time and money, and particularly favours the selection of fast growing antagonist

capable to colonise fruit wounds. The problem of that strategy used in several works is the fact that both isolation and bioassays are performed at room temperature (Wisniewski et al. 1995; Lima et al. 1998; Scherm et al. 2003; Zhang et al. 2010). This may partly explain the lack of correlation generally reported between laboratory tests with host/parasite systems at room temperature and the real performance of the BCAs/products under commercial cold conditions (Droby et al. 1993; Wisniewski, Wilson, El Ghaouth, and Droby 2001).

The objectives of this work were to isolate and to select antagonistic yeasts from pear fruit surfaces and wounds, adapted to low storage temperature. An improved selection strategy was used in this work for the first time. This strategy involves the isolation of BCAs from fruit wounds washing fluids showing biocontrol activity against *P. expansum* at $-1/0^{\circ}\text{C}$. Additionally, a second *in situ* screening using the most promising yeast isolates against *B. cinerea* was also done to select BCAs' ability to control the two main regional postharvest pear pathogens.

Materials and methods

Source of spoilage fungi and biocontrol yeasts

Both spoilage fungi and epiphytic yeasts were isolated from pear fruits Beurre D'Anjou and Packham's Triumph cultivars after 6 months of storage at $-1/0^{\circ}\text{C}$. Fruits were obtained from two packinghouses located in the Upper Valley of Río Negro and Neuquén provinces (Patagonia, Argentina) during 2008 season. Packinghouse 'B' has not used fungicides for the last two years. Packinghouse 'C' was characterised by the use of organic management, i.e. chemical fungicides have not been used for more than 5 years.

Pathogens

Isolation and identification

Fruits showing the typical symptoms of blue mould or grey mould were removed from storage and used for fungi isolation. Each isolate was grown at 24°C as a monoconidial culture on potato dextrose agar (PDA) and kept at 4°C until use. Fungal virulence was assured by periodic transfers through pears. *Botrytis* isolates were identified by phenotypic (cultural and morphological) features from cultures on PDA. *Penicillium* isolates were identified by phenotypic features from cultures on Czapek yeast autolysate agar plates and Czapek agar plates according to Frisvad and Samson (2004) and by ITS1-5.8S-ITS2 rDNA PCR-RFLP (Pianzola, Moscatelli, and Vero 2004). All fungal isolates were conserved in PDA and stored at 4°C in the North Patagonian Culture Collection (NPCC), Neuquén, Argentina.

Selection

P. expansum and *B. cinerea* isolates were selected by their aggressiveness and sensitivity to fungicides thiabendazol (TBZ) [2-(4-Thiazolyl)-1H-benzimidazole as Tecto 50SC Syngenta Agro S.A.] and Captan [N-(trichlorometilto) phtalimida as CAPTAN S. Ando & Cia. S.A.] according to the following procedures.

Aggressiveness determination

The aggressiveness of each fungal isolate was determined by measuring the lesion diameters (mm) induced on pear fruits after wound inoculation with the respective isolate. Surface-sterilised pear fruits (70% ethanol) were wounded using a sterile tool (3 mm deep and 3 mm wide) and subsequently inoculated of an aqueous suspension of the respective pathogen isolate at 10^6 conidia/mL. *P. expansum* conidia were obtained from 7-days-old cultures in darkness at 20°C, and *B. cinerea* conidia were obtained from 14-days-old cultures at 20°C under a 12:12 h (light:dark) photo regime. Conidial suspensions were obtained by scraping the colony surface with a sterile scalpel, resuspended in sterile water and filtered to remove fungal mycelium. Conidia concentrations were adjusted by direct count with a Neubauer chamber. Treated fruits were placed in polyethylene bags and incubated at $-1/0^\circ\text{C}$ and 95% relative humidity (RH) under commercial storage room conditions. After 60 days, lesion diameters were measured and recorded. Each pear constituted a single replicate and a total of nine replicates were carried out.

MCC, defined as the minimal concentration of conidia that causes rot in fruit (100% incidence), were determined for the more aggressive *P. expansum* and *B. cinerea* isolates according to the methodology described earlier. Each wound was inoculated with 10 μl of a water suspension of the respective pathogen at different concentrations (10^2 , 10^3 , 10^4 or 10^5 conidia/mL). Each experiment was conducted three times with three fruits per treatment.

Sensitivity to fungicides

Fungicide sensitivity of *P. expansum* and *B. cinerea* isolates was tested on PDA added with either TBZ or Captan. For this purpose, 10 μl of a conidial suspension (10^6 conidia/mL) was seeded as a drop on PDA plates amended with 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 5 and 1 mg/L TBZ and 666, 333, 166, 88, 41, 20, 10, 5 and 1 mg/L Captan. After 72h of incubation at 20°C in darkness, fungal growth was visually determined. Minimum inhibitory concentration (MIC) of TBZ and Captan, defined as the lowest fungicide concentration that inhibited fungal growth, was determined for *B. cinerea* and *P. expansum* (Pianzola et al. 2004). Experiments were carried out in duplicates.

Yeasts

Selection

In order to isolate highly effective antagonistic yeasts, a selective method partially adapted from Wilson et al. (1993) was employed. A total of 200 pear fruits were separated in two sets: 100 artificially wounded pears (3mm deep and 3 mm wide) and 100 healthy pears, and both set of pears were then stored at $-1/0^\circ\text{C}$ and 95% RH in commercial standard conditions. The same procedure was carried out in the two previously mentioned packinghouses (C and B). After 6 months of storage, 56 healthy pear wounds and 60 healthy surfaces from pears were selected for washing preparations. Both tissue blocks (5 mm deep \times 5 mm wide) containing the healthy wounds and surfaces (2 cm diameter) from healthy pears were removed by using a sharp knife and immediately immersed in 1 mL water separately and subjected to

agitation at 150 rpm for 2 h at 1°C. The washing waters obtained were employed as a source of possible antagonists in the primary screening.

Primary screening

Packham's Triumph pear fruits stored for 6 months at $-1/0^{\circ}\text{C}$ were surface-sterilised with 70% (v/v) ethanol, and air dried prior to wounding. The artificial wounds (one wound – 3 mm deep and 3 mm wide – in the equatorial region of each fruit) were performed using a sterile cork borer. Each pear fruit was inoculated with 50 μl of the respective washing. After 2 hours at room temperature, 20 μl of a conidial suspension of *P. expansum* at the MCC (1×10^4 conidia/mL) were also added to the wounds. Pear wounds inoculated only with the pathogen were used as controls. After inoculation, the fruits were placed on trays packs in fruit boxes within polyethylene bags and stored at $-1/0^{\circ}\text{C}$. The treatments were arranged in completely randomised design. Trials were conducted with five fruits per treatment. The wounds were examined for decay and lesion diameters (mm) every 15 days during the assays storage time. Both disease incidence (DI), calculated as the number of decay wounds over the total number of wounds, and decay reduction (DR), calculated as $\text{mean lesion diameter in control} - \text{mean lesion diameter in treatment} \times 100/\text{mean lesion diameter in control}$, were recorded during the assay storage time. Washings exhibiting a reduction in DI higher than 50% and a DR higher than 40% were selected as possible antagonist yeast source.

The potential antagonist yeasts were isolated from washing preparations from healthy wound and surface from fruits of primary screening. About 100 μl of each washing was spread on pear juice agar (85% v/v of fresh pear juice, 1.5% w/v agar-agar) supplemented with ampicillin (0.5 mg/L). Plates were incubated at $-1/0^{\circ}\text{C}$ until yeast colonies development (around 15 days). A representative number of yeast colonies were selected according to their frequencies and morphology and conserved at -20°C using glycerol (20% v/v) as a crioprotectant agent.

Secondary screening

Individual yeast isolates obtained from washings selected in the primary screening were used in the secondary screening. Two yeast isolates: *A. pullulans* NPCC 1281 and *Rhodotorula mucilaginosa* NPCC 1278 selected in a previous work by means of a different selection protocol (Robiglio et al. 2011) were also included in this assay. Antagonists were prepared by growing cultures on Glucosa, Peptona, Yeast extract (GPY) agar (g/L: yeast extract 5, glucose 20, peptone 5 and agar 20) for 24 h at 26°C . A loop of the respective young yeast culture was suspended in sterile water at a concentration of 10^6 cell/mL adjusted by direct counting using a Neubauer chamber. In this assay, surface-sanitised Packham's pears with one month of storage at $-1/0^{\circ}\text{C}$ were wounded (3 mm in diameter and 3 mm deep) and inoculated with 20 μl of the pure yeast culture suspension (10^6 cells/mL). After 2 hours, 20 μl of a *P. expansum* conidial suspension was inoculated at the MCC in the same wounds (1×10^4 conidia/mL). Fruits treated with synthetic fungicides TBZ and Captan were also evaluated in order to compare the control effects of both chemical and biological agents. These fungicides were applied by dipping the wounded pears in fungicide solution at commercial concentration (530 mg/L of TBZ and 660 mg/L of Captan)

for 30 s and inoculated with 20 μl of *P. expansum* conidial suspension (1×10^4 conidia/mL). Wounds inoculated only with spoilage fungi were used as controls.

After inoculation, fruits were placed on packing trays in plastic bags and stored for 200 days in boxes under standard conditions ($-1/0^\circ\text{C}$ and 95% RH). The treatments were arranged in completely randomised design. The wounds were periodically examined for decay incidence and lesion diameters (mm) every 15 days. The experiment was designed with five fruits per treatment and each treatment was repeated three times.

The most promising yeast strains against *P. expansum* were further tested in a second bioassay during the following postharvest period to determine their biocontrol activity against *B. cinerea*, according to the methodology described earlier. *B. cinerea* conidial suspension was inoculated at the MCC in the wounds (5×10^3 conidia/mL). Additionally, yeast suspensions (20 μl , 1×10^6 cells/mL) of each promising strains were individually inoculated into the wounds to evaluate the capacity of yeasts to successfully colonise the wound. After inoculation, fruits were placed on packing trays in plastic boxes and stored in boxes under standard conditions ($-1/0^\circ\text{C}$ and 95% RH) for 100 days. Both DI and DR were recorded during the assay storage time. The yeast populations were evaluated after 100 days of incubation by yeast cells counts (CFU) according to Vero, Garmendia, Gonzalez, Garat, and Wisniewski (2009). The experiment was designed with five fruits per treatment and each treatment was repeated three times.

Yeast identification

Yeasts obtained from washings selected in the primary screening were identified by ITS1-5.8S-ITS2 rDNA PCR-RFLP analysis as described by Esteve-Zarzoso, Belloch, Uruburu, and Querol (1999). Patterns obtained for each isolate after digestion with the restriction enzymes *Cfo* I, *Hae* III and *Hinf* I were compared with those of reference strains available in the yeast identification database (www.yeast-id.com). Yeast identity was confirmed by sequencing the D1/D2 domains of the 26S rRNA gene (Kurtzman and Robnett 1998). The sequences obtained for yeast isolates were compared with those published at GenBank database (available at the National Center for Biotechnology Information, NCBI) using BLAST.

Statistical analysis

Data were subjected to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey test ($P = 0.05$) using STATISTICA data analysis software system, version 7 (Stat Soft Inc., 2004, France).

Results

Isolation, identification and characterisation of pathogens

A total of 32 isolates from pears exhibiting blue mould symptoms and 27 isolates obtained from pears exhibiting grey mould symptoms were identified by morphological methods as *B. cinerea* and *P. expansum*, respectively (Table 1). PCR-RFLP analysis of *P. expansum* isolates evidenced a same PCR product of about 600 pb and

Table 1. Origin, identification and characterization of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* isolates of pears with diseases symptoms, after 6 months at cold conservation.

<i>Penicillium expansum</i>						<i>Botrytis cinerea</i>					
NPCC	Origin		Lesion diameter (mm)±SD ^c	MIC ^d (mg L ⁻¹)		NPCC	Origin		Lesion diameter (mm)±SD ^c	MIC ^d (mg L ⁻¹)	
	B/C ^a	D/P ^b		TBZ	Captan		B/C ^a	D/P ^b		TBZ	Captan
2001	B	D	21.4±2.5 _{ek}	50	20	2033	B	D	24.8±1.8 _{df}	< 1	5
2002	B	D	25.2±1.5 _{ik}	< 1	< 1	2034	B	D	28.4±2.4 _{eh}	< 1	< 1
2003	B	D	14.4±5.4 _{bd}	< 1	< 1	2035	B	D	14.6±2.1 _{ac}	< 1	5
2004	B	D	23.2±1.3 _{gk}	10	41	2036	B	D	36.2±2.5 _{hi}	< 1	10
2005	B	D	25.8±2.4 _{jk}	< 1	41	2037	B	D	19.6±1.1 _{bd}	< 1	5
2006	B	D	26.4±1.8 _k	> 1000	20	2038	B	D	28.8±3.4 _{fh}	< 1	20
2007	B	D	17.2±1.8 _{cf}	> 1000	41	2039	B	P	10.4±1.1 _a	< 1	< 1
2008	B	D	19.0±3.4 _{dh}	> 1000	< 1	2040	B	P	36.0±2.3 _{hi}	< 1	10
2009	B	D	22.6±2.6 _{fk}	> 1000	< 1	2041	B	P	28.4±3.6 _{eh}	< 1	20
2010	B	D	25.2±1.3 _{ik}	5	41	2042	B	P	39.4±3.4 _i	< 1	41
2011	B	D	21.4±3.5 _{ek}	< 1	10	2043	B	P	20.0±1.6 _{be}	< 1	< 1
2012	B	D	22.6±1.1 _{fk}	< 1	41	2044	B	P	25.1±1.5 _{dg}	< 1	> 1
2013	B	D	21.8±3.1 _{ek}	> 1000	41	2045	B	P	10.0±1.6 _a	< 1	20
2014	B	D	17.8±4.1 _{ch}	> 1000	41	2046	B	P	64.2±9.8 _k	< 1	20
2015	B	D	0.0±0.0 _a	> 1000	83	2047	B	P	21.8±1.9 _{bf}	< 1	41
2016	B	D	20.0±0.0 _{ei}	< 1	< 1	2048	B	P	53.0±1.9 _j	< 1	41
2017	B	D	23.3±1.0 _{gk}	> 1000	41	2049	B	P	71.6±6.0 _k	< 1	41
2018	B	D	9.6±1.1 _b	< 1	41	2050	B	P	65.0±2.0 _k	< 1	41
2019	B	D	20.8±3.8 _{ej}	< 1	10	2051	C	D	34.0±5.9 _{hi}	< 1	41
2020	B	D	20.0±2.1 _{ei}	< 1	< 1	2052	C	D	24.6±1.5 _{df}	< 1	41
2021	B	D	9.6±1.5 _b	> 1000	20	2053	C	D	33.8±7.8 _{gi}	< 1	41
2022	B	D	18.2±3.1 _{ch}	< 1	< 1	2054	C	D	13.6±1.1 _{ab}	< 1	< 1
2023	B	P	26.2±0.8 _k	> 1000	83	2055	C	D	34.8±3.3 _{hi}	< 1	41
2024	B	P	18.8±2.4 _{ch}	< 1	< 1	2056	C	D	23.2±0.4 _{cf}	< 1	10

Table 1 (Continued)

<i>Penicillium expansum</i>						<i>Botrytis cinerea</i>					
Origin			Lesion diameter (mm) \pm SD ^c	MIC ^d (mg L ⁻¹)		Origin			Lesion diameter (mm) \pm SD ^c	MIC ^d (mg L ⁻¹)	
NPCC	B/C ^a	D/P ^b		TBZ	Captan	NPCC	B/C ^a	D/P ^b		TBZ	Captan
2025	B	P	13.4 \pm 1.1 _{bc}	> 1000	20	2057	C	D	24.4 \pm 3.3 _{df}	< 1	41
2026	B	P	10.0 \pm 1.6 _b	< 1	41	2058	C	D	48.8 \pm 4.3 _j	< 1	41
2027	B	P	26,0 \pm 1,6 _{jk}	> 1000	41	2059	C	D	14.2 \pm 1.5 _{ab}	< 1	< 1
2028	B	P	24,8 \pm 1,3 _{ik}	< 1	166						
2029	B	P	25,2 \pm 1,3 _{ik}	> 1000	41						
2030	C	P	16,4 \pm 1,1 _{ce}	< 1	83						
2031	C	P	17,4 \pm 2,4 _{cf}	< 1	83						
2032	C	P	26,8 \pm 1,6 _k	< 1	41						

Note: Values within a column and pathogen followed by the same letter are not significantly different according to Tukey Tests ($P > 0.05$).

^aOrigin B/C. B: transition packinghouse; C: organic packinghouse.

^bOrigin D/P. D: D'Anjou cultivar; P: Packham's cultivar.

^cThe results are presented as mean of the independent experiments with three times with three fruit per treatment. \pm SD: Standard deviation.

^dMIC: Minimal inhibitory concentration of TBZ and Captan.

a restriction pattern after digestion with *Hinf* I consisting on three bands of 300 + 180 + 120 pb. This pattern was coincident with that reported for the *P. expansum* type strain (Pianzola et al. 2004).

All *P. expansum* and most *B. cinerea* isolates were recovered from the packing-house B (Table 1). Additionally Beurre D'Anjou cultivar was the main source of fungi isolates (Table 1). Results of the aggressiveness tests *in situ* indicated that all isolates of *P. expansum* and *B. cinerea* produced different lesion diameters on pear fruits (Table 1), the mean lesion diameters caused by *B. cinerea* and *P. expansum* were 31 mm and 19 mm, respectively, in assayed conditions. The isolates that showed the highest aggressiveness levels (the highest lesion diameters) were *P. expansum* NPCC 2006, NPCC 2023 and NPCC 2032 and *B. cinerea* NPCC 2046, NPCC 2049 and NPCC 2050 (Table 1).

Regarding resistance assays, MIC for TBZ was also a variable feature among the *P. expansum* isolates evaluated (from < 1 to > 1000 mg/L). Most isolates belonging to *P. expansum* species (86%) were capable to grow in plates containing 1000 mg/L of TBZ, concentration higher than that used in commercial conditions (530 mg/L). MIC for Captan was also variable; but all isolates were sensitive to the commercial doses of this fungicide (660 mg/L). The highest values of MIC for Captan were 83 and 166 mg/L; these values were only observed in 12.5% of the *P. expansum* isolates (Table 1).

B. cinerea isolates were not able to grow in plates containing 1 mg/L of TBZ (Table 1). As in *P. expansum*, MIC for Captan was variable among different isolates of *B. cinerea*. The highest MIC value, showed by 40% of the isolates, was 41 mg/L (Table 1). All *B. cinerea* isolates were sensitive to the commercial doses of both previously mentioned fungicides.

Due to the regional relevance of *P. expansum* as the main regional pear postharvest pathogen, one isolate of this species (*P. expansum* NPCC 2023) was selected to be used during both primary and secondary screenings because of its high aggressiveness and resistance to fungicides. Using the same criterion, the isolate *B. cinerea* NPCC 2049 was chosen to be used during the last step of this selection programme.

MCC was determined for these isolates on pear fruit at low temperature ($-1/0^{\circ}\text{C}$) and corresponded to 1×10^4 conidia/mL and 5×10^3 conidia/mL for *P. expansum* and *B. cinerea*, respectively.

Isolation, identification and selection of antagonists

Primary screening

Taking into account that both *P. expansum* and *B. cinerea* pathogens are able to grow at $-1/0^{\circ}\text{C}$ (storage temperature), the complete process of isolation and selection of antagonist yeast was evaluated at this temperature.

A total of 116 washings were recovered from healthy wounds and pear surfaces obtained from both B and C packinghouses. These washings were tested in a primary screening against *P. expansum* NPCC 2023 in *in situ* assays on pear wounds in cold. More than 60% of the total number of washings tested showed some degree of antagonistic activity (at least 15% of reduction in lesion diameter compared to the control inoculated only with the pathogen). However, only 27 washings (23%),

Table 2. Origin and number of washing waters selected after primary screening against *P. expansum*.

Washing waters origin	Number of washing waters (%)				Total (%)
	Packinghouse B		Packinghouse C		
	Packham's	D'Anjou	Packham's	D'Anjou	
Wounds	10 (37.1)	3 (28.5)	1 (3.7)	4 (14.8)	18 (66.7)
Surface	1 (3.7)	2 (7.4)	2 (7.4)	4 (14.8)	9 (33.3)
Total	10 (37.0)	6 (22.2)	3 (11.1)	8 (29.6)	27 (100.0)

reached the criteria arbitrarily established for the primary screening to be selected as a potential source of antagonists; i.e., washings able to reduce the decay incidence by more than 50% and the lesion diameter by more than 40% (Table 2). Most washings with good antagonist activity (66.7%) were obtained from healthy wounds (Table 2).

According to both yeast colony morphology and frequency on plates incubated in cold, a total of 55 yeast cultures were obtained from the 27 selected washings. The yeasts were identified using the restriction analysis of the 5.8S-ITS region and identity confirmed by sequence analysis as belonging to 11 different species. In Table 3, we indicated the distribution of yeast species in each different washing waters. *A. pullulans* as well as three different species of *Cryptococcus*: *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus wieringae* were the most frequently detected species in the selected washings (Table 3). These yeast species were detected in washings, independently from the origin (packinghouse B/C, cultivar P/D, pear site wound/surface). All remaining yeast species were obtained from one particular washing (Table 3).

Four yeast species were only associated with pears under organic management (packinghouse C): *Cryptococcus tephrensis*, *Candida patagonica*, *Pichia membranifaciens* and *Rhodotorula glutinis*, while *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Rhodotorula laryngis* were only recovered from pears stored in the packinghouse B, under transition management (Table 3). In case of yeast genera that begin with the same initial, a second letter will be used in the abbreviation, to easily differentiate them.

The yeast *Cr. victoriae* was present in all washings that exhibited a DR higher than 60% (seven washing waters, Table 3), on its own (29%) or with other species (71%). In those cases, accompanying species were *Cr. albidus* and/or *A. pullulans*.

Secondary screening

A total of 26 isolates representative of the 11 yeast species identified (species in bold type letters in Table 3) were selected to be evaluated in a secondary screening on pear wounds.

The isolates were selected from active washings according to their frequencies in order to have a complete picture of the yeast diversity. In this bioassay, each yeast isolate was assessed individually against *P. expansum* NPCC 2023 (Table 4). Pears inoculated with TBZ and Captan fungicides at commercial concentrations were also considered with comparative purposes (Table 4).

Table 3. Yeast isolates from each selected washing waters (ww) in primary screening.^a

Pear site	Cultivar	Transition packinghouse (B)			Organic packinghouse (C)		
		ww	DR (%)	Yeast Species	ww	DR (%)	Yeast Species
Surface	Beurre D'Anjou	1	60	<i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. victoriae</i>	17	52	<i>Cr. albidus</i> , <i>R. mucilaginosa</i>
		2	53.2	<i>A. pullulans</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>Cr. wieringae</i>	18	41.3	<i>A. pullulans</i> , <u><i>Cr. albidus</i></u> ^b , <i>Cr. tephrensis</i>
					19	43.3	<i>A. pullulans</i> , <i>C. patagonica</i> , <i>Cr. tephrensis</i>
	Packham's Triumph	3	85	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. victoriae</i>	20	45.3	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. tephrensis</i>
					21	42.1	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. tephrensis</i> , <i>R. glutinis</i>
					22	46.1	<i>A. pullulans</i> ^b , <i>Cr. albidus</i>
Wounds	Beurre D'Anjou	4	100	<i>Cr. victoriae</i>	23	60	<u><i>Cr. victoriae</i></u> ^b
		5	43	<i>A. pullulans</i>	24	43	<u><i>A. pullulans</i></u> ^b , <i>Cr. albidus</i>
		6	40.3	<i>R. laryngis</i>	25	41.8	<u><i>A. pullulans</i></u> ^b
					26	40.4	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. wieringae</i>
					27	43.6	<i>A. pullulans</i> , <u><i>P. membranifaciens</i></u> ^b
	Packham's Triumph	7	100	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. albidus</i> , <u><i>Cr. victoriae</i></u> ^b			
		8	69	<i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. victoriae</i> , <i>R. laryngis</i> ^b			
		9	60	<i>A. pullulans</i> , <i>Cr. victoriae</i> , <i>Cr. wieringae</i> , <i>R. laryngis</i>			
		10	53	<i>A. pullulans</i>			
		11	50	<i>A. pullulans</i>			
		12	50	<i>Cy. infirmominiatun</i> ^b			
		13	49.3	<i>Cr. wieringae</i> , <i>Cr. victoriae</i>			
		14	47.2	<i>A. pullulans</i> ^b			
15	47	<i>Cr. victoriae</i> ^b , <i>Cr. wieringae</i> , <i>R. laryngis</i>					
16	45.3	<i>Cr. victoriae</i>					

ww: washing waters; DR: decay reduction. *A.*: *Aureobasidium*; *C.*: *Candida*; *Cr.*: *Cryptococcus*; *Cy.*: *Cystofilobasidium*; *R.*: *Rhodotorula*; *P.*: *Pichia*. Bold type: isolates selected to be evaluated in the secondary screening against *P. expansum*. Underline type: most promising yeast strains obtained in the bioassays against *B. cinerea*.

^aWashing waters exhibiting a reduction in disease incidence (DI) higher than 50% and a DR higher than 40% in primary screening against *P. expansum*.

^bMost promising yeast strains obtained in the secondary screening against *P. expansum*.

Table 4. Efficacy of yeast and chemical fungicides in secondary screening against pathogen on wound-inoculated pear at $-1/0^{\circ}\text{C}$.

Treatment		<i>P. expansum</i> (200 days)						
Yeast species and strain (NPCC number)	Origin ^a					DI (%)	LD mm (\pm SD)	DR (%)
	<i>A. pullulans</i>	1256	C	P	S			
	1262	C	D	w		–	NI	100 _d
	1269	B	D	w		60 _b	45.66 \pm 1.52 _d	15 _a
	1273	C	P	S		–	NI	100 _d
	1274	B	P	w		–	NI	100 _d
	1277	C	D	w		100 _c	18.00 \pm 1.00 _c	67 _c
	1281	B	P	S		60b	38.66 \pm 3.45_e	28ab
<i>C. patagonica</i>	1249	C	D	S		100 _c	39.00 \pm 1.00 _e	28 _{ab}
<i>Cr. albidus</i>	1247	C	P	S		60 _b	46.00 \pm 2.00 _{fg}	15 _a
	1248	C	D	S		–	NI	100 _d
<i>Cr. tephrens</i>	1242	C	D	S		60 _b	18.00 \pm 1.00 _c	67 _c
	1244	C	D	S		60 _b	43.00 \pm 1.00 _{ef}	20 _{ab}
<i>Cr. victoriae</i>	1243	B	D	S		40 _a	29.50 \pm 0.50 _d	45 _b
	1255	B	P	w		40 _a	23.66 \pm 0.57 _{bc}	56 _c
	1259	C	D	w		–	NI	100 _d
	1260	B	P	w		–	NI	100 _d
	1263	B	P	w		–	NI	100 _d
	1271	B	D	w		40 _a	28.00 \pm 1.00 _d	48 _{bc}
<i>Cr. wieringae</i>	1268	C	D	w		40 _a	12.33 \pm 2.08 _a	76 _c
<i>Cy. infirmominiatum</i>	1261	B	P	w		–	NI	100 _d
<i>P. membranifacien</i>	1250	C	P	w		–	NI	100 _d
<i>R. glutinis</i>	1246	C	P	S		80 _c	31.66 \pm 1.52 _d	41 _b
<i>R. laryngis</i>	1251	B	D	w		80 _c	45.66 \pm 1.52 _d	15 _a
	1253	B	P	w		60 _b	18.66 \pm 1.52 _{ab}	65 _c
	1264	B	P	w		–	NI	100 _d
<i>R. mucilaginoso</i>	1241	C	D	S		100 _c	51.33 \pm 1.52 _h	5 _a
	1270	B	D	S		80 _c	41.00 \pm 1.00 _e	24 _{ab}
	1278	B	P	S		60b	18.00 \pm 1.00_e	67c
Chemical fungicide								
Tiabendazol (528 mg/L)						100 _c	52.66 \pm 0.57 _h	2 _a
Captan (660 mg/L)						100 _c	41.66 \pm 1.52 _{ef}	23 _{ab}
Fungal pathogen alone						100 _c	54.00 \pm 1.73 _h	

Note: Values within a column followed by the same letter are not significantly different according to Tukey Tests ($P > 0.05$).

^aOrigin B/C. B: transition packinghouse; C: organic packinghouse. D/P. D: D'Anjou cultivar; P: Packham's cultivar; S/H. S: Surface, W: Wounds.

^bDI: disease incidence, rot percentage; LD: lesion diameter; DR: Decay reduction; NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina; NI: no visual infection at inoculated wound sites.

All yeasts tested completely controlled the DI caused by *P. expansum* after 100 days of storage at $-1/0^{\circ}\text{C}$. However, only 10 isolates (*A. pullulans* NPCC 1262, 1273 and 1274; *Cr. albidus* NPCC 1248, *Cr. victoriae* NPCC 1259, 1260 and 1263; *Cy. infirmominiatum* NPCC 1261, *P. membranifaciens* NPCC 1250 and *R. laryngis* NPCC 1264) maintained the complete control after 200 days of incubation (marked as ^b in

Table 5. Efficiency of selected yeast against *B. cinerea* in pear wound at $-1/0^{\circ}\text{C}$.

Yeast species and strain	Treatment		<i>B. cinerea</i> (100 days) ^a		
	NPCC		DI (%)	LD (mm \pm SD)	DR (%)
<i>A. pullulans</i>	1273		100 _b	73.33 \pm 0.57 _d	19.34 _a
	1274		100 _b	71.00 \pm 3.46 _d	23.08 _a
	1262		100 _b	71.33 \pm 1.15 _d	22.72 _a
<i>Cr. albidus</i>	1248		80 _{ab}	30.33 \pm 9.07 _a	62.08 _c
<i>Cr. victoriae</i>	1259		60 _a	35.00 \pm 2.00 _{ab}	62.08 _c
	1263		80 _{ab}	40.66 \pm 1.15 _b	55.94 _c
	1260		100 _b	66.33 \pm 2.08 _{cd}	28.13 _a
<i>Cy. infirmominitatun</i>	1261		100 _b	54.16 \pm 4.70 _c	40.23 _b
<i>P. membranifaciens</i>	1250		60 _a	30.33 \pm 1.52 _a	67.13 _c
<i>R. laryngis</i>	1264		100 _b	71.33 \pm 4.04 _d	22.72 _a
Fungal pathogen alone			100 _b	88.50 \pm 5.46 _e	

Note: Values within a column followed by the same letter are not significantly different according to Tukey Tests ($P > 0.05$).

^aDI: disease incidence, rot percentage; LD: lesion diameter; DR: Decay reduction; NPCC: North Patagonian Culture Collection, Neuquén, Argentina.

Table 3). Most isolates showing the best biocontrol performance were obtained from washing waters of wounds (80%), and from Packham's cultivar (70%) (Table 3).

A broad biocontrol effectiveness range was observed among yeast isolates belonging to the same species. For example, some strains of *A. pullulans* (NPCC 1262, 1273 and 1274) completely controlled DI while other strains of the same species (*A. pullulans* NPCC 1256 and 1277) only reduced the lesion diameter in a minimum percentage (Table 4).

The protection levels achieved by both *A. pullulans* NPCC 1281 and *R. mucilaginosa* NPCC 1278 yeast strains, selected as the best biocontrol yeasts in a previous work (Robiglio et al. 2011), were lower than those obtained for the best yeast isolates described in this work (Table 4). Finally, treatments carried out by TBZ and Captan demonstrated that these chemical fungicides were ineffective in controlling blue mould decay at the evaluated conditions. This result confirms the TBZ-resistance observed for *P. expansum* NPCC 2023 in *in vitro* assays.

B. cinerea biocontrol assay

The 10 most promising yeast strains (marked as ^b in Table 3) obtained in the bioassays against *P. expansum*, i.e. those exhibiting complete control of the decay incidence of blue mould, were further tested in a second bioassay to determine their biocontrol activity against *B. cinerea*. All yeast strains reduced lesion diameter caused by *B. cinerea* after 100 days of incubation at $-1/0^{\circ}\text{C}$ (Table 5). *Cr. albidus* NPCC 1248, *C. victoriae* NPCC 1259 and 1263, and *P. membranifaciens* NPCC 1250 reduced the decay incidence to 60–80% and the lesion diameter to 56–67% (Table 5). All effective yeast isolates were able to actively grow under storage condition, reaching maximum populations between 10^5 and 10^6 CFU per wound (data not shown). These four yeasts with the best antagonist activity were recovered from organic pear wounds.

Discussion

The results obtained in this work support the hypothesis that the best strategy to isolate potential antagonists against a particular etiological agent is to look in places where a disease caused by the pathogen can be expected, but it does not occur (Baker and Cook, 1974). The improved methodology proposed in this work is based on obtaining microorganisms from healthy wounds of pear fruits after 6 months of cold storage. These organisms are probably adapted to storage conditions (low temperatures, fruit-host and postharvest treatments) and could exhibit some antagonist activity due to the fact that they were isolated from healthy wounds. Other authors have isolated potential antagonists from fresh fruits before post-harvest storage; however, in that condition it became difficult to find cold-adapted yeasts able to live and compete against naturally occurring fungi (Chand-Goyal and Spotts 1996; Lima et al. 1998; Viñas et al. 1998; Sugar and Basile 2008). In our opinion, the ability to grow at low temperatures is a positive characteristic that must be prioritised from the initial stages of any yeast selection programme to be used as a BCA in cold storage. In the previously mentioned studies, even though a large number of yeasts were isolated from fruits, only 2.5–10% showed an acceptable biocontrol capacity on fruit at 1°C or 4°C (Lima et al. 1998; Viñas et al. 1998; Sugar and Basile 2008). Using our approach, 116 washing waters were tested in a primary screening *in situ* and more than 23% of them were pre-selected because of their biocontrol capacity against *P. expansum* at low temperature. Additionally, 10 out of 26 yeasts isolates obtained from these active washings, completely controlled *P. expansum* DI after 200 days at $-1/0^{\circ}\text{C}$ and four of them were also able to control, in different percentages, the incidence of *B. cinerea* after 100 days at the same temperature. Based on these data, our strategy to obtain BCAs seems to be much more effective than the previously reported methods. The fact that most isolates showing good antagonistic activity were obtained from wounds evidences that healthy wounds are a better BCA source than fruit surfaces.

Another aspect considered in our proposed strategy is the use of local pathogens for BCA selection reflecting the 'real world' in which the potential antagonists will act. The *P. expansum* and *B. cinerea* pathogen isolates used in this work were characterised and selected for their aggressiveness in pear fruits and their low sensitivity level to the two most used fungicides in postharvest storage. The uses of the most aggressive and resistant fungal strains will guarantee, to some extent, the success of the selected BCAs. In some previously published works, pathogen strains used in *in situ* assays during BCA selection were purchased from culture collections (Chand-Goyal and Spotts 1996; Yu et al. 2007). Other works make use of randomly chosen pathogen strains isolated from diseased fruits without testing their aggressiveness and fungicide resistance (Janisiewicz and Marchi 1992; Wilson et al. 1993; Zhang et al. 2008). Regarding resistance assays, and based on the discriminatory concentration of TBZ (10 mg/L) established by Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) as the threshold to determine resistance to this fungicide (Smith, Trivellas, Johnson, and Joshi 1991), 50% of the *P. expansum* isolates showed resistant phenotype (Table 1), instead all *B. cinerea* isolates were sensitive to this fungicide. High levels of resistance to TBZ could be explained by the broad, long-term use of this fungicide in regional conventional packinghouses (Brent and Hollomon 2007; Dobra et al. 2008). A discriminatory concentration for Captan

sensitivity was not established by FRAC. The multi-site activity of this fungicide has been related to its full effectiveness despite their extensive and sometimes exclusive use over many years (Brent and Hollomon 2007). All isolates belonging to both pathogens were sensitive to the commercial concentration of Captan (660 mg/L) being *P. expansum* the species showing the lowest sensitivity levels (MIC 166 mg/L). Among the *P. expansum* and *B. cinerea* isolates analysed in this work, no direct relationship between aggressiveness and MIC for TBZ and Captan was detected.

The most frequently isolated yeast genera in active washings were *Aureobasidium*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. These genera have already been reported as effective BCAs against a number of postharvest fruit pathogens under diverse conditions (Robert 1990; Chand-Goyal and Spotts, 1996; Yu et al. 2007; Sugar and Basile 2008; Vero et al. 2009). The identified biota also includes a single isolate of *Cy. infirmominiatum* whose anamorph *Cryptococcus infirmo-miniaturum* was previously reported as pear epiphytic yeast (Chand-Goyal and Spotts 1996). The same researchers also reported the presence of *A. pullulans*, *Cr. albidus* and *R. glutinis* in pears and some isolates of these species showed capacity to reduce decay incidence caused by *P. expansum* in small-scale tests and in semi-commercial and commercial trials (Chand-Goyal and Spotts 1997; Bellows et al. 1999; Sugar and Basile 2008). Our work is the first report about the isolation of *Cr. victoriae*, *Cr. wieringae*, *Cr. tephrensensis*, *R. laryngis* and *C. patagonica* from pear fruit surfaces (Table 3).

In accordance with the selective isolation method proposed in this work, most yeast species detected here has also been isolated from a variety of cold environments. *Cryptococcus*, *Pichia* and *Rhodotorula* genera include several species isolated from cold environment (Scorzetti, Petrescu, Yarrow, and Fell 2000; Starmer et al. 2005; Turchetti et al. 2008). *A. pullulans*, *Cy. infirmominiatum* and *R. mucilaginosa* have been isolated from glacial ice (Tosi, Casado, Gerdol, and Caretta 2002; Starmer et al. 2005; D'Elia, Veerapaneni, Theraisnathan, and Rogers 2009). On the other hand, yeast species *A. pullulans*, *C. patagonica*, *P. membranifaciens* and *R. mucilaginosa* are fairly ubiquitous in both food and natural environments (Querol and Fleet 2006; Sangorrín, Lopes, Giraudo, and Caballero 2007; Gholamnejad, Etebarian, and Sahebani 2010).

This is the first study in which yeast identification at species level has been performed to obtain the real mixed biota present in washings with biocontrol activity. In this sense, interactions between microorganisms in most of the active washings could also be involved in the biocontrol activity of each particular washing. This fact could be taken into account for future development of BCAs based on mixed cultures of yeasts (Viljoen 2006; Sharma et al. 2009). The most frequent mixtures in this work were those containing the species *A. pullulans*, *Cr. albidus* and *Cr. victoriae*.

In a previous work (Robiglio et al. 2011) a quite different microbiota was obtained from the same packinghouse B. That study was based on a different methodological approach for yeast isolation: the utilisation of washing waters only from the surface of healthy pears and the isolation on GPY agar at 26°C. Out of seven species identified in that work, only four were common to this work: *A. pullulans*, *Cr. albidus*, *P. membranifaciens* and *R. mucilaginosa*. This difference could be due to the selective pressure applied in this work during yeast isolation: healthy wounds with a greater availability of nutrients than the surface might be antagonist yeasts because pathogens in the storage room do not grow. The fact that the most

promising yeast isolates obtained in the previous work (Robiglio et al. 2011): *A. pullulans* NPCC 1281 and *R. mucilaginosa* NPCC 1278 showed lower biocontrol activity than most yeast isolates obtained during this work (Table 4) is another evidence for the success of the improved methodology proposed.

Our results clearly indicate that there is a large diversity in the biocontrol capacity of different strains belonging to the same yeast species; however, a relationship between the biocontrol capacity and the origin was not observed. A broad biocontrol effectiveness range was particularly evident for isolates of *A. pullulans*, *Cr. victoriae*, *R. laryngis* and *R. mucilaginosa*. This diversity was also observed by other authors (Robert 1990; Chand-Goyal and Spotts 1996; Lima et al. 1998; Janisiewicz, Tworowski, and Kurtzman 2001; Robiglio et al. 2011). Additionally, Janisiewicz et al. (2001) recommended that in order to find the best antagonist strain of particular yeast species, it would be worthwhile to first explore a single location (e.g., orchard) by making multiple isolations of the same species over time. The differences between different locations within a region or between different geographical regions may be even greater (Chand-Goyal and Spotts 1996).

This research represents the first evidence for the potential use of *Cr. victoriae* to control fruit postharvest diseases. Additionally, although other works report the use of *P. membranifaciens* (Masih and Paul 2002; Santos and Marquina 2004; Cao, Yuan, Hu, and Zheng 2010) and *Cr. albidus* (Fan and Tian 2001; Helbig 2002; Chan and Tian 2005) as BCAs for postharvest diseases on fruit, its potential use on pears has been reported in this work for the first time.

In addition, this work proposes an improved strategy based on the utilisation of fruit wounds at low temperatures as a selective step that overcomes the main limitations of other BCA selection protocols previously described (Wilson et al. 1993; Viñas et al. 1998). Several aspects of previously proposed methodologies were significantly improved in this work: (1) wounded pear fruits were stored for 6 months at $-1/0^{\circ}\text{C}$; (2) pear fruit blocks from healthy wounds were washed and these washings were used to co-inoculate fresh pear wounds with *P. expansum* at $-1/0^{\circ}\text{C}$; (3) regional isolates of *P. expansum* and *B. cinerea* selected for their aggressiveness and sensitivity to fungicides were used in BCA selection; (4) washings exhibiting a reduction in DI higher than 50% and a DR higher than 40% after 50 days at $-1/0^{\circ}\text{C}$ were selected for yeast isolation and (5) yeast isolation was carried out on pear juice agar plates at $-1/0^{\circ}\text{C}$.

Following this improved strategy, four antagonistic microorganisms with potential exploitation as a.i.s for the development of products for postharvest control of blue and grey rot on pear were selected. Future research will focus on the elucidation of the mechanisms of action involved in biological control and on the adaptation of the microorganisms to the fermentation and formulation conditions requested by bioindustries to develop a formulated biofungicide with a potential market.

Acknowledgements

This research was supported by CONICET (PIP 1366), ANPCyT (PICT 2008-1674) and Universidad Nacional del Comahue (I-147) grants. Lutz, M.C. is the recipient of a fellowship from CONICET. We are grateful to UVEG and CSIC for kindly supplying online yeast database access (<http://www.yeast-id.com>).

References

- Baker, K.J., and Cook, R.J. (1974), *Biological control of plant pathogens*, San Francisco: Freeman.
- Bellows, T.S., Fisher, T.W., Caltagirone, L.E., Dahlsten, D.L., Gordh, G., and Huffaker, C.B. (1999), *Handbook of Biological Control, Principles and Applications of Biological Control*, San Diego, New York: Academic Press, p. 1046.
- Bleve, G.F., Grieco, G., Cozzi, A., Logrieco, A., and Visconti, A. (2006), 'Isolation of Epiphytic Yeasts with Potential for Biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on Grape', *International Journal of Food Microbiology*, 108, 204–209.
- Brent, K.J., and Hollomon, D.K. (2007), *Fungicide Resistance, The Assessment of Risk. Fungicide Resistance Action Committee*, (2nd rev. ed.), UK: Fungicide Resistance Action Committee.
- Cao, S., Yuan, Y., Hu, Y., and Zheng, Y. (2010), 'Combination of *Pichia membranifaciens* and Ammonium Molybdate for Controlling Blue Mould Caused by *Penicillium expansum* in Peach Fruit', *International Journal of Food Microbiology*, 141, 173–176.
- Chan, Z., 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.
- Chand-Goyal, T., and 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, 51–64.
- Chand-Goyal, T., and Spotts, R.A. (1997), 'Biological Control of Postharvest Diseases of Apple and Pear Under Semi-commercial Conditions Using Three Saprophytic Yeasts', *Biological Control*, 10, 199–206.
- D'Elia, T., Veerapaneni, R., Theraisnathan, V., and Rogers, S.O. (2009), 'Isolation of Fungi From Lake Vostok Accretion Ice', *Mycologia*, 1016, 751–763.
- Dobra, A., Di Masi, S., Rossini, M., and Engler, D. (1995), '*Penicillium* Species of Postharvest Diseases of Pome Fruit in Argentina', *European Journal of Plant Pathology*, Abs, 1345.
- Dobra, A.C., Sosa, M.C., and Dussi, M.C. (2008), 'Low Incidence of Fungal and Bacterial Diseases in the Pear Production of North Patagonia, Argentina', *Acta Horticulturae*, 800, 907–912.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlendercohen, B., Weiss, B., and Daus, A. (1993), 'Pilot Testing of *Pichia guilliermondii*, A Biocontrol Agent of Postharvest Diseases of Citrus Fruit', *Biological Control*, 3, 47–52.
- Droby, S., Lischinski, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Chand-Goyal, T., Eckert, J.W., and 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.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999), 'Identification of Yeasts by RFLP Analysis of the 58S rRNA Gene and Two Ribosomal Internal Transcribed Spacers', *International Journal Systematic Bacteriology*, 49, 329–337.
- Fan, Q., and Tian, S.P. (2001), 'Postharvest Biological Control of Grey Mold and Blue Mold on Apple by *Cryptococcus albidus* Saito', *Postharvest Biology and Technology*, 3, 341–350.
- Frisvad, J.C., and Samson, R.A. (2004), 'Polyphasic Taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A Guide to Identification of Food and Air-borne terverticillate *Penicillia* and Their Mycotoxins', in *Studies in mycology*, 49, 1–174.
- Gholamnejad, J., Etebarian, H.R., and Sahebani, N. (2010), 'Biological Control of Apple Blue Mold With *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*', *African Journal Food Science*, 4, 001–007.
- Helbig, J. (2002), 'Ability of the Antagonistic Yeast *Cryptococcus albidus* to Control *Botrytis cinerea* in Strawberry', *BioControl*, 47, 85–99.
- Janisiewicz, W.J., and Marchi, A. (1992), 'Control of Storage Rots on Various Pear Cultivars With a Saprophytic Strain of *Pseudomonas syringae*', *Plant Disease*, 76, 555–560.
- Janisiewicz, W.J., and 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., Tworzoski, T.J., and Kurtzman, C.P. (2001), 'Biocontrol Potential of *Metchnikowia pulcherrima* Strains Against Blue Mold of Apple', *Phytopathology*, 91, 1098–1108.
- Janisiewicz, W.J., Pimenta, R.S., and Jurick, W.M. (2011), 'A Novel Method for Selecting Antagonists Against Postharvest Fruit Decays Originating From Latent Infections', *Biological Control*, 59, 384–389.
- Jijalki, M.H. (2011), '*Pichia anomala* in Biocontrol for Apples: 20 Years of Fundamental Research and Practical Applications', *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 93–105.
- Kurtzman, C.P., and Robnett, C.J. (1998), 'Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts From Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences', *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331–371.
- Lennox, C.L., Spotts, R.A., and Cervantes, L.A. (2003), 'Populations of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* spp on Pear Fruit, and in Orchards and Packinghouses, and Their Relationship to Postharvest Decay', *Plant Disease*, 87, 639–644.
- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R., and de Cicco, V. (1998), 'Activity of Two Yeast *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* Against Postharvest Rots on Different Fruits', *Bioscience Science Technology*, 8, 257–267.
- Mari, M., Bertolini, P., and Pratella, G.C. (2003), 'Non-conventional Methods for the Control of Post-harvest Pear Diseases', *Journal Applied Microbiology*, 94, 761–766.
- Masih, E.I., and Paul, B. (2002), 'Secretion of β -1,3-glucanase by the Yeast *Pichia membranefaciens* and Its Possible Role in the Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Grey Mould of Grapevine', *Current Microbiology*, 44, 391–395.
- Pianzola, M.J., Moscatelli, M., and Vero, S. (2004), 'Characterization of *Penicillium* Isolates Associated With Blue Mold on Apple in Uruguay', *Plant Disease*, 88, 23–28.
- Pimenta, R.S., Morais, P.B., Rosa, C.A., and Corrêa, J.A. (2009), 'Utilization of Yeasts in Biological Control Programs', in *Yeast Biotechnology, Diversity and Applications*, eds. T. Satyanarayana and G. Kunze, Germany: Springer Science, Business Media B.V, pp. 199–214.
- Querol, A., and Fleet, G.H. (2006), *The Yeast Handbook Yeasts in Food and Beverages*, Germany: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 452.
- Robert, R.G. (1990), 'Biological Control of Mucor Rot of Pear by *Cryptococcus laurentii*, *C. flavus* and *C. albidus*', *Phytopathology*, 80, 1051–1154.
- Robiglio, A., Sosa, M.C., Lutz, M.C., Lopes, C.A., and Sangorrin, M.P. (2011), 'Yeast Biocontrol of Fungal Spoilage of Pears Stored at Low Temperature', *International Journal of Food Microbiology*, 147, 211–216.
- Sangorrin, M.P., Lopes, C.A., Giraud, R.M., and Caballero, A.C. (2007), 'Diversity and Killer Behaviour of Indigenous Yeasts Isolated From the Fermentation Vat Surfaces in Four Patagonian Wineries', *International Journal of Food Microbiology*, 119, 351–357.
- Santos, A., and Marquina, D. (2004), 'Killer Toxin off *Pichia membranefaciens* and Its Possible Use as a Biocontrolagent Against Grey Mould Disease of Grapevine', *Microbiology*, 150, 2527–2534.
- Scherm, B., Ortu, G., Muzzu, A., Budroni, M., Arras, G., and Migheli, Q. (2003), 'Biocontrol Activity of Antagonistic Yeasts Against *Penicillium expansum* on Apple', *Journal of Plant Pathology*, 85, 3, 205–213.
- Scorzetti, G., Petrescu, I., Yarrow, D., and Fell, J.W. (2000), '*Cryptococcus adeliensis* sp nov, a Xylanase Producing Basidiomycetous Yeast From Antarctica', *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, 153–157.
- Sharma, R.R., Singh, D., and Singh, R. (2009), 'Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables by Microbial Antagonists', *A review Biological Control*, 50, 205–221.
- Smith, C.M., Trivellas, A.E., Johnson, L.B.E., and Joshi, M.M. (1991), 'Methods for Monitoring the Sensitivity of a Range of Fungal Pathogens to Benzimidazole Fungicides', FRAC methods for monitoring fungicide resistance. *Bulletin EPPO*, 21, 336–341.
- Spotts, R.A., and Cervantes, L.A. (2002), 'Involvement of *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis* in Russet of d'Anjou Pear Fruit', *Plant Disease*, 86, 625–628.
- Starmer, W.T., Fell, J.W., Catranis, C.M., Aberdeen, V., Ma, L.J., Zhou, S., and Rogers, S.O. (2005), 'Yeasts in the Genus *Rhodotorula* Recovered From the Greenland Ice Sheet', in *Life*

- in *Ancient Ice, New Jersey*, eds. J.D. Castello and S.O. Rogers, Princeton: University Press, pp. 181–195.
- Sugar, D., and Basile, S.R. (2008), 'Timing and Sequence of Postharvest Fungicide and Biocontrol Agent Applications for Control of Pear Decay', *Postharvest Biology and Technology*, 49, 107–112.
- Sundh, I., and Melin, P. (2011), 'Safety and Regulation of Yeasts Used for Biocontrol or Biopreservation in the Food or Feed Chain', *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 113–119.
- Tosi, S., Casado, B., Gerdol, R., and Caretta, G. (2002), 'Fungi Isolated From Antarctic Mosses', *Polar Biology*, 25, 262–268.
- Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C., and Vaughan-Martini, A. (2008), 'Psychrophilic Yeasts in Glacial Environments of Alpine Glaciers', *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 73–83.
- Vero, S., Garmendia, G., Gonzalez, M.B., Garat, M.F., and Wisniewski, M. (2009), 'Aureobasidium pullulans as a Biocontrol Agent of Postharvest Pathogens of Apples in Uruguay', *Bioscience Science Technology*, 19, 1033–1049.
- Viljoen, B.C. (2006), 'Yeast Ecological Interactions. Yeast–Yeast, Yeast–Bacteria, Yeast–Fungi Interactions and Yeasts as Biocontrol Agents', in *The Yeast Handbook*, eds. A. Querol and G.H. Fleet, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 83–110.
- Viñas, I., Usall, J., Teixido, N., and Sanchis, V. (1998), 'Biological Control of Major Postharvest Pathogens on Apple With *Candida sake*', *International Journal of Food Microbiology*, 40, 9–16.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Droby, S., and Chalutz, E. (1993), 'A Selection Strategy for Microbial Antagonists to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables', *Science Horticulturae*, 53, 183–189.
- Wisniewski, M., Droby, S., Chalutz, E., and Eilam, Y. (1995), 'Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and on the Biocontrol Activity of *Candida oleophila*', *Plant Pathology*, 44, 1016–1024.
- Wisniewski, M., Wilson, C., El Ghaouth, A., and Droby, S. (2001), 'Non-chemical Approaches to Postharvest Disease Control', *Acta Horticulturae*, 553, 407–412.
- Wisniewski, M.E., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., El-Ghaouth, A., and Stevens, C. (2007), 'Postharvest Biocontrol, New Concepts and Applications', in *Biological Control, A Global Perspective*, eds. C. Vincent, M.S. Goettel and G. Lazarovits, London: CAB International, pp. 262–273.
- Yu, T., Chen, J., Chen, R., Huang, P., Liu, D., and Zheng, X. (2007), 'Biocontrol of Blue and Gray Mold Diseases of Pear Fruit by Integration of Antagonistic Yeast With Salicylic Acid', *International Journal of Food Microbiology*, 116, 337–345.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., and Gullino, M.L. (2010), 'Selection and Evaluation of New Antagonists for Their Efficacy Against Postharvest Brown Rot of Peaches', *Postharvest Biology and Technology*, 55, 174–181.
- Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Zhang, H., and Zheng, X. (2008), 'Control of Postharvest Pear Diseases Using *Rhodotorula glutinis* and Its Effects on Postharvest Quality Parameters', *International Journal of Food Microbiology*, 126, 167–171.
- Zhang, H., Zheng, X., Fu, C., and Xi, Y. (2005), 'Postharvest Biological Control of Gray Mould Rot of Pear With *Cryptococcus laurentii*', *Postharvest Biology and Technology*, 35, 79–86.