

vegetable crops. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, Nueva Zelandia, 3–7 de febrero de 2003. p. 33

Silveira, A.C.; Gepp, V.; & Perez, E. 2001. Aislamiento y selección de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Anais da 7ª Reuniao de Controle Biológicos de Fitopatógenos. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho. 26-27 de noviembre de 2001. p.95.

Silvera E., González, P., Mondino, P., Galván, G., y Gepp, V. (1998) Segundo año de evaluación del Control Biológico de la mancha foliar y punta seca de la cebolla (*Allium cepa*) Ocasionada por *Botrytis squamosa* en almacigo. Resumen en Fitopatología Vol 34 (2) p .51-52

Sosa López, A. A. - Cabrera, M.G. - Alvarez, R.E. Ramírez, S.S. y Rolin, H. D. (2000) Propóleos: alternativa en el control biológico de patologías fungosas e las plantas cultivadas. Universidad Nacional Del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

Pezet, R.; Pont, V. and Tabacchi, R. (1999). Simple Analysis of 6-pentyl—Pyrone, a Major Antifungal Metabolite of *Trichoderma* spp., Useful for Testing the Antagonistic Activity of these Fungi. *Phytochemical Analysis* **10**,285–288.

Vero, S. Mondino, P. Burgueño, J. Soubes M. and Wisniewski. M. (2002) Characterization of Biocontrol Activity of Two Yeast Strains from Uruguay Against Blue Mold of Apple. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 26 (1) pp. 91 – 98.

Vero, S., y Mondino, P., 2002. *Control biológico de enfermedades de plantas*. En Perfil Ambiental del Uruguay 2002, Ana Dominguez y Ruben Prieto (Coordinadores) p.81-92

Capítulo 5.8

Bases conceptuales para el Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades



Control biológico de patógenos en postcosecha de manzanas

**Dra. Silvana Vero¹,
Fernanda Garat²
Inés de Aurrecochea³**

¹Docente Cátedra de Microbiología, Facultad de Química (UDELAR)

²Docente Cátedra de Microbiología, Facultad de Química (UDELAR)

³Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía (UDELAR)

Se estima que las pérdidas postcosecha de frutas y vegetales pueden llegar hasta el 25%. Es de suma importancia minimizar las pérdidas en esta etapa ya que aquí se acumulan todos los costos de la cadena productiva. Parte de estas pérdidas se deben a infecciones con patógenos fúngicos. Estas infecciones pueden ocurrir entre la floración y la maduración del fruto o pueden adquirirse durante la cosecha y posterior acondicionamiento y almacenamiento. En el primer caso las infecciones pueden permanecer quiescentes hasta que comience la senescencia del fruto durante el almacenamiento. En el segundo caso los patógenos penetran a la fruta a través de heridas causadas durante la cosecha y el manejo posterior a la misma.

Se estima que las pérdidas postcosecha de frutas y vegetales pueden llegar hasta el 25%.

Para minimizar las pérdidas ocasionadas por este tipo de patógenos se deben tomar medidas tendientes a minimizar el número de heridas por fruto y el inóculo inicial de patógeno. Un bajo número de heridas se puede lograr con cuidadosas medidas de manejo durante y después de la cosecha, mientras que para minimizar el inóculo inicial es necesario extremar las medidas de higiene y desinfección de los envases, de las cámaras frigoríficas y de la fruta misma previo al almacenamiento. Como desinfectante de frutos se pueden utilizar productos químicos tales como hipoclorito de sodio, dióxido de cloro. También existen referencias del uso de productos de origen natural tales como bicarbonato de sodio (2-3%) o ácido acético (4-5%) como primer baño para la fruta previo al almacenamiento, cuyo resultado es una disminución de la aparición de podredumbres causadas por patógenos de heridas. Nuestro grupo está trabajando en este aspecto, y se ha determinado que 100 ppm de hipoclorito de sodio y 10 ppm de dióxido de cloro (temperatura ambiente, pH=6) pueden reducir 10 veces la carga inicial de patógenos en 30 segundos de contacto en condiciones de ensayos de laboratorio. Las pruebas de laboratorio, indican que el bicarbonato de sodio y el ácido acético tiene efecto fungistático, y que concentraciones de 0.5% de bicarbonato inhiben el crecimiento de patógenos en jugo de manzana. Basados en estos resultados se realizarán pruebas en fruta próximamente.

Sin embargo, estas medidas muchas veces no alcanzan para proteger la fruta durante todo el período de almacenamiento,

por lo que se puede recurrir a otros métodos, como ser la protección de la superficie de los frutos con microorganismos capaces de controlar el desarrollo de patógenos que pudieran llegar a la fruta. A estos microorganismos se los llama antagonistas o biocontroladores y el uso de los mismos es una forma de realizar control biológico. Los microorganismos utilizados para este fin deben cumplir con una serie de requisitos:

- ser capaces de controlar cepas patógenas nativas de alta agresividad.
- no ser patógenos para el ser humano, ni animales.
- no producir metabolitos tóxicos en el sitio de acción.
- ser buenos colonizadores de los sitios donde se espera que actúen.
- ser capaces de reproducirse o por lo menos permanecer activos durante todo el período de almacenamiento.

Es por ello que todo trabajo de control biológico debe comenzar con el aislamiento y caracterización de cepas nativas de patógenos de forma de seleccionar las más agresivas para utilizar en la selección de los agentes de biocontrol. El segundo paso consiste en el aislamiento de los potenciales agentes de biocontrol. Los sitios de aislamiento deben ser muy similares a los sitios de aplicación posterior. Luego es necesario realizar la selección de los mejores antagonistas. Para ello, la mejor prueba consiste en ensayos de biocontrol en presencia de los patógenos en condiciones similares a las reales. En el caso de patógenos postcosecha los resultados de la selección realizada en las condiciones de laboratorio son extrapolables a cámaras comerciales siempre que las condiciones de almacenamiento en dichas cámaras sean controladas. El paso posterior es una identificación precisa de los microorganismos seleccionados y un estudio completo de los mecanismos por los cuales ejercen el biocontrol.

En la actualidad existen varias formulaciones comerciales desarrolladas en el extranjero, basadas en el uso de microorganismos biocontroladores para el uso en postcosecha de frutas. Una de ellas es el producto ASPIRE cuyo principio activo es una levadura identificada como *Candida oleophila*. Existe otro producto denominado BIOSAVE basado en la actividad de una bacteria (*Pseudomonas*

syringae). Estos productos han demostrado tener efecto solamente protector sobre la fruta, no resultando efectivos cuando la infección ya está establecida. Por otro lado, utilizados en condiciones comerciales no alcanzan el nivel de protección de los fungicidas químicos. Esto ha llevado al desarrollo de una segunda generación de productos, tratando de alcanzar un mayor nivel de protección. Estos productos incorporan productos naturales tales como el quitosano, enzimas hidrolíticas o bicarbonato de sodio junto a los microorganismos antagonistas de forma de lograr un efecto curativo y de mayor duración. El quitosano es un polisacárido que se puede obtener de la caparazón de moluscos y de las paredes de ciertos hongos. Actúa como barrera protectora, tiene cierta actividad antifúngica y se ha demostrado que induce las respuestas de defensa en la fruta. Las enzimas hidrolíticas utili-

dora fueron aislados de fruta almacenada en cámara de frío por 6 meses.

Los ensayos de selección se realizaron en cámaras a 1°C sobre heridas de fruta inoculadas con patógeno. Estos ensayos consisten en la inoculación de heridas de manzana con el antagonista, dejando una herida como control la cual se inocula sólo con agua estéril. Luego se inoculan todas las heridas con una suspensión del patógeno capaz de lograr una infección del 100% en esas condiciones de almacenamiento.

La fruta se acondiciona en bandejas y se mantiene a 1°C durante 3 meses. Transcurrido ese período, se determina el número de heridas afectadas y el diámetro de la pudrición en las mismas para cada tratamiento (figs. 5-8.1 y 5-8.2)

En la actualidad existen varias formulaciones comerciales desarrolladas en el extranjero, basadas en el uso de microorganismos biocontroladores para el uso en postcosecha de frutas.

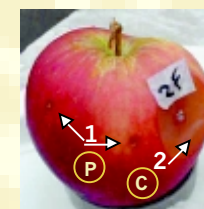


Figura 5-8.1

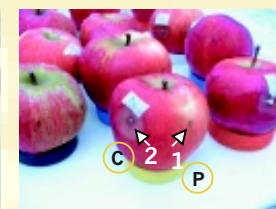


Figura 5-8.2

zadas son enzimas capaces de destruir paredes de hongos tales como quitinasas, glucanasas y proteasas.

Nuestro equipo ha seleccionado microorganismos capaces de proteger heridas de manzanas del ataque de cepas nativas y agresivas de *Penicillium expansum* (moho azul) y *Botrytis cinerea* (moho gris). Las cepas patogénicas fueron seleccionadas de una colección de cepas nativas teniendo en cuenta la agresividad y la resistencia a fungicidas.

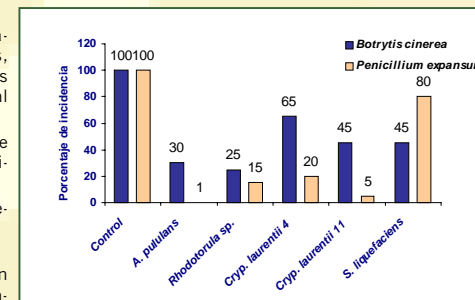
En las Figs. 5-8.1 y 5-8.2 se observa un ensayo de selección de antagonistas contra *Penicillium expansum*. Se muestra la herida control sin aplicación de antagonista y las heridas protegidas por la inoculación previa con un buen antagonista.

En la búsqueda de microorganismos antagonistas, se realizaron aislamientos de varios sitios que incluyeron:

- superficie de frutas sanas, recién cosechadas, provenientes de huertas de manejo convencional y orgánico.
- heridas realizadas sobre fruta en el árbol y recogidas a los 7 días.
- superficie de fruta almacenada en cámara de frío.

Los microorganismos con mayor actividad biocontrola-

Figura 5-8.3 % de incidencia de los patógenos fuente a distintos tratamientos



La Figura 5-8.3 muestra los resultados de un ensayo de selección de antagonistas. Se ve la efectividad de distintos microorganismos en controlar la aparición del moho azul causado por *Penicillium expansum* y del moho gris causado por *Botrytis cinerea*. La gráfica muestra el porcentaje de incidencia de la enfermedad en las heridas inoculadas con los diferentes microorganismos en contraste con aquellas inoculadas solamente con los patógenos (Control). Se puede apreciar que la efectividad depende de la cepa. Cepas de la misma especie (*Cryptococcus laurentii* 4 y *Cryptococcus laurentii* 11) tienen distinta efectividad.

De acuerdo a los datos de disminución de incidencia y disminución de severidad, el mejor antagonista resultó ser una levadura de la especie *Aureobasidium pullulans* con el cual se logró una protección del 99% en fruta inoculada con *Penicillium expansum* y del 70% contra *Botrytis cinerea*. (Fig. 5-8.3) Se trata de un elevado nivel de control con buen efecto protector pero no curativo. Esto significa que una vez establecida la infección por parte de los patógenos, el antagonista es inefectivo.

La identificación de este biocontrolador se corroboró por métodos genéticos por lo

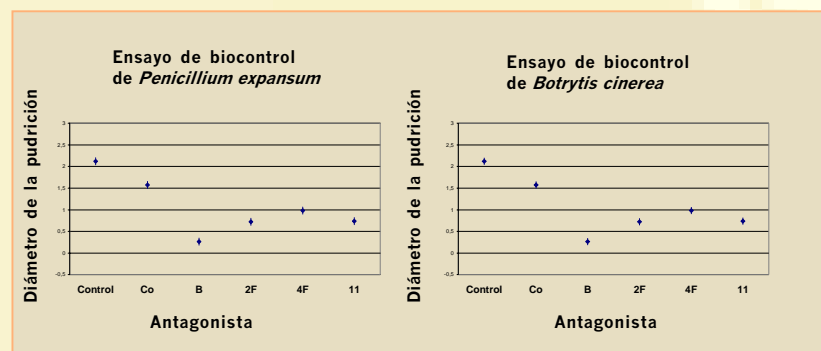


Figura 5-8.4 Antagonistas: Co: *Candida oleophila* B: *Aureobasidium pullulans* 2F: *Rhodotorula glutinis* 4F: *Cryptococcus laurentii* 4 11: *Cryptococcus laurentii* 11

En la Figura 5-8.4 se muestran los diámetros de pudrición ocasionados por los patógenos en presencia y ausencia de antagonistas. Las líneas muestran los intervalos de 90% de confianza. Se puede apreciar que en la mayoría de los casos la pudrición en las heridas protegidas es significativamente menor que en el control.

De acuerdo a los datos de disminución de incidencia y disminución de severidad, el mejor antagonista resultó ser una levadura de la especie *Aureobasidium pullulans* con el cual se logró una protección del 99% en fruta inoculada con *Penicillium expansum* y del 70% contra *Botrytis cinerea*.

cual la identidad del microorganismo es clara. La especie a la cual pertenece este microorganismo no ha sido asociada a patogenicidad en humanos, y esta cepa en particular no es capaz de crecer a temperaturas mayores de 30°C y muere a 37°C (temperatura corporal del ser humano), por lo cual se puede asumir su incapacidad para infectar al ser humano.

Se están estudiando los mecanismos por los cuales este microorganismo actúa como biocontrolador. Se comprobó la capacidad del mismo de colonizar las heridas de manzana, tanto a temperatura ambiente como a temperatura de almacenamiento en cámara (1°C), determinándose su permanencia en las heridas por más de tres meses. Se verificó además, que este antagonista es capaz de producir enzimas que hidrolizan paredes de hongos (quitinasas y glucanasas) y que compite por nutrientes con los patógenos. Es importante destacar que no se detectó la producción de sus-

tancias antibióticas, lo cual es una propiedad deseable en un antagonista, ya que si el biocontrol se ejerce por producción de antibióticos la aparición de cepas patógenas resistentes al mismo, puede ser posible.

Por lo tanto se postula que este microorganismo coloniza las heridas de manzana compitiendo efectivamente por nutrientes y espacio con los patógenos. Las enzimas hidrolíticas producidas por el biocontrolador podrían favorecer la destrucción de los patógenos que no fueron capaces de infectar la herida.

Se está estudiando la posibilidad de combinar este antagonista con sustancias naturales potenciadoras del biocontrol, tales

Se está estudiando la posibilidad de combinar este antagonista con sustancias naturales potenciadoras del biocontrol, tales como el quitosano o derivados del mismo.

como el quitosano o derivados del mismo. Hemos comprobado que el antagonista es capaz de colonizar las heridas en presencia de estas sustancias. Se debe evaluar ahora si el agregado de estas sustancias permite obtener un efecto curativo además del efecto protector ya demostrado.

Bibliografía

El Gauth, A.; Wilson, C.L.; Wisniewski, M.; Droby, S.; Smilanick, J.; Korsten, L. 2002 Biological Control of Postharvest Diseases of Citrus Fruits. En: Biological Control of Crop Diseases. Gnanamanickam, S.S. (Ed.) Marcel Dekker, New York.

Garmendia, G.; Garat, M.F.; Vero, S. 2003. Control biológico de patógenos postcosecha en manzanas. XI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM.11-13 setiembre de 2003. La Plata - Argentina

Mondino, P. & Vero, S. 1999 Control Biológico Postcosecha. Medidas para conservar fruta y hortalizas. *Horticultura Internacional* **26**, 29-36.

Palou, L.; Usall, J.; Muñoz, J.A. Smilanick, J.L. Viñas, I. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology* **24**, 93-96.

Pianzola, M.J., Moscatelli, M. and Vero, S Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay Aceptado para su publicación en *Plant Disease*. Agosto de 2003

Vero, S.; Mondino, P.; Burgueño, J.; Soubes, M.; Wisniewski, M. 2002.Characterization of Biocontrol Activity of Two Yeast Strains from Uruguay Against Blue Mold of Apple. *Postharvest Biology and Technology*. **26**, 91-98

Vero, S., y Mondino, P., 2002. *Control biológico de enfermedades de plantas*. En Perfil Ambiental del Uruguay 2002, Ana Dominguez y Ruben Prieto (Coordinadores) 81-92