

**Boletín
Electrónico**
de la **FCA-UNCo**
Volumen 2, N° 6

JUNIO 2010



**FACULTAD
DE
CIENCIAS
AGRARIAS**

El Boletín Electrónico de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional del Comahue (UNCo), es una publicación electrónica que se edita periódicamente y se distribuye por correo electrónico a los suscriptores.

<http://sites.google.com/site/boletinfaunco/>

Para suscribirse al boletín debe enviar un correo electrónico especificando nombre y apellido, organización y casilla de correo en la que desea recibir la publicación a:

inscripcionesboletinfa@gmail.com

Las noticias y artículos técnicos contenidos en cada número son responsabilidad de sus autores y no reflejan necesariamente la opinión de la editorial. Pueden ser reproducidos mencionando autor, fecha, volumen y número del Boletín.

Coordinación General: Secretaría de Extensión Universitaria de la FCA, Adriana Bünzli. **Comité Editorial:** María Cristina Aruani, Norma Barnes, Sergio Behmer, Juan Carlos Forquera, Pablo D. Reeb, Andrés Venturino.

Facultad de Ciencias Agrarias, UNCo
Ruta 151, km 12,5.
(8303) Cinco Saltos, Río Negro,
Patagonia, Argentina.
Tel: +54-299-4980124.
Fax: +54-299-4982200

PODREDUMBRES de POSTOSECHA en PERAS: Búsqueda de Posibles Antagonistas Biológicos

M. Cristina Sosa^{1,2,3}, Andrea Robiglio², M. Cecilia Lutz^{1,2,3},
Christian A. Lopes^{2,3} y Marcela P. Sangorrín^{2,3*}

¹ Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias

² Laboratorio de Microbiología y Biotecnología, Facultad de Ingeniería

³ Instituto Multidisciplinario de Investigación y Desarrollo de la Patagonia Norte (IDEPA, CONICET- UNComahue)

*sangorrimarcela@conicet.gov.ar

Las podredumbres más importantes de poscosecha en peras de la región de los valles de Río Negro y Neuquén, son el “moho azul” causado por *Penicillium expansum* y *Penicillium* spp. y el “moho gris” causado por *Botrytis cinerea* (Dobra et al. 2008). Las restricciones en el uso de principios activos de fungicidas de síntesis - falta de registro- y en los límites máximos de residuos permitidos, así como la pérdida de eficacia de algunos fungicidas, dada la presencia de cepas de *Penicillium* y *Botrytis* resistentes, evidencian la falta de estrategias alternativas más seguras, amigables con el ambiente y a la vez, eficientes en el control de estos patógenos.

En diferentes estudios, se ha demostrado que el control biológico

de enfermedades de poscosecha mediante microorganismos epífitos (bacterias y levaduras) es una alternativa promisoriosa y factible de incorporarse en sistemas de producción de fruta orgánica e integrada. En los últimos años, se han seleccionado levaduras como Agentes de Control Biológico (ACB) de patógenos de citrus, frutos de pepita y frutillas en poscosecha (Janisiewicz, 2010). Sin embargo, sólo unos pocos ACB se formularon comercialmente y no tienen registro en Argentina. En el año 2007 se inició una línea de investigación en UNCo para abordar la problemática del control de podredumbres en pera en la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, proponiendo como estrategia las levaduras nativas como ACB.

¿Por qué en pera?

Argentina lidera las exportaciones mundiales, con el 40% del total producido en el Hemisferio Sur.

Las podredumbres aparecen después de 3-4 meses de conservación en frío y aumentan a tiempos mayores.

¿Qué ventajas presentan las levaduras?

Se aíslan de los mismos alimentos que se quieren preservar.

Se reconocen como "GRAS" (Generally Recognized Safe). No afectan la salud humana.

Utilizan un amplio rango de nutrientes, crecen con baja concentración de oxígeno, baja actividad de agua, baja temperatura y sobreviven en condiciones ambientales adversas.

Son genéticamente estables y efectivas en bajas cantidades.

¿Por qué la aplicación de ACB en postcosecha?

El ambiente de conservación de la fruta es confinado y controlado, lo que facilita su aplicación y adaptación.

El valor agregado de los productos cosechados, justifica mayores costos de aplicación.

En este estudio se planteó que "*levaduras nativas aisladas y seleccionadas de fruta de pera almacenada a 0/-1°C, tienen mayor adaptación al hábitat de conservación y mejor capacidad antagónica frente a los patógenos regionales, que las levaduras comerciales*". En este primer artículo se presenta el trabajo de aislamiento y caracterización de los principales patógenos de postcosecha y de las levaduras epífitas de peras de la región.

Aislamiento y Caracterización de Patógenos: *B. cinerea* y *P. expansum*

Los patógenos se aislaron de peras con síntomas de moho gris y moho azul (Figura 1), conservadas en una cámara frigorífica de la región (A), con manejo convencional de la fruta: tratamiento de tiabendazol en el drencher y en la línea de empaque.

Mediante métodos morfológicos y culturales se identificó a *P. expansum*, agente causal del moho azul en 13 aislamientos y a *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris en 10 aislamientos (Figura 2). La identificación de *P. expansum* se confirmó por el método molecular (Pianzzola *et al.*, 2004).

Los aislamientos de *P. expansum* y *B. cinerea* se caracterizaron por **virulencia** en ensayos de 7 días a 24°C (diámetro de lesión en pera) y por **resistencia** a dos fungicidas usados habitualmente en la región: tiabendazol (TBZ) y captan, cuyas dosis comerciales son 500 y 660 ppm respectivamente. Se realizaron

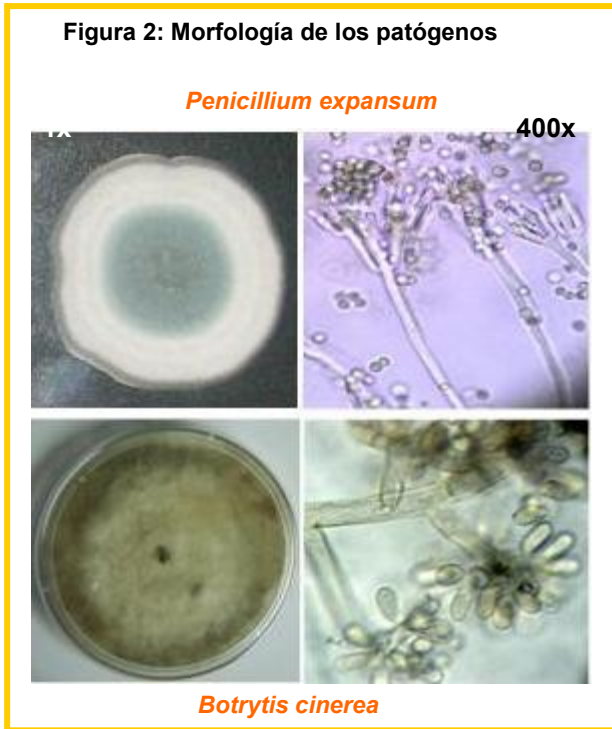
Figura 1. Peras con síntomas de podredumbre.



ensayos *in vitro* a concentraciones de 1 a 2000 ppm, determinándose la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada aislamiento de patógeno a cada fungicida (Tabla 1).

En cuanto a la resistencia al TBZ, el criterio usado para la caracterización de los patógenos fue la concentración discriminatoria propuesta por la FRAC (Comité de Acción para la Resistencia a Fungicidas):

Figura 2: Morfología de los patógenos



* Medias +/- desvío estándar. Valores con la misma letra dentro de cada grupo de patógeno, no son estadísticamente diferentes ($P > 0,05$).

Tabla 1. Virulencia y resistencia de *P. expansum* y *B. cinerea*

Patógeno y aislamiento	Diámetro de lesión (mm)*	CIM (ppm)		
		Captan	TBZ	
<i>P. expansum</i>	AP1	22,6 ± 2,0 abc	5	250
	AP2	22,3 ± 5,0 abc	5	>2000
	AP3	24,6 ± 4,0 abc	5	250
	AP4	27,0 ± 1,0 bc	5	250
	AP5	20,0 ± 5,0 ab	5	250
	AP6	22,3 ± 7,0 abc	5	1
	AP7	29,0 ± 2,0 c	5	250
	AP8	22,3 ± 3,0 abc	5	250
	AP9	20,0 ± 5,0 ab	5	250
	AP10	17,6 ± 3,0 a	5	250
	AP11	26,0 ± 6,0 bc	5	1
	AP12	20,3 ± 0,5 ab	5	5
	AP13	29,0 ± 6,0 c	5	>2000
<i>B. cinerea</i>	AB1	37,6 ± 8,0 ab	41	250
	AB2	45,3 ± 9,0 b	88	250
	AB3	24,0 ± 6,0a	41	250
	AB4	28,6 ± 10,0ab	88	250
	AB5	38,0 ± 1,0 ab	41	250
	AB6	34,0 ± 11,0 ab	41	250
	AB7	33,6 ± 6,0 ab	41	250
	AB8	34,3 ± 11,0 ab	41	250
	AB9	39,6 ± 12,0 ab	5	1
	AB10	39,3 ± 4,0 ab	41	250

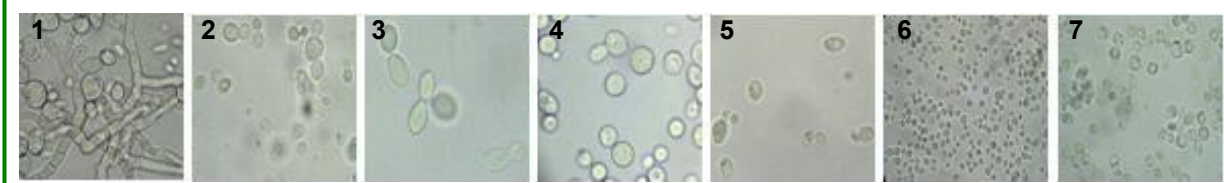
* Medias +/- desvío estándar. Valores con la misma letra dentro de cada grupo de patógeno, no son estadísticamente diferentes ($P > 0,05$).

aislamiento sensible: crecimiento por debajo de 10 ppm; *aislamiento resistente*: crecimiento desde y por encima de 10ppm. El 76% de aislamientos de *P. expansum* y 90% de *B. cinerea* fueron resistentes a TBZ (Tabla 1). Se destacaron los aislamientos AP7 y AP13 de *P. expansum* por presentar mayor diámetro de podredumbre (29mm) y resistencia a TBZ. Además para este patógeno se encontraron dos aislamientos sensibles a la dosis comercial del TBZ (AP2 y AP13). Dentro de los aislamientos de *B. cinerea*, AB2 fue el más virulento, con 45mm de lesión, y con alta resistencia a TBZ, pero con CIM menores a la dosis comercial de este fungicida. Todos los aislamientos de *P. expansum* fueron sensibles a 5 ppm de captan (Tabla 1), en cambio el 70% de los aislamientos de *B. cinerea* pudo crecer hasta 41 ppm y el 20% hasta 88 ppm de TBZ.

Aislamiento y Caracterización de levaduras

De superficie de peras sanas con 7 meses de conservación a 0/-1°C en dos cámaras frigoríficas de la región: con manejo convencional (A) y con manejo de transición a orgánico certificado (B), se aislaron 75 levaduras epífitas en total, que se agruparon por caracteres culturales y microscópicos (Figura 3).

Figura 3. Grupos de levaduras establecidos por características culturales y microscópicas (400x)



Se identificaron las especies de cada grupo (Tabla 2) por métodos moleculares propuestos por Esteve-Zarzoso et al. (1998). El 64% de las levaduras aisladas provinieron de la cámara de transición a orgánico (B), presentando mayor diversidad de especies que en la cámara A.

Tabla 2. Diversidad y abundancia de especies de levaduras aisladas de pera.

grupo	Especies de levaduras	Número de aislamientos (%)		Total
		Cámara A	Cámara B	
1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	10 (37)	24 (50)	34
2	<i>Pichia philogaea</i>	-	7 (15)	9
3	<i>Cryptococcus diffluens</i>	-	9 (19)	7
4	<i>Cryptococcus albidus</i>	1 (4)	1 (2)	2
5	<i>Pichia membranifaciens</i>	-	1 (2)	1
6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5 (18)	6 (12)	11
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11 (41)	-	11
Total /cámara		27	48	75

En el biocontrol de patógenos, las levaduras pueden emplear varias estrategias, dos de ellas son: buen **crecimiento en frío** y producción de **toxinas killer** (proteínas que producen y resultan letales para otros microorganismos tales como hongos patógenos).

Estas dos características se evaluaron en los aislamientos epífitos de pera, en otras levaduras de bodegas vínicas productoras de toxinas *killer* y en una levadura comercial propuesta para control biológico poscosecha en otros países (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización de levaduras de pera y de otros orígenes

Fuente	Especies de levaduras (Nº de aislamientos)	Crecimiento a 0°C			Toxinas killer Nº (%)
		+	m	-	
Epífitas de pera	<i>A. pullulans</i> (34)	28	4	2	28 (82)
	<i>C. diffluens</i> (9)	7	1	1	8 (90)
	<i>C. albidus</i> (2)	1	-	1	2 (100)
	<i>P. membranifaciens</i> (1)	-	1	-	1 (100)
	<i>P. philogaea</i> (7)	7	-	-	4 (57)
	<i>R. mucilaginosa</i> (11)	7	2	2	7 (63)
	<i>S. cerevisiae</i> (11)	-	-	1	11 (100)
Bodegas regionales	<i>H. uvarum</i> (2)	1	-	1	2 (100)
	<i>M. pulcherrima</i> (2)	1	-	1	2 (100)
	<i>T. delbrueckii</i> (2)	1	-	1	2 (100)
	<i>W. anomala</i> (2)	1	-	1	2 (100)
Comercial	<i>C. albidus</i> C85	1	-	-	1 (100)

+ = alto, m= moderado - = ausente

En este estudio se demostró que:

- En la región, existen aislamientos de *P. expansum* y *B. cinerea* de pera resistentes a TBZ, que respaldan la necesidad de métodos de control alternativos a los fungicidas.
- El manejo libre de químicos conserva mejor la diversidad y abundancia de la flora epífita de levaduras de la fruta de la cámara B.
- Existe un alto porcentaje de levaduras productoras de toxinas *killer* y con buen crecimiento a 0°C, características alentadoras en la búsqueda de buenos antagonistas.
- Las levaduras aisladas de pera *A. pullulans*, *C. albidus* y *P. membranifaciens*, han sido reportadas como eficientes antagonistas de patógenos en poscosecha.

En el próximo artículo se presentarán los estudios sobre la capacidad biocontroladora de las levaduras nativas y su comparación con la levadura comercial.

Bibliografía de referencia

- Dobra, A., M.C. Sosa & M.C. Dussi. 2008. Low Incidence of Fungal and Bacterial Diseases in the Pear Production of North Patagonia. Argentina. Acta Horticulturae Nº 800. pp. 907-912.
- Esteve-Zarzoso, B. Belloch, F. Uruburu & A. Querol. 1998. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bact. 49: 329-337.
- Janisiewicz W.J., 2010. Quo vadis of biological control of postharvest diseases. D. Prusky & M.L. Gullino (eds.), *Postharvest Pathology*, Vol. 2, Springer Science.
- Pianzola, M.J, M. Moscatelli & S. Vero., 2004. Characterization of *Penicillium* Isolates Associated with Blue Mold on Apple en Uruguay. Plant Dis. 88 (1): 23-28.