



Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche

**Diversidad de levaduras en fruta fina de la  
Patagonia: selección de potenciales  
antagonistas de patógenos de poscosecha.**



Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología

Lic. en Cs. Biológicas Sofía Natividad López

Directora: Dra. María Belén Pildain  
Codirectora: Dra. Marcela Paula  
Sangorrin

2021

*A Santiago*

# **AGRADECIMIENTOS**

Nadie consigue nada solo, es por ello que agradezco profundamente a todas las personas e instituciones que fueron parte de este proceso:

- Al Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP) por proporcionarme todo lo necesario para poder realizar este trabajo.
- Al CONICET, la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (SCTeIP) del Chubut y a Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (PICT) por el financiamiento para poder llevar adelante esta Tesis.
- Al Programa BEC.AR por otorgarme una Beca de estadía de Doctorado en Ciencia y Tecnología en España.
- Al Instituto de Investigación de Tecnología Agroalimentaria (IRTA) de la Generalitat de Catalunya por recibirme y con total generosidad permitirme realizar allí parte de mi trabajo de investigación.
- Al PROBIEN por brindarme el espacio para realizar parte de este trabajo.
- A Belén por tanta generosidad para enseñarme, por ser un ejemplo como profesional y formadora, por cada oportunidad brindada, por su confianza, paciencia, aliento permanente y por creer en mí, a veces más que yo misma.
- A Marcela por enseñarme tanto sobre el biocontrol, por su tiempo, aliento, compromiso, dedicación y por estar cada vez que la necesité.
- A las Dras. Miriam Etcheberry y Cecilia Mestre y al Dr. Martín Moliné, por su tiempo, aportes y correcciones que permitieron mejorar la presentación y escritura de este manuscrito.
- A todos los integrantes del área de Protección Forestal, por darme la posibilidad formar parte de este grupo de trabajo, por la calidez y por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, a mis compañeras y compañeros de oficina, especialmente a Lau G.
- A las alumnas de la Lic, en Ciencias Biológicas de la UNPSJB que realizaron sus Trabajos de Campo y Laboratorio en el marco de este tema de investigación.
- A mis amigas, a Vale por su incondicionalidad, su tiempo y hermandad siempre. A Clau, Pame y Lau V. por estar siempre, por acompañarme y alegrarse con cada logro.
- A Shir, por estar, amar y cuidar a Santiago.
- Por último, a las personas más importantes, a mi familia por su apoyo y aliento en cada uno de mis pasos. Especialmente a Edu y a Santi por aguantar mis ausencias y por acompañarme y motivarme con paciencia en el proceso de escritura. LOS AMO!!

# **RESUMEN**

Las cerezas, frambuesas y zarzamoras se comercializan frescas y se almacenan en frío para extender su vida útil. Un problema de estos productos son las pérdidas en poscosecha causada por mohos. En nuestro país no hay fungicidas registrados para la etapa posterior a la cosecha en estas frutas. Motivo por el cual, el uso de agentes de control biológico (ACB) se propone como un método alternativo para el control de las enfermedades de poscosecha.

En este marco, el objetivo general de esta tesis fue generar información sobre los mohos causantes de enfermedades de poscosecha en fruta fina; y seleccionar levaduras indígenas de Patagonia como potenciales ACB para estos patógenos. Para ello se llevó a cabo: 1) Aislamiento e identificación de hongos patógenos y levaduras endo y epifíticas a partir de frutos en condiciones de producción convencional y orgánica; 2) Caracterización y selección de hongos en base a su virulencia, resistencia a fungicida y concentración infectiva mínima (CIM); 3) Selección de levaduras antagonistas por su capacidad biocontroladora en condiciones de conservación de la fruta; 4) Determinación de mecanismos de acción involucrados en la capacidad antagónica de las levaduras seleccionadas; 5) Evaluación de la disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura y pH en el crecimiento de las levaduras; 6) Determinación de la concentración efectiva mínima (CEM) de cada aislamiento de levadura.

Como resultado se obtuvieron 43 aislamientos de mohos a partir de fruta con síntomas con enfermedad, determinados taxonómicamente en 5 géneros y 9 especies. La caracterización de la virulencia, CIM y resistencia al fungicida iprodione, demostró que *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491 son aislamientos altamente patogénicos para las frutas finas desde el almacenamiento hasta su comercialización. Ambas especies fueron aisladas de la zona del Paralelo 42°.

Se obtuvieron 660 aislamientos de levaduras nativas de cerezas, frambuesas y zarzamoras, a partir de aguas de lavados, utilizando diferentes técnicas y tiempos de conservación de la fruta. Posteriormente, la evaluación de la adaptación al frío demostró que 100 aislamientos fueron capaces de crecer a 0°C (temperatura de almacenamiento de la fruta). A partir de la identificación molecular, las levaduras se distribuyeron en 9 géneros y 20 especies.

Se seleccionaron 52 aislamientos de levaduras para evaluar su capacidad antagonista frente a *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491 en cerezas y 15 aislamientos para ensayos en frambuesas y zarzamoras. Además, se evaluó la eficacia de levaduras de formulación comercial (Yield Plus y Boni Protect) y NPCC1250 *Pichia membranifaciens* y NPCC1263 *Vishniacozyma victoriae*, levaduras biocontroladoras de patógenos de pera. Las características de las frambuesas y zarzamoras, pérdida de firmeza y alto nivel de inóculo de patógenos que traen estos frutos del campo, requirieron desarrollar una metodología para la evaluación del potencial biocontrolador de las levaduras sobre la infección natural de mohos. Se determinó también, que las frambuesas y zarzamoras traen una alta carga de inóculo de *Botrytis cinerea*, capaz de causar el deterioro de la fruta en poscosecha, por lo que se incluyó también en los análisis posteriores.

Luego, se seleccionaron los diez aislamientos de levaduras con mayor efecto sobre la virulencia (reducción del 50% o más) de uno o ambos patógenos en fruta almacenada a 0°C y/o 22°C. La levadura comercial Yield Plus mostró resultados equiparables a los obtenidos con levaduras nativas, mientras que Bony Protect y las levaduras ACB de pera, redujeron la incidencia de los patógenos en menor porcentaje que las nativas (entre 0 -

32%). Se evaluó la posibilidad de mejorar la eficacia de los ACB a través de mezclas de dos levaduras (1:1), pero estas no evidenciaron actividad sinérgica que aumente la efectividad que tienen las levaduras por separado.

En cuanto a la determinación de los mecanismos de acción *in vitro*, vinculados a la actividad antagonista de los diez aislamientos de levaduras, se observó que: *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 fueron las levaduras con una batería de mecanismos de acción más amplia pero no fueron capaces de producir toxinas *killer* ni de competir por hierro.

A partir de estas observaciones se concluyó que estos tres aislamientos presentan mayor potencial ACB, por lo cual se evaluó su comportamiento frente a cambios fisiológicos (temperatura, pH y actividad de agua ( $a_w$ ) y la determinación de la CEM de inóculo de ACB para obtener la mayor efectividad frente a *Mucor piriformis*, *Penicillium crustosum*, y *B. cinerea*. Estos ensayos mostraron que: las tres levaduras tienen mayor crecimiento en la combinación  $a_w$  x temperatura 0.995 a 20°C y tolerancia a modificación del pH. *A. pullulans* ccSL1141 fue el que mostró mayor crecimiento a 0° y 5°C. *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 fue capaz de crecer en todas las temperaturas, rangos de pH y  $a_w$ . Las CEM de las tres levaduras se encuentran en concentraciones del orden de  $10^7$  cél/mL. *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 fue la levadura más efectiva al producir reducción sobre la virulencia de los tres patógenos evaluados.

De esta manera esta Tesis aporta:

- los primeros registros de la diversidad de hongos y levaduras asociadas a frutas finas de Patagonia,
- el primer registro de *P. crustosum* y *M. piriformis* como los patógenos más frecuentes, responsables del deterioro de cerezas, frambuesas y zarzamoras en Patagonia,
- el primer estudio de la capacidad antagónica de levaduras nativas adaptadas al frío frente a patógenos de poscosecha de interés regional,
- la caracterización de diez levaduras nativas adaptadas al frío con capacidad antagonista a través del estudio de los mecanismos de acción en ensayos *in vitro*,
- información relevante para futuros procesos de producción de biomasa a gran escala a través del comportamiento de *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 frente a cambios fisiológicos y de la CEM para asegurar el efecto antagónico,
- el primer registro y caracterización de la especie *Cystofilobasidium capitatum* como potencial ACB con condiciones para continuar con las etapas de desarrollo de un bioproducto por su capacidad de crecimiento en un amplio rango de temperaturas, pH,  $a_w$ , espectro de acción más amplio y concentraciones efectivas bajas.

# **SUMMARY**



Cherries, raspberries, and blackberries (fine fruits) are marketed fresh and cold stored to extend their shelf life. A problem with these products is the postharvest losses caused by molds. In our country there are no registered fungicides for the post-harvest stage on these fruits. Reason why, the use of biological control agents (CBA) is proposed as an alternative method for the control of post-harvest diseases.

Within this framework, the general objective was to generate information on molds that cause postharvest diseases in fine fruit; and select indigenous Patagonian yeasts as potential CBAs for pathogens. For this, the following was carried out: 1) isolation and identification of pathogenic fungi and endo and epiphytic yeasts from fruits under conditions of conventional and organic production; 2) Characterization and selection of fungi based on their virulence, resistance to fungicide and minimum infective concentration (MIC), 3) Selection of antagonistic yeasts for their biocontrol capacity under fruit conservation conditions; 4) Determination of mechanisms of action involved in the antagonistic capacity of the selected yeasts; 5) Evaluation of water availability (aw), temperature and pH in yeast growth; 6) Determination of the minimum effective concentration (CEM) of each yeast isolate.

As a result, 43 mold isolates were obtained from fruit with symptoms of disease, taxonomically determined in 5 genera and 9 species. The characterization of virulence, MIC and resistance to the fungicide iprodione, showed that *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 and *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491 are highly pathogenic isolates for fine fruits from storage to marketing. Both species were isolated from the 42° Parallel zone.

660 isolates of native yeast from cherries, raspberries and blackberries were obtained from washing waters, using different techniques and fruit preservation times. Subsequently, the cold adaptation evaluation showed that 100 isolates were able to grow at 0°C (fruit storage temperature). From the molecular identification, the yeasts were distributed in 9 genera and 20 species.

52 yeast isolates were selected to evaluate their antagonistic capacity against *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 and *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491 in cherries and 15 isolates for tests on raspberries and blackberries. In addition, the efficacy of commercially formulated yeasts (Yield Plus and Boni Protect) and NPCC1250 *Pichia membranifaciens* and NPCC1263 *Vishniacozyma victoriae*, biocontrolling yeasts of pear pathogens, were evaluated. The characteristics of raspberries and blackberries, loss of firmness and high level of pathogen inoculum brought by these fruits from the field, required the development of a methodology for evaluating the biocontrol potential of yeasts under natural mold infection. It was also determined that raspberries and blackberries carry a high load of inoculum of *Botrytis cinerea*, capable of causing deterioration of the fruit in post-harvest, which is why it was also included in subsequent analyzes.

Later, ten yeast isolates with the greatest effect on the virulence (reduction of 50% or more) of one or both pathogens in fruit stored at 0°C and / or 22°C were selected for their ability to reduce the virulence of *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 and *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491. The commercial Yield Plus yeast showed results comparable to those obtained with native yeasts, while Bony Protect and CBA pear yeasts reduced the incidence of pathogens in a lower percentage than native yeasts (between 0 - 32%).

To improve the efficiency of the CBA, we performed mixtures of two yeasts (1: 1), but these did not show synergistic activity that increases the effectiveness of the yeasts separately.

Regarding the determination of the mechanisms of action *in vitro*, linked to the antagonistic activity of the ten yeast isolates, it was observed that: *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 and *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 were the yeasts with a battery of broader mechanisms of action. Also, they were not capable of producing killer toxins or competing for iron.

Based on these observations, it was concluded that these three isolates have a higher CBA potential, which is why its behavior against physiological changes (temperature, pH and water activity ( $a_w$ ) and the determination of the CEM of ACB inoculum were evaluated to obtain the greatest effectiveness against *Mucor piriformis*, *Penicillium crustosum*, and *B. cinerea*. These tests showed that: the three yeasts have higher growth in the combination  $a_w$  x temperature 0.995 at 20°C and pH modification tolerance. *A. pullulans* ccSL1141 was the one that showed the highest growth at 0°C and 5°C. *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 was able to grow at all temperatures, pH ranges, and  $a_w$ . The CEM of the three yeasts are found in concentrations of the order of  $10^7$  cél/mL. *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 was the most effective yeast in producing a reduction in virulence of the three pathogens evaluated.

In this way this Thesis provides:

- the first records of the diversity of fungi and yeasts associated with fine fruits of Patagonia,
- the first record of *P. crustosum* and *M. piriformis* as the most frequent pathogens, responsible for the deterioration of cherries, raspberries and blackberries in Patagonia.
- the first study of the antagonistic capacity of native yeasts adapted to the cold against post-harvest pathogens of regional interest.
- the characterization of ten native yeasts adapted to the cold with antagonistic capacity through the study of the mechanisms of action in *in vitro* tests.
- relevant information for future large-scale biomass production processes through the behavior of *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 and *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 against physiological and CEM changes to ensure the antagonistic effect.
- the first record and characterization of the *Cystofilobasidium capitatum* species as a potential CBA with conditions to continue with the stages of development of a bioproduct due to its capacity for growth in a wide range of temperatures, pH,  $a_w$ , broader spectrum of action and effective concentrations low.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>1. LAS FRUTAS FINAS .....</b>	<b>18</b>
1.1 Importancia de las frutas finas a nivel mundial.....	18
1.2 Producción de frutas finas en Argentina y en Patagonia.....	19
1.3 Cosecha y poscosecha de frutas finas.....	22
1.3.1 Cosecha de cerezas.....	22
1.3.2 Poscosecha de cerezas.....	22
1.3.3 Cosecha de frambuesas y zarzamoras .....	24
1.3.4 Poscosecha de frambuesas y zarzamoras .....	24
1.4 Características de la producción.....	25
<b>2. PATÓGENOS DE POSCOSECHA.....</b>	<b>26</b>
2.1 Pérdidas producidas en la poscosecha.....	26
2.2 Patógenos de poscosecha en frutas finas.....	27
2.3 Control químico de las enfermedades de poscosecha en frutas finas.....	28
2.3.1 Resistencia a fungicidas .....	29
2.4 Alternativas al uso de fungicidas químicos.....	30
2.4.1 Utilización de agua clorada.....	30
2.4.2 Utilización de atmósferas modificadas.....	30
2.4.3 Utilización de calcio.....	30
2.4.4 Utilización de microorganismos antagonistas como agentes de control biológico ....	31
<b>3. LAS LEVADURAS .....</b>	<b>31</b>
3.1. Levaduras en frutas .....	32
3.2 Levaduras adaptadas al frío.....	32
3.3 Levaduras como agentes de control biológico .....	33
3.4 Desarrollo de un agente de control biológico basado en levaduras.....	34
3.4.1 Criterios para la selección de una levadura antagonista ideal .....	34
3.4.2 Etapas y factores en el desarrollo de una levadura ACB para la obtención de un bioproducto .....	35
3.4.3 Estrategia de aislamiento y selección de levaduras como ACB.....	36
3.4.4 Mecanismos de acción de las levaduras antagonistas .....	37
3.4.5 Mejoramiento de la capacidad biocontroladora de las levaduras.....	42
3.4.6 Producción de agentes de control biológico.....	43
3.5 Ventajas e inconvenientes en el uso de agentes de biocontrol .....	44
3.6 Perspectivas de los agentes de control biológico .....	45
3.7 Bioproductos: Agentes de control biológico comercializados .....	45
3.8 Levaduras como ACB de patógenos de poscosecha en fruta fina.....	47
3.9 Levaduras como ACB en Argentina .....	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>

<b>CAPITULO I AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACION DE PATÓGENOS</b>	<b>51</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>53</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>53</b>
<b>MATERIALES</b> .....	<b>53</b>
Medios de cultivo utilizados para el aislamiento, crecimiento e identificación de hongos filamentosos .....	53
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
1. Sitios de muestreo .....	54
2. Aislamiento de hongos .....	56
3. Evaluación de virulencia .....	57
4. Identificación de los hongos aislados.....	58
4.1 Identificación morfológica .....	58
4.2 Identificación molecular, extracción de ADN y condiciones de PCR .....	59
4.3 Análisis filogenético.....	59
5. Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas <i>in vitro</i> .....	60
6. Estimación de la concentración infectiva mínima (CIM) .....	60
7. Análisis estadísticos .....	60
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
1. Aislamiento de patógenos a partir de frutas enfermas.....	61
2. Evaluación de la virulencia de los hongos aislados en cerezas .....	61
3. Evaluación de la virulencia de los hongos aislados en frambuesas y zarzamoras .....	65
4. Identificación de hongos aislados .....	66
5. Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas <i>in vitro</i> .....	68
6. Estimación de la concentración mínima infectiva (CIM) .....	69
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>70</b>
<b>CAPITULO II AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACION DE LEVADURAS</b>	<b>75</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>76</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>77</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>77</b>
<b>MATERIALES</b> .....	<b>77</b>
Material vegetal.....	77
Medios de cultivo utilizados .....	77
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>78</b>
1. Aislamiento de las levaduras.....	78
1.1 Levaduras epifíticas en cerezas, frambuesas y zarzamoras .....	78
1.2 Levaduras endofíticas de cerezas .....	79
1.3 Aislamiento selectivo en cereza .....	79

1. Selección de levaduras por crecimiento en frío.....	80
3. Identificación molecular de las levaduras .....	80
3.1 Extracción de ADN .....	80
3.2 Condiciones de PCR.....	81
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
1. Aislamiento de las levaduras.....	81
2. Selección de levaduras por crecimiento en frío.....	82
3. Identificación molecular de las levaduras .....	83
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>88</b>
<b>CAPITULO III EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DE LEVADURAS NATIVAS .....</b>	<b>93</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>94</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>95</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>96</b>
<b>MATERIALES .....</b>	<b>96</b>
Material vegetal.....	96
Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos .....	96
Microorganismos.....	97
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>98</b>
1. Crecimiento y producción de inóculo de los hongos patógenos y levaduras con potencial biocontrolador .....	98
2. Biocontrol en frutas finas .....	98
2.1 Biocontrol en cerezas .....	98
2.2 Biocontrol en frambuesas y zarzamoras.....	99
3. Combinación de levaduras: Co-inoculación en cerezas .....	100
4. Análisis estadístico.....	102
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>102</b>
<b>1. Biocontrol en fruta fina.....</b>	<b>102</b>
1.1. Biocontrol en cerezas .....	102
1.2. Biocontrol en frambuesas y zarzamoras.....	110
2. Combinación de levaduras: Co-inoculación en cerezas .....	115
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>126</b>
<b>CAPITULO IV CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN .....</b>	<b>131</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>132</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>133</b>
<b>OBJETIVO PARTICULAR.....</b>	<b>133</b>
<b>MATERIALES .....</b>	<b>133</b>
Microorganismos.....	133
Medios de cultivo utilizados .....	134

Soluciones utilizadas:.....	134
Enzimas comerciales.....	135
Reactivos.....	135
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>135</b>
1. Producción de compuestos antifúngicos .....	135
1.1 Inhibición de la germinación de mitosporas de los patógenos .....	135
1.2 Evaluación de producción de sustancias difusibles de las levaduras biocontroladoras .....	136
1.3 Evaluación de producción de compuestos orgánicos volátiles (COV) de las levaduras biocontroladoras.....	136
2. Producción de enzimas líticas extracelulares de las levaduras antagonicas analizadas ....	137
2.1. Actividad quitinasa.....	137
2.2 Actividad proteasa.....	137
2.3 Actividad glucanasa .....	138
3. Capacidad de formación de biofilms por parte de las levaduras antagonicas .....	138
4. Producción de toxinas killer por parte de las levaduras antagonicas .....	138
5. Producción de sideróforos.....	139
6. Análisis estadísticos .....	139
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>139</b>
1. Producción de compuestos antifúngicos .....	139
2. Producción de enzimas líticas extracelulares de las levaduras antagonicas analizadas ....	142
3. Capacidad de formación de biofilms por parte de las levaduras antagonicas .....	144
4. Producción de toxinas killer y sideróforos por parte de las levaduras antagonicas .....	146
<b>DISCUSION.....</b>	<b>146</b>
<b>CAPITULO V RESPUESTA FISIOLÓGICA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA EFECTIVA DE LOS POTENCIALES ACB.....</b>	<b>150</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>152</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>152</b>
<b>MATERIALES.....</b>	<b>152</b>
Material vegetal.....	152
Microorganismos.....	152
Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos .....	153
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>153</b>
1. Crecimiento y producción de inóculo de los hongos patógenos y levaduras con potencial biocontrolador .....	153
2. Determinación del efecto de la disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH, y su interacción en el crecimiento <i>in vitro</i> de las levaduras.....	154
3. Determinación de la concentración efectiva mínima en ensayos de biocontrol en cerezas .....	156

4. Análisis estadísticos .....	156
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>156</b>
1. Determinación del efecto de la disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH, y su interacción en el crecimiento <i>in vitro</i> de las levaduras.....	157
2. Determinación de la concentración efectiva mínima en ensayos de biocontrol en cerezas .....	166
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>178</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>205</b>
<b>ARTÍCULO DE RESPALDO.....</b>	<b>217</b>



# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1. LAS FRUTAS FINAS

Las denominadas “frutas finas” o “frutos rojos”, nombre que se vincula al aspecto comercial y no al botánico, integran un conjunto de diferentes especies que se caracterizan por su reducido tamaño, en comparación con las frutas de pepita o las cítricas (Von Bernard y Obschatko 2003, Franceschinis 2016). Se agrupan en: 1) “*Berries*”, comúnmente llamados “frutos del bosque”, incluyen la frambuesa (*Rubus idaeus* L.) y la zarzamora o murra (híbridos del género *Rubus*), como también la frutilla (*Fragaria ananassa* e híbridos), el arándano (*Vaccinium corymbosum*), la grosella (*Ribes grossularia*); el casis (*Ribes nigrum*) y el corinto (*Ribes rubrum*); 2) “*Cherries*”, como la cereza (*Prunus avium* L.) y la guinda (*Prunus cerasus* L.) (Viteri y Benes 2014).

### 1.1 Importancia de las frutas finas a nivel mundial

Las frutas finas son frutas cultivadas en climas templados, tienen un muy alto precio unitario el mercado fresco y, además, son de interés para la agroindustria (UIA 2008). Constituyen uno de los grupos de productos más dinámicos del comercio alimentario mundial en los últimos 20 años (Bruzzone 2007, TIP 2019, Alves 2020). El aumento en el consumo en países desarrollados del hemisferio norte, ha provocado que la demanda mundial de frutas finas sea creciente y esté insatisfecha (Viteri y Benes 2014). La causa principal del aumento de consumo de las frutas finas se debe a sus cualidades nutricionales y medicinales (Bruzzone 2007).

La participación mundial de la producción de fruta fina representa un 3% de la producción mundial total de frutas (UIA 2008) (Figura 1). Mundialmente, cinco países acumulan más del (50%) de la producción de fruta fina; los principales productores son Estados Unidos (22,9%), Rusia (8,7%), Polonia (6,3%), Turquía (6,2%), Alemania (6,2%), España (5,5%), Italia (3,9%), Irán (3,4%), Corea (3,2%) y el resto del mundo (33,6%) (CIME-EEyN-UNSAM 2012).

Los *Berries* y *Cherries* son consumidos en todo el mundo y se exportan tanto frescos como congelados y/o preservados con distintos métodos. En la Tabla 1 se sintetizan los precios promedio alcanzados por las frutas finas frescas y las congeladas en el mercado mundial.

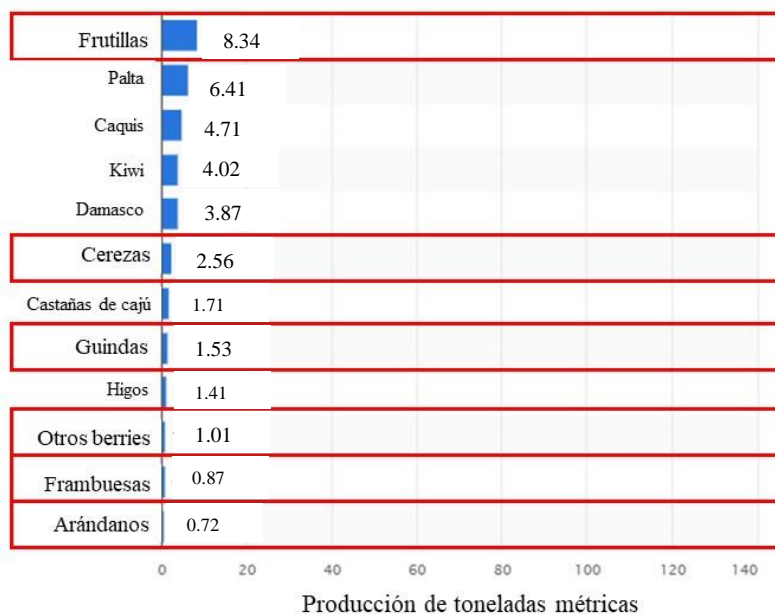


Figura 1. Producción mundial de frutas finas (Recuperado de <https://www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/>)

Tabla 1. Evolución Precio Promedio frutas finas expresado en U\$S/kilo. Tomado de (Viteri y Benes 2014)

Condición	Año					Promedio
	2005	2006	2007	2008	2009	
Fruta fina fresca	2,30	3,00	2,84	3,57	2,67	2,87
Fruta fina congelada	1,20	1,44	1,62	2,14	1,93	1,63

## 1.2 Producción de frutas finas en Argentina y en Patagonia

En la Argentina la producción de frutas finas, representadas principalmente por arándanos, frutillas, frambuesas, zarzamoras y cerezas, se desarrolla en varios puntos del país y se presenta como una de las actividades más prometedoras para la región Patagonia Sur, en base a su favorable comportamiento productivo, adaptación a la región y a la identificación de posibilidades comerciales, especialmente para el mercado externo (UIA 2008, Peralta 2010, Kirschbaum y Ruiz 2017). La producción de *Cherries* y *Berries* tiene como ventaja la exportación en contra estación, ya que los principales países importadores son del hemisferio norte lo que hace muy rentable su comercialización, entre los que se encuentran Alemania, Estados Unidos, Francia y Canadá

(quienes en conjunto concentran el 58% del total mundial), Reino Unido, Japón, Italia, Austria, Holanda y Bélgica (Caminiti 2005, Raffo et al., 2006, Bruzone 2009). Debido a las condiciones agroecológicas propias de los valles cordilleranos esta actividad podría extenderse mucho más, lo que permitiría la obtención de un producto característico de la región patagónica y el acceso a nuevos mercados externos con alta demanda de estos frutos (Manavella, 2004).

En cuanto a las cerezas, su producción está en aumento en la República Argentina (FAO 2009). Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2018) la producción de cerezas se localiza en las provincias de Mendoza (46% del total nacional), Chubut (17%), Río Negro (11%) y Santa Cruz (9%) mientras que el 7% restante pertenece al resto del país (fundamentalmente Buenos Aires y San Juan). Las variedades más utilizadas, por su calidad, son ‘Bing’ y ‘Lapins’. Ambas representan más del 52% de las plantas, seguidas en importancia por ‘Sweetheart’ (11%), ‘Newstar’ (7,7%) y ‘Stella’ (6.8%) (Cittadini et al., 2008). ‘Rainier’, es una variedad que alcanza muy buenos precios en EE.UU., pero es de difícil manejo durante poscosecha (Ellena 2012).

La Patagonia representa el 55% de la superficie de cerezas del país, es la región que muestra el mayor crecimiento en los últimos años y tiene la proporción producción/exportación más alta del país, un indicador de la alta calidad y tecnología de la producción regional y el crecimiento de la superficie plantada que se aproxima a las 1.000 ha en toda Patagonia, ha sido acompañado por el aumento de los volúmenes exportados. En los últimos cinco años el volumen comercializado en los mercados del mundo se triplicó (Scarpati et al., 2011, Villareal y Raffo 2020).

La mayor parte de la producción en nuestro país se destina a la exportación. Los principales mercados de exportación se observan en la Figura 2. Argentina se encuentra en el puesto 9 del ranking de exportadores mundiales de cerezas y representa el 1% del valor mundial exportado (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 2018).

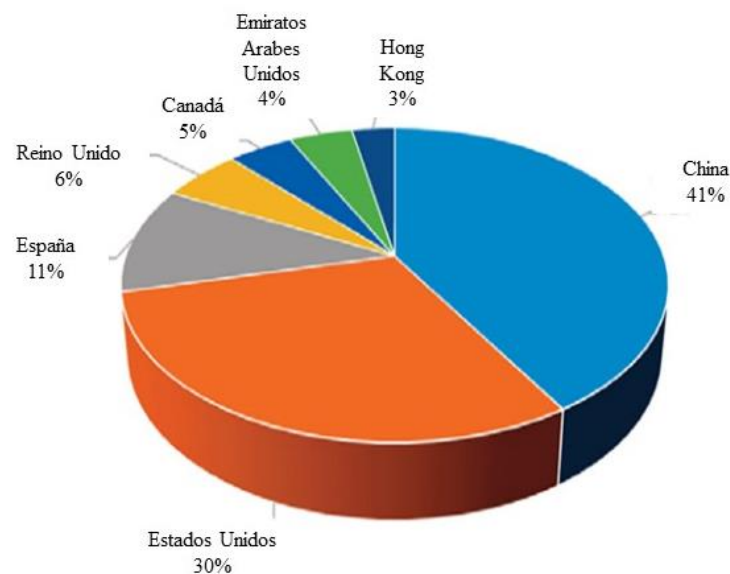


Figura 2. Porcentaje de fruta exportada a los principales destinos en la temporada 2019/2020 (Tomado de Villareal y Raffo 2020).

Argentina produce aproximadamente 1.500 t de frambuesa, 350 t de zarzamora y 180 t de otros *Berries* y la superficie cultivada con este grupo de frutos es de alrededor de 300 ha (Kirschbaum y Ruiz 2017). Más del 70% de la superficie cultivada con frambuesas, moras y *Ribes* se concentra en la región de la Patagonia (provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz) dado que son producciones que se adaptan bien en áreas climáticas con veranos frescos; por esa razón, los valles cordilleranos son ideales (De Michelis et al., 2017). También hay pequeñas fincas de frambuesas y zarzamoras en Tucumán, Santa Fe y Buenos Aires (Kirschbaum y Ruiz 2017).

La Comarca del Paralelo 42°, que incluye a las localidades de El Bolsón, Lago Puelo, Epuyen y El Hoyo es la principal región productora de frutas finas de Argentina y en particular de frambuesa. En la Comarca del Paralelo 42° hay 196 ha de fruta fina cultivada de las cuales 71,3 pertenecen a la frambuesa, el resto se dividen entre nueve variedades diferentes de frutas finas y aporta el 45% de la producción nacional de frambuesas (UIA 2008). El cultivo frambuesas es una producción intensiva de gran interés por su alta rentabilidad, manejo relativamente sencillo y buenas posibilidades de mercado debido a su creciente y sostenida demanda. Su fruto es uno de los frutos de clima templado de mayor precio unitario en el mercado en fresco y con gran demanda por parte de la agroindustria (Justo et al., 2014). Las variedades más utilizadas en orden de importancia son: ‘Autum Bliss’, ‘Heritage’, ‘Tulamenn’ y ‘Schoenemann’ (Bruzone 2006).

En cuanto a la zarzamora, aunque, actualmente existen unas pocas hectáreas implantadas en la región y no tiene gran participación en el mercado externo, es un tipo de fruto con gran potencial productivo y con excelentes perspectivas de desarrollo en Patagonia ya que tiene gran demanda en los países del hemisferio norte como producto fresco y congelado (Caminiti 2005, Bruzone 2009). Es el cuarto *Berry* en importancia, en cantidad de hectáreas implantadas, (Martínez 2007) y el mayormente asilvestrado en la zona del Paralelo 42°, siendo además impulsado en los últimos años por su incorporación en la industria alimentaria (junto a otros *Berries*) en lácteos, cereales en barra, golosinas, bebidas sin alcohol y té, entre otros (Bruzone 2009).

### 1.3 Cosecha y poscosecha de frutas finas

#### 1.3.1 Cosecha de cerezas

Para establecer el momento óptimo de cosecha el parámetro más generalizado es la utilización de tablas de color con recomendaciones específicas para las distintas variedades (Cittadini y San Martino 2006, Raffo Benegas 2017). La calidad de la cereza es afectada por su madurez al momento de la cosecha, lo que influye tanto sobre su tamaño, firmeza, dulzura y sobre su habilidad para soportar los rigores del almacenamiento y el transporte (Scarpati et al., 2011, Gonçalves 2007). Es por eso que, la cosecha debe realizarse evitando provocar golpes y marcas en la fruta ya que, el manejo en la poscosecha no puede mejorar la calidad de la fruta, sólo retrasar su declinación (Crisosto et al., 1993). Otros aspectos que deben tenerse en cuenta son: no cosecharlas inmaduras ya que suelen ser más pequeñas y de escaso sabor y al ser frutas no climatéricas los índices de madurez no varían una vez que los frutos han sido cosechados (su tasa respiratoria y de producción de etileno no se incrementan luego de la cosecha), evitar cortar el pedúnculo (ayudan a retrasar la senescencia), evitar caídas que superen los 5 o 7 cm y enfriarla dentro de las 2 h de cosechada (Candan et al., 2007, 2017, Candan 2006, Cittadini y San Martino 2006).

#### 1.3.2 Poscosecha de cerezas

El proceso que atraviesan las cerezas durante la poscosecha se observa en la Figura 3. La cereza en general, se empaqueta el mismo día de la cosecha para disminuir costos de logística y espera de

la fruta en cámaras de frío. Las cerezas son cosechadas y preservadas en cajones de 6 kilos que son llevados a la planta de empaque y vaciados delicadamente en el hidro-cooler (túnel de agua fría), este enfriamiento (*hidrocooling*), que se realiza con agua clorada y en algunos casos se incorporan ciertos fungicidas, sirve para reducir la tasa respiratoria y de emisión de etileno, frenar la maduración, retrasar la senescencia, eliminar o reducir el desarrollo de ciertos patógenos, estimular la resistencia al ataque fúngico (Cittadini y San Martino 2006). Luego se mantienen en cámara a 2°C y 95% de humedad relativa hasta su ingreso al proceso de clasificación, en el cual la fruta de buena calidad se separa de la fruta defectuosa (Cittadini y San Martino 2006). Posteriormente, la cereza de buena calidad pasa a la etapa de calibración en la cual la fruta se separa por tamaño. Por último, se empacan en general manualmente ubicándolas en cajas corrugadas con dos bolsas de nylon de 2,5 kilos cada una. De allí se paletizan y se depositan en cámaras de frío y humedad controlada hasta su transporte a destino (Cittadini y San Martino 2006, Candan 2006). La adecuada refrigeración es la técnica más apropiada para la conservación de cerezas y existen otras prácticas complementarias para mejorar el almacenamiento, como las atmósferas modificadas, atmósferas controladas y recubrimientos comestibles (Candan 2006). Aproximadamente el 60% de las cerezas se comercializan en fresco y el 40% restante se procesa o se descarta (McCune et al., 2011). Bajo óptimas condiciones de almacenamiento, las cerezas pueden mantener una calidad apropiada durante 40-50 días (Candan et al., 2017).

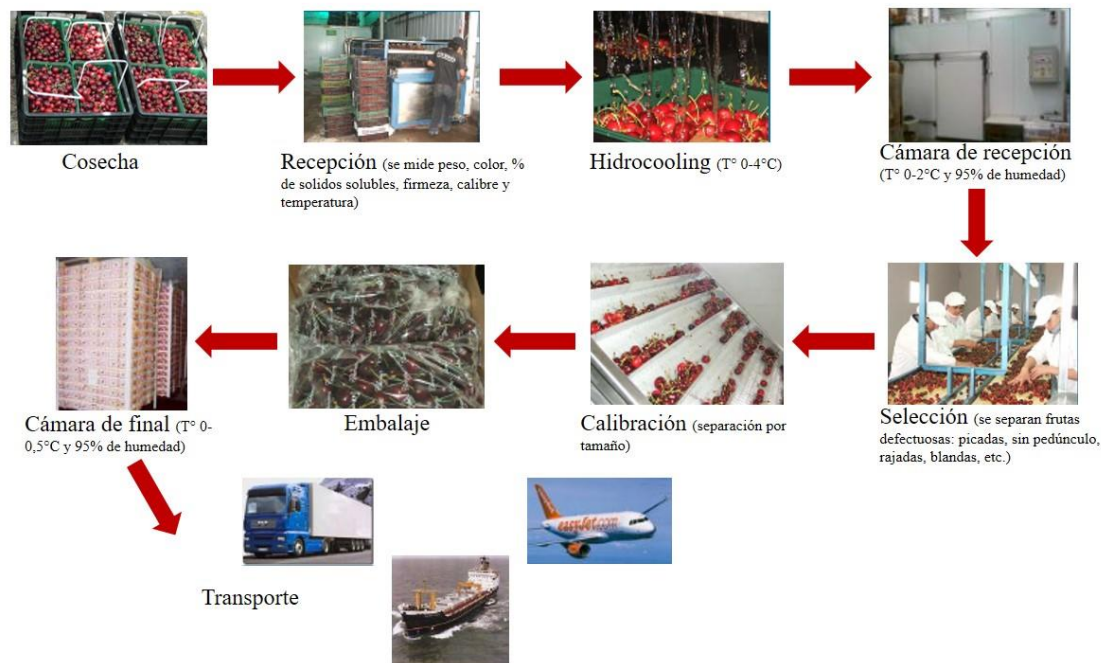


Figura 3. Etapas en una planta de empaque de cerezas (Tomado y modificado de Romano y Pugh)

2008).

### 1.3.3 Cosecha de frambuesas y zarzamoras

El índice de cosecha utilizado es el color de la superficie del fruto y éste debe ser cercano al rojo para frambuesas y morado para zarzamoras, se consideran además la acidez y los sólidos solubles totales debido a que en el fruto estos parámetros no varían en poscosecha (no climatéricos) (Robledo et al., 2013). La frambuesa con una madurez adecuada se desprende fácilmente del receptáculo, debe tener un color brillante y una firmeza consistente, en la zarzamora el receptáculo queda inserto al momento de cosechar, obteniendo un fruto lleno (De Michelis et al., 2017). Otras consideraciones al momento de la cosecha son no dañar, apretar o golpear la fruta, cosechar temprano en la mañana evitando las temperaturas altas, no cosechar con rocío o con lluvias, evitar la contaminación de la fruta (colocar los materiales de cosecha lejos de la superficie del suelo) (Robledo et al., 2013).

### 1.3.4 Poscosecha de frambuesas y zarzamoras

El proceso que atraviesan las frambuesas y zarzamoras durante la poscosecha se observa en la Figura 4. La cosecha de frambuesas y zarzamoras se inicia con la selección de la fruta puede realizarse en el campo o una vez que la fruta llega a *packing*, descartando las que presentan rasgaduras, machucones, golpes o heridas, sobre madurez, daños por insectos, hongos, etc. Luego, la fruta se transporta a la zona de embalaje, que debe realizarse lo más rápido posible (para bajar la temperatura de campo) y evitando golpear la fruta. La etapa de embalaje de la fruta debe realizarse con temperaturas no superiores a 4°C evitando que se produzcan aumentos que deterioren la fruta, a diferencia de las cerezas, estas frutas no se lavan. El tiempo transcurrido entre cosecha y comercialización o transporte debe ser el mínimo para llegar a los diferentes mercados en óptimas condiciones (Robledo et al., 2013). El almacenamiento refrigerado es el factor clave para preservar estos frutos, pero puede ser acompañado por otras herramientas, como el uso de atmósferas modificadas y controladas para prolongar su vida útil (Piljac-Zegarac y Samec 2010, Robledo et al., 2013). El tiempo de almacenamiento de estos tipos de frutas en fresco es menor que el de las cerezas. La calidad poscosecha de frambuesas 'Autumn Bliss' conservadas a 0°C puede mantenerse durante 12 días y las moras almacenadas a 2°C tienen una la vida útil de



9 días (Tezotto-Uliana et al., 2018, Perkins-Veazie et al., 1997).

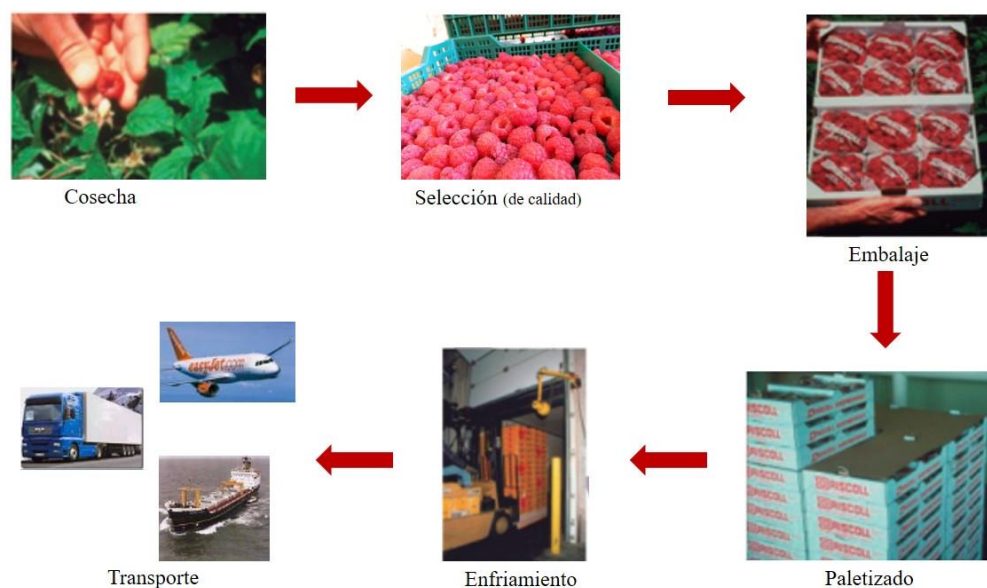


Figura 4. Etapas en una planta de empaque de frambuesas (Tomado y modificado de Robledo et al., 2013).

Una de las características que tienen en común, tanto los *Cherries* como los *Berries* cultivados, es el poco tiempo de almacenamiento que resisten (en comparación con otros tipos de frutas) debido al aumento de su metabolismo luego de la cosecha (alta actividad respiratoria), lo que conlleva un cambio organoléptico y de apariencia acompañado con un aumento en la susceptibilidad a ser atacadas por hongos causantes de pudriciones y su estructura frágil (Candan 2006).

#### 1.4 Características de la producción

La mayor parte de la producción de *Cherries* y *Berries* cultivados se realiza en la región de manera convencional, pero con un muy bajo uso de agroquímicos y fertilizantes (IICA 2009).

En la Argentina, la fruticultura está en permanente evolución. Los productores de frutas consiguen mantener una fuerte presencia en los mercados más exigentes del mundo (fundamentalmente de la Unión Europea) con productos de sobresalientes características organolépticas, lo que ha llevado a los productores a la adopción de programas que tienden a ofrecer productos cada vez más inocuos y cuya producción es de bajo impacto sobre el medioambiente (sin uso de

agroquímicos), este concepto es denominado Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) (Cittadini y San Martino 2006). Para el caso de las cerezas, el Ministerio de Agroindustria ha aprobado un protocolo específico elaborado por profesionales del sector público y la actividad privada que posibilita que los productores de cerezas puedan obtener el derecho de uso del sello de calidad que diferencia a los alimentos argentinos de calidad *Premium* (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 2018).

A partir de las exigencias de los mercados internacionales, la producción orgánica en Argentina está en aumento (Ramírez 2012). La ley Nacional de Producción Ecológica, Biológica y Orgánica N° 25.127 define como “ecológico, biológico u orgánico a todo sistema de producción agropecuario, su correspondiente agroindustria, como así también a los sistemas de recolección, captura y caza, sustentables en el tiempo y que mediante el manejo racional de los recursos naturales y evitando el uso de los productos de síntesis química y otros de efecto tóxico real o potencial para la salud humana, brinde productos sanos”.

Argentina se caracteriza por ser un importante exportador de productos orgánicos y posee una superficie cercana a las 5.000 ha cosechadas de frutas orgánicas (Spalla 2016).

En la región patagónica funcionan 20 industrias transformadoras, algunas de las cuales certifican su producción como fruta fina orgánica (Bruzzone 2009), entre ellas se incluyen los establecimientos Valle del medio, Humus y la Cooperativa del Paralelo 42° (que nuclea a diferentes productores de fruta fina) (Kramer 2016).

## **2. PATÓGENOS DE POSCOSECHA**

### **2.1 Pérdidas producidas en la poscosecha**

Estudios recientes de varias organizaciones internacionales han demostrado que aproximadamente el 33% de la producción total de frutas y verduras se pierde luego de la cosecha (FAO 2011, OECD 2014). Una de las causas de las pérdidas se debe a la reducción de la vida útil causada por las infecciones de hongos patógenos durante el manejo, distribución y almacenamiento poscosecha (Romanazzi et al., 2016). Esto se debe a que, los hongos patógenos, saprófitos o parásitos, aprovechan para desarrollarse los altos contenidos de agua, altos niveles de humedad, aumento de nutrientes, valores bajos de pH y que han perdido la mayor parte de la resistencia intrínseca que protege a los frutos durante su desarrollo en el árbol (Viñas 1990, Droby et al., 1992).

## 2.2 Patógenos de poscosecha en frutas finas

Las cerezas, frambuesas y zarzamoras son frutas altamente perecederas y su vida útil es relativamente corta debido a sus altas tasas de actividad respiratoria y susceptibilidad a diferentes enfermedades fúngicas que desarrollan podredumbres durante el almacenamiento en cámaras frigoríficas (Alonso y Alique 2006, Feliziani et al., 2013, Tezotto-Uliana et al., 2013, Guerreiro et al., 2015, Madrid y Beaudry 2020). Estas pérdidas varían en función de la zona de producción, de la especie y cultivar, edad del árbol, de las condiciones climáticas y del manejo pre y poscosecha (heridas y daños durante la cosecha, transporte y posterior manejo, efectividad de los tratamientos fungicidas y la conservación) (Smilanick et al., 2006, Conte et al., 2009).

Los hongos patógenos principalmente reportados para cerezas en diferentes partes del mundo son *Monilinia* spp. y *Botrytis cinerea*, y ocasionalmente *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium* spp., *Mucor piriformis* (Ogawa et al., 1995, Romanazzi 2001, Qin et al., 2003, Schena et al., 2003, Børve y Stensvand 2019). En la Figura 5 se observan algunas frutas finas con síntomas de enfermedades.

*Botrytis cinerea* es la enfermedad poscosecha más común de las frambuesas y zarzamoras (Snowdon, 1990). Otras enfermedades registradas en menor frecuencia son las causadas por *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. y *Alternaria* spp. (Rogéria Antonioli et al., 2011, Zhang et al., 2020, Madrid y Beaudry 2020).

La podredumbre causada por *Monilinia* spp. causa pérdidas sustanciales antes y después de la cosecha y está presente en todo el mundo. Las pérdidas en la poscosecha, durante el almacenamiento y el transporte, pueden llegar a ser del 80% cuando las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de la enfermedad (Mari et al., 2020).

*Botrytis cinerea* está, frecuentemente, latente en el campo y aparece durante el transporte. El hongo crece fácilmente a temperaturas superiores a 4°C y durante la temporada de lluvias, esto da como resultado la pérdida total de la cosecha o la fruta degradada (Madrid y Beaudry 2020).

*Mucor piriformis* y *Rhizopus stolonifer* causan enfermedades muy importantes en las frutas de hueso en muchas regiones. Las pérdidas causadas por estos patógenos se observan principalmente en las empacadoras después del almacenamiento en frío, aunque a veces ocurren en el campo, especialmente después de largos períodos de humedad y pueden ser graves y alcanzar hasta el 50% de las frutas almacenadas afectadas (Usall et al., 2013, Mari et al., 2020).

La enfermedad causada por *Penicillium* spp. es una enfermedad menor, solo en frutas senescentes almacenadas durante largos períodos y su incidencia puede superar el 10% (Mari et al., 2020).

La pudrición causada por *Alternaria alternata* generalmente es visible solo después de un largo almacenamiento. Los brotes de podredumbre por *Alternaria* están aumentando en los EE. UU. por la aparición de cepas resistentes a los fungicidas utilizados (Yang et al., 2015).

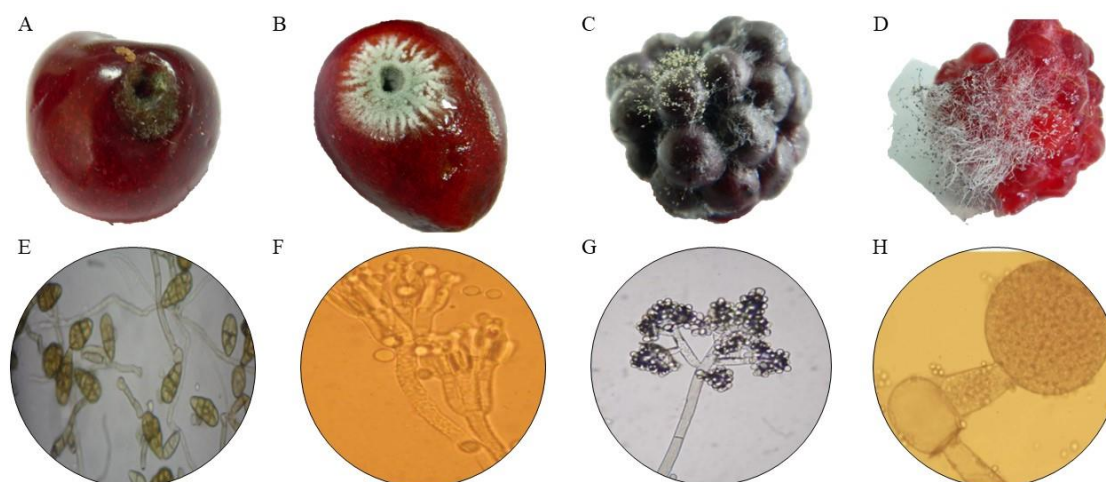


Figura 5. Patógenos desarrollados en frutas finas: A) *Alternaria alternata* en cereza, B) *Penicillium crustosum* en cereza, C) *Botrytis cinerea* en zarzamora, D) *Mucor piriformis* en frambuesa. Vistas microscópicas de las estructuras reproductivas de E) *Alternaria alternata*, F) *Penicillium crustosum*, G) *Botrytis cinerea*, H) *Mucor piriformis*.

(la imagen microscópica de *B. cinerea* fue tomada de <https://www.inia.cl/sanidadvegetal/2016/11/04/pudricion-gris-botrytis-cinerea-2/>).

En Argentina existen escasos trabajos de identificación de los patógenos que afectan a cerezas, frambuesas y zarzamoras durante la poscosecha. Se han reportado cerezas afectadas en la poscosecha por *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp. y *Penicillium* spp. en el sureste de la provincia de Buenos Aires (Horvitz et al., 2004). En Patagonia Norte (Río Negro y Neuquén) se han reportado que las enfermedades por hongos son causadas mayormente por *Penicillium*, seguido luego por *Alternaria* y *Botrytis* (Candan 2006, Nome et al., 2012, Colodner y Candan 2011, 2017).

### 2.3 Control químico de las enfermedades de poscosecha en frutas finas

A pesar de que las enfermedades causadas hongos pueden ser disminuidas mediante la utilización de BPA estas no siempre son suficientes para proteger la fruta del desarrollo de patógenos de poscosecha, especialmente durante el almacenamiento prolongado o el período de

comercialización (Murray et al., 2019). Esto conlleva a recurrir a programas de control integrado que incluyen el uso de algunos fungicidas de síntesis considerados de bajo riesgo (Colodner y Candan 2011, Murray et al., 2019, Palou y Smilanick 2020). Estos continúan siendo un método de control elegido debido, fundamentalmente, a su bajo costo, facilidad de aplicación y efectividad (Usall et al., 2016, Murray et al., 2019, Palou y Smilanick 2020).

En Argentina, no hay fungicidas de poscosecha habilitados para su uso en frambuesas y zarzamoras. Para el caso particular de fungicidas utilizados para el control de enfermedades de poscosecha en cerezas, el Iprodione ha sido el más usado seguido por Captan (Colodner y Candan 2011). En el año 2014 se aprobó un registro de uso provisorio de los principios activos fludioxonil, iprodione y pirimetanil, el cual se mantuvo vigente hasta marzo del 2017 (Candan et al., 2017).

Según la ficha técnica de Iprodione comercializado en Argentina, es un fungicida (dicarboxamida) orgánico de síntesis química de contacto (actúa sobre la superficie de las frutas) para el control de diversos hongos fitopatógenos, eficaz sobre *Botrytis*, *Monilinia*, *Helminthosporium*, *Penicilium* y *Sclerotinia*, que actúa inhibiendo la acción de las esporas y bloqueando el micelio que invade los tejidos sanos. En un estudio realizado en cerezas variedad Stella del Alto Valle de Río Negro para el control de patógenos de poscosecha, la utilización de Iprodione no arrojó resultados significativos para el control de *Alternaria* y *Penicillium* (Colodner y Candan 2011).

### 2.3.1 Resistencia a fungicidas

Dada la utilización masiva de los fungicidas, y en muchos casos la falta de conocimiento y conciencia sobre su correcto uso, se han generado problemas como son la aparición de cepas resistentes de hongos (Murray et al., 2019). La resistencia de los hongos a los fungicidas constituye en la actualidad un tema central dentro de las estrategias del control químico e integrado de las enfermedades (Palou y Smilanick 2020). La resistencia puede ser definida como un ajuste estable y hereditario de un hongo a un fungicida. De este ajuste, resulta una reducción considerable de la sensibilidad al fungicida tanto en laboratorio y en el invernáculo como a campo (Carmona et al., 2011). Existen dos tipos de resistencia, la resistencia natural (cuando una determinada especie fúngica es naturalmente menos sensible a un fungicida que otras especies) y la adquirida (ocurre cuando una cepa de hongos se vuelve insensible a determinado fungicida en el campo o en el empaque). En general, la resistencia surge en respuesta al uso repetido de un fungicida o al uso repetido de fungicidas relacionados por el mecanismo bioquímico de acción (Carmona et al., 2011).

El desarrollo de resistencia a fungicidas, sumado a los problemas de toxicidad provocados para el hombre, daño al medio ambiente, restricciones impuestas por los mercados importadores, ha favorecido la investigación hacia el desarrollo de otros métodos de control (Lima et al., 1998, Cittadini y San Martino 2006, Janisiewicz et al., 2010).

## 2.4 Alternativas al uso de fungicidas químicos

### 2.4.1 Utilización de agua clorada

Una de las estrategias de control más utilizada para controlar el desarrollo de patógenos luego de la cosecha de cerezas es el uso de agua clorada durante el *hydrocooling*, que se debe mantener en una concentración de cloro libre de 100 ppm y un pH entre 6.5 a 7.5, para que el agua del proceso no resulte una fuente de contaminación de la fruta, en la línea de empaque (Colodner y Candan 2011, Candan et al., 2017).

### 2.4.2 Utilización de atmósferas modificadas

El uso de empaques con atmósferas modificadas es otra de las tecnologías más utilizados para mantener la calidad tanto en *Cherries* como en *Berries* durante la poscosecha (Cittadini y San Martino 2006, Robledo et al., 2013). Debido a que la atmósfera gaseosa cambia continuamente durante todo el período de almacenamiento por la influencia de la respiración de la fruta, cambios bioquímicos y la lenta difusión de los gases a través del envase, el plástico de las bolsas de empaque permite el balance de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> adecuados, evitando los procesos de anaerobiosis y la acumulación de humedad excesiva por condensación al permitir la salida de vapor de agua (Cittadini y San Martino 2006, Kumar et al., 2018). El uso de empaques con atmósferas modificadas, además de retrasar la respiración y la producción de etileno, mantiene la firmeza y el contenido de proteínas y azúcar soluble en las frutas, reduce la proliferación de mohos, levaduras y bacterias (Spotts et al., 2002, Tian et al., 2004a, Serrano et al., 2005, Wang et al., 2014, Kumar et al., 2018).

### 2.4.3 Utilización de calcio

El calcio (Ca<sup>2+</sup>) desempeña un papel muy importante en la estructura de la fruta y resistencia de la pared celular, la estructura e integridad de la membrana plasmática (Poovaiah et al., 1993). Sin embargo, la fruta a menudo es deficiente en Ca<sup>2+</sup> debido a su baja movilidad en las plantas

(Conway et al., 2002). Se ha demostrado que tratamientos con cloruro de  $\text{Ca}^{2+}$  y bicarbonato de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden ser beneficioso, tanto para mantener la calidad de la fruta como para reducir el desarrollo de patógenos durante el almacenamiento (Ippolito et al., 2005, Wang et al., 2014).

#### 2.4.4 Utilización de microorganismos antagonistas como agentes de control biológico

Otra alternativa para el control de los patógenos de poscosecha de fruta fina, en la que se hará foco en esta Tesis, es el control biológico a través de antagonistas microbianos, ya sea empleándolo sólo o formando parte de una estrategia de control integrado (Liu et al., 2013, Droby et al., 2016, Usall et al., 2016).

La prohibición de muchos fungicidas químicos, por los motivos ya mencionados, como el desarrollo de biotipos de resistencia, las consideraciones ambientales y de salud, ha sido uno de los motores para desarrollar tecnologías alternativas de manejo de enfermedades seguras y efectivas controlar los patógenos poscosecha (Droby et al., 2016). El uso potencial de los microorganismos antagonistas epífitos (levaduras, bacterias y hongos) para controlar patógenos poscosecha comenzó a informarse hace más de 35 años (Tronsmo y Dennis 1977, Wilson y Pusey 1985) y, desde entonces, la necesidad de buscar y desarrollar estrategias alternativas para el manejo de la enfermedad poscosecha sigue siendo una línea de investigación prioritaria por parte de muchos científicos y empresas comerciales de todo el mundo (Droby et al., 2016, Usall et al., 2016).

El uso de antagonistas microbianos para controlar los patógenos de poscosecha ha generado muchas expectativas, en contraste con el biocontrol en precosecha y en el suelo, como alternativa a los productos químicos y esto se debe, principalmente, a que durante el procesamiento y almacenamiento poscosecha factores ambientales como la temperatura y la humedad están regulados y el conocimiento de la etiología de las enfermedades permiten dirigir la aplicación de un antagonista a un producto y mantener su población (Wisniewski et al., 2007, Droby et al., 2009).

Si bien, se pueden utilizar hongos filamentosos, bacterias y levaduras como ACB, la mayoría de los agentes y productos de biocontrol poscosecha reportados son levaduras (Droby et al., 2016).

### 3. LAS LEVADURAS

Las levaduras son un grupo versátil de hongos (Phylla Ascomycota y Basidiomycota) que se reproducen asexualmente por gemación o fisión, lo que resulta en un crecimiento que se compone

principalmente de células individuales (Kurtzman et al., 2011). Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en microbiomas en todo el mundo, en todo tipo de sustratos y ambientes y son uno de los grupos microbianos más relevantes en biotecnología (Buzzini y Margesin 2014). Las levaduras tienen una rica historia y un futuro brillante en biotecnología, son indispensables en las fermentaciones alimentarias tradicionales, otras se están desarrollando para la producción de biocombustibles para la generación de nuevas fuentes de energía, se han desarrollado sistemas de levadura para la producción de proteínas heterólogas, son cada vez más importantes como biocatalizadores para la producción de productos químicos finos y proteínas farmacéuticas de alto valor, debido a sus capacidades metabólicas, tienen papeles importantes en la biorremediación ambiental y en la producción de todo tipo de enzimas (Johnson y Echavarrri-Erasun 2011).

### 3.1. Levaduras en frutas

Las frutas sirven como hospedadores de muchos microorganismos que colonizan la superficie (epífitas) o viven dentro (endófitos) de sus tejidos. Representan un hábitat primario y una fuente de energía en el ciclo de vida de muchos hongos, algunos de los cuales son fitopatógenos y son responsables de pérdidas económicas significativas antes y después de la cosecha, mientras que otros microorganismos, como las levaduras, se consideran beneficiosos y pueden influir en la sobre el desarrollo de los síntomas de la enfermedad al interactuar directamente con los patógenos o inducir resistencia en el hospedador (Droby et al., 2016, Wisniewski et al., 2016).

Existen pocos estudios sobre las comunidades de levaduras que habitan en las frutas finas durante la poscosecha. En el trabajo de Serradilla et al., (2013) los géneros de levaduras en poscosecha de cerezas que se identificaron fueron *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Torulasporea*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Cystofilobasidium*, *Citeromyces*, *Sporobolomyces*, *Metschnikowia* y *Entyloma*. Mientras que en el estudio realizado por Venturini et al., (2002) se identificó la presencia de representantes de los géneros *Trichosporon*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. Bovi et al., (2019) estudiaron la microbiota asociada a la poscosecha de *Berries* (frambuesas, moras, arándanos y frutillas) identificando la presencia de levaduras de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*.

### 3.2 Levaduras adaptadas al frío

Las levaduras adaptadas al frío, como otros organismos, pueden dividirse en psicrófilas (psicrófilas obligadas) y psicrotolerantes (psicrófilas facultativas). Las psicrófilas exhiben una



temperatura de crecimiento mínima de alrededor de 0°C, un óptimo de aproximadamente 15°C (o inferior) y no crecen a temperaturas superiores a 20°C. Mientras que las psicrotolerantes también crecen a 0°C, pero tienen un crecimiento óptimo a temperaturas cercanas a 20°C (Buzzini y Margesin 2014). Las levaduras adaptadas al frío se han encontrado en numerosos hábitats fríos, incluidos el permafrost, la nieve, los desiertos fríos y el hielo glacial, el agua de deshielo y los sedimentos, el mar profundo y alimentos congelados y refrigerados (Boundy-Mills 2014). La mayoría de las especies de levadura aisladas de estos hábitats pertenecen a los basidiomicetes pertenecientes a los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon* y *Rhodospodidium* y levaduras ascomicetes de los géneros *Debaryomyces*, *Lipomyces*, *Candida* y *Metschnikowia*, lo que se puede atribuir a su mayor tolerancia y adaptación a condiciones estresantes (Maráz y Kovács 2014, Sangorrin et al., 2014).

Las frutas almacenadas a 0°C, en las cuales se desarrollan levaduras adaptadas al frío, son un ambiente propicio para el aislamiento de con capacidades biocontroladoras (Lutz et al., 2012).

### 3.3 Levaduras como agentes de control biológico

Las levaduras, en general, tienen una alta tolerancia a las condiciones ambientales estresantes que prevalecen antes y después de la cosecha (bajas y altas temperaturas, desecación, amplio rango de humedad relativa, bajos niveles de oxígeno, fluctuaciones de pH, radiación UV) y se adaptan de manera única al microambiente presente en los tejidos de la fruta heridos (alta concentración de azúcar, alta presión osmótica y bajo pH) (Droby et al., 2016). Además, muchas especies de levaduras pueden crecer rápidamente en sustratos económicos en fermentadores y, por lo tanto, es redituable producirlas en grandes cantidades (Spadaro et al., 2010). A diferencia de los hongos filamentosos, no producen esporas o micotoxinas alergénicas, y tienen requisitos nutricionales simples que les permiten colonizar superficies secas durante largos períodos de tiempo (Droby et al., 2016).

Gracias a esas particularidades, las levaduras, se han posicionado como microorganismos de gran interés para ser utilizados en programas de control biológico dado que son relativamente fáciles de producir, mantener y pueden ser manipulados con el fin de mejorar su uso y eficiencia (Pimenta et al., 2009).

Existen numerosos trabajos en los últimos años, en los que se han reportado la capacidad biocontroladora de diferentes especies de levaduras, aisladas a partir de frutas, sobre el desarrollo de patógenos de poscosecha (Sangorrin et. al 2014). Algunas de ellas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunas especies de levaduras aisladas a partir de frutas con capacidad biocontroladora sobre patógenos de poscosecha.

Sustrato de aislamiento	Especies de levaduras	Patógenos que controlan	Referencia
Manzana	<i>Candida sake</i>	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	Viñas et al., (1998)
Naranja	<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	El-Ghaouth et al., (1998)
Durazno	<i>Pichia membranaefaciens</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Fan y Tian (2000)
Uva	<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>Monilinia fructicola</i>	Kurtzman y Droby (2001)
Cerezas	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilinia laxa</i>	Schena et al., (2003)
Manzana	<i>Pichia membranefaciens</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Monilinia fructicola</i>	Qin et al., (2006)
Manzana	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Vero et al., (2009)
Pera	<i>Vishniacozyma victoriae</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Lutz et al., (2020)
Ciruela	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Rhodotorula phylloplana</i>	<i>Monilinia fructicola</i>	Janisiewicz et al., (2014)
Higo	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Monilinia laxa</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Ruiz-Moyano et al., (2016)
Manzana y limón	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Agirman et al., (2020)

### 3.4 Desarrollo de un agente de control biológico basado en levaduras

#### 3.4.1 Criterios para la selección de una levadura antagonista ideal

La selección de la levadura adecuada es la base para el desarrollo del ACB, por lo cual, además de estudiar su poder inhibitorio se deben tener en cuenta otras características. Wilson y Wisniewski (1989) describen a un antagonista ideal de patógenos de poscosecha para el desarrollo de productos comerciales como aquél que es:

- ✓ Genéticamente estable.
- ✓ Efectivo a concentraciones bajas.

- ✓ Poco exigente en sus requerimientos de nutrientes.
- ✓ Capaz para sobrevivir a condiciones ambientales adversas, como lo son las condiciones de bajas temperaturas de almacenamiento.
- ✓ Eficaz frente a una amplia gama de patógenos en diferentes tipos de frutas.
- ✓ Capaz de crecer en medios de crecimiento económicos sin perder capacidad de control.
- ✓ Prestarse a la formulación y almacenado por largos períodos sin perder capacidad de control y fácil de aplicar.
- ✓ Resistente a productos químicos utilizados en poscosecha.
- ✓ Inocuo para la salud humana.
- ✓ Compatible con otros métodos de control.

### 3.4.2 Etapas y factores en el desarrollo de una levadura ACB para la obtención de un bioproducto

La identificación, desarrollo y comercialización de un producto biológico es un proceso largo y costoso que en las etapas iniciales demanda al investigador mucho tiempo para desarrollar un "concepto de producto" y resolver los posibles obstáculos para la comercialización (Usall et al., 2016). Para que una levadura se convierta en un ACB y se pueda comercializar como un producto comercial es necesaria la colaboración entre grupos de investigación y empresas del sector agrícola y alimentario (Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Un esquema de la serie etapas que pueden seguirse se presenta en la Figura 6. Según Droby et al., (2009) a través de las etapas debe demostrarse:

- la efectividad de microorganismo frente al patógeno,
- la bioseguridad del antagonista seleccionado para el hombre, el ambiente, y los organismos que no ha de controlar,
- la posibilidad de obtener productos de alta viabilidad y estables a un bajo costo,
- la posibilidad de patentar y registrar para un uso comercial,
- la factibilidad de comercializarlo como un producto con un rango de efectividad amplio y de fácil aplicación.



Figura 6. Etapas y factores en el desarrollo de un bioproducto (tomado de Yáñez-Mendizábal et al., 2012)

### 3.4.3 Estrategia de aislamiento y selección de levaduras como ACB

El éxito de la levadura ACB depende del proceso de búsqueda y selección, depende del patógeno a controlar, la fruta hospedante y el sitio en el cual se deberá aplicar (Fravel 2005). Cook y Baker (1983) y Schisler y Slininger (1997), entre otros, brindan una idea de dónde buscar antagonistas. Si la intención es encontrar microorganismos para proteger la fruta durante la poscosecha probablemente la detección de microorganismos que colonizan la superficie de la fruta tendrá mayor probabilidad de éxito que si el agente se busca en otros sistemas (Janisiewicz y Korsten 2002).

Teniendo en cuenta lo reportado por Robiglio et al., (2011) y Lutz et al., (2012), una estrategia de aislamiento y selección para la búsqueda de levaduras con capacidad de ser ACB para poscosecha de frutas almacenadas en frío, puede realizarse de la siguiente manera:

- Aislando los potenciales ACB a partir de aguas de lavado de frutas: a) sanas luego de un período largo de almacenamiento y b) de frutas con heridas que se mantienen sanas luego de un período de tiempo de almacenamiento prolongado en un ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad.
- Detección *in vitro* de potenciales candidatos para la actividad antagonista.
- Ensayos *in vivo* para la evaluación de la actividad biocontroladora en las heridas de frutas

inoculadas con los patógenos.

Esta metodología se basa en la hipótesis de que la mejor estrategia para aislar posibles antagonistas contra un agente etiológico particular es buscar en lugares donde se puede esperar una enfermedad causada por el patógeno, pero no ocurre (Baker y Cook, 1974, Vero et al., 2016). Además, la obtención de microorganismos a partir de heridas sanas de frutas después de un largo período de almacenamiento en frío indicaría que estos probablemente estén adaptados a las condiciones de almacenamiento (bajas temperaturas, a las frutas hospedadoras y a los tratamientos de poscosecha) y que podrían exhibir cierta actividad antagonista debido al hecho de que se aislaron de heridas sanas (Lutz et al., 2012).

Otro aspecto a tener en cuenta, luego de la estrategia de selección, que ayudará a seleccionar cepas de ACB eficientes, a comprender como actúan y a mejorar su actividad antagonista, consiste en dilucidar cuáles son sus mecanismos de acción (Fravel 2005).

#### 3.4.4 Mecanismos de acción de las levaduras antagonistas

Las interacciones entre el antagonista, el patógeno, la fruta (el hospedador) y la microbiota residente en el fructoplano se han estudiado ampliamente y se ha sugerido que desempeñan un papel fundamental en varios sistemas de biocontrol (Chan et al., 2007, Hershkowitz et al., 2013, Kwasiborski et al., 2014). En este sentido, el sitio de la herida donde se desarrolla la infección de la mayoría de los patógenos de poscosecha, es de particular interés al explorar los mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas (Spadaro y Droby 2016). El rendimiento de un ACB es el resultado de las complejas interacciones cuadritróficas que tienen lugar entre el antagonista, el patógeno, el hospedador y la microbiota epífita residente (Figura 7). Aunque estas interacciones han sido investigadas durante más de treinta años, el conocimiento al respecto de los microbiomas y sus mecanismos de acción aún se están dilucidando a través del desarrollo nuevas herramientas y tecnologías moleculares (Abdelfattah et al., 2016).

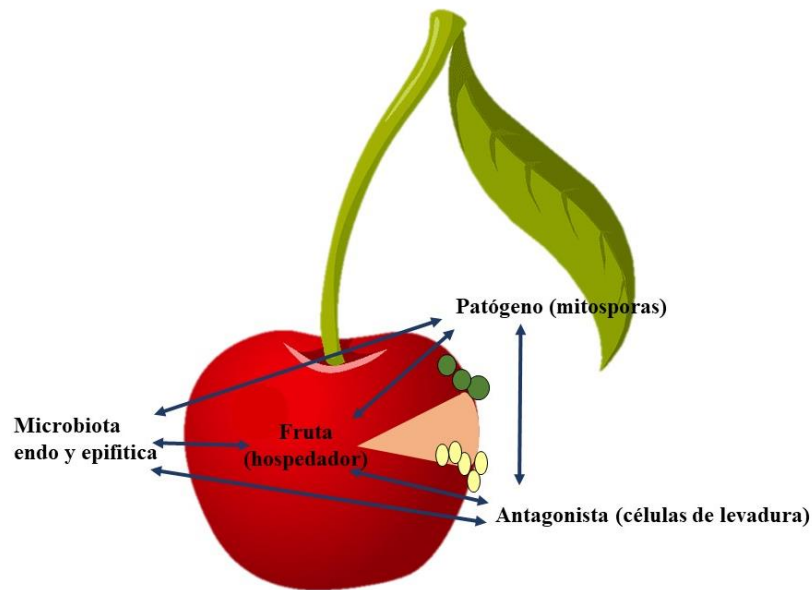


Figura 7. Sistema cuadritrófico: enfoque sistémico para el estudio de los mecanismos de acción involucrados en el control biológico poscosecha que considera las interacciones que ocurren entre la fruta hospedador, el patógeno, el antagonista y la microbiota epifita y endofítica (modificado de Spadaro y Droby 2016).

Diferentes autores coinciden en que un ACB exitoso estará equipado con varios mecanismos que trabajarán en conjunto al momento de controlar el desarrollo de la enfermedad (Mondino y Vero 2006, Jamalizadeh et al., 2011). Algunos de los mecanismos de acción de los ACB más estudiados se comentan a continuación.

#### 3.4.4.1 Competencia por nutrientes

La competencia se define como una superposición de nicho, como resultado de una situación en la que existe una demanda simultánea del mismo recurso por parte de dos o más poblaciones microbianas (Droby y Chalutz 1994). La competencia por nutrientes (por ejemplo, carbohidratos, nitrógeno, oxígeno) y espacio se ha considerado uno de los principales mecanismos de acción de los ACB frente a patógenos poscosecha, puede ser efectivo cuando el antagonista está presente en cantidades suficientes en el momento y lugar correctos y puede utilizar recursos limitados de manera más eficiente que el patógeno (Spadaro y Droby 2016).

En las heridas de frutas, por ejemplo, las levaduras crecen rápidamente durante las primeras 24 h y, como resultado, agotan los nutrientes disponibles y ocupan físicamente el espacio de la herida, lo que puede tener un efecto directo en la germinación de las mitosporas de hongos. Por lo tanto,

en las primeras 24 h, este podría ser un modo de acción muy importante (Liu et al., 2012).

La competencia por nutrientes fue demostrada para *Meyerozyma guilliermondii* contra *P. digitatum* en co-cultivos en medio sintético (Droby et al., 1989). Como las levaduras pueden usar satisfactoriamente una amplia gama de carbohidratos, que incluyen disacáridos y monosacáridos, y fuentes de nitrógeno (Spadaro et al., 2010), es probable que el nitrógeno represente un factor limitante en ambientes ricos en carbono, como lo son las heridas de pera (Janisiewicz y Korsten, 2002). La competencia por azúcares y nitratos fue demostrada también en las interacciones entre *M. guilliermondii* y *B. cinerea* en manzana (Zhang et al., 2011).

Uno de los tipos de competencia por nutrientes, que tiene un papel importante en el biocontrol de los patógenos de poscosecha, es la competencia por hierro, debido a que es esencial para el crecimiento de hongos (Saravanakumar et al., 2008). Por ejemplo, la levadura podría beneficiarse de la herida de la fruta, que es un microambiente con bajo contenido de oxígeno y hierro, produciendo sideróforos para competir por el hierro e interferir con la germinación, crecimiento y virulencia del patógeno (Spadaro y Droby 2016). Las levaduras como *Rhodotorula glutinis* son con frecuencia productores de sideróforos y su concentración está estrechamente asociada con la concentración de hierro en el medio (Di Francesco et al., 2016). *Metschnikowia pulcherrima* y *M. fructicola* pueden producir un pigmento rojo, pulcherrimina, formado a partir de ácido pulcherrimínico e iones férricos, que está involucrado en el control de *B. cinerea*, *Alternaria alternata* y *P. expansum* en manzana (Saravanakumar et al., 2008).

#### 3.4.4.2 Antibiosis: Producción compuestos difusibles y volátiles

Las levaduras pueden producir compuestos antifúngicos, como toxinas *killer*, péptidos y metabolitos antibióticos (Selitrennikoff 2001).

La antibiosis se define como la inhibición o destrucción de un microorganismo por sustancias tales como metabolitos específicos o inespecíficos o enzimas producidos por otro microorganismo (Melin et al., 2007). Los antibióticos pueden ser sustancias volátiles o no volátiles producidas por un microorganismo y efectivas a bajas concentraciones (menos de 10 ppm) (Liu et al., 2013). 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). La producción de compuestos antimicrobianos por los ACB podría verse influenciada por varios factores abióticos como el oxígeno, la temperatura, las fuentes específicas de carbono y nitrógeno y los microelementos (Liu et al., 2013). Entre los metabolitos antibióticos, el ejemplo más estudiado es el farnesol de *Cr.*

*albicans*, que puede inhibir *in vitro* diversas bacterias y hongos (Liu et al., 2014). *Aureobasidium pullulans* puede producir Aureobasidina A, un depsipéptido cíclico con propiedades antifúngicas y antibióticas, particularmente contra *Botrytis* spp., *Monilinia* spp. y *Penicillium* spp. tanto *in vitro* como *in vivo* (Liu et al., 2007). La Aureobasidina A puede bloquear la actividad de la inositol fosforilceramida sintasa, una enzima esencial para la biosíntesis de esfingolípidos fúngicos (Spadaro y Droby 2016).

Ciertas cepas de levadura con un fenotipo asesino producen toxinas proteicas extracelulares designadas como toxinas *killer*, que son letales para las células microbianas sensibles que pueden pertenecer a la misma especie o a una diferente. Los ejemplos más estudiados son las toxinas K1, K2 y K28 de *S. cerevisiae* (Breinig et al., 2002). Las toxinas *killer* confieren una ventaja ecológica a las levaduras sobre sus competidores. La mayoría de las toxinas *killer* son estables y activas a valores de pH de entre 3-5.5, típicos en heridas de frutas (Marquina et al., 2002). Se ha reportado que este modo de acción estaría relacionado con la capacidad de biocontrol de las levaduras antagonistas como *P. membranifaciens* (Santos et al., 2009) frente a *B. cinerea* en vid y *Wickerhamomyces anomalus* y *Meyerozyma guilliermondii* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (Lima et al., 2013).

Otro de los tipos de sustancias producidas por ACB, que están frecuentemente involucrados en el control biológico de varias enfermedades fúngicas de frutas en poscosecha, son los compuestos orgánicos volátiles (COV) (Di Francesco et al., 2016). Los COV son productos químicos con bajo peso molecular, alta presión de vapor y baja solubilidad en agua que les permite evaporarse fácilmente en el aire o "gas de escape" (Jamalizadeh et al., 2011). El alcohol fenético, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol son algunos de los COV producidos por *Aureobasidium pullulans* frente a *B. cinerea*, *C. acutatum* y *Penicillium* spp. en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Di Francesco et al. 2014). Los COV emitidos por estos ACB proporcionan solo una contribución limitada al control biológico de los patógenos, ya que muestran una actividad fungistática (detienen el crecimiento de los patógenos, pero no los matan) (Di Francesco et al., 2016). Sin embargo, se sabe que algunos hongos pueden producir una amplia gama de COV (Miyazawa et al., 2008). Otro tipo de aplicación de los COVs producidos por los ACB son por aplicación de biofumigantes, en el que los antagonistas no están en contacto directo con el patógeno y la producción de COV es el único mecanismo de acción, esto fue reportado por Huang et al., (2011, 2012) al inhibir el crecimiento de *B. cinerea* en frutillas con COVs de *Candida intermedia* y *Sporidiobolus pararoseus*.



#### 3.4.4.3 Producción de enzimas líticas

En las paredes celulares de los hongos el glucano es el principal polisacárido estructural constituyendo aproximadamente 50-60% en peso seco de la pared. La quitina es un homopolímero lineal e insoluble que conforma alrededor del 20%, o más, de las paredes celulares de los hongos filamentosos (Seidl 2008). Las proteínas de la pared celular juegan un papel importante en el mantenimiento de la forma celular, mediando la adhesión para la migración y fusión celular, protegiendo la célula contra sustancias extrañas, mediando la absorción de moléculas y sintetizando y remodelando los componentes de la pared celular. La descomposición de la pared celular fúngica requiere la participación de diferentes enzimas, especialmente  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas, pero también proteasas (Spadaro y Droby 2016).

Las levaduras antagonistas pueden producir quitinasas, celulasas,  $\beta$ -glucanasas y proteasas capaces de degradar la pared de los patógenos, provocando daños y destrucción a nivel celular (Castoria et al., 2001, Vero et al., 2009, Lutz et al., 2013). La capacidad de los antagonistas para unirse a las hifas de los patógenos y su capacidad para secretar enzimas líticas juegan un papel importante en la actividad de biocontrol (Liu et al., 2013). 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).

La acción de la  $\beta$ - glucanasa se reportó por primera vez cuando se estudió de la capacidad de *M. guilliermondii* para unirse a las hifas de *B. cinerea* y secretar  $\beta$ - (1–3) glucanasa que degrada las paredes celulares del patógeno (Wisniewski et al., 1991). Masih y Paul (2002) mostraron que la exo-  $\beta$ -1,3-glucanasa secretada por *P. membranifaciens* tenía un papel en la actividad de biocontrol contra *B. cinerea* en la vid. Por otro lado, Saravanakumar et al., (2009) reportaron que las enzimas quitinasas extracelulares producidas por cepas de *M. pulcherrima* tienen un efecto inhibitorio sobre *B. cinerea*. Mientras que Zhang et al., (2012) demostraron la actividad antifúngica de una serina proteasa alcalina producida por *Aureobasidium pullulans* (cepa PL5) y la relacionaron con su modo de acción como ACB.

#### 3.4.4.4 Producción de biofilm

La capacidad de los ACB para formar un biofilm, creando una barrera mecánica interpuesta entre la superficie de la herida y el patógeno, puede considerarse un sistema de exclusión del sitio. La formación de biofilms se ha propuesto como un posible mecanismo de biocontrol en algunas levaduras antagonistas (Vero et al., 2013). El antagonista debe tener la capacidad de adherirse,

colonizar y multiplicarse para colonizar con éxito las superficies frutales sanas y lesionadas (Liu et al., 2013). En la mayoría de los casos, esta característica está asociada con la formación de un biofilm, donde hay micro-colonias encerradas en una matriz hidratada de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos producidos por los microorganismos (Bassam et., 2009).

Se encontró una relación positiva entre la formación de biofilms, la capacidad de colonización de heridas de *M. pulcherrima* y *W. anomala* y la reducción del desarrollo del patógeno cuando estas se enfrentaron a *B. cinerea* en uvas, mientras que *S. cerevisiae*, sin capacidad de formación de biofilm, mostró una menor colonización de la herida y no afectó el crecimiento de *B. cinerea* (Parafati et al., 2015)

#### 3.4.5 Mejoramiento de la capacidad biocontroladora de las levaduras

La eficiencia de los ACB seleccionados puede mejorarse de diferentes maneras. Una de ellas es combinando el ACB con otros compuestos antimicrobianos (Liu et al., 2013). Qin et al., (2003) informaron que el ácido salicílico (AS) aumenta la eficacia del biocontrol de *R. glutinis* contra *P. expansum* y *A. alternata* en cerezas. Otro regulador del crecimiento de las plantas y activador de defensa, el metil jasmonato, también se ha utilizado para mejorar la eficacia del biocontrol de las levaduras antagonistas en varias frutas, como la manzana (Ebrahimi et al., 2012), pera (Zhang et al., 2009), durazno (Yao y Tian 2005a). También se ha informado que el quitosano, controla las enfermedades poscosecha a través de sus propiedades antifúngicas y su capacidad para provocar respuestas de defensa del hospedador (Bautista-Baños et al., 2006). En base a estas propiedades, se ha demostrado que el quitosano es un aditivo efectivo para mejorar el rendimiento de las levaduras de biocontrol, como *Candida saitoana* (El-Ghaouth et al., 2000) y *Cr. laurentii* (Meng et al., 2010).

Según Narayanasamy (2006), otra forma de mejorar la actividad de un ACB es a través del uso de mezclas antagonistas, ya que estas pueden proporcionar las siguientes ventajas:

- ampliación del espectro de actividad que resulta en el control de dos o más enfermedades poscosecha;
- aumento de la efectividad en diferentes situaciones, tales como cultivares, etapas de madurez y ambientes;
- mejora, en eficiencia y confiabilidad, del biocontrol ya que los componentes de la mezcla actúan a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, antagonismo, parasitismo e inducción de resistencia en el hospedador;

- reducción en la tasa de aplicación y el costo del tratamiento;
- combinación de diferentes rasgos de biocontrol sin la transferencia de genes extraños a través de la transformación genética.

Al seleccionar los componentes de mezclas de antagonistas, se deben considerar ciertos atributos, que incluyen: ausencia de antagonismo entre un ACB contra otro componente y selección de componentes con interacciones positivas (sinergismo) que permiten una utilización más efectiva de los recursos (Narayanasamy 2006). Nunes et al., (2002) prepararon mezclas antagonistas que compuestas por *Candida sake* CPA-1 (a  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^7$  CFU/mL) y *Pantoea agglomerans* CPA-2 (a  $2 \times 10^7$  y  $8 \times 10^7$  CFU/mL) y evaluaron su eficacia en el control de *P. expansum* y *B. cinerea* en pera y manzana. A temperatura ambiente, una mezcla (50:50 de ambos ACB) detuvo completamente el desarrollo de *P. expansum* en las manzanas. Bajo almacenamiento en frío, la combinación de *Candida sake* a  $2 \times 10^7$  CFU / mL + *P. agglomerans* en ambas concentraciones, en una proporción de 50:50, fue eficaz contra la descomposición de la pera.

#### 3.4.6 Producción de agentes de control biológico

Una vez seleccionado el ACB, aunque cumpla con las características “ideales”, mencionadas en el Punto 3.4.1, los factores económicos dictarán si se comercializará o no (Wilson y Wisniewski 1989).

Cuestiones tales como la producción económica de grandes cantidades de un microorganismo en una formulación que garantice una vida útil razonable y mantenga la eficacia durante las pruebas a gran escala son pasos fundamentales en el proceso de desarrollo de un producto de biocontrol comercial (Droby et al., 2016). Los factores más importantes que se deben conocer acerca de los ACB para la producción de su biomasa incluyen la utilización de fuentes de carbono y su comportamiento frente a la actividad agua ( $a_w$ ), la temperatura y el pH (Fravel 2005). Se han descrito sistemas de producción de biomasa optimizados para algunos agentes de biocontrol poscosecha, incluidas bacterias como *P. agglomerans* PBC-1 (Manso et al., 2010) y *B. subtilis* CPA-8 (Yáñez-Mendizábal et al., 2012) y levaduras como *Candida sake* CPA-1 (Abadias et al., 2003) y *A. pullulans* (Mounir et al., 2007). Por otro lado, conocer la concentración efectiva mínima del ACB también resulta muy importante, porque además de cumplir con la característica de ser efectivo a bajas concentraciones, conocer la concentración de inóculo necesaria para que el ACB cumpla con su máxima función como antagonista permite optimizar los recursos de producción, formulación y aplicación del ACB (Wilson y Wisniewski 1989, McLaughlin et al.,

1990a).

### 3.5 Ventajas e inconvenientes en el uso de agentes de biocontrol

Las ventajas que ofrece la aplicación de antagonistas microbianos en el control de la enfermedad poscosecha, en comparación con los fungicidas sintéticos (Griffiths 1981, Bonaterra et al., 2012, Yáñez-Mendizábal et al., 2012), son:

- Mayor seguridad en comparación con los principales productos químicos utilizados actualmente, porque tienen menos riesgos de toxicidad y no se acumulan en los alimentos.
- Mayor persistencia en el tiempo, proporcionando un control más eficaz.
- Producción de un efecto insignificante en el balance ecológico debido a que sólo interactúan sobre las especies patógenas contra las que son aplicadas, sin interferir sobre el resto de la microbiota natural existente y sin favorecer la aparición de nuevas enfermedades.
- Compatibilidad con otros sistemas de control, por lo que se pueden aplicar junto a otros productos.

Por otro lado, Droby et al., (2016) y Yáñez-Mendizábal et al., (2012) explican algunos de los factores que restringen el desarrollo y la utilización de microorganismos como agentes de biocontrol:

- La eficacia de estos productos debe ser similar a la lograda por los fungicidas químicos, que se encuentra en el rango de 98 a 100% de control de la enfermedad. Este nivel rara vez se alcanza con los productos de control biológico cuando se usan como un tratamiento independiente (estrategias para el mejoramiento de la actividad biocontroladora se describieron en el Punto 3.4.5). Los procesos de producción y formulación, pasos fundamentales en el proceso de desarrollo de un producto de biocontrol comercial, frecuentemente se llevan a cabo por, o en asociación, con empresas privadas, motivo por el cual todos los datos de investigación y desarrollo relacionados con el ACB están protegidos por acuerdos de confidencialidad. Esto conduce a la falta de referencias científicas sobre temas esenciales como es la producción económica de grandes cantidades de un microorganismo en una

formulación que garantice la vida útil razonable y mantenga la eficacia durante las pruebas a gran escala.

- El estrecho rango de actividad (hospedadores y patógenos) de muchos ACB es una limitación seria para su éxito comercial. En el caso de los productos para control biológico de poscosecha, este problema es aún más crítico porque el mercado poscosecha es muy limitado (estrategias para mejorar la performance del rango de acción se describieron en el Punto 3.4.5).
- A diferencia de los productos químicos, al momento de la formulación, se debe tener en cuenta que son seres vivos que deben sobrevivir a condiciones limitantes de nutrientes, temperatura, desecación, actividad de agua ( $a_w$ ), etc.
- Problemas en el patentamiento de los microorganismos y registro de las formulaciones.

### 3.6 Perspectivas de los agentes de control biológico

En los últimos años, el interés de las compañías químicas multinacionales y las industrias microbianas (como los productores de levadura) en las tecnologías de control biológico, incluidos los usos posteriores a la cosecha, ha crecido sustancialmente. Esto se refleja en el número de adquisiciones realizadas por grandes y medianas empresas especializadas en el desarrollo de tecnologías ecológicas para controlar las enfermedades de las plantas (CPM 2010).

El aumento del interés de las empresas multinacionales en productos biológicos se basa en:

- Ofrecer a sus clientes (distribuidores y, posteriormente, productores) una cartera completa de herramientas existentes para la protección de las plantas, que incluyen productos convencionales y "ecológicos" (Droby et al., 2016).
- La preocupación por la inocuidad de los alimentos, incluidos los residuos químicos y el impacto ambiental (Droby et al., 2016).
- Que muchas grandes cadenas de supermercados están estableciendo sus estándares para residuos químicos cada más restrictivos (Usall et al., 2016).
- La producción orgánica, un claro usuario final de estos productos de biocontrol, que no era lo suficientemente importante en el pasado, es ahora un sector agrícola en aumento (Usall et al., 2016).

### 3.7 Bioproductos: Agentes de control biológico comercializados

A lo largo de los más de 30 años en los que se viene desarrollando e investigando el uso de microorganismos como ACB de patógenos de poscosecha se han identificado numerosos antagonistas, levaduras y bacterias, en estudios de laboratorio, semicomerciales y comerciales, de los cuales, varios han alcanzado niveles avanzados de desarrollo y comercialización (Droby et al., 2016). Los bioproductos y sistemas para los cuales fueron desarrollados se presentan a continuación:

- Aspire (Ecogen, Langhorne, PA, EE. UU.) basado en la levadura *Candida oleophila* recomendado para el control de *Botrytis* y *Penicillium* en frutos de pepita (Blachinsky et al., 2007),
- Yield Plus (Lallemand, Montreal, Canadá) basado en la levadura *Cryptococcus albidus*, recomendado para el control de *Botrytis*, *Penicillium* y *Mucor* en frutos de pepita (Janisiewicz y Korsten, 2002)
- Candifruit (IRTA, Lleida, España) basado en la levadura *Candida sake* para el control de enfermedades de frutas pepita (Teixidó et al., 2011),
- BioSave 10 y 11 LP, (JET Harvest, Longwood, FL, EE. UU.) basados en la bacteria *Pseudomonas syringae* registrados un USA para el control de podredumbres en cerezas, manzanas y peras (Janisiewicz y Jeffers 1997, Janisiewicz y Korsten 2002).
- Avogreen (Universidad de Pretoria, Pretoria, Sudáfrica) basado en la bacteria *Bacillus subtilis* se introdujo en Sudáfrica para el control de la mancha de *Cercospora*, una enfermedad poscosecha de la palta, pero no logró el éxito comercial debido a resultados inconsistentes (Demoz y Korsten, 2006).
- Nexy (Leasafre, Lille, Francia) basado, también, en la levadura *Candida oleophila*, se desarrolló en Bélgica, y se sometió a aprobación regulatoria en 2005 para su aplicación en poscosecha contra *P. expansum* y *B. cinerea* en frutas de pepita, cítricos y plátano (Lahlali et al., 2011a).
- Boni Protect (Bio-Ferm, Tulln, Austria), basado en el *yeast-like* (hongo tipo levadura) *Aureobasidium pullulans*, tiene un uso sugerido como una aplicación previa a la cosecha para controlar los patógenos de herida que se desarrollan en frutas de pepita durante el almacenamiento (Lima et al., 2015).
- Pantovital (Domca, Granda, España) basado en *Pantoea agglomerans* CPA-2, eficaz contra los principales patógenos poscosecha de pepita y cítricos (Teixidó et al., 2001, Cañamás et al., 2008) fue formulado, pero nunca comercializado (Torres et al., 2014).

Shemer (Bayer, Leverkusen, Alemania) basado en la levadura *Metschnikowia fructicola* registrada en Israel para la aplicación previa y posterior a la cosecha en diversas frutas y verduras, incluidos damascos, cítricos, uvas, duraznos, pimientos, fresas y batatas representa un ejemplo más exitoso de un producto de biocontrol poscosecha.

### 3.8 Levaduras como ACB de patógenos de poscosecha en fruta fina

Particularmente para *Cherries*, el control biológico de enfermedades de poscosecha está orientado activamente hacia la utilización levaduras antagonistas como componentes de un manejo integrado (Spotts et al., 1998, 2002, Karabulut et al., 2001). Experiencias realizadas en China demostraron que *Cryptococcus laurentii* es un eficaz ACB ya que resiste muy bien las condiciones de almacenamiento (baja temperatura, O<sub>2</sub> y alta concentración de CO<sub>2</sub>) (Tian et al., 2004a). Ensayos realizados en Italia con *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces anomalus* demostraron que estas levaduras pueden ser eficaces para el control de *Monilinia laxa* en condiciones de poscosecha (Oro et al., 2014).

Por otro lado, también se ha efectuado manejo integrado en el control de la pudrición marrón a través del uso combinado de las levaduras *Cr. laurentii*/*Cr. infirmo-miniatius* y una baja dosis de *Iprodione* (Spotts et al., 1998). Además, varios estudios han demostrado que el tratamiento poscosecha de cerezas con bicarbonato de sodio, el molibdato de amonio o ácido salicílico podrían ser potenciadores de los métodos de control biológico (Spotts et al., 1998, 2002, Karabulut et al., 2001, Qin et al., 2006).

No hay referencias bibliográficas aún que reporten el uso de levaduras como ACB de patógenos de poscosecha en frambuesas y zarzamoras. Si existen antecedentes sobre control biológico en zarzamoras con bacterias del género *Bacillus* como ACB frente a *R. stolonifer* (Chavez-Diaz 2011) y sobre el efecto de compuestos volátiles producidos por *Bacillus siamensis* sobre *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en frambuesas (Zhang et al., 2020a).

### 3.9 Levaduras como ACB en Argentina

En Argentina, el control de las enfermedades en poscosecha se ha basado en la utilización de fungicidas de síntesis; sin embargo, en la actualidad, existen pocos principios activos eficientes y con registro en el país para su uso. En este sentido, el control biológico se plantea como una alternativa promisoriosa y factible de ser incorporada en el sistema de producción orgánica e integrada (Robiglio et al., 2011). Si bien, como se mencionó anteriormente, a nivel mundial ya se

encuentran algunos registrados, formulados y comercializados algunos bioproductos basados en levaduras, el elevado costo de la importación del producto y la inconsistente respuesta que se ha observado cuando éstos son probados en regiones distintas y en otros cultivos diferentes a los de su origen, han dificultado su uso universal (Droby et al., 2009, 2016, Usall et al., 2016).

Por este motivo, en los últimos años han aumentado en distintos lugares del país los estudios que intentan abordar la problemática de los patógenos de poscosecha mediante el uso de levaduras antagonistas, pero ninguno de estos ha llegado aún a la etapa de comercialización. Nally et al., (2012) y Ponsone et al., (2011) aislaron levaduras a partir de uvas, de las provincias de San Juan y Mendoza respectivamente, y las seleccionaron por su capacidad controladora sobre *Botrytis cinerea* y *Aspergillus*. Benitez Ahrendts y Carrillo (2004), Visintin et al., (2007) y Pérez et al., (2017) han determinado la acción inhibitoria de cepas de levaduras sobre el crecimiento de mohos patógenos (del género *Penicillium*) sobre cítricos de las provincias de Jujuy, Entre Ríos y Tucumán, respectivamente. La capacidad biocontroladora de *Rhodotorula rubra* y *Candida pelliculosa* fue reportada frente a *B. cinerea* para tomates en poscosecha en Buenos Aires (Dal Bello et al., 2008). Pesce et al., (2017) probaron la efectividad de distintas cepas de levaduras frente a *Colletotrichum gloeosporioides* en aceitunas en la provincia de San Juan. En las provincias de Río Negro y Neuquén, Robiglio et al., (2011), Lutz et al., (2012, 2020) y Gramisci et al., (2018) han seleccionado y patentado el uso levaduras nativas con capacidad biocontroladora sobre *Penicillium expansum* y *B. cinerea* en peras y optimizado los métodos para la producción de biomasa a gran escala y evaluando los ensayos a escala comercial en líneas de empaque.

A partir de los resultados de esta Tesis se generan los primeros registros de control biológico en fruta fina en Argentina (López et al., 2016, Villalba et al., 2016).



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS GENERAL**

Existen levaduras indígenas en fruta sana almacenada que, seleccionadas en base a su actividad antagónica *in vivo* y a sus mecanismos de acción *in vitro*, permiten disminuir la incidencia de enfermedades fúngicas de poscosecha.

## **OBJETIVO GENERAL**

Generar información básica y de transferencia a partir de la diversidad de levaduras indígenas en frutas de *Cherries* y *Berries*, con el fin de seleccionar antagonistas para el control de enfermedades de poscosecha.

# **CAPITULO I AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACION DE PATÓGENOS**

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades poscosecha se producen como consecuencia de condiciones meteorológicas adversas durante el desarrollo del fruto, por la recolección de los frutos en un avanzado estado de madurez, carencia de un programa de control integrado de estas enfermedades y/o manejo deficiente de prácticas precosecha o manipulación poscosecha (Looney et al., 1996). El desarrollo de podredumbres como resultado del ataque de microorganismos durante el almacenamiento es una de las principales causas del deterioro de las frutas frescas y es un factor limitante en la vida útil de las frutas finas cosechadas (Barkai-Golan 2001). Las enfermedades de poscosecha en la fruta se pueden medir por su virulencia, el grado o capacidad relativa de un microorganismo de causar daño en el hospedante (Casadevall y Pirofski 1999) a través de la "incidencia" (la presencia o ausencia de síntomas) y la "severidad" (el grado en que se expresan los síntomas) (Michailides et al., 2009). Las enfermedades de poscosecha han sido tradicionalmente controladas a través del uso de fungicidas de origen químico, sin embargo muchos de estos productos han sido retirados o limitados debido los efectos perjudiciales sobre la salud de los consumidores, los efectos nocivos para el medio ambiente en general y el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos de poscosecha (Narayanasamy 2013).

Los principales patógenos que afectan a las frutas finas en la poscosecha son *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp., *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium* spp. y *Mucor* spp. (Snowdon 1990, Ogawa et al., 1995). La incidencia de los patógenos menos comunes pueden variar de un año a otro, de una estación a otra y de un lugar a otro, lo que sugiere que los factores climáticos pueden afectar la cantidad de inóculo disponible o la resistencia a la infección de la fruta (Dennis 1983).

El conocimiento del patosistema en el que se desea intervenir es fundamental para iniciar cualquier medida de control. Un patosistema vegetal es aquel en el que la especie hospedante es una planta y el parásito (que puede ser un insecto, hongo, bacteria, micoplasma, virus o virión) es un organismo que durante una parte de su ciclo de vida habita al hospedante y obtiene nutrientes a partir de él. El rasgo principal del concepto de patosistema es que éste se relaciona con el parasitismo (interacción patógeno-hospedante, el hospedante tiene la propiedad de resistir al parásito y el parásito tiene la propiedad de parasitar al hospedante) y no con el estudio del hospedante o el patógeno por separado (Cordo et al., 2014).

Por lo cual, es importante conocer los hongos patógenos de esta región, ya que, como se trata de seres vivos, su distribución y desarrollo estarán directamente influenciados por el ambiente (Mondino y Vero 2006).

## **HIPÓTESIS**

Existen hongos en fruta fina almacenada que pueden ser patógenos virulentos a bajas concentraciones de mitosporas y resistentes a fungicidas, responsables de su deterioro luego de la cosecha.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar los hongos asociados a las enfermedades de poscosecha de frutos de cereza, frambuesa y zarzamora de Patagonia Sur.
- Determinar la virulencia de los aislamientos de hongos usando los parámetros de incidencia y severidad.
- Identificar los hongos virulentos, causantes de enfermedad en fruta fina.
- Evaluar el grado de resistencia (o sensibilidad) al fungicida de síntesis Iprodione de los aislamientos de hongos potencialmente patógenos.
- Determinar la concentración infectiva mínima (CIM) de los patógenos para de producir podredumbre en las frutas finas.

## **MATERIALES**

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

Todos los medios de cultivo utilizados se prepararon con agua destilada y se esterilizaron por vapor saturado a presión en autoclave a 120°C y 2 atmósferas durante el tiempo especificado para cada medio de cultivo.

- Agar, papa, dextrosa (APD) de formulación comercial de Laboratorios Britania, según especificaciones del producto (39 g/L).

- Agar Czapek Yeast Autolysate (CYA):  $\text{NaNO}_3$  3 g/L, extracto de levadura 5 g/L, sacarosa 30 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1,3 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L, KCl 0,5 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,005 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g/L, agar 15 g/L (Pitt 1979).
- Agar de nitrato de glicerol al 25% (G<sub>25</sub>N):  $\text{K}_2\text{HP0}_4$  0,75 g/L, solución Czapek 7,5 mL/L, extracto de levadura 3,7 g/L, glicerol 250 g/L, agar, 15 g/L (Pitt 1973).
- Medio líquido malta-peptona: Extracto de malta 30 g/L, Peptona 3 g/L

## MÉTODOS

### 1. Sitios de muestreo

Durante diciembre de 2011, enero y febrero de 2012 se seleccionaron chacras y centros de acopio a partir de los cuales se obtuvieron de cerezas bajo producción convencional de dos localidades de la zona oeste de Chubut: Trevelin cerezas variedades Lapins, Bing y Rainier, y en Lago Puelo cerezas de la variedad Lapins. Mientras que, en la zona este, se muestrearon cerezas de la variedad Lapins en la localidad de Gaiman (Figura 8).

Las frutas orgánicas se obtuvieron de la zona del Paralelo 42°. Cerezas variedad Lapins y frambuesas Autumn Bliss fueron obtenidas de un establecimiento ubicado en Lago Puelo; y cerezas variedad Bing y frambuesas variedad Autumn Bliss de un establecimiento de la localidad de El Bolsón (Figura 8). No se obtuvieron frambuesas bajo producción convencional ya que la mayoría de la producción se realiza de manera orgánica.

Las zarzamoras fueron recolectadas de plantas asilvestradas en la zona cordillerana del Paralelo 42° (Figura 8).

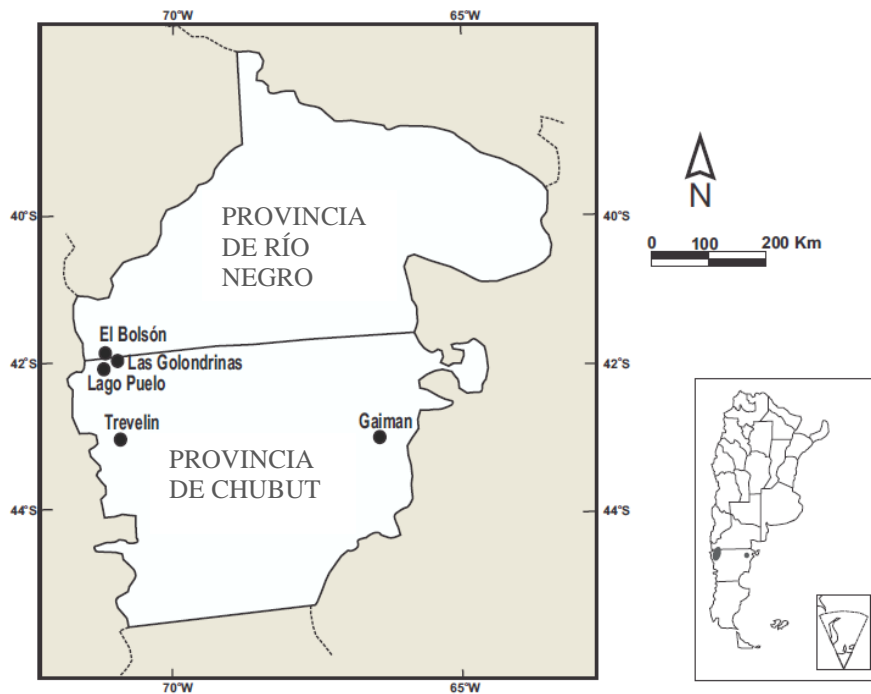


Figura 8. Mapa de los sitios de muestro. La zona del Paralelo 42° está comprendida por las localidades de El Bolsón, Las Golondrinas y Lago Puelo.

Las frutas fueron cosechadas a madurez comercial o colectadas de los centros de acopio de manera aleatoria el mismo día de la cosecha y conservadas a 0°C en cámaras frigoríficas de la “Cooperativa de productores de fruta fina” de Trevelin para la realización de los posteriores bioensayos (Figura 9).



Figura 9. Localización de los ensayos en cámara de almacenamiento de la “Cooperativa de productores de fruta fina” de Trevelin.

## 2. Aislamiento de hongos

A partir de frutos que fueron mantenidos a 0°C durante 1, 30 o 60 días en el caso de las cerezas; y 1, 3 o 6 días en el caso de las frambuesas y zarzamoras, se tomaron muestras de aquellos que presentaron síntomas de podredumbre. Se analizaron 1080 frutos: 648 cerezas (de tres variedades y de tres sitios diferentes, 432 de producción convencional y 216 de producción orgánica), 216 frambuesas (de una variedad y dos sitios, cultivos orgánicos) y 216 zarzamoras (provenientes de un solo sitio de cultivo asilvestrado). Los frutos con síntomas de podredumbre fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70% por aspersion durante 30 s y secados con un algodón estéril. Posteriormente se extrajeron porciones de tejido (de 3 mm de ancho x 3 mm de largo) de la zona de transición entre tejido interno sano y enfermo (zona de avance de la infección) (Pitt y Hocking 2009, Tafinta et al., 2014, Wang et al., 2020). Se colocaron tres porciones de tejido equidistantes en placas de Petri con APD y fueron incubadas durante 7 a 10 días en cámara de crecimiento a 22°C (Figura 10). Se aislaron los hongos cuyo crecimiento comenzó sobre el tejido vegetal y se cultivaron en cajas de Petri con APD en cámara de crecimiento a 22°C.



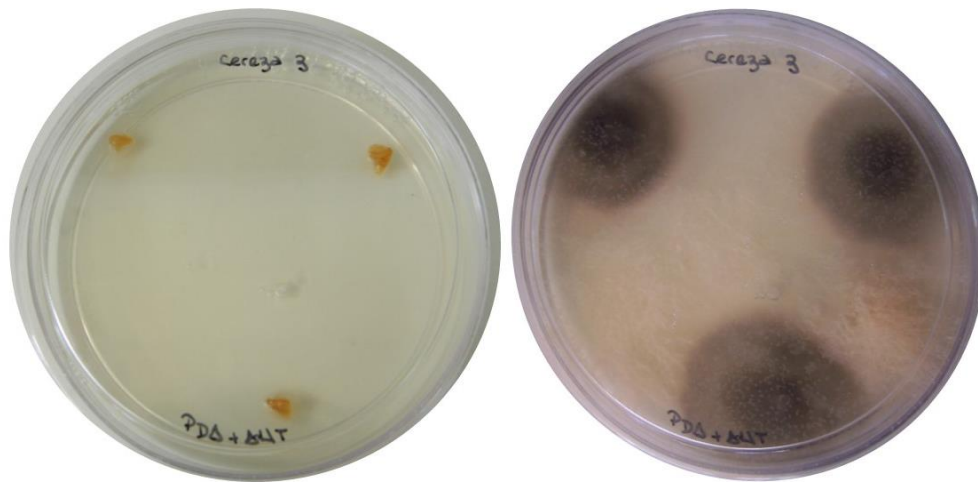


Figura 10. Técnica utilizada para el aislamiento de hongos

### 3. Evaluación de virulencia

Para determinar la virulencia (%) de los aislamientos obtenidos se tomaron como parámetros la incidencia (% de heridas con síntomas de enfermedad respecto del total de heridas) y/o la severidad (diámetro de la lesión).

#### 3.1 Evaluación de la virulencia en cerezas

La evaluación de la virulencia se determinó en cerezas realizando heridas artificiales, de 3x3x3mm, con un palillo estéril (autoclavado) en la región ecuatorial de cerezas, previa esterilización por inmersión de la fruta en hipoclorito de sodio al 2% durante 30 s (emulando condiciones de *hydrocooling*, Ippolito et al., 2005, Nicosia et al., 2016). Luego de 30 min se inocularon con 10 µL de suspensiones de 10<sup>6</sup> mitosporas/mL de los aislamientos fúngicos, las cuales fueron ajustadas utilizando cámara de recuento (Neubauer). Como control negativo se inocularon frutas con agua destilada estéril. Las frutas se colocaron en bandejas plásticas dentro de bolsas de polietileno y se conservaron en condiciones de almacenamiento (30 días a 0°C, seguidos por 3 días a 22°C), y en condiciones de comercialización (7 días a 22°C) en cámaras frigoríficas y climatizadas adecuadas. Cada ensayo se realizó por triplicado con diez frutos por repetición. La severidad se obtuvo midiendo el diámetro de lesión, en milímetros, en cada fruto y la incidencia (%I) fue determinada de acuerdo a la siguiente expresión:

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

Donde:

%I: es incidencia de la enfermedad en porcentaje

x: es el número de frutos inoculados

b: es el número de frutos inoculados y enfermos

La virulencia, medida que representa el efecto combinado de la severidad (diámetro de la lesión en mm) y la incidencia (%), se calculó de la siguiente manera (Louw y Korsten 2014):

$$\%V = [(d \times F) / (Tn \times D)] \times 100$$

Donde:

%V: es la virulencia en porcentaje

d: diámetro medio de la lesión,

F: número de heridas enfermas observadas,

Tn: el número total de heridas inoculadas

D: el máximo diámetro medible de la lesión.

### 3.2 Evaluación de la virulencia en frambuesas y zarzamoras

Dada las características de estos frutos (rápida pérdida de la firmeza), no fue posible realizar heridas artificiales para medir la severidad. Por este motivo, en frambuesas y zarzamoras se evaluó la incidencia sobre la epidermis de las frutas inoculando 10 µL de cada suspensión de 10<sup>6</sup> mitosporas/mL. Las frutas se conservaron en dos condiciones de almacenamiento: a) a 0°C por 5 días y a 22°C por 2 días, b) en condiciones de comercialización durante 5 días a 22°C. Se determinó la incidencia. Cada ensayo se realizó por triplicado con diez frutos por repetición.

## 4. Identificación de los hongos aislados

### 4.1 Identificación morfológica

Los hongos que mostraron incidencia en la fruta se identificaron morfológicamente a nivel de género según sus características macro y microscópicas a partir de cultivos en APD, Czapek y G25N utilizando lupa estereoscópica, marca Zeiss, modelo Stemi SV11, 40X, luz con incorporada, y microscopio óptico marca Zeiss, modelo Standard 20, 100X, con luz incorporada,

utilizando la bibliografía de Samson et al., (2004) y Pitt y Hocking (2009).

#### 4.2 Identificación molecular, extracción de ADN y condiciones de PCR

Para la extracción de ADN, se cultivaron los aislamientos de hongos en medio líquido en malta-peptona, con 5 mL de medio en tubos de 15 mL, en oscuridad durante 7 días. El ADN fue extraído usando el kit comercial Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA). Se amplificaron las regiones del ADN nuclear ITS (Internal Transcribed Spacer region) y beta-tubulina dependiendo de los géneros fúngicos y de acuerdo a estudios taxonómicos específicos para cada taxón: primers (Invitrogen Argentina) ITS1-ITS4 (White et al., 1990) para el género *Cladosporium*, ITS4-ITS5 (White et al., 1990) para *Alternaria* y *Mucor*, ITS1F-ITS4 (Gardes y Bruns 1993) para *Botrytis*, y Bt2A-Bt2B (Glass y Donaldson 1995) para *Penicillium* (Anexo 1).

La reacción de amplificación por PCR se realizó incluyendo dNTPs (0,25 mM de c/u), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, buffer de PCR 5X (Promega, Madison, WI, USA), 0,1 mM de cada primer, 100 ng de DNA y 1,25 U de GoTaq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). El volumen final de la reacción fue de 50 µL. La reacción se llevó a cabo en termociclador (My Cyclyer, BioRad, Hercules, CA). Las condiciones de ciclado se detallan en el Anexo 2 según Gardes y Bruns (1993) para el género *Botrytis*, Braun et al., (2003) para *Cladosporium*, Kim et al., (2007) para *Penicillium*, Pryor y Gilbertson (2000) para *Alternaria* y Kwasna et al., (2006) para *Mucor*. Los productos de la PCR fueron visualizados y separados en un gel de agarosa 1 % (p/v) con GelRed™ (Bioitum Inc.) como intercalante y las bandas fueron visualizadas bajo luz UV. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados en un secuenciador automático (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) en la empresa Macrogen (Seúl, Corea).

Las secuencias se identificaron consultando la base de datos GenBank utilizando la opción de búsqueda BLASTn con parámetros por defecto (Altschul et al., 1997). Similitudes por encima del 98% fueron tratados a nivel de especie. Respecto a la identificación se especifica el nivel de corte en cuanto a similitud general (98%) sobre un 90% de cobertura.

#### 4.3 Análisis filogenético

Para similitudes por debajo del 98% se realizó un árbol filogenético. Las relaciones filogenéticas fueron inferidas con la máxima verosimilitud (ML). Los mejores modelos de ajuste de la

evolución fueron K80 (ITS dataset) y TRN + G ( $\beta$ -tubulina dataset), determinado en jModelTest (Posada 2008). Se realizó análisis de máxima verosimilitud con bootstrapping no paramétrico aplicado en RAxML 7.2.8 (Stamatakis 2014), utilizando los parámetros por defecto, ejecutado en CIPRES (cyber infrastructure for phylogenetic research) Science Gateway 3.1 (Miller et al., 2010) con 1.000 repeticiones.

#### 5. Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas *in vitro*

Se evaluó la sensibilidad a fungicidas (inhibición del crecimiento) de los aislamientos de hongos que resultaron virulentos, mediante ensayos de crecimiento en medio APD con Dicarboximida (Iprodione ROVRAL® 50 WP). Se prepararon suspensiones de mitosporas ( $10^6$  mitosporas/mL) de las cuales se sembraron 10  $\mu$ L en placas de APD modificado con 2000, 1000 (dosis comercial), 500, 250 o 125 ppm de Iprodione. Las placas se incubaron 72 h a 22°C en oscuridad. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la concentración más baja de fungicida que inhibe el crecimiento de hongos (Pianzola et al., 2004). Se consideraron sensibles a aquellos aislamientos que no fueron capaces de crecer en la dosis comercial o menores. Se realizaron tres repeticiones por dosis de fungicida para cada hongo.

#### 6. Estimación de la concentración infectiva mínima (CIM)

Se realizaron ensayos de CIM siguiendo las metodologías de Biggs (1999) y Oliveira et al., (2014). La concentración mínima de mitosporas capaz de producir el 100% de incidencia en las heridas de las frutas se evaluó sobre los patógenos más virulentos y menos sensibles al fungicida, inoculando cerezas, frambuesas y zarzamoras con 10  $\mu$ L de suspensiones  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  mitosporas/mL en heridas artificiales. Como control negativo se inocularon frutas con agua destilada estéril. Las frutas se colocaron en bandejas plásticas dentro de bolsas de polietileno y se conservaron en condiciones de almacenamiento (30 días a 0°C, seguidos por 3 días a 22°C), y en condiciones de comercialización (7 días a 22°C) en cámaras frigoríficas y climatizadas adecuadas. Cada ensayo se realizó por triplicado con diez frutos por repetición.

#### 7. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de los ensayos de virulencia y CIM se sometieron a análisis estadísticos utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con comparación de pares, por no cumplir

con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Infostat versión 2019p.

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento de patógenos a partir de frutas enfermas

De un total de 1080 frutas analizadas, 648 cerezas, 216 frambuesas y 216 zarzamoras, 34 frutos de cerezas, siete de frambuesas y dos de zarzamoras, y mostraron síntomas de enfermedad (Figura 11). Los 43 aislamientos de las diferentes especies de patógenos obtenidos fueron utilizados para los bioensayos y depositados en el cepario del CIEFAP (Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico).

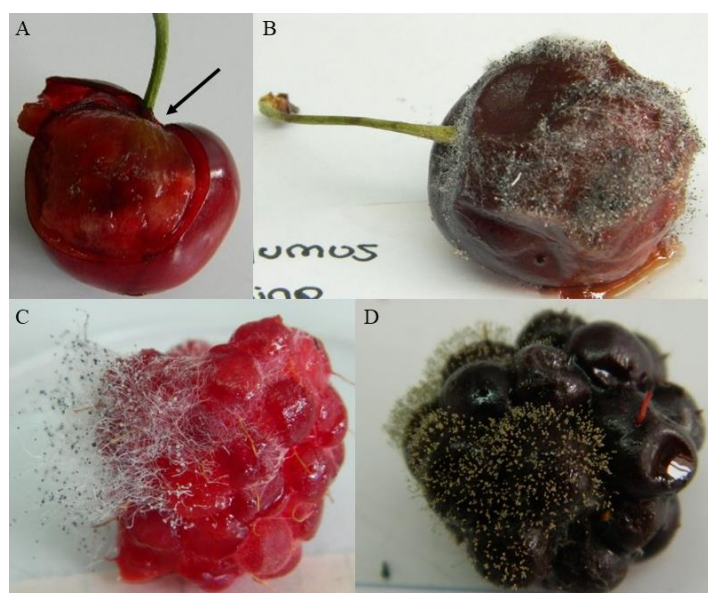


Figura 11. Frutas con síntomas de pudrición. A) Tejido afectado (flecha), B) Cereza enferma, C) Frambuesa enferma, D) Zarzamora enferma.

### 2. Evaluación de la virulencia de los hongos aislados en cerezas

El ensayo de virulencia mostró que, de los 43 aislamientos realizados a partir de las diferentes frutas enfermas, 31 fueron capaces de crecer en la fruta (mostrados en Tabla 3). De ellos el 29% presentó valores de virulencia mayores al 50% tanto a temperatura de almacenamiento (0°C) como a temperatura de comercialización (22°C).

Del total de hongos aislados, el 58.06% de los aislamientos son provenientes del Paralelo 42°, el 22.5% de Gaiman el 19.35% de Trevelin (Tabla 3).

Ocho de los aislamientos más virulentos corresponden a *Mucor piriformis* y uno a *Penicillium crustosum*. Los efectos causados por estos hongos se observan en la Figura 12.

El Paralelo 42° presentó la mayor diversidad de especies (de las 17 especies identificadas 9 estuvieron presentes en este sitio) y es el sitio del cual provienen el 88.8% de los aislamientos cuyas enfermedades mostraron mayor virulencia. El 11.2% restante corresponde a Trevelin. La virulencia de los aislamientos provenientes de Gaiman no superó el 9% (Tabla 3).

El 44.45% de los aislamientos más virulentos provienen del tipo de producción convencional, mientras que el 55.55% de la producción orgánica. El tiempo de almacenamiento a 0°C para el aislamiento de los hongos más virulentos varió entre 1 y 30 días (Tabla 3).

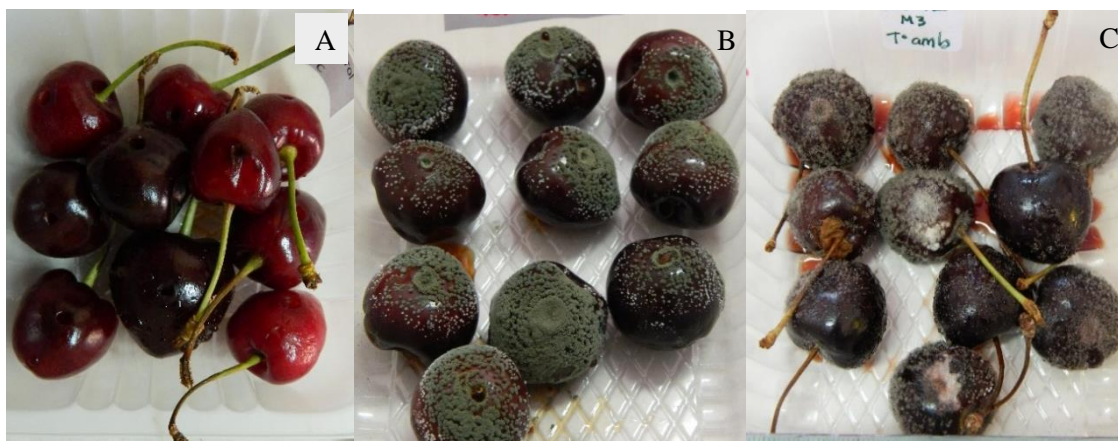


Figura 12. A) Cerezas control (sin inocular); B) cerezas inoculadas con *P. crustosum*; C) cerezas inoculadas con *Mucor piriformis*.

Los hongos que no mostraron crecimiento sobre la fruta corresponden a aislamientos de *Chaetomium funicula*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium acuminatum*, *Leucostoma personii*, *Trichoderma citriviridae*, *Ulocladium chartarum* y *U. consortiale* (estos no se muestran en la Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación de la virulencia de los hongos aislados de diferentes frutas finas sobre cerezas en diferentes condiciones

Especies identificadas ccCIEFAP	E value	Indentidad	N° de acceso Gen Bank	Fruta	Sitio de origen	Tipo de Producción	Tiempo a 0°C (días)	Virulencia de la enfermedad (%)	
								22°C **	0°C #
<i>Alternaria alternata</i> 505	0.0	100	KP985749	Cereza	Gaiman	Convencional	1	0.3	0
<i>Alternaria alternata</i> 509	0.0	100	KP985749	Cereza	Gaiman	Convencional	1	0.35	0
<i>Alternaria alternata</i> 510	0.0	100	KP985749	Cereza	Gaiman	Convencional	1	1.16	0
<i>Alternaria alternata</i> 513	0.0	100	KP985749	Cereza	Gaiman	Convencional	1	1.33	0
<i>Alternaria arborescens</i> 486	0.0	100	KM246282	Cereza	Trevelin	Convencional	1	0.05	0
<i>Alternaria arborescens</i> 512	0.0	100	KM979953	Cereza	Gaiman	Convencional	1	1.4	0
<i>Alternaria arborescens</i> 526	0.0	100	KM979953	Cereza	Gaiman	Convencional	30	8.64	4,34
<i>Alternaria rosae</i> 495	0.0	98	KC797648	Cereza	P42	Orgánica	1	1.8	5,08
<i>Botrytis cinerea</i> 504	0.0	100	KR094468	Zarzamora	P42	Asilvestrada	6	17.01	15
<i>Botrytis cinerea</i> 528	0.0	99	KF859918	Cereza	P42	Orgánica	60	14.84	8.61
<i>Cladosporium macrocarpum</i> 499	0.0	100	NR_119657	Cereza	P42	Convencional	30	7.35	3.77
<i>Cladosporium macrocarpum</i> 531	0.0	100	LN834379	Cereza	Trevelin	Convencional	60	3.7	9.32
<i>Mucor circinelloides</i> 482	0.0	99	NR_126116	Cereza	P42	Orgánica	30	8.35	1.2
<i>Mucor fragilis</i> 502	0.0	99	GU566275	Zarzamora	P42	Asilvestrada	6	6.90	35.66
<b><i>Mucor piriformis</i> 484 *</b>	<b>0.0</b>	<b>97</b>	<b>JN206033</b>	<b>Cereza</b>	<b>Trevelin</b>	<b>Convencional</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>75</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 487*</b>	<b>0.0</b>	<b>96</b>	<b>JN206033</b>	<b>Frambuesa</b>	<b>P42</b>	<b>Orgánica</b>	<b>6</b>	<b>97.85</b>	<b>100</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 489*</b>	<b>0.0</b>	<b>96</b>	<b>JN206033</b>	<b>Frambuesa</b>	<b>P42</b>	<b>Orgánica</b>	<b>6</b>	<b>94.15</b>	<b>50</b>
<i>Mucor piriformis</i> 490*	0.0	96	JN206033	Frambuesa	P42	Orgánica	6	0.6	0
<b><i>Mucor piriformis</i> 492</b>	<b>0.0</b>	<b>98</b>	<b>JN206033</b>	<b>Cereza</b>	<b>P42</b>	<b>Convencional</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 493</b>	<b>0.0</b>	<b>98</b>	<b>JN206033</b>	<b>Cereza</b>	<b>P42</b>	<b>Orgánica</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<i>Mucor piriformis</i> 494		<b>98</b>	<b>JN206033</b>	Cereza	<b>P42</b>	<b>Convencional</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>95</b>
<i>Mucor piriformis</i> 500	<b>0.0</b>	<b>98</b>	<b>JN206033</b>	Cereza	<b>P42</b>	<b>Convencional</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<i>Mucor piriformis</i> 501	<b>0.0</b>	<b>98</b>	<b>JN206033</b>	Cereza	<b>P42</b>	<b>Orgánica</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<i>Penicillium commune</i> 503	3e-178	99	KT313385	Cereza	Gaiman	Convencional	60	1.54	0
<i>Penicillium commune</i> 508	2e-164	99	JQ217372	Cereza	Trevelin	Convencional	60	1.65	5
<i>Penicillium crustosum</i> 479	0.0	99	AY674351	Frambuesa	P42	Orgánica	6	9.35	1.03
<i>Penicillium crustosum</i> 480	0.0	99	AY674351	Frambuesa	P42	Orgánica	6	10.13	0
<i>Penicillium crustosum</i> 483	0.0	99	AY674351	Cereza	Trevelin	Convencional	1	2.55	0
<i>Penicillium crustosum</i> 491	<b>0.0</b>	<b>99</b>	<b>AY674352</b>	<b>Cereza</b>	<b>P42</b>	<b>Orgánica</b>	<b>30</b>	<b>62.9</b>	<b>30.65</b>
<i>Penicillium crustosum</i> 496	0.0	99	AY674351	Cereza	Trevelin	Convencional	1	14.7	1.18
<i>Penicillium simplicissimum</i> 485	0.0	99	GU981626	Frambuesa	P42	Orgánica	6	42.9	0.61

Virulencia de la enfermedad =  $[(d \times F)/T_n \times D] \times 100$ , donde D = 20 mm . Los números marcados en negrita indican los aislamientos más virulentos en cada temperatura evaluada. \* Ver árbol filogenético (figura 5). \*\* Condiciones de comercialización [7 días a 22°C] # Condiciones de almacenamiento [30 d a 0°C+ 3 d a 22°C]. P42: Paralelo 42°.



### 3. Evaluación de la virulencia de los hongos aislados en frambuesas y zarzamoras

Para evaluar los patógenos aislados en frambuesas y zarzamoras se utilizó como parámetro la incidencia (Tabla 4). No se muestran los hongos para los cuales la incidencia fue igual a cero en ambas temperaturas.

Tal como ocurrió en las cerezas, las especies que mostraron máxima incidencia en frambuesas fueron ocho aislamientos de *M. piriformis*, tanto a temperatura de almacenamiento como de comercialización, y tres aislamientos de *P. crustosum*, uno a temperatura almacenamiento y dos a temperatura de comercialización, y un aislamiento de *B. cinerea* a temperatura almacenamiento (Tabla 4, Figura 13). En zarzamoras, seis aislamientos de *M. piriformis* produjeron la máxima incidencia a temperatura de comercialización, mientras que ocho lo hicieron a temperatura de almacenamiento. Sólo un aislamiento de *P. crustosum* provocó la incidencia máxima a temperatura de almacenamiento (Tabla 4, Figura 13).

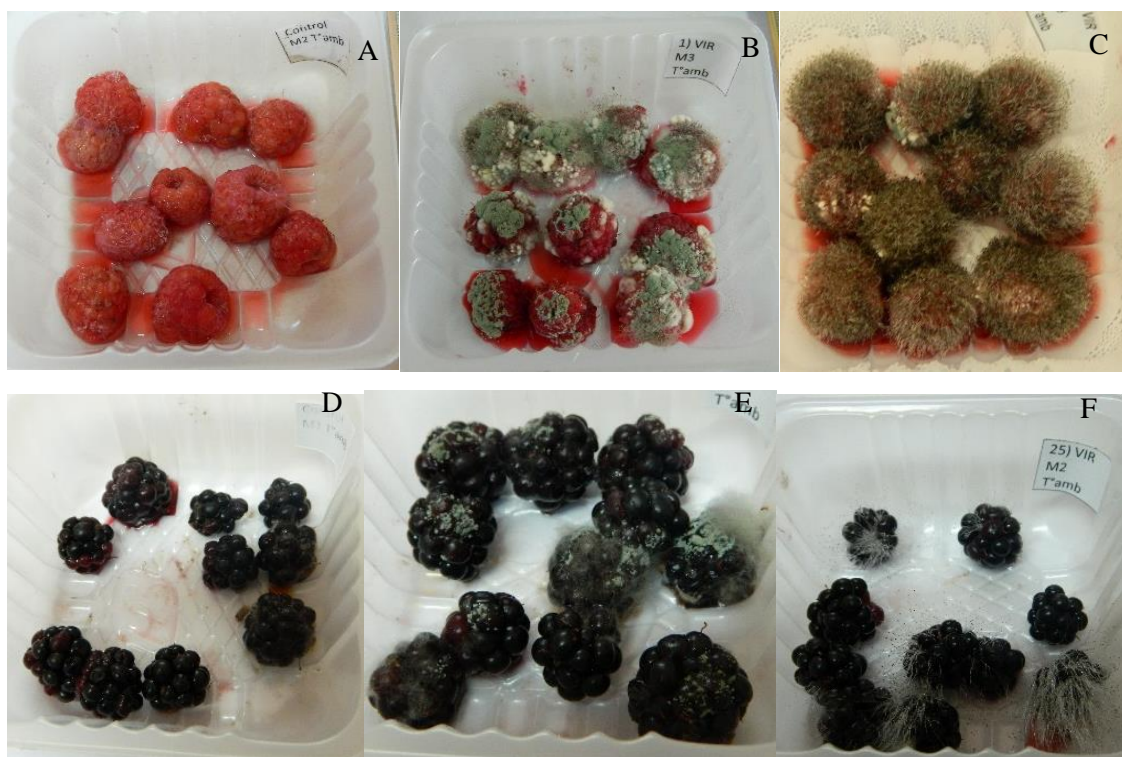


Figura 13. A) Frambuesas control (sin inocular); B) frambuesas inoculadas con *P. crustosum*; C) frambuesas inoculadas con *M. piriformis*; D) zarzamoras control (sin inocular); E) zarzamoras inoculadas con *P. crustosum*; F) zarzamoras inoculadas con *M. piriformis*.

Tabla 4. Evaluación de la incidencia de hongos sobre frambuesas y zarzamoras a diferentes temperaturas de conservación.

ccCIEFAP	Frambuesas		Zarzamoras	
	22°C *	0°C#	22°C*	0°C#
<b><i>Botrytis cinerea</i> 504</b>	<b>100 C</b>	56.67 ab	96.97 CD	60 ab
<i>Botrytis cinerea</i> 528	46.67 AB	46.66 ab	46.67 ABC	53.33 ab
<i>Mucor fragilis</i> 502	43.33 AB	16.66 a	33.33 AB	3.33 a
<b><i>Mucor piriformis</i> 484 *</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	<b>100 D</b>	<b>100 b</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 487 *</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	<b>93.33BCD</b>	<b>100 b</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 489*</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	<b>100 D</b>	<b>100 b</b>
<i>Mucor piriformis</i> 490*	20 AB	0 a	0 A	0 a
<b><i>Mucor piriformis</i> 492</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	<b>100 D</b>	<b>100 b</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 493</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	<b>100 D</b>	<b>100 b</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 494</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	<b>100 D</b>	<b>100 b</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 500</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	86.67 ABCD	<b>100 b</b>
<b><i>Mucor piriformis</i> 501</b>	<b>100 C</b>	<b>100 b</b>	<b>100 D</b>	<b>100 b</b>
<b><i>Penicillium crustosum</i> 491</b>	<b>100 C</b>	70 ab	80 ABCD	73.33 ab
<b><i>Penicillium crustosum</i> 479</b>	<b>100 C</b>	20 a	96 CD	10 a
<b><i>Penicillium crustosum</i> 480</b>	13.83 AB	<b>100 b</b>	60 ABCD	<b>100 b</b>
<i>Penicillium simplicissimum</i> 485	90 BC	63.33 ab	26.60 A	3.33 a
Control	0 A	0 a	0 A	0 a

Porcentajes de incidencia de cada patógeno analizados para cada temperatura con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ( $p > 0.05$ ) entre columnas. Los análisis estadísticos se realizaron por temperatura no entre ellas (letras en mayúsculas indican los análisis para 22°C y en minúscula para 0°C). Letras diferentes indican diferencias significativas. Los números marcados en negrita indican los aislamientos más virulentos en cada temperatura evaluada. \* Ver árbol filogenético (figura 5). \*\* Condiciones de comercialización [7 días a 22°C] # Condiciones de almacenamiento [30 d a 0°C+ 3 d a 22°C]

#### 4. Identificación de hongos aislados

La identificación de los hongos se realizó para los aislamientos que causaron algún grado de enfermedad, los 12 aislamientos que no causaron pudrición no fueron identificados. Se

identificaron 31 aislamientos, 27 de ellos fueron identificados a nivel de especie (Tabla 3). Para los hongos que presentaron mayor grado de enfermedad se un análisis filogenético, determinándose entonces con mayor exactitud que los aislamientos de *Mucor* corresponden a *Mucor piriformis* (Figura 14A) y los de *Penicillium* en *Berries* a *P. crustosum* (Figura 14B).

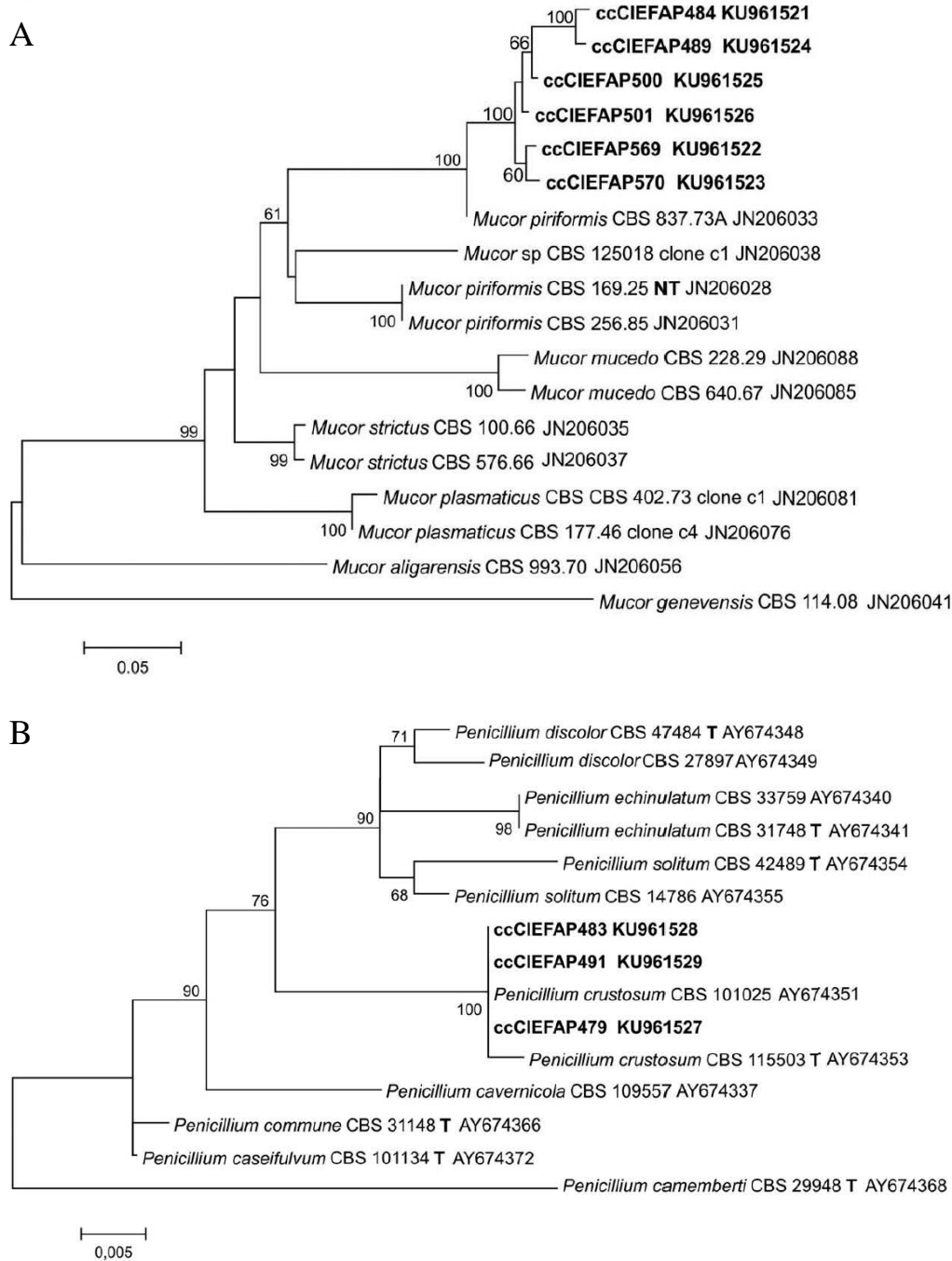


Figura 14. A. Árbol de máxima verosimilitud de *Mucor piriformis* a partir de secuencias de ITS. B. Árbol de máxima verosimilitud de *Penicillium crustosum* a partir de  $\beta$ -tub. Los valores Bootstrap resultantes de 1000 repeticiones se muestran en los puntos de ramificación.

## 5. Determinación de la sensibilidad/resistencia a fungicidas *in vitro*

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del fungicida fue evaluada *in vitro* a las 72 hs de incubación a 20°C. Los aislamientos presentaron variabilidad en el comportamiento frente al fungicida y las concentraciones evaluadas.

Se evaluaron doce aislamientos (los más virulentos), nueve de ellos mostraron mayor virulencia de la enfermedad en los tres tipos de fruta, se sumaron, además, tres aislamientos que provocaron el 100% de incidencia en frambuesas y zarzamoras.

De estos 12 aislamientos, 9 fueron no sensibles a la dosis comercial de Iprodione (1000 ppm) de los cuales 8 crecieron incluso en una dosis de fungicida que duplica a la dosis comercial (Tabla 5).

Los aislamientos no sensibles (capaces de crecer a la dosis comercial o mayor) fueron *M. piriformis* ccCIEFAP487, ccCIEFAP489, ccCIEFAP492, ccCIEFAP493, ccCIEFAP500 y ccCIEFAP501 (Figura 15), y *P. crustosum*, ccCIEFAP479, ccCIEFAP480 y ccCIEFAP491, todos provenientes del Paralelo 42°.

Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima de Iprodione para los aislamientos más virulentos

Especies	ccCIEFAP	CMI ppm
		Iprodione
<i>Botrytis cinerea</i>	504	500
<i>Mucor piriformis</i>	484	500
<i>Mucor piriformis</i>	487	>2000
<i>Mucor piriformis</i>	489	>1000
<i>Mucor piriformis</i>	492	>2000
<i>Mucor piriformis</i>	493	>2000
<i>Mucor piriformis</i>	494	<125
<i>Mucor piriformis</i>	500	>2000
<i>Mucor piriformis</i>	501	>2000
<i>Penicillium crustosum</i>	479	>2000
<i>Penicillium crustosum</i>	480	>2000
<i>Penicillium crustosum</i>	491	>2000

CMI: Concentración mínima inhibitoria. ppm: partes por millón

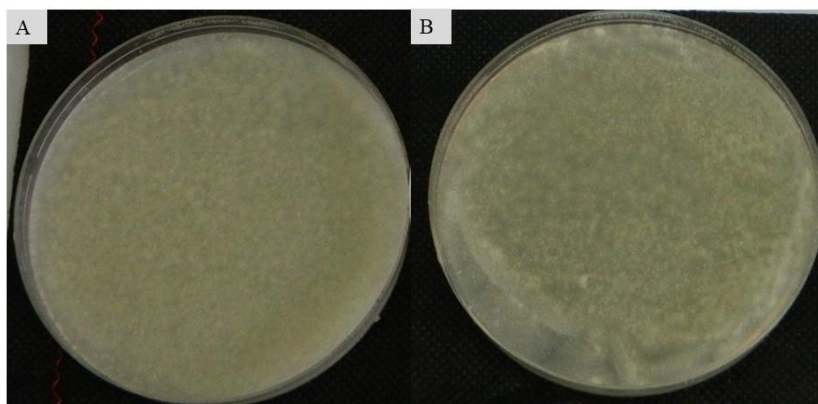


Figura 15. *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 creciendo en medio de cultivo APD modificado con Iprodione en concentraciones de A) 2000 ppm y B) 1000 ppm

#### 6. Estimación de la concentración mínima infectiva (CIM)

La evaluación de la CIM se realizó para los aislamientos de hongos que provocaron mayor virulencia en cerezas, o que provocaron 100% de incidencia, en frambuesas y zarzamoras, y que no resultaron sensibles al fungicida (Tabla 6). Para los tres tipos de frutas, los aislamientos de *M. piriformis* ccCIEFAP489, 492, 493, 501 mostraron tener una concentración infectiva mínima más baja. De los tres aislamientos de *Penicillium crustosum*, el aislamiento *P. crustosum* ccCIEFAP491 fue el de menor CIM para cerezas y frambuesas (Figura 16).

Tabla 6. Concentración infectiva mínima de los aislamientos patógenos de cereza, frambuesa y zarzamora, no sensibles a fungicida, a temperaturas de comercialización y almacenamiento.

ccCIEFAP	CIM					
	Cerezas		Frambuesas		Zarzamoras	
	22°C	0°C	22°C	0°C	22°C	0°C
<i>Mucor piriformis</i> 487	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>Mucor piriformis</i> 489	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>Mucor piriformis</i> 492	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>Mucor piriformis</i> 493	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>Mucor piriformis</i> 500	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>

<i>Mucor piriformis</i> 501	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
<i>Penicillium crustosum</i> 491	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Penicillium crustosum</i> 479	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Penicillium crustosum</i> 480	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>

22°C: temperatura de comercialización, 0°C: temperatura de almacenamiento.

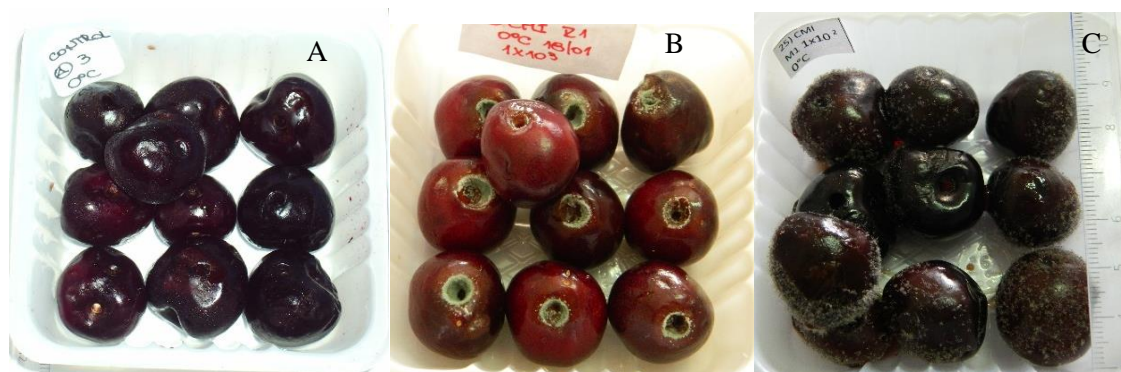


Figura 16. A) Cerezas control (inoculadas con agua destilada estéril); B) CIM de *P. crustosum* (10<sup>3</sup>); C) CIM de *M. piriformis* (10<sup>2</sup>).

Se seleccionaron dos aislamientos virulentos comunes a los tres tipos de frutas, *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491, para hacer la evaluación de los potenciales agentes de biocontrol, por tener alta virulencia, por no presentar sensibilidad al fungicida y una CIM baja.

## DISCUSIÓN

Entre las especies de hongos patógenos, identificadas y caracterizadas en este estudio, las más importantes en términos del deterioro para las frutas finas evaluadas, fueron *M. piriformis* y *P. crustosum*. Ambas especies resultaron patógenas tanto en condiciones ambientales como en condiciones de almacenamiento. Estas especies han sido anteriormente descritas como patógenos para frutas de pepita y frutas de carozo (Michailides y Spotts 1990, Sholberg y Michailides 1997, Frisvad y Samson 2004, Pitt y Hocking 2009, Madrid y Beaudry 2020, Palou y Smilanick 2020). Las dos especies se presentaron en los sitios de muestreo de Trevelin y Paralelo 42° en cerezas y frambuesas, tanto en condiciones orgánicas y convencionales. Esto indicaría que el diferente clima, tipo de fruta y manejo no influyó en la presencia/ausencia de las dos especies de patógenos.

Hasta el momento no existen evidencias que unifiquen criterios del efecto del manejo sobre la diversidad fúngica. Estudios realizados sobre vides y manzanas bajo tratamiento orgánico y convencional han mostrado que la comunidad fúngica puede ser influenciada por el manejo; mientras, por el contrario, para cítricos en Portugal se observó que el sitio de origen influiría más que el tipo de producción (Nunes et al., 2008, Schmid et al., 2011, Abdelfattah et al., 2016).

Las cerezas, frambuesas y zarzamoras deben ser conservadas a 0°C para extender su vida útil en los mercados. Esta temperatura también inhibe el crecimiento de muchos hongos y bacterias que causan podredumbres poscosecha. No obstante, nuestros resultados muestran que, en cerezas, ocho aislamientos (18.6%) mostraron una virulencia mayor al 50%, tanto en condiciones de temperatura ambiente como a temperatura de conservación. Para la mayoría de los aislamientos, que mostraron virulencia por debajo del 50% a temperatura de comercialización, la virulencia se redujo aún más a temperatura de almacenamiento. Por otro lado, *Mucor piriformis* ccCIEFAP487, 492, 493, 500 y 501 presentaron virulencia a 0°C igual o mayor que a temperatura ambiente. Estos resultados indican que el tratamiento de frío aplicado para la conservación de la fruta no resulta efectivo sobre algunos aislamientos de patógenos, por lo tanto, cuando las condiciones de temperatura sean favorables la calidad de la fruta estará muy afectada al momento de la comercialización. *M. piriformis* puede crecer y producir infección a 0°C tan rápido como a 22°C, esto concuerda con otros estudios de esta especie sobre diferentes tipos de frutas alrededor del mundo (Smith 1979, Michailides y Spotts 1990). *M. piriformis* puede crecer y esporular a 0 – 1°C, que es la temperatura típica de conservación de la fruta, sin embargo, no puede tolerar altas temperaturas (máxima temperatura 27°C) (Guo et al., 1999). Spotts y Cervantes (1986) observaron que la susceptibilidad de la fruta a *M. piriformis* depende también de la madurez de la misma, esto podría influir en las cerezas ya que permanecen entre 30 y 60 días en cámaras de frío hasta su comercialización. Varias especies de *Mucor* han sido reportadas como agentes causales de deterioro muy común en distintas frutas (Spotts et al., 1998, Mari et al., 2000, Palou et al., 2009), ya que no se ven afectadas por la mayoría de los fungicidas y el incremento del uso de los mismos para controlar otros patógenos ha reducido la competencia para *Mucor* spp. Recientemente, las enfermedades causadas por *Mucor* spp. se han convertido en foco de interés en otras partes del mundo por las pérdidas en fruta almacenada que han causado en los últimos años (Nguyen 2015, Saito et al., 2016), concordando con nuestros resultados para fruta fina. Børve y Stensvand (2019) reportaron que el agua clorada del *hydrocooling* puede ser contaminada con mitosporas de *M. piriformis* luego de lavar fruta con inóculo del campo, y que su reutilización puede causar la infección de hasta el 80% de cerezas almacenadas. Como medida de manejo frente

a este patógeno, y extensivo a otros, el uso de bolsas plásticas y cajas ayuda a contener y prevenir la dispersión secundaria.

En este trabajo demostramos por primera vez la virulencia de *P. crustosum* en fruta fina, y también indicamos a través de los ensayos de resistencia a fungicidas, CIM y variación de la temperatura que *P. crustosum* es un patógeno emergente para la industria de fruta fina en Argentina, tal como ocurre en manzanas y peras en condiciones de almacenamiento en otras regiones del mundo (Louw y Korsten 2014, Vico et al., 2014). *Penicillium crustosum* ha sido aislado como componente mayoritario de la microbiota presente en glaciares del Ártico (Sonjak et al., 2005) por lo que se trata de una especie cosmopolita con habilidad para crecer en condiciones extremas. La presencia de *Penicillium* spp. en los centros de acopio de fruta fina en Patagonia Sur fue relativamente alta en comparación con reportes previos de otras regiones (Nome et al., 2012, Colodner y Candan 2011) lo que probablemente indique que el tratamiento con fungicida no reduzca las poblaciones de este patógeno provenientes de la precosecha. Sin embargo, es de destacar que hubo diferencias entre aislamientos de esta especie, destacándose *P. crustosum* ccCIEFAP491 (aislado de cereza orgánica) como más virulento y capaz de generar pudrición a la CIM más baja en cerezas. Incluso fue capaz de generar una virulencia de la enfermedad 29 veces mayor que los aislamientos de *P. crustosum* ccCIEFAP479 (aislado de frambuesa orgánica) y ccCIEFAP496 (aislado de cereza convencional) a temperatura de conservación.

Las especies de los géneros *Mucor* y *Penicillium* fueron aisladas en la comarca del Paralelo 42° y Trevelin donde existe un clima templado y húmedo (Cabrera 1976) que favorece el desarrollo de estos mohos (Pitt 2002, Richardson 2009). Similares resultados fueron obtenidos por Børve et al., (2000) para *M. piriformis* en cerezas de Noruega donde el clima húmedo durante la temporada de crecimiento de la fruta favoreció el desarrollo de este patógeno. En Gaiman, donde el clima es seco (Chiozza y Figueira 1982), el género *Alternaria* fue más frecuente, en concordancia con la estructura morfológica que tienen estos taxones, con esporas grandes, de pared gruesa y fuertemente melanizadas que les confiere mayor tolerancia a climas más calurosos y secos (Sterflinger et al., 2012). Las zonas cordilleranas (Trevelin y Paralelo 42°) presentaron el 40% de las especies fúngicas en común, las cuales no se observaron para la zona Este de producción de la Patagonia (Gaiman). Estos resultados indicarían que, el sitio de origen influiría con las diferencias observadas en la distribución de las diferentes especies.

Los aislamientos de los géneros mayoritarios, *Mucor* y *Penicillium*, resultaron ser también los de menor sensibilidad al fungicida Iprodione. En nuestro estudio el 75% de los aislamientos



causantes de la mayor virulencia y/o de la máxima incidencia en la fruta mostraron ser resistentes al fungicida Iprodione a dosis comerciales o mayores (Tabla 1). Este fungicida, presenta eficacia reportada para *M. fructicola*, *Penicillium* spp., *A. alternata*, *Rhizopus* sp. y *B. cinerea* (Eckert y Ogawa 1988, Hong et al., 1998, Spotts et al., 1998). Colodner y Candan (2011) reportaron la aparición de pudrición causada por *Penicillium* sp. y *Alternaria* sp. en cerezas de Río Negro y Neuquén, tratadas con soluciones de Iprodione y almacenadas a 0°C durante 30 días. Las especies del género *Penicillium* son consideradas patógenos de riesgo alto por desarrollar resistencia a fungicidas (FRAC 2010). Los factores que contribuyen a esta alta resistencia incluyen su corto ciclo de vida y la esporulación abundante en las superficies afectadas de los hospedantes, lo que incrementa la posibilidad de mutaciones y su diseminación (Kendall y Hollomon 1998). El desarrollo de resistencia a fungicidas ha sido reportado en *Penicillium expansum* de manzanas y peras (Karaoglanidis et al., 2011, Lutz et al., 2012) pero para *P. crustosum* no hay registros en cerezas y frambuesas, desde donde hemos obtenido aislamientos altamente resistentes en condiciones *in vitro*. El Iprodione, al igual que muchos otros fungicidas, no es particularmente efectivo sobre la amplia variedad de patógenos aislados en este muestreo, sólo resultó efectivo para tres aislamientos (*M. piriformis* ccCIEFAP484, 494 y *B. cinerea* ccCIEFAP504) de los 12 aislamientos probados.

Estos resultados dan indicios de la presencia de poblaciones fúngicas resistentes a los métodos de control utilizados en los centros de acopio y almacenaje de la fruta. Por lo que un monitoreo de los hongos patógenos debería ser una práctica común en estos sitios, con el objetivo de detectar cualquier cambio en la sensibilidad/resistencia de los hongos de manera temprana para poder ajustar estrategias de manejo y control normalmente utilizados (Legard et al., 1997 en Barkai Golan 2001).

La evaluación de la concentración mínima infectiva (CIM) de los aislamientos de mayor virulencia/incidencia, mostró que los que presentan la CIM más baja, en los tres tipos de frutas, son aislamientos de las especies *M. piriformis* y *P. crustosum*. Al comparar la CIM con respecto a la fruta, se observó diferencias entre *Berries* y cerezas (Tabla 4). En frambuesas y zarzamoras la evaluación de la CIM siguió la tendencia esperada, donde suspensiones con mayores concentraciones de esporas conducen a una mayor tasa de infección y formación de lesión, tal cual lo registrado por Spotts (1986) para peras. Mientras que, en cerezas no se evidenciaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de esporas inoculadas y la incidencia

de *Mucor* y *Penicillium*, ya que la misma en todos los casos fue superior al 80%. Los aislamientos de *M. piriformis* requieren menos inóculo para lograr la CIM a 0°C, lo que demuestra que es un patógeno muy bien adaptado al frío. Nuestros resultados sugieren que la infección no siempre es regida por la densidad de mitosporas inoculados sobre la fruta y ni por la temperatura a la cual se mantiene la fruta. Podría deberse más bien al nivel de resistencia del hospedador, a través de la síntesis de proteínas tales como  $\beta$ -1.3-Glucanasa, fenilalanina amonio-liasa (PAL) y peroxidasa (POD) (Yao y Tian 2005b), o la preferencia del patógeno por la fruta.

Los resultados de este estudio aportan nuevos datos sobre las comunidades de hongos asociados a fruta fina, teniendo en cuenta su virulencia, identidad y asociando la resistencia a fungicidas, diferencias agroecológicas y tipo de producción de las diferentes áreas de las cuales provienen los aislamientos.

Los patógenos de mayor virulencia en la fruta fina de esta región no resultaron ser los patógenos que provocan mayores daños y pérdidas en poscosecha en estas frutas en otras partes del mundo, tales como *Monilinia* spp, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* (Karabulut et al., 2001, Romanazzi 2010, Tezotto-Uliana et al., 2014). Esto podría deberse a deficientes prácticas culturales en los campos productores de frutas y a las características climáticas de la zona (mencionadas anteriormente) que podrían favorecer más a *M. piriformis* y *P. crustosum* que a otros patógenos. Tanto *Mucor piriformis* como *Penicillium crustosum* sobreviven y crecen en el suelo a bajas temperaturas (Michailides y Spotts 1986, DeVries et al., 2002, Sonjak et al., 2006). Estudios han demostrado que *M. piriformis* sobrevive en los 5 cm superficiales del suelo como esporangiosporas y que las densidades de población son más altas 2 meses después de la cosecha debido a la colonización de los frutos que quedan en el suelo luego de la cosecha y son colonizados por *M. piriformis* (Michailides y Spotts 1986). Además, Mari et al. (2000) correlaciona positivamente la viabilidad de las esporangiosporas con las lluvias y humedad el suelo, incluso durante un verano seco, cuando muchos sistemas de riego están en funcionamiento, la humedad del suelo puede alcanzar niveles muy favorables para la viabilidad y desarrollo de *M. piriformis*. Las condiciones ambientales en las zonas de producción en Patagonia, como también dentro de las cámaras de conservación, podrían entonces ser favorables para que *P. crustosum* y *M. piriformis* se desarrollen en las frutas durante la poscosecha.

Los aislamientos *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491, fueron seleccionados para los ensayos de biocontrol que se presentan más adelante en esta Tesis.

# **CAPITULO II**

## **AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACION DE LEVADURAS**

## INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de microorganismos interactúan entre sí y con la planta. Estas interacciones pueden ser beneficiosas para la planta, neutras o perjudiciales. Como se trató en el Capítulo anterior, los patógenos interactúan negativamente con la planta produciendo enfermedad. Existen otros microorganismos que interactúan en forma positiva como, por ejemplo, cuando estos microorganismos establecen relaciones de antagonismo con los patógenos. A la posibilidad de utilizar las interacciones antagónicas para eliminar o impedir el desarrollo de patógenos que puedan atacar a la planta y desarrollar la enfermedad se lo ha denominado control biológico (Mondino y Vero 2006).

En el control biológico de enfermedades de poscosecha de frutas, el microbioma natural es la principal fuente para la selección de las agentes de control biológico (ACB) (Droby et al., 2009, Liu et al., 2013, Spadaro y Droby 2016). Los principales antagonistas seleccionados incluyen bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Wills y Golding 2016). Hasta la fecha, un estrecho rango de géneros de levaduras ha sido aislado como ACBs de enfermedades de poscosecha, tales como *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* y *Rhodotorula* (Liu et al., 2013, Droby et al., 2016, Spadaro y Droby 2016). *Aureobasidium pullulans* es conocido como un microorganismo *yeast-like*. Se trata de un hongo dimórfico, es decir que puede desarrollarse como hongo formando hifas o como levadura dependiendo de las condiciones ambientales, (Slepecky y Starmer 2009). En esta Tesis se considerará su estudio en conjunto con las levaduras.

El aislamiento, la identificación de los organismos y las condiciones para su crecimiento óptimo constituyen la base del screening de ACB. El criterio utilizado en estos pasos tendrá un gran impacto en las especies de antagonistas aisladas y su modo de acción. Algunas de las estrategias que han sido utilizadas tradicionalmente para la búsqueda y selección de antagonistas consisten en el aislamiento de los potenciales ACB a partir de aguas de lavado de frutas recogidas en los huertos, que luego son sembradas en un medio de cultivo artificial e incubadas a temperatura ambiente; seguido por el *screening in vitro* de actividades antagónicas de interés de los potenciales antagonistas y ensayos *in situ* de actividad antagónica en las heridas de frutas inoculadas con los patógenos que se pretenden controlar (Lutz 2015). El mayor problema de estas estrategias es que se llevan a cabo a temperatura ambiente, lo cual puede resultar una limitante, ya que las levaduras antagonistas deberán ser capaces de sobrevivir y colonizar eficientemente las heridas de la fruta a bajas temperaturas (condición de almacenamiento de la fruta en poscosecha) (Lima et al., 1998, Viñas et al., 1998, Zhang et al., 2005, Zhang et al., 2010). En este marco, las estrategias utilizadas

para obtener y evaluar potenciales ACB de poscosecha dependen del agrosistema y deben tener en cuenta: (1) la temperatura de almacenamiento de la fruta en poscosecha (0°C para fruta fina); (2) diferencias intraespecíficas a nivel de cepas de los potenciales antagonistas, debido a que pueden presentar diferentes capacidades para crecer a temperaturas bajas y mecanismos de acción; (3) fruta de origen orgánico y de transición, es decir sin alteración de la microbiota nativa y (4) un antagonista potencial debe ser evaluado usando aislamientos regionales de hongos patógenos de poscosecha (Sangorrin et al., 2014, Lutz 2015).

De acuerdo a estas consideraciones, para la búsqueda de potenciales levaduras antagonistas contra enfermedades fúngicas de poscosecha en el sistema fruta fina de Patagonia, se plantearon la siguiente hipótesis y los siguientes objetivos:

## **HIPÓTESIS**

En la fruta fina almacenada existe una gran diversidad de levaduras adaptadas al frío que pueden crecer a la temperatura conservación de la fruta (0°C)

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar levaduras epifíticas y endofíticas nativas de cerezas, frambuesas y zarzamoras.
- Seleccionar levaduras nativas adaptadas al frío, capaces de crecer a la temperatura de almacenamiento de la fruta (0°C).
- Determinar molecularmente las especies de levaduras aisladas adaptadas al frío.

## **MATERIALES**

### Material vegetal

Los sitios de donde fueron obtenidas las frutas y las variedades utilizadas en los ensayos de este Capítulo fueron detallados en la Sección 1 de Métodos del Capítulo I, Figura 1.

### Medios de cultivo utilizados

Todos los medios de cultivo utilizados se prepararon con agua destilada. Los medios de cultivo a base de jugo de frutas fueron esterilizados por en autoclave por vapor fluente durante 20 min. El medio de cultivo GPY se esterilizó por vapor saturado a presión en autoclave a 120°C y 2 atmósferas durante 20 min.

- Agar jugo de cereza 80% (AJC 80%): agar 20 g/L, jugo de cereza 80% v/v. El jugo de cereza fue extraído de frutas de las variedades Lapins y Bing.
- Agar jugo de frambuesa 70% (AJF 70%): agar 20 g/L, jugo de frambuesa 70% v/v. El jugo de frambuesa fue extraído de frutas de la variedad Autumn bliss.
- Agar jugo de zarzamoras 70% (AJZ 70%): agar 20 g/L, jugo de zarzamora 70% v/v. El jugo de frambuesa fue extraído de frutas asilvestradas.
- Agar, extracto de levadura, glucosa y peptona + rosa de bengala (GPY+RB): agar 20g/L, extracto de levadura 5 g/L; peptona 5 g/L; glucosa 40 g/L + rosa de bengala 30mg/mL (para retrasar el crecimiento de hongos filamentosos).

## MÉTODOS

### 1. Aislamiento de las levaduras

#### 1.1 Levaduras epifíticas en cerezas, frambuesas y zarzamoras

Las levaduras epifíticas se aislaron siguiendo el método de Venturini et al., (2002). Para cada sitio y variedad, se tomaron seis muestras de seis frutas sanas (sin heridas). Cada muestra se sometió a agitación durante 2 h a 160 rpm en 30 mL de agua destilada estéril (Figura 1). Se sembraron 100  $\mu$ L de cada agua de lavado sobre la superficie de placas de Petri con medio de cultivo GPY+RB y paralelamente en AJC 80%, AJF 70% o AJZ 70%, dependiendo si las aguas de lavado provenían de cerezas, frambuesas o zarzamoras. Se sembraron 3 cajas de cada medio (3 de GPY+RB y 3 de AJC 80% o AJF 70% o AJZ 70%) con el agua de lavado de cada muestra, por cada tipo de fruta, por cada variedad (en cerezas), por cada sitio. Las placas de Petri se incubaron a 8°C hasta la observación de colonias (aproximadamente 15 días). Se seleccionó un número representativo de colonias de levaduras de acuerdo a la morfología de la colonia, a la frecuencia de aparición y al tipo y lugar de origen de la fruta. Los aislamientos se repitieron con fruta almacenada después de 1, 30 y 60 días en el caso de las cerezas y después de 1, 3 y 6 días de frambuesas y zarzamoras, siguiendo la misma metodología descrita arriba. Los aislamientos se conservaron a -20°C utilizando glicerol (20% v/v) como agente crioprotector (Robiglio et al., 2011).

## 1.2 Levaduras endofíticas de cerezas

Se tomaron seis muestras de seis frutas sanas para cada variedad de fruta por sitio. De cada fruta se tomaron ocho discos de tejido interno (sin epidermis) de 0.5 cm de diámetro con sacabocado estéril (Figura 17C). Los discos fueron posteriormente sometidos a agitación en 10 mL de agua destilada estéril durante 2 h a 160 rpm. Los criterios para la siembra en placas de Petri, los medios de cultivo, la selección de colonias, las condiciones de incubación y la conservación de los aislamientos fueron los mismos que los mencionados en el apartado anterior (1.1). Se sembraron 3 cajas de cada medio con el agua de lavado de cada muestra, por cada variedad, por cada sitio.

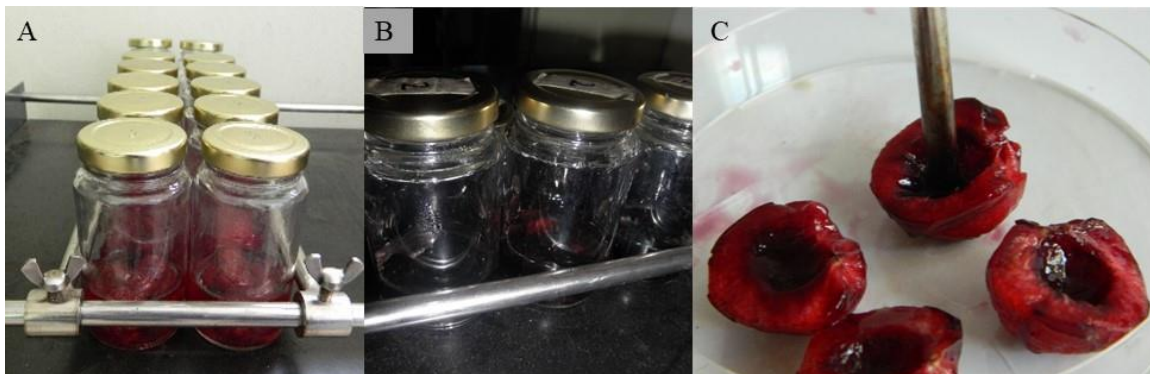


Figura 17. A) Aguas de lavado de cerezas, B) aguas de lavado de zarzamoras, C) técnica utilizada para aislar levaduras endofíticas

## 1.3 Aislamiento selectivo en cereza

Para obtener levaduras antagónicas altamente eficaces se empleó el método de aislamiento selectivo de Lutz et al., (2012). Se tomaron seis muestras de diez frutas sanas para cada variedad por sitio de muestreo, las cuales fueron heridas artificialmente con palillos estériles (3 mm de profundidad y 3 mm de ancho) y conservadas 45 días en condiciones normales de almacenamiento de la fruta (-1/0°C). Transcurrido ese tiempo, se seleccionaron 6 cerezas por muestra que no mostraron síntomas de enfermedad para preparar las aguas de lavado. Para ello se cortaron bloques de tejido de la fruta (de 2 cm de diámetro) que contenían las heridas sanas, se sumergieron en 10 mL de agua destilada estéril y se sometieron a agitación a 160 rpm durante 2 h. Los criterios para la siembra en placas de Petri, los medios de cultivo, la selección de colonias, las condiciones de incubación y la conservación de los aislamientos fueron los mismos que los mencionados en el apartado 1.1. Se sembraron 3 cajas de cada medio con el agua de lavado de cada muestra, por

cada variedad, por cada sitio.

### 1. Selección de levaduras por crecimiento en frío

Las levaduras aisladas fueron seleccionadas de acuerdo a su capacidad de crecimiento a la temperatura de almacenamiento de la fruta (-1/0°C), siguiendo la metodología de Robiglio et al., (2011). El desarrollo de este punto sirvió como base para la selección de las levaduras que se utilizaron para los ensayos de biocontrol. Para cada aislamiento de levaduras, se preparó una suspensión acuosa con  $10^6$  cél/mL ajustada utilizando cámara de Neubauer. Posteriormente, se sembraron 5 µL de cada suspensión (en forma de gota) en placas de Petri con agar GPY y se incubaron a -1/0°C durante diez días. La lectura se realizó por observación de crecimiento según una escala cualitativa (Escala: +/+ : Rápido; +/- : Medio; -/+ : Lento; -/- : No crece). También se sembraron placas para ser colocadas a 22°C, utilizadas como control positivo del crecimiento. El ensayo se realizó por triplicado.

### 3. Identificación molecular de las levaduras

#### 3.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se siguió la metodología de Robiglio (2010), la misma se detalla a continuación:

- I. Se colocaron 2-3 cucharaditas de perlas de vidrio y 500 µl de buffer de lisis. (Tris: 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, SDS 0.3% p/v pH 8) en un tubo Eppendorf estéril por cada cepa a estudiar.
- II. Se resuspendieron 2 asadas bien cargadas de la cepa correspondiente en cada tubo.
- III. Los tubos se agitaron en vórtex durante 3 min, cambiando el ángulo del Eppendorf para permitir que se rompan bien las células.
- IV. Los Eppendorf se colocaron a 65°C en baño termostatzado, durante 1 h.
- V. Los tubos se agitaron nuevamente en el vórtex durante 3 min.
- VI. Se centrifugaron durante 15 min. a 13000rpm.
- VII. Se tomó el sobrenadante (stock de DNA) y se colocó en un Eppendorf estéril.
- VIII. Se realizó una dilución (necesaria para realizar la reacción de PCR), se tomaron 5 µl del stock en 500 de agua miliQ, se colocó la dilución inmediatamente a 4°C y el stock guardarlo en el freezer a -20°C.



### 3.2 Condiciones de PCR

La identificación de las levaduras se realizó por secuenciación de los dominios D1 / D2 del gen 26S rRNA, utilizando los primers NL1 y NL4 (Kurtzman y Robnett 1997) (Anexo 1). La reacción de PCR para la amplificación del ADN incluyó: dNTPs (0.25 mM de cada uno), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 1 x tampón de PCR suministrado con la enzima polimerasa; 0.1 mM de cada uno de los primers; 100-500 ng de ADN; 6% de albúmina de suero bovino (BSA, Promega Corp.) y 1.25 U GoTaq polimerasa (Promega, Madison, Wisconsin). El volumen final de reacción fue de 25 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en termociclador (My Cyclyer, BioRad, Hercules, CA). Se utilizaron las condiciones de la PCR de Esteve-Zarzoso et al., (1999), las mismas se detallan en el Anexo 2. Los productos de la PCR fueron visualizados y separados en un gel de agarosa 1% (p/v) con GelRed™ (Bioitum Inc.) como intercalante y las bandas fueron visualizadas bajo luz UV. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados en la empresa MacroGen (Seúl, Corea) y en la unidad genómica de INTA Castelar. Las secuencias se identificaron de la misma forma que fue descrita en el Capítulo I (Pág. 59). Para las levaduras que se eligieron como candidatas en el Capítulo III 3 por su capacidad biocontroladora, se realizó un análisis filogenético.

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento de las levaduras

Se obtuvieron 660 aislamientos de levaduras provenientes de frambuesas, zarzamoras y cerezas a partir de las aguas de lavado (Figura 18 y Tabla 7). Las levaduras se encuentran depositadas en el cepario personal Sofía López (SL) en el Área de Protección Forestal del CIEFAP hasta que sean ingresadas al cepario institucional del CIEFAP.

Para las cerezas se realizaron los tres tipos de aislamientos de levaduras mencionados en los métodos, aislamiento de levaduras epifíticas, aislamiento de levaduras endofíticas y aislamiento selectivo, secciones 1.1, 1.2 y 1.3 respectivamente. Los diferentes aislamientos no se realizaron para frambuesa y zarzamora. Para estas frutas se realizó la metodología de la sección 1.1, ya que al colocarlas en agitación se rompen y se mezclan las levaduras epi y endofíticas. Además, en frambuesa y zarzamora no es posible separar la epidermis del tejido interno de estas frutas para

aislar levaduras endofíticas, ni herirlas sin romper todo el fruto para hacer aislamiento selectivo.

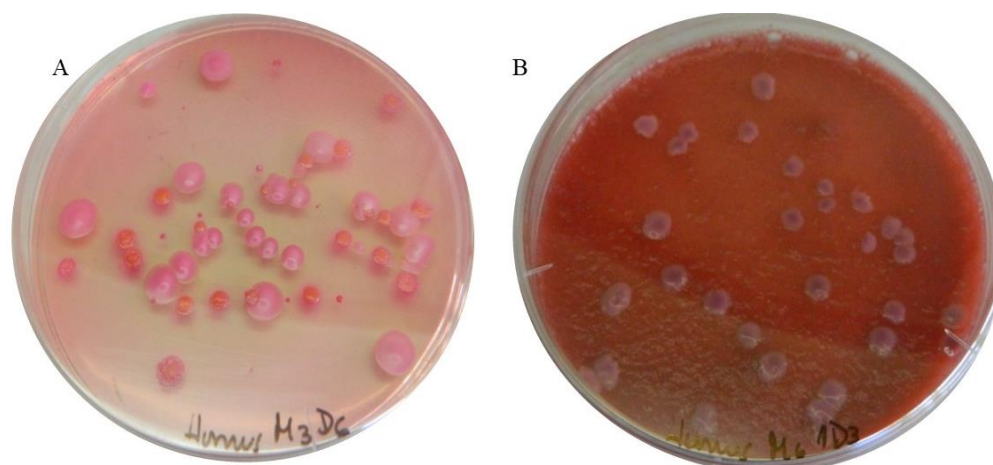


Figura 18. A) Colonias de levaduras creciendo en GPY+RB, B) Colonias de levaduras creciendo en AJF 70%.

Tabla 7. Número de aislamientos de levaduras seleccionados a partir de las aguas de lavado por tipo de fruta y método de aislamiento

Tipo de fruta	Método de aislamiento	Número de aislamientos
Cerezas	Epifíticas	286
	Endofíticas	64
	Aislamiento selectivo	109
Frambuesas	Epi y endofíticas	77
Zarzamoras	Epi y endofíticas	124
Total		660

## 2. Selección de levaduras por crecimiento en frío

Se evaluó la capacidad de crecimiento a 0°C (temperatura de almacenamiento de las cerezas, frambuesas y zarzamoras para comercialización en fresco) de los 660 aislamientos de levaduras obtenidos. Se observó que 312 aislamientos no tuvieron la capacidad para crecer a la temperatura utilizada en el ensayo. De los restantes 348 aislamientos, 100 se consideraron crecimiento de rápido, 71 medio y 177 lento. Para la identificación, y posteriores ensayos de biocontrol se consideraron los aislamientos de crecimiento rápido. En la Figura 19 se observa el crecimiento de las muestras a los 10 días y la clasificación en velocidad de crecimiento que se consideraron

rápido, medio y lento.

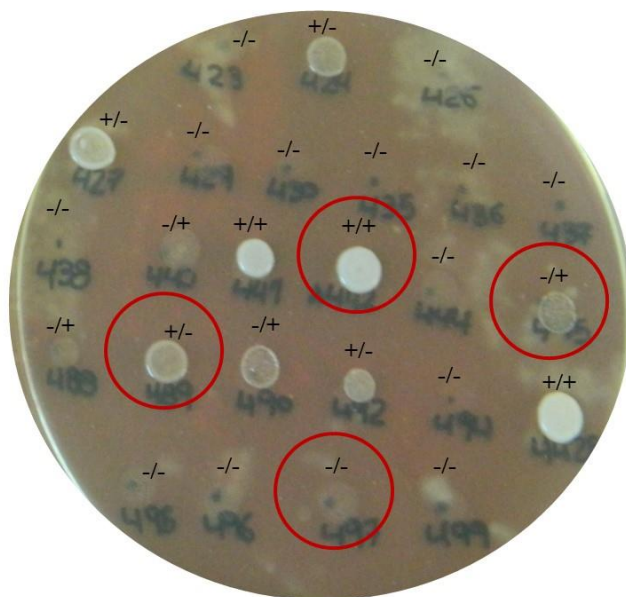


Figura 19. Velocidades de crecimiento a temperatura de almacenamiento (0°C) luego de 10 días: +/+ : Rápido; +/-: Medio; -/+ : Lento; -/-: No crece.

### 3. Identificación molecular de las levaduras

Se identificaron los 100 aislamientos de levaduras que se consideraron de crecimiento rápido a 0°C. El 1.29% de aislamientos de frambuesa, el 16.55% de aislamientos provenientes de cerezas y el 20.16% de aislamientos de zarzamoras, del total de levaduras que fueron aisladas de cada tipo de fruta, crecieron dentro de lo que se consideró “rápido”.

Se identificaron un total de 21 especies, distribuidas en trece géneros (Anexo 3). A partir de cerezas (provenientes de los tres sitios de muestreo diferentes) se aislaron trece especies de levaduras diferentes, las mismas fueron *Aureobasidium pullulans*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cy. infirmominiatum*, *Cy. macerans*, *Gelidatrema spencermartinsiae* (ex *Cryptococcus spencermartinsiae*), *Piskurozyma capsuligena* (ex *Filobasidium capsuligenum*), *Tausonia pullulans* (ex *Guehomyces pullulans*), *Mrakia frigida* y *Naganishia adeliensis* (ex *Cryptococcus adeliensis*), *N. albidosimilis* (ex *Cryptococcus albidosimilis*), *N. globosa*, *Vishniacozyma tephrensis* (ex *Cryptococcus tephrensis*), *V. victoriae* (ex *Cryptococcus victoriae*) (Figura 20). A partir de zarzamoras, se aislaron diez especies diferentes: *Curvibasidium cygneicollum* (ex *Rhodotorula fujisanensis*) *Cy. capitatum*, *Cy. infirmominiatum*, *Filobasidium stepposum* (ex *Cryptococcus stepposus*), *F. wieringae* (ex *Cryptococcus wieringae*), *Holtermanniella wattica*

(ex *Cryptococcus waticus*), *Naganishia antarcticus* (ex *Cryptococcus antarcticus*), *N. albidosimilis*, *N. globosa* y *Rhodosporidiobolus colostri* (ex *Rhodotorula colostri*) (Figura 20) y solo cuatro especies a partir de frambuesas, *A. pullulans*, *V. victoriae*, *F. wieringae* y *Meyerozyma guilliermondii* (Figura 20, Anexo 3). Las frambuesas y zarzamoras fueron provenientes de un solo sitio de muestreo.

Del total de levaduras identificadas ocho especies se encontraron exclusivamente en cerezas (*N. adeliensis*, *F. magnum*, *G. spencermartinsiae*, *V. tephrensis*, *Cy. macerans*, *P. capsuligena*, *T. pullulans*, *M. frigida*), cinco especies fueron identificadas exclusivamente a partir de zarzamoras (*N. antarcticus*, *F. stepposum*, *H. wattica*, *R. colostri*, *Cu. cygneicollum*) y una de frambuesas (*M. guilliermondii*) (Figura 20, Anexo 3).

Solo cinco especies de levaduras fueron identificadas en los tres sitios de muestreo (*N. adeliensis*, *V. victoriae*, *Cy. infirmominiatum*, *Cy. macerans*, *T. pullulans*) (Figura 20, Anexo 3).

Ninguna de las especies identificadas fue común a los tres tipos de fruta.

De las especies identificadas, tres fueron exclusivas del sitio de muestreo Gaiman (*F. magnum*, *V. tephrensis*, *P. capsuligena*), dos especies exclusivas de Trevelin (*G. spencermartinsiae*, *M. frigida*), siete especies exclusivas de Paralelo 42° (*N. antarcticus*, *F. stepposum*, *H. wattica*, *F. wieringae*, *M. guilliermondii*, *R. colostri*, *Cu. cygneicollum*) (Figura 20, Anexo 3).

La especie identificada más frecuente fue *V. victoriae* (22%), seguida por *T. pullulans* (14%) (Figura 20, Anexo 3).

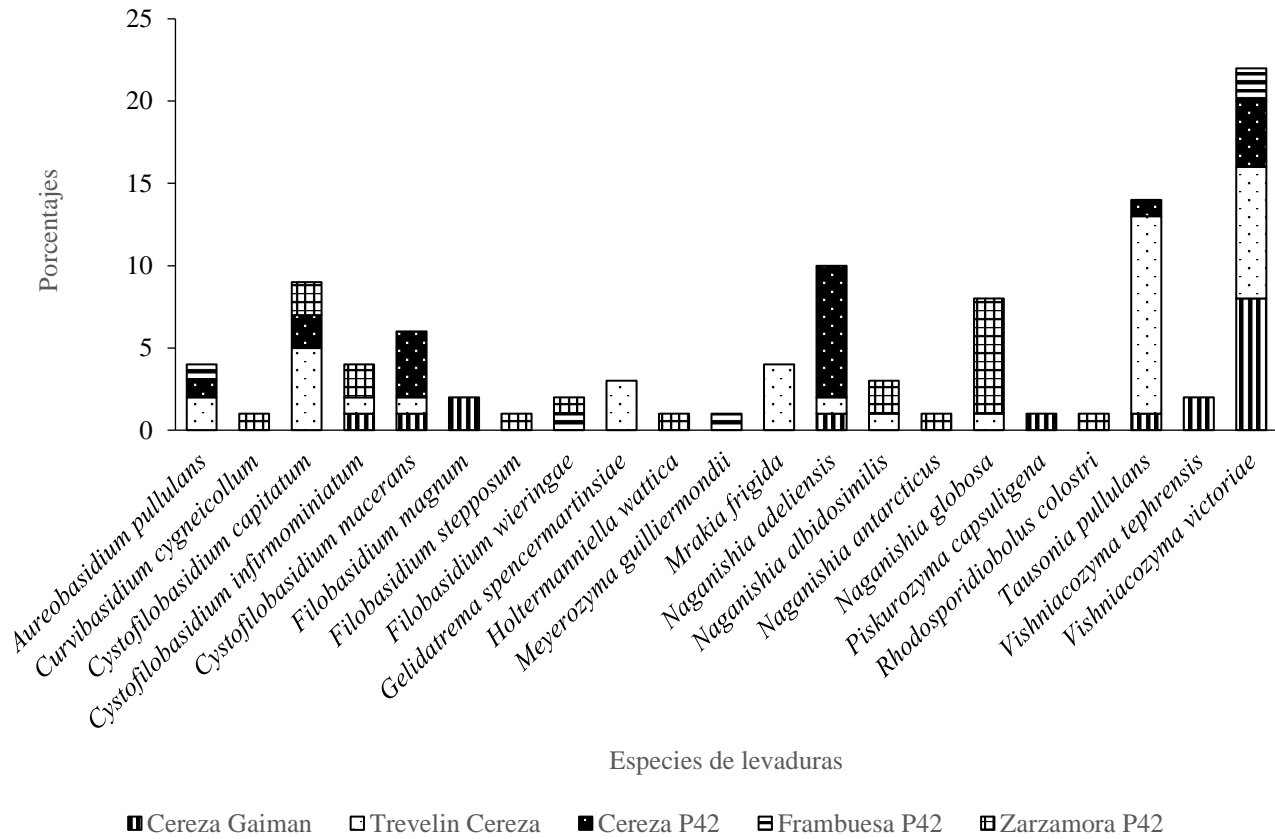


Figura 20. Porcentaje de las diferentes especies de levaduras capaces de crecer a 0°C identificadas en relación al tipo de fruta y a los sitios de muestreo.

El sitio de muestro a partir del cual se obtuvo un mayor número de levaduras adaptadas al frío fue el Paralelo 42° (P42). Cabe destacar que este fue el único sitio del que se tomaron muestras a partir de los tres tipos de frutas (Figura 21).

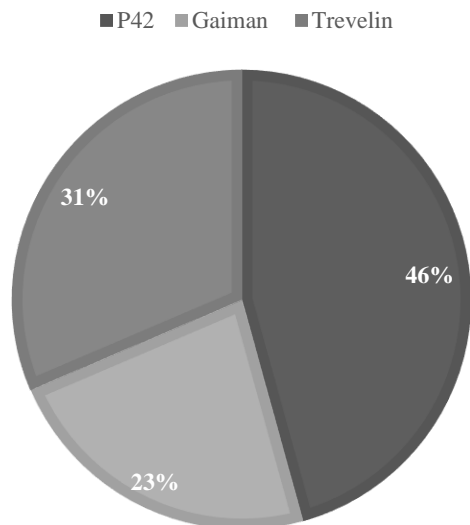


Figura 21. Porcentaje de distribución por sitio de muestreo del total de levaduras aisladas e identificadas adaptadas al frío.

El tipo de aislamiento que logro más número de aislamientos de levaduras adaptadas al frío a partir de cerezas fue para levaduras epifíticas (Figura 22A). Además, la mayoría de las levaduras se obtuvieron a partir de cerezas producidas convencionalmente (Figura 22B). Cabe destacar, que las cerezas orgánicas sólo fueron originarias del Paralelo 42°, mientras que las muestras de las cerezas de producción convencional fueron mayores y provenientes de dos sitios de muestreo diferentes. El tiempo de almacenamiento de 30 días en poscosecha presentó mayor número de aislamientos de las levaduras adaptadas al frío en cerezas (Figura 22C).

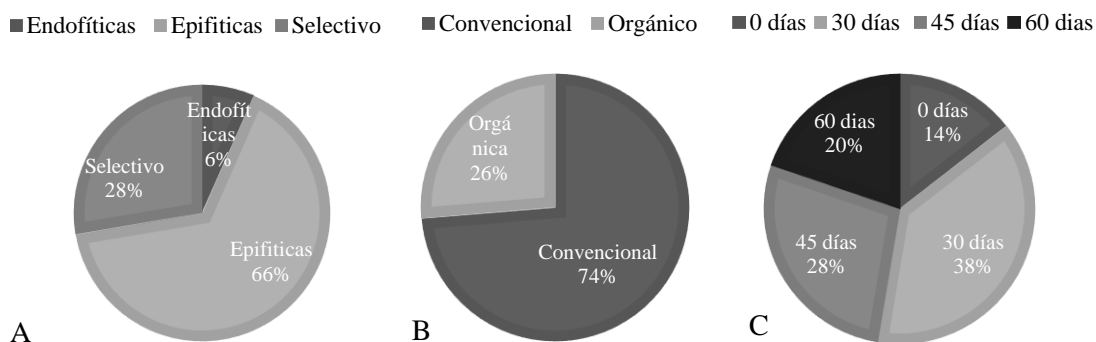


Figura 22. Porcentajes de las levaduras capaces de crecer a 0°C aisladas a partir de cerezas en relación con: A) el tipo de aislamiento, B) el tipo de producción, C) el tiempo de almacenamiento.

Del sitio de muestreo localizado en Trevelin se obtuvieron cerezas de tres variedades distintas. Los aislamientos de levaduras obtenidos en este sitio provienen mayoritariamente de las variedades Bing y Lapins (Figura 23A).

En el sitio de muestreo del Paralelo 42° de realizaron aislamientos de levaduras de dos variedades diferentes de cerezas, ambas de origen orgánico. En este caso la mayoría de los aislamientos de levaduras que desarrollan provenían de las cerezas variedad Bing (Figura 23B).

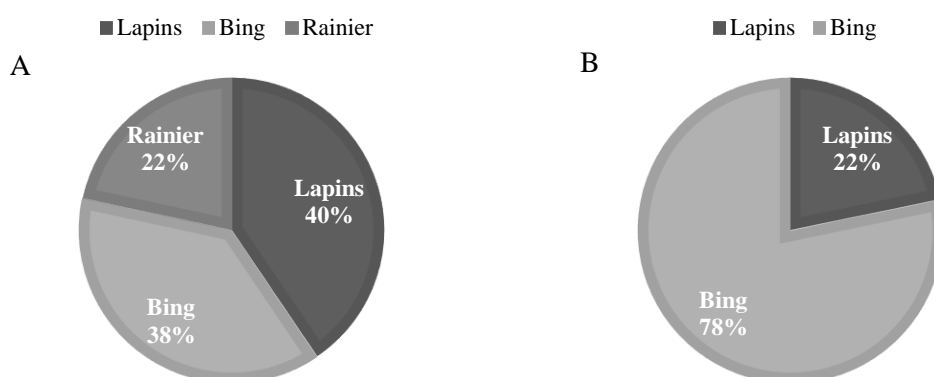


Figura 23. Frecuencias relativas de los aislamientos de levaduras capaces de crecer a 0°C en relación con cerezas de diferentes variedades: A) provenientes de Trevelin, B) Provenientes de Paralelo 42°.

Las cerezas de variedad Lapins fueron las únicas que se encontraron en los tres sitios de muestreo. Las cerezas, de esta variedad, de Gaiman y Trevelin fueron las que otorgaron un mayor número de aislamientos de levaduras adaptadas al frío en comparación con las cerezas del Paralelo 42° (Figura 24).

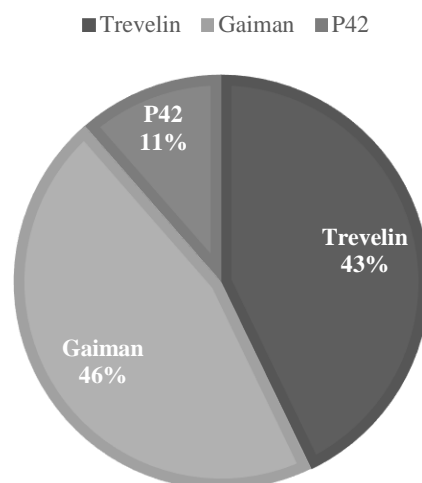


Figura 24. Frecuencias relativas de levaduras identificadas capaces de crecer en frío de cerezas variedad Lapins según el sitio de origen de las frutas.

A partir de las zarzamoras se obtuvo el mayor número de aislamientos de levaduras de los *Berries* capaces de crecer en frío. Esto además coincide con la mayor diversidad de especies de levaduras de zarzamoras frente a las frambuesas. Por otro lado, a los tres días de conservación de la fruta se obtuvieron el mayor número de aislamientos de levaduras a partir zarzamoras y todos los aislamientos de levaduras de frambuesa (Figura 25).

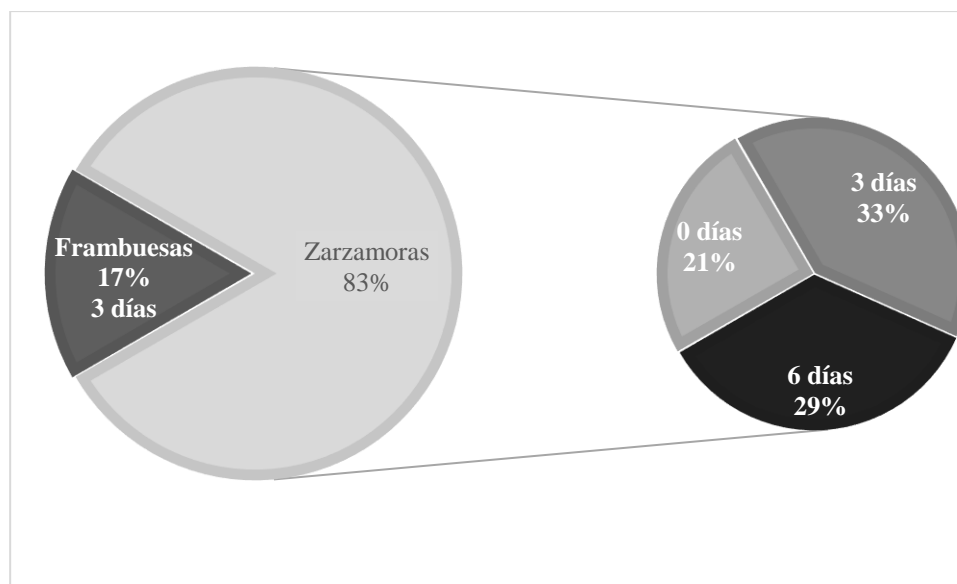


Figura 25. Frecuencias relativas de levaduras aisladas a partir de *Berries* (frambuesas y zarzamoras) capaces de crecer a 0°C en relación al tiempo de conservación en poscosecha.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio en *Cherries* y *Berries* producidas de forma convencional, orgánica y asilvestrada, revelaron la presencia de una gran diversidad de especies de levaduras, habitantes naturales de las frutas (Venturini et al., 2002, Jensen et al., 2013, Abdelfattah et al, 2016).

Los aislamientos obtenidos en este trabajo fueron realizados a partir de fruta conservada a 0°C, tomando muestras de las mismas a diferentes tiempos. El muestreo de levaduras se realizó a partir de aguas de lavado de las frutas que se sembraron en placas a temperatura de heladera (4-8°C). Esto implica que se aislaron levaduras adaptadas al frío, pero no todas ellas tuvieron la capacidad



de crecer a 0°C. Esto puede deberse a que algunas de las levaduras aisladas pueden ser psicrófilas obligadas (tienen una temperatura máxima para el crecimiento < 20°C, una temperatura óptima de 15°C, y una temperatura mínima a 0°C o inferior) y otras las psicrófilas facultativas (pueden considerarse como mesófilos que evolucionaron para tolerar el frío que exhiben temperaturas óptimas > 20°C y son capaces de crecer alrededor de 0°C) (Rossi et al., 2009, Buzzini y Margesin 2014). El uso de levaduras adaptadas al frío, determinarían el éxito de un ACB para el control de las enfermedades de poscosecha de frutas (Lutz et al., 2012, Sangorrin et al., 2014, Villalba et al., 2016).

A lo largo del proceso de búsqueda de un ACB, un paso importante está relacionado con el aislamiento de los organismos. En este trabajo se aislaron un gran número de levaduras epifíticas, endofíticas y a través de un aislamiento selectivo a partir de fruta herida sana y se seleccionaron todas las capaces de crecer a la temperatura de conservación de la fruta 0°C. Cabe resaltar que tres especies, *Cystofilobasidium macerans*, *Piskurozyma capsuligena* y *Mrakia frigida*, solo fueron aisladas con el aislamiento selectivo a partir de fruta sana herida artificialmente. Si bien el mayor porcentaje de levaduras que crecen en frío se obtuvo a partir del método de aislamiento de epifíticas, el método más eficiente para obtener levaduras antagonistas se determinará en los próximos Capítulos.

De las 21 especies de levaduras solamente dos especies corresponden a levaduras ascomicetes (*Aureobasidium pullulans* y *Meyerozyma guilliermondii*) mientras que las restantes 19 son basidiomicetes. Esto podría deberse a la influencia de fuerzas selectivas específicas de cada hospedante, como la disponibilidad de nutrientes, que crea condiciones que determinan la composición de las comunidades de microorganismos que se encuentran en cada tipo de fruta (Rosa et al. 1995). El estado de madurez también es uno de los factores que inciden en la biodiversidad de las levaduras de la fruta, se ha demostrado que la microbiota de frutas inmaduras es dominada por levaduras basidiomicetes, mientras que la fruta absolutamente madura (senescencia) cuya epidermis se encuentra debilitada y comienza a exudar jugos es un medio donde la disponibilidad de azúcar en la superficie aumentaría el crecimiento de poblaciones de levaduras ascomicetes oxidativas o de baja fermentación (Barata et al., 2012, Ghanbarzadeh et al., 2019). Por todo esto, en nuestro sistema, el estado de madurez (comercial) al que se cosechan los *Cherries* y los *Berries* podría ser el motivo por el cual la mayoría de las levaduras aisladas corresponden a los basidiomicetes, ya que la fruta se cosecha antes de la senescencia.

Por otro lado, el clima también puede ser un factor determinante en la diversidad de levaduras. Los resultados de este trabajo, donde las levaduras identificadas fueron aisladas de frutas

conservadas en frío y capaces de crecer a 0°C coinciden con lo que ocurre con levaduras aisladas de hábitats glaciares, donde el 13% de las levaduras identificadas son ascomicetes y el 87% basidiomicetes (Johnson 2013). Las levaduras basidiomicetes se adaptan a estos ambientes fríos a través de la formación de cápsulas de polisacáridos y cambios en la composición de los lípidos de la membrana (Rossi et al., 2009, Shivaji y Prasad 2009).

El 100% de las levaduras identificadas ya han sido reportadas como levaduras adaptadas al frío (Buzzini y Margesin 2014). Esto concuerda con su capacidad para crecer a bajas temperaturas y destaca la importancia de aislar y seleccionar los antagonistas en condiciones de bajas temperaturas para obtener individuos adaptados a esos ambientes (Sangorri et al., 2014).

Algunas de las especies identificadas en el presente trabajo ya fueron aisladas de la superficie de frutas y han sido identificadas como habitantes de la microbiota de cerezas, y manzanas como *T. pullulans*, y *G. spencermartinsiae*, (Qin et al., 2004, de García et al., 2010). Otras especies, además de haber sido aisladas de frutas han sido caracterizadas como potenciales agentes de control biológico. *Filobasidium magnum* (ex *Cryptococcus magnum*) fue probada para el control de *Monilinia fruticola* en duraznos y para el control de *P. expansum* en uvas, *V. tephrensensis* es un potencial ACB contra *Fusarium* spp. en pepinos y *M. guilliermondii* fue usada como levadura antagonista frente a diferentes patógenos de tomates Cherry (Janisiewicz et al., 2010, Vero et al., 2010, Zhao et al., 2010, Kamel et al., 2016, Rodríguez Assaf et al., 2020). Se destacan *Aureobasidium pullulans* y *Rhodospiridiobolus colostri* por haber sido aisladas y probadas como ACB sobre patógenos poscosecha que afectan a frutas finas en Italia y Colombia, respectivamente (Schena et al., 2003, Medina et al., 2009). Por otro lado *A. pullulans*, *Cy. infirmominiatum*, *F. wieringae* y *V. victoriae* fueron caracterizadas como ACB en peras en condiciones de poscosecha en Patagonia (Robiglio et al., 2011, Lutz et al., 2012, 2020).

Por otro lado, algunas de las especies identificadas se encuentran asociadas a otros procesos biotecnológicos. *N. adeliensis* es productora de xilanasas utilizadas en la industria de fermentación de panificados (Scorzetti et al., 2000) y enzimas hidrolíticas útiles para la degradación de poli- y oligosacáridos vegetales, las cuales se pueden aplicar como ingrediente probiótico o agente terapéutico en la alimentación (Białkowska y Turkiewicz 2014). *Tausonia pullulans* es capaz de acumular lípidos saponificables importantes para la producción de biocombustibles (Martinez et al., 2016). Otras como *F. stepposum*, *Cy. capitatum*, *Cy. infirmominiatum* y *R. colostri* son reconocidas por producir pigmentos fotoprotectores (carotenos) y por su supervivencia a altas concentraciones de UV-B (Moliné et al., 2014). *Cy. capitatum*, *Cy. macerans*, *P. capsuligena* y *M. frigida* producen pectinasas importantes en el procesamiento

industrial de jugos (Nakagawa et al., 2002, Margesin et al., 2005, Białkowska y Turkiewicz 2014, Merín et al., 2014). Cavello et al., (2016) caracterizaron aislamientos adaptados al frío de *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Naganishia adeliensis* y *T. pullulans* como productoras de pectinasas.

Además, algunas especies identificadas en este trabajo, como *N. adeliensis*, *F. wieringae*, *R. colostri* y *Cu. cygneicollum* fueron asociadas a frutos de raulí (*Nothofagus nervosa*) donde podrían actuar como agentes promotores del crecimiento y/o ACB contra patógenos que afectan a esta especie forestal (Fernández et al., 2012).

Las levaduras que fueron aisladas solo en zarzamoras (*N. antarcticus*, *F. stepposum*, *H. wattica*, *R. colostri* y *Cu. cygneicollum*) están asociadas al tipo de producción asilvestrada, sin uso de ningún químico. *Meyerozyma guilliermondii* solo fue aislada a partir de frambuesas orgánicas. En la zona no se producen zarzamoras ni frambuesas de manera convencional por lo cual no se pueden comparar si existen diferencias en la microbiota asociada. *R. colostri* también se aisló en zarzamoras de Colombia, (Medina et al., 2009) y *M. guilliermondii* ha sido aislada a partir de cítricos, manzanas y tomates (Scherm et al., 2003, Zhao et al., 2009, Lahlali et al., 2011b). Si bien existen levaduras como *N. antarcticus* y *H. wattica*, que por el momento han sido reportadas como habitantes exclusivamente de zonas frías y se cree que podrían tratarse de organismos endémicos de ciertas zonas, los organismos adaptados al frío (incluyendo levaduras) son extremadamente versátiles en sus capacidades adaptativas, y por lo tanto, cambiarían su aparente estado endémico para lograr una distribución más ubicua en otros hábitats (Vishniac 1999). Eso explicaría el motivo por el cual han sido identificadas en este trabajo como habitantes de la superficie de frutas. En relación a las diferencias observadas entre las levaduras aisladas a partir de las diferentes variedades de frutas la comparación entre los diferentes sitios no es factible debido a que la variedad Rainier solo se obtuvo del sitio Trevelin y del sitio Gaiman solo se obtuvieron frutos de la variedad Lapins. Las diferencias observadas en la diversidad de las levaduras adaptadas al frío aisladas a partir de cerezas estarían más asociadas a los sitios de muestreo que a las diferentes variedades.

La determinación taxonómica de levaduras mostró que *N. adeliensis*, *V. victoriae*, *Cy. infirmominiatum*, *Cy. macerans* y *T. pullulans* fueron las especies comunes a los tres sitios de muestreo. Cabe destacar que las levaduras de los géneros *Vishniacozyma*, *Cryptococcus* y *Guehomyces* fueron las que se identificaron con más frecuencia. Esto puede deberse a que son géneros comunes en aislamientos de ambientes fríos (Buzzini y Margesin 2014). Además, son géneros con capacidad de colonizar las superficies de frutas y son predominantes en aislamientos

a partir de duraznos y manzanas (Wilson y Chalutz 1989, Janisiewicz et al., 2010, Lutz et al., 2012, Abdelfattah et al., 2016).

Las especies de levaduras aisladas a partir de cerezas muestran un mayor número de especies que las aisladas a partir de cerezas producidas convencionalmente. Al comparar los tres sitios de muestreo, el sitio de muestreo del Paralelo 42° (P42) fue el que mostró la mayor diversidad de especies, esto podría deberse a que es el único sitio en que se muestrearon los tres tipos de frutas, las cerezas, frambuesas y zarzamoras. Estas frutas fueron obtenidas en los establecimientos de la zona y son producidas de forma orgánica y de forma asilvestrada en el caso de las zarzamoras. Estos resultados son similares a los obtenidos por Camatti-Sartori et al., (2005) y Granado et al., (2008) donde las producciones orgánicas de manzanas en Brasil y en Suiza presentaron una mayor diversidad de especies de levaduras que las producciones convencionales. Las diferencias observadas entre la microbiota de las frutas de producción orgánica y convencional se deben probablemente a las estrategias utilizadas para la protección de las plantas en los sistemas convencionales (Granado et al., 2008). La aplicación de fungicidas, nutrientes para el suelo, entre otros, pueden afectar la distribución de las levaduras (Combina 2005 et al., 2005, Nisiotou y Nychas 2007).

La presencia de una microbiota más rica y diversa en la fruta podría aumentar el nivel de microorganismos benéficos y de acción antagónica y al mismo tiempo aumentar la probabilidad de controlar hongos patógenos. Es por ello que resulta muy importante estudiar y valorizar los microbiomas naturales de las frutas ya que en ellos no solo podrían encontrarse levaduras antagonistas para ser utilizadas como agentes de control biológico, sino también con potencial para diferentes aplicaciones biotecnológicas.

Si bien, no todas las levaduras adaptadas al frío aisladas en este trabajo tienen antecedentes como ACB, serán incluidas en ensayos de biocontrol para la selección de las levaduras con mayor potencial antagonista que se tratará en el siguiente Capítulo.

**CAPITULO III**  
**EVALUACIÓN DE LA**  
**CAPACIDAD**  
**BIOCONTROLADORA DE**  
**LEVADURAS NATIVAS**

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de los más de 30 años en los que se viene desarrollando el control biológico, numerosos antagonistas microbianos (levaduras y bacterias) de patógenos de poscosecha han sido identificados en estudios de laboratorio, semicomerciales, y comerciales (Droby et al., 2016). A pesar de esto, el uso de levaduras potencialmente antagonistas como agentes de biocontrol todavía está subexplotado y pocos productos fitosanitarios a base de levadura han llegado al mercado (Usall et al., 2016).

Las levaduras combinan fuertes actividades antifúngicas con propiedades ventajosas para una aplicación (por ejemplo, actividad antagonista, capacidad de cultivo, formulabilidad, aplicabilidad, etc.) y, por lo tanto, son prometedoras para el desarrollo de agentes biológicos (Freimoser et al., 2019). Como ACB en poscosecha de frutas, se sabe que las levaduras son tolerantes a las condiciones ambientales extremas que prevalecen antes y después de la cosecha (bajas y altas temperaturas, desecación, amplio rango de humedad relativa, bajos niveles de oxígeno, fluctuaciones de pH, radiación UV) y, además, están adaptadas de manera única al microambiente de la fruta (alta concentración de azúcar, alta presión osmótica y bajo pH) (Spadaro y Droby 2016).

En particular, la alta eficiencia de las levaduras aplicadas como agentes de control biológico (ACB) está relacionada con su adaptación tanto al entorno inmediato como a las condiciones nutricionales predominantes en la zona de la herida, su capacidad para crecer a bajas temperaturas y su capacidad para colonizar heridas (Sharma et al., 2009).

Los productos de control biológico basados en levaduras que alcanzaron niveles avanzados de desarrollo y comercialización fueron, *Candida oleophila* (Aspire, Ecogen, Langhorne, PA, US), *Cryptococcus albidus* (Yield Plus, Lallemand, Montreal, Canadá) y *Candida sake* (Candifruit, IRTA, Lleida, España) (Teixidó et al., 2011). Más recientemente, en Bélgica, se ha desarrollado *Candida oleophila* (Nexy, Leasafre, Lille, Francia), para la aplicación frente a patógenos de poscosecha en pomelo, cítricos y banano (Lahlali et al., 2011b). *Aureobasidium pullulans*, que si bien es un hongo “yeast-like” se ha estudiado como las levaduras, ha sido utilizado para el desarrollo de productos como Boni Protect (Bio-Ferm, Tulln, Austria), este producto es de aplicación precosecha, ya que controla los patógenos de heridas que se desarrollan en la fruta de pepita durante el almacenamiento (Lima et al., 2015). Estos se comercializaron durante algunos años, pero se interrumpieron debido a deficiencias comerciales relacionadas con el marketing

principalmente (Droby et al., 2016). Actualmente, *Metschnikowia fructicola* (Shemer, Bayer, Leverkusen, Alemania) registrada en Israel para aplicaciones durante pre y poscosecha en diversas frutas y verduras, incluyendo albaricoques, cítricos, uvas, melocotones, pimientos, fresas y batatas, representa uno de los ejemplos más exitosos de un producto de biocontrol poscosecha (Spadaro y Droby, 2016).

Un amplio rango de acción y rendimiento aceptable y constante en condiciones comerciales es fundamental para el éxito de cualquier agente de biocontrol (Droby et al., 2016). Para obtener ACBs con estas características, una de las estrategias de aislamiento y selección más aceptada es que se debe obtener de la comunidad nativa que habita la fruta, ya que el antagonista se encuentra allí en constante interacción con la fruta hospedadora, patógenos y demás microorganismos formando parte del microbioma en el cual deberá ejercer su antagonismo (Massart et al., 2015, Abdelfattah et al., 2016).

Otra de las estrategias utilizadas para obtener un ACB de patógenos de poscosecha que cumpla con las características ideales es la de aumentar su eficacia mediante el uso de combinaciones de ACB o de sus metabolitos (Panebianco et al., 2015; Zhao et al., 2020, Rivas-Garcia et al., 2019). Las mezclas de ACB complementarios y no competitivos pueden tener un espectro más amplio de actividad (diferentes frutas y cultivos) y pueden controlar más de una enfermedad al mismo tiempo. La eficacia de las mezclas de ACB podría resultar no sólo de la actividad antagónica de los microorganismos individuales, sino también de su acción sinérgica que puede suprimir un patógeno objetivo a través de diferentes mecanismos de acción (Fogliano et al., 2002, Woo et al., 2002). Una forma de evidenciar el efecto de las mezclas de levaduras es a través del Efecto esperado (Ee) de las respuestas aditivas de los tratamientos levadura 1+levadura 2, 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 (Richer 1987, Lutz 2015).

Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados, para la selección de levaduras potencialmente antagonistas contra enfermedades fúngicas de poscosecha en el sistema fruta fina de Patagonia, se plantearon la siguiente hipótesis y objetivos:

## **HIPÓTESIS**

Existen especies de levaduras adaptadas al frío presentes en la fruta fina con actividad antagónica contra hongos causantes de enfermedades de poscosecha

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar y seleccionar levaduras nativas por sus capacidades biocontroladora frente a patógenos regionales de fruta fina en condiciones de comercialización y conservación.
- Comparar el efecto biocontrolador de levaduras nativas con el de levaduras comerciales frente a los patógenos regionales de fruta fina.
- Evaluar el efecto de la combinación de levaduras nativas potencialmente antagonistas sobre la capacidad de biocontrol frente a patógenos poscosecha en cerezas.

## **MATERIALES**

### Material vegetal

Las cerezas utilizadas pertenecen a las variedades Bing y Lapins, fueron cosechadas a madurez comercial y obtenidas de centros de acopio en las localidades de Trevelin y Gaiman, respectivamente. Las frambuesas, variedad Autumn Bliss se obtuvieron de centros de acopio en la localidad de Lago Puelo. Las frutas de zarzamoras fueron recolectadas a la madurez, a partir de plantas asilvestradas en la zona cordillerana del Paralelo 42°. La colecta de la fruta y los bioensayos se realizaron entre diciembre 2013/febrero 2014 y diciembre 2014/febrero 2015

### Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos

Todos los medios de cultivo utilizados se prepararon con agua destilada y se esterilizaron por vapor saturado a presión en autoclave a 120°C y 2 atmósferas durante el tiempo especificado para cada medio de cultivo.

- Para el crecimiento de las levaduras se utilizó Agar, extracto de levadura, glucosa y peptona (GPY): agar 20g/L, extracto de levadura 5 g/L; peptona 5 g/L; glucosa 40 g/L.



- Para el crecimiento de los patógenos se utilizó Agar, papa, dextrosa (APD) de formulación comercial de Laboratorios Britania, según especificaciones del producto (39 g/L).
- Para la preparación de las suspensiones de células de levaduras se utilizó tampón fosfato potásico: 70 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 M; 30 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 M, 300 mL de agua destilada, v / v / v, pH 6.5).

## Microorganismos

Los hongos patógenos utilizados para los ensayos de biocontrol sobre cerezas fueron *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491 y *Mucor piriformis* ccCIEFAP501, seleccionados según su patogenicidad en el Capítulo 1 de esta Tesis. Los mismos se encuentran depositados en el cepario del CIEFAP.

De los 100 aislamientos de levaduras y hongos “*yeast-like*” con capacidad para crecer a 0°C (Capítulo 2) se seleccionaron 52 (provenientes de cerezas, frambuesas y zarzamoras) para probar su efecto como ACB en cerezas. Esta selección se realizó en base a quedarán representadas todas las especies de levadura y “*yeast-like*”, todos los sitios de muestreo y todos los tipos de fruta a partir de los cuales fueron aislados. Las levaduras se encuentran depositadas en el cepario personal (SL).

Para los ensayos de biocontrol en frambuesas y zarzamoras, se seleccionaron siguiendo el mismo criterio descrito arriba, 13 aislamientos de levaduras obtenidos a partir de este tipo de frutos y 2 de los aislamientos nativos más efectivos frente a los patógenos en cerezas.

Se utilizaron, además, 2 levaduras biocontroladoras comerciales desarrolladas para el control de patógenos poscosecha en manzanas y cítricos (Yield Plus basada en *Cryptococcus albidus* y Boni Protect, basada en *Aureobasidium pullulans*) y 2 levaduras biocontroladoras utilizadas sobre patógenos de pera (*Pichia membranifaciens* NPCC1250 y *Vishniacozyma victoriae* NPCC1263), patentadas por el grupo de trabajo de PROBIEN (UNCo, Neuquen).

## MÉTODOS

### 1. Crecimiento y producción de inóculo de los hongos patógenos y levaduras con potencial biocontrolador

Los patógenos *M. piriformis* y *P. crustosum* se hicieron crecer en APD, a partir de los cultivos mantenidos en el cepario. Ambos hongos se incubaron en cámara de cultivo durante siete días en oscuridad a 24°C. Las suspensiones de mitosporas de cada patógeno se realizaron por raspado de la superficie de la colonia con un asa estéril en agua destilada estéril (ADE) con 0.01% (v/v) de Tween 80%. Posteriormente se filtraron a través de malla de tela estéril para eliminar restos de micelio. Las suspensiones se ajustaron de acuerdo a su CIM, por recuento directo con cámara de Neubauer al microscopio óptico. Las levaduras se hicieron crecer a partir de los cultivos conservados en GPY. Los aislamientos en placas de Petri se incubaron en cámaras de cultivo durante 72 h en oscuridad a 15°C y 22°C (teniendo en cuenta su naturaleza psicrófila, analizada en el Capítulo 2). Las suspensiones de células de levaduras se obtuvieron por raspado con un asa estéril en tampón fosfato. Las suspensiones se ajustaron por recuento directo con cámara de Neubauer al microscopio óptico para obtener una concentración de 10<sup>8</sup> cél/mL.

### 2. Biocontrol en frutas finas

#### 2.1 Biocontrol en cerezas

Se emplearon frutas sanas esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio (2%), a las cuales se les provocó una herida artificial en la zona ecuatorial (de 3 mm de ancho x 3 mm de largo). Teniendo en cuenta lo reportado por Qin et al., (2004), se inocularon en la herida 20 µL de cada levadura (1x10<sup>8</sup> cél/mL), luego de 2 hs se inocularon 10 µL de los patógenos a la CIM (10<sup>3</sup> mitosporas/mL para *P. crustosum* y 10<sup>2</sup> mitosporas/mL para *M. piriformis*). Como control negativo se inoculó agua destilada sola y como positivo se inocularon los patógenos solos. Con el fin de determinar si las levaduras podrían producir síntomas similares a los causados por los patógenos se inocularon heridas con las levaduras solamente (Rist y Rosenberger 1995). Las frutas tratadas se colocaron en bandejas de plástico de 100 mm × 150 mm × 50 mm dentro de bolsas de polipropileno con cierre hermético de 140 mm x 220 mm (Figura 26). Las frutas se conservaron a 0°C por 30 días y 3 días a 22°C (condiciones de almacenamiento), y a 22°C por 7 días

(condiciones de comercialización). Determinó la virulencia (%) ocasionada por los patógenos en presencia de las levaduras a través de los parámetros incidencia (% de heridas enfermas) y severidad (diámetro de lesión) de la misma manera que en el Capítulo 1. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento con 10 frutas cada uno.



Figura 26. Cerezas sanas heridas artificialmente e inoculadas con levaduras y/o patógenos colocadas en bandejas plásticas.

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos, las levaduras se clasificaron en tres rangos definidos arbitrariamente dependiendo del desarrollo de los patógenos, el cual fue expresado como virulencia (%).

El grupo 1 comprende levaduras que tuvieron efecto biocontrolador bajo o nulo frente al desarrollo de los patógenos (virulencia entre el 76 y el 100%). El grupo 2 incluye a las levaduras que mostraron efecto moderado frente al desarrollo de los hongos patógenos (virulencia de la enfermedad entre el 51-75%). Y por último el grupo 3 incluye a las levaduras que mostraron alto efecto de biocontrol sobre el desarrollo de los patógenos, en estos casos la virulencia fue menor al 50%.

## 2.2 Biocontrol en frambuesas y zarzamoras

### 2.2.1 Ensayos de biocontrol con inoculación de patógenos

Se inocularon frutas sanas con suspensiones de cada levadura ( $1 \times 10^8$  cél/mL), por la técnica de pulverizado con posterior inoculación de 10  $\mu$ L de los patógenos a la CIM. Como control negativo se pulverizó agua destilada sola y como positivo se inocularon los

patógenos solos. Las frutas se conservaron a 0°C 6 días y 1 día a 22°C (condiciones de almacenamiento), y a 8°C por 6 días y 1 día a 22°C (condiciones de comercialización). Las frutas tratadas se colocaron en bandejas de plástico de 100 mm × 150 mm × 50 mm dentro de bolsas de polipropileno con cierre hermético de 140 mm x 220 mm. Se determinó la incidencia de pudriciones (% de frutas enfermas) para cada caso. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento con 10 frutas cada una.

### 2.2.2 Ensayos de biocontrol sin inoculación de patógenos: infección natural

Teniendo en cuenta que la fruta ya trae una carga de microorganismos de precosecha, capaz de provocar una infección natural sobre la fruta, se realizó un ensayo en frambuesas y zarzamoras, en el cual la fruta sana se inoculó con suspensiones de cada levadura ( $1 \times 10^8$  cél/mL). La inoculación de las levaduras se realizó por la técnica de pulverizado sin posterior inoculación los patógenos. Como control negativo se pulverizó agua destilada sola. Las frutas tratadas se colocaron en bandejas de plástico de 100 mm × 150 mm × 50 mm dentro de bolsas de polipropileno con cierre hermético de 140 mm x 220 mm. Las frutas se conservaron a 0°C por 6 días y 1 día a 22°C (condiciones de almacenamiento), y a 8°C por 6 días y 1 día a 22°C (condiciones de comercialización). Se determinó la incidencia de pudriciones (% de frutas enfermas) para cada caso. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento con 10 frutas cada una.

### 2.2.3 Identificación de microorganismos aislados de la infección natural en frambuesas y zarzamoras

Los hongos que se desarrollaron naturalmente en frambuesas y zarzamoras, se aislaron e identificaron morfológicamente a nivel de género y especie (cuando fue posible) según sus características macro y microscópicas a partir de cultivos en APD, y molecularmente siguiendo la misma metodología detallada en el Punto 4 del Capítulo 1.

## 3. Combinación de levaduras: Co-inoculación en cerezas

Con el fin de determinar si existe un sinergismo entre las levaduras que mostraron capacidad biocontroladora en el ensayo de biocontrol en cerezas (Punto 2), se prepararon soluciones con mezcla de dos levaduras diferentes en iguales proporciones para obtener

una concentración final de  $1 \times 10^8$  cél/mL, de modo que fuera la misma concentración utilizada en los ensayos de biocontrol previos. Se emplearon frutas sanas, a las cuales se les provocó una herida artificial (de 3 mm de ancho x 3 mm de largo). Se inocularon en la herida 20  $\mu$ L de la solución de levaduras, con posterior inoculación de 10  $\mu$ L de los patógenos (a la CIM). Como control negativo se inoculó agua destilada sola y como positivo se inocularon los patógenos solos. Las frutas tratadas se colocaron en bandejas de plástico de 100 mm  $\times$  150 mm  $\times$  50 mm dentro de bolsas de polipropileno con cierre hermético de 140 mm x 220 mm. Las frutas se conservaron a 0°C por 30 días y 3 días a 22°C, y a 22°C por 7 días. Se determinó la incidencia (% de heridas enfermas) y severidad (diámetro de lesión) de pudriciones para cada caso. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento con 10 frutas cada una. 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 inoculados sanos.

I (%): Incidencia de la enfermedad

La fórmula de Limpel's (Limpel 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 de levadura 1 + levadura 2 sobre el control de un patógeno específico.

x: Porcentaje de control de levadura 1

y: Porcentaje de control de levadura 2.

Se considerará que existe sinergia en la combinación de dos levaduras, si la combinación de los dos agentes produce un control mayor que el Ee, en caso contrario ocurre antagonismo entre las levaduras.

#### 4. Análisis estadístico

Se realizó el análisis correspondiente de los datos obtenidos en los ensayos utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2019p aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con comparación de a pares, dado que no se cumplieron los supuestos para utilizar análisis de la varianza con el método de comparaciones múltiples.

### RESULTADOS

#### 1. Biocontrol en fruta fina

##### 1.1. Biocontrol en cerezas

En los ensayos de biocontrol se enfrentaron 56 aislamientos de levaduras, 52 nativos y 4 no nativos, a dos patógenos (*Penicillium crustosum* ccCIEFAP491 y *Mucor piriformis* ccCIEFAP501). Debido a que la temperatura de almacenamiento de poscosecha de estas frutas es a 0°C durante un tiempo de hasta 45 días, en este estudio, se utilizó el crecimiento de las levaduras a esta temperatura tanto como criterio de selección de crecimiento (Capítulo II), como también para evaluar su acción frente a los patógenos. También se tuvo en cuenta la temperatura de comercialización (22°C) a la que la fruta se encuentra expuesta durante la venta en verdulerías, supermercados o durante la venta en la calle, para evaluar el comportamiento de las levaduras psicrófilas potencialmente antagonistas frente a los patógenos en estas condiciones.

Los resultados del ensayo de biocontrol se presentan en las Figuras 27 y 28 y Anexos 4 y 5. Por el volumen de datos obtenidos, los gráficos muestran los resultados de los enfrentamientos levadura-patógeno en los que la virulencia de la enfermedad fue menor a 100%.

Cuando las levaduras se enfrentaron a *P. crustosum* ccCIEFAP491 a 0°C y 22°C, el 50.9% (28) y el 65.45% (36) de los aislamientos tuvo un efecto biocontrolador menor al 24% (grupo 1) respectivamente. Al enfrentarlas a *M. piriformis* ccCIEFAP501 a 0°C y 22°C, el 60% (33) y el 65.45% (36) de los aislamientos se clasificó en el grupo 1 respectivamente.

El 27.47% (15) de las levaduras se clasificó dentro del grupo 2 cuando se enfrentaron a

*P. crustosum* ccCIEFAP491 y la fruta se conservó a 22°C y el 14.54% (8) a 0°C. Al enfrentarse a *M. piriformis* ccCIEFAP501 el 14.54% (8) de los aislamientos se clasificó dentro del grupo 2 al conservar la fruta a 22°C y el 18.18% (10) al almacenarla a 0°C.

Al enfrentar a las levaduras a *P. crustosum* ccCIEFAP491, el 34.54% (19) y 7.27% (4) de los aislamientos se clasificaron dentro del grupo 3 al conservar la fruta a 0°C y 22°C, respectivamente. En los ensayos de biocontrol que se hicieron enfrentando las levaduras a *M. piriformis* ccCIEFAP501, el 21.81% (12) y el 20% (11) de los aislamientos se clasificaron dentro del grupo 3 cuando la fruta se conservó a 0°C y a 22°C, respectivamente.

Si bien 28 aislamientos diferentes clasificaron en el grupo 3, por su efecto sobre *P. crustosum* o *M. piriformis*, se consideraron levaduras con mayor potencial biocontrolador a aquellas que lograron reducir (en un 50% o más) una de las enfermedades en ambas temperaturas o ambas enfermedades en alguna de las 2 temperaturas. Los 10 aislamientos que mostraron mayor efecto biocontrolador se muestran con flechas rojas en las Figuras 27 y 28. Todas ellas mostraron diferencias significativas con respecto al control ( $P \geq 0.05$ ). A partir de los datos presentados en los Anexos 4 y 5, se puede observar, además, que algunas de las levaduras seleccionadas logran reducir la virulencia porque tienen un efecto sobre la severidad (diámetro de lesión) más que sobre la incidencia, como es el caso de *V. victoriae* ccSL30, *F. stepposum* ccSL614 *Cy. capitatum* ccSL1204 y Yield Plus (*Cryptococcus albidus*) para *P. crustosum* a 0°C, *N. adeliensis* ccSL441, *N. globosa* ccSL631, *V. victoriae* ccSL771, *A. pullulans* ccSL1141 tuvieron efecto sobre las dos variables. Cuando la fruta se conservó a 22°C, *N. adeliensis* ccSL441 redujo tanto la incidencia como la severidad, mientras que *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 redujeron la virulencia a través de una disminución en el diámetro de la lesión.

En el caso de las frutas en las que se enfrentaron las levaduras con *M. piriformis* (Anexo 5), las levaduras, *N. adeliensis* ccSL154, *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199, *N. globosa* ccSL631, *V. victoriae* ccSL771, *T. pullulans* ccSL899, *A. pullulans* ccSL1141, redujeron la virulencia afectando tanto la severidad como la incidencia de la enfermedad en ambas temperaturas.

*Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204, fue la única levadura que mostró efecto biocontrolador mayor al 50%, para los dos patógenos en las dos temperaturas probadas. En la Figura 29 se muestra el efecto de *Cy. capitatum* ccSL1204 frente a *P. crustosum*

ccCIEFAP491.

*Aureobasidium pullulans* ccSL1141 fue capaz de reducir en más del 75% de la virulencia de *P. crustosum* en ambas temperaturas y más del 50% del desarrollo de *M. piriformis* a temperatura de comercialización.

*Naganishia adeliensis* ccSL441 redujo la virulencia causada por *P. crustosum* en un 82.4% y 55.77% a 22°C y a 0°C, respectivamente.

*Filobasidium. stepposum* ccSL614 logró reducir más del 50% de la enfermedad causada por *P. crustosum* en ambas temperaturas.

*Vishniacozyma victoriae* ccSL30 redujo más del 50% de la virulencia provocada por *P. crustosum* a temperatura de comercialización y redujo la enfermedad causada por *M. piriformis* en un 91% a temperatura de almacenamiento.

Otro aislamiento de *V. victoriae* ccSL771 (pero proveniente de otro lugar de aislamiento, ver Capítulo 2) redujo el 79.35% de la virulencia causada por *P. crustosum* a temperatura de comercialización y más del 59% de la enfermedad causada por *M. piriformis* a ambas temperaturas.

*Naganishia globosa* ccSL631 pudo reducir la virulencia causada por *P. crustosum* en más del 73% a temperatura de comercialización y en más del 70% de la enfermedad causada por *M. piriformis* en ambas temperaturas.

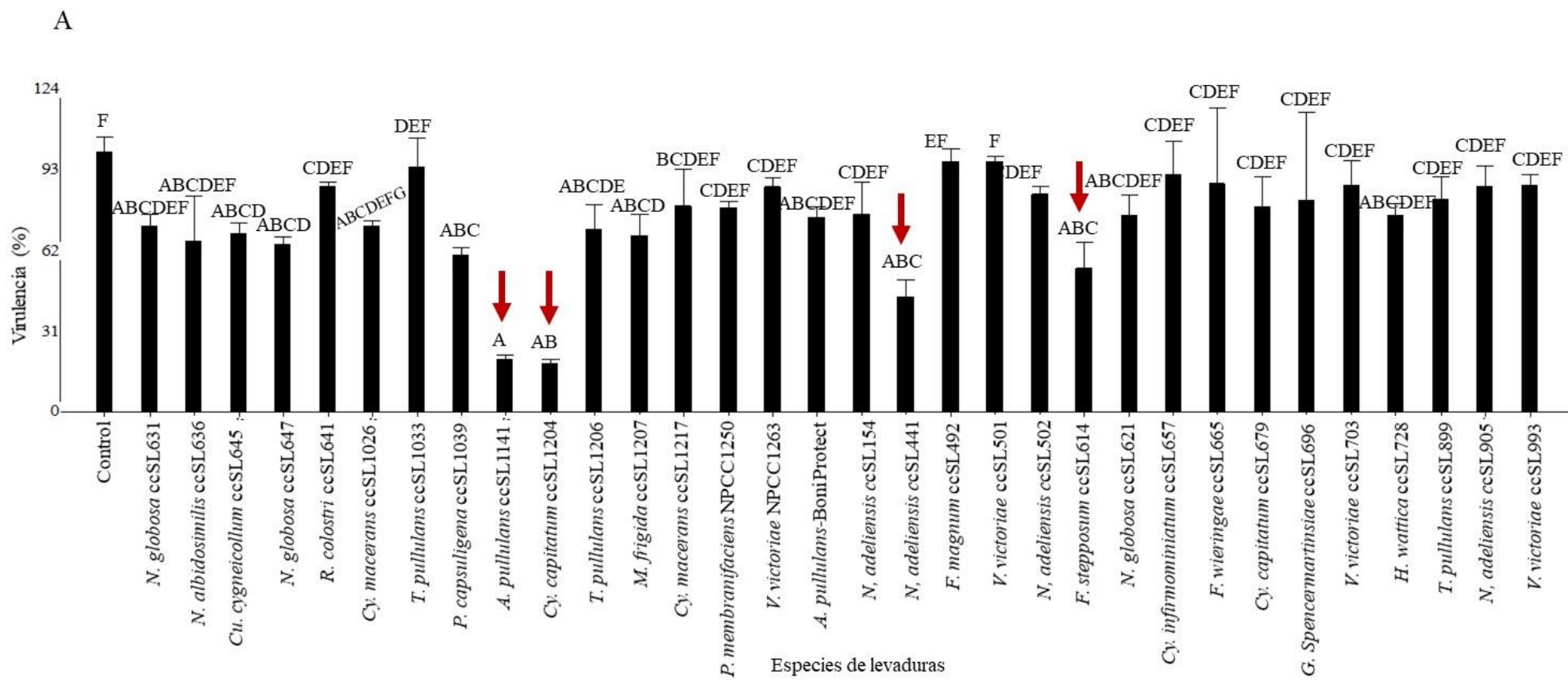
Tres levaduras lograron mayor control solo sobre la virulencia que causa *Mucor piriformis* a ambas temperaturas, *N. adeliensis* ccSL154, *Tausonia pullulans* ccSL899 y *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199. El porcentaje de reducción de la virulencia de la primera fue del 78.3% y 55.6% cuando la fruta se almacenó a 0°C y a 22°C, respectivamente. La segunda, redujo el 94.56% a temperatura de comercialización (22°C) y 71.56% a temperatura de almacenamiento (0°C). Mientras que, *M. guilliermondii* redujo la enfermedad en un 84% a temperatura de comercialización y 96.66% a temperatura de almacenamiento (Figura 29).

Yield Plus (*Cryptococcus albidus*) fue la única levadura no nativa ubicada en el grupo 3. Al aplicarla, la virulencia causada por *M. piriformis* en ambas temperaturas y de *P. crustosum* a temperatura ambiente, fue menor al 50%.

Si bien se realizaron ensayos de biocontrol con levaduras de las mismas especies, se



observó que los diferentes aislamientos tuvieron diferentes capacidades para enfrentar a los patógenos. Esto puede observarse para la especie *V. victoriae*, los aislamientos ccSL771 de proveniente de Trevelin, ccSL30 y ccSL501 de Gaiman y ccSL201 del Paralelo 42°, clasificadas en el grupo 3 al enfrentarlos a *P. crustosum* y al conservar la fruta a 0°C, mientras que bajo esas mismas condiciones, los aislamientos ccSL993 y ccSL703 de Trevelin y ccSL964 y ccSL427 del Paralelo 42° se clasificaron en el grupo 2 y NPCC1263 de Neuquén, ccSL305 de Gaiman y ccSL1109 del Paralelo 42° en el grupo 1 (Anexo 4).



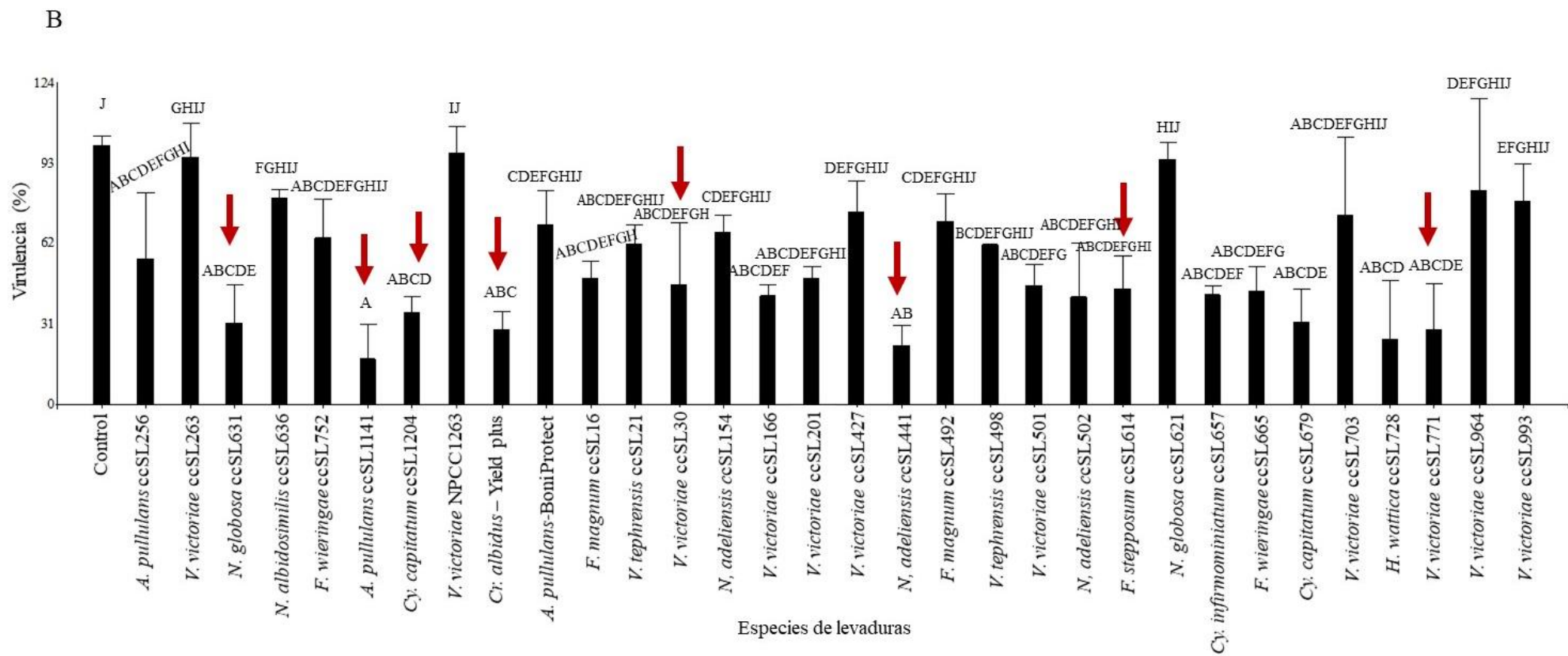
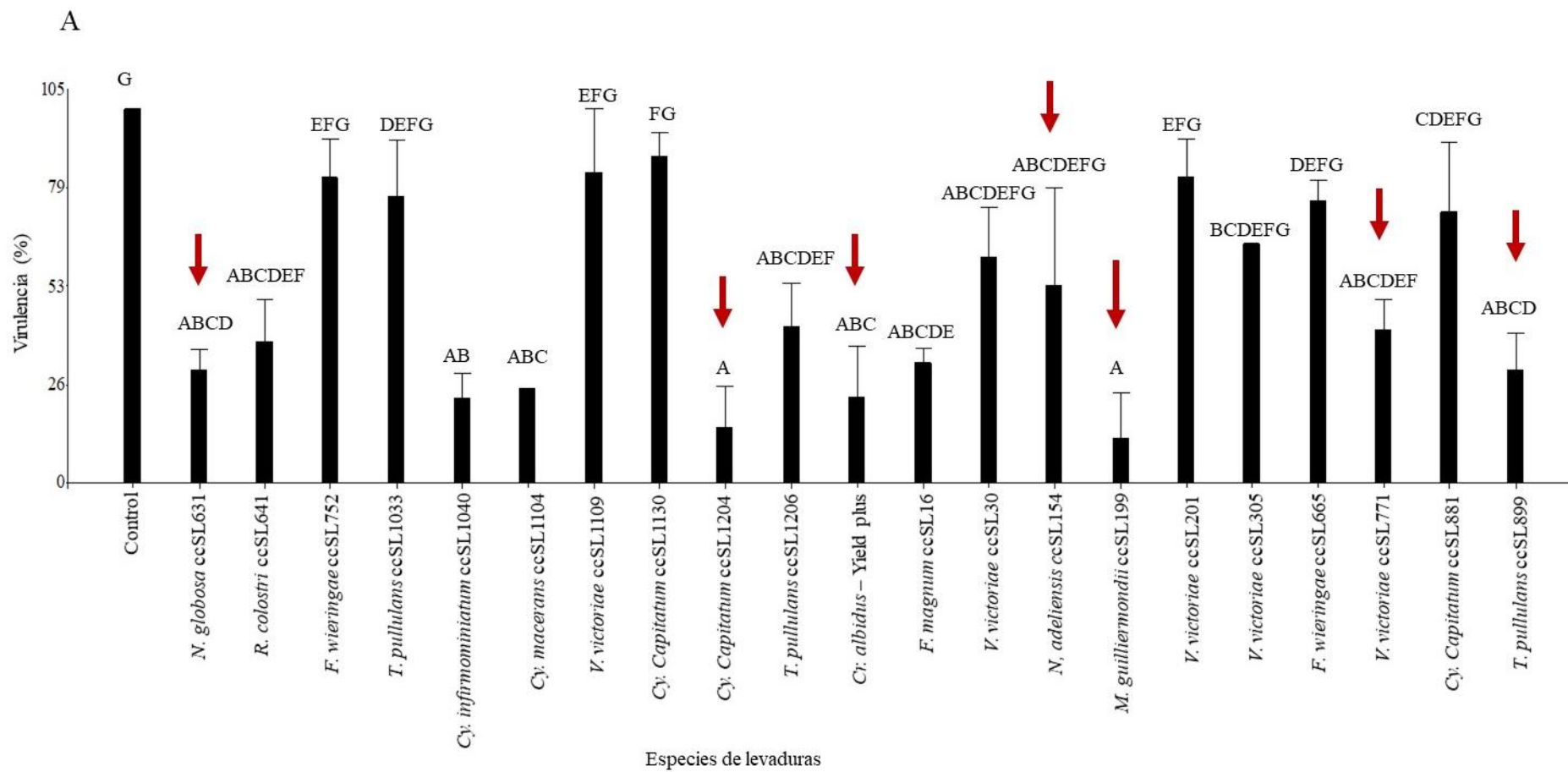


Figura 27. Virulencia ocasionada por *Penicillium crustosum* cuando se enfrentó a diferentes levaduras a A) temperatura de comercialización (22°C) y B) temperatura de almacenamiento (0°C). Las flechas rojas señalan a las levaduras consideradas con mayor potencial biocontrolador. Letras iguales sobre las barras indican que no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test Kruskal Wallis ( $P \geq 0.05$ ).



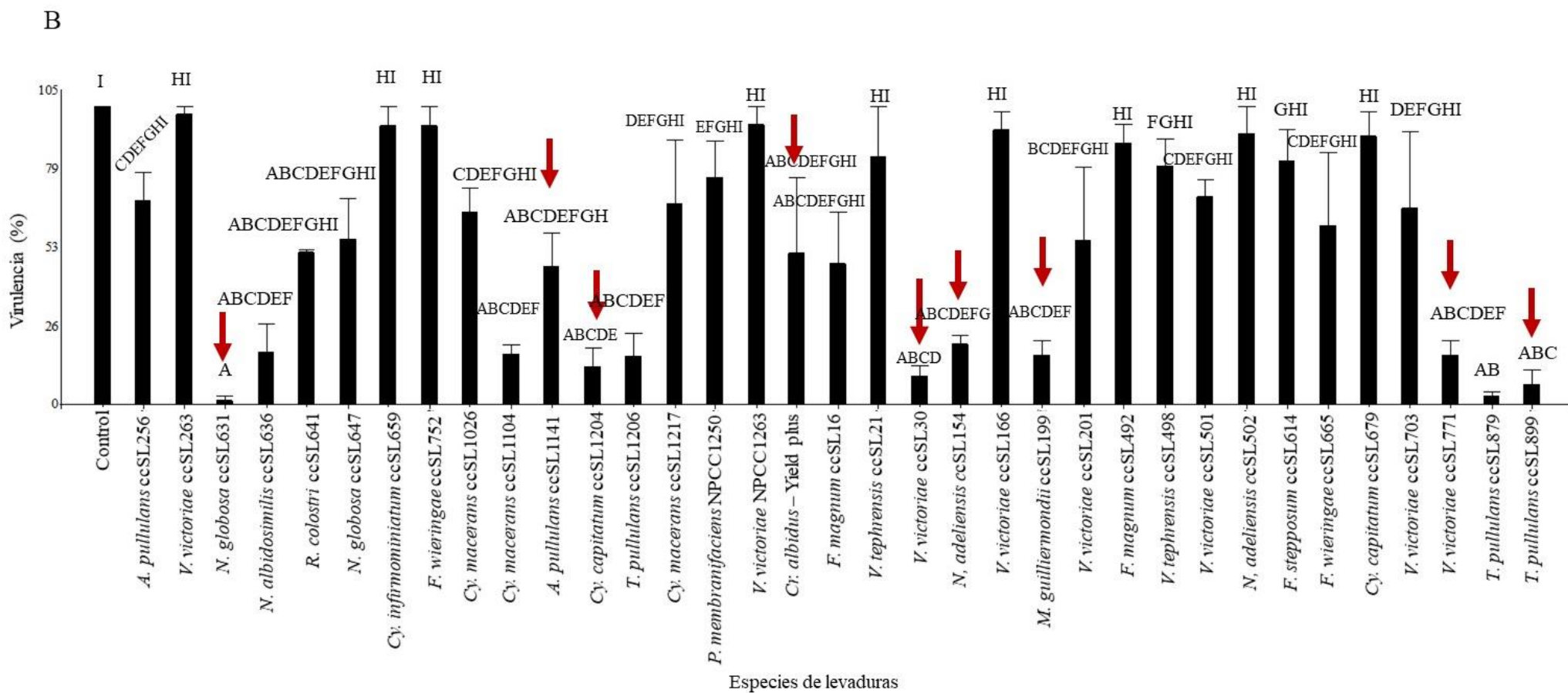


Figura 28. Virulencia ocasionada por *Mucor piriformis* cuando se enfrentó a diferentes levaduras a, A) temperatura de comercialización (22°C) y B) temperatura de almacenamiento (0°C). Las flechas rojas señalan a las levaduras consideradas con mayor potencial biocontrolador. Letras iguales sobre las barras indican que no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test Kruskal Wallis ( $P \geq 0.05$ ).



Figura 29. Ensayos de biocontrol sobre *Cherries* conservadas a temperatura ambiente: A) cerezas inoculadas con *P. crustosum* ccCIEFAP491 (control positivo), B) cerezas inoculadas con *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491, C) cerezas inoculadas con agua (control negativo); D) *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 (control positivo), E) cerezas inoculadas con *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199 y *Mucor piriformis* ccCIEFAP501, F) cerezas inoculadas con agua (control negativo).

## 1.2. Biocontrol en frambuesas y zarzamoras

### 1.2.1 Ensayos de biocontrol con inoculación de patógenos

Se probó la capacidad biocontroladora sobre los patógenos seleccionados en el Capítulo 1 (*Mucor piriformis* y *Penicillium crustosum*), de trece aislamientos levaduras nativas aisladas a partir de frambuesas y zarzamoras, (*Aureobasidium pullulans* ccSL256, *Naganishia albidosimilis* ccSL636, *Naganishia antarcticus* ccSL619, *Filobasidium stepposum* ccSL614, *Vishniacozyma victoriae* ccSL201, *Holtermanniella wattica* ccSL728, *Filobasidium wieringae* ccSL665, *Cystofilobasidium capitatum* ccSL679, *Cystofilobasidium infirmominiatum* ccSL657, *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199, *Naganishia globosa* ccSL631, *Rhodospodiobolus colostri* ccSL646, *Curvibasidium cygneicollum* ccSL645), de 2 levaduras nativas eficaces sobre los patógenos de cerezas (*Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204), de 2 levaduras comerciales (Yield Plus y Boni Protect), y de 2 levaduras biocontroladoras probadas frente a patógenos de pera (NPCC1250 *Pichia membranifaciens* y NPCC1263

*Vishniacozyma victoriae*). Los resultados de este ensayo no mostraron efecto biocontrolador de las levaduras sobre el desarrollo de los hongos, además mostraron que la fruta al ser dejada durante 7 días a 22°C se degrada rápidamente de manera que no se puede apreciar el efecto de los diferentes tratamientos probados y que la fruta contiene una carga natural de patógenos diferente a los inoculados. Esto puede observarse en la Figura 30, donde por ejemplo en 30A donde se inoculó *P. crustosum*, se desarrolló naturalmente *M. piriformis*. Por este motivo, se definió rediseñar el ensayo para evaluar infección natural como se muestra en el punto siguiente.

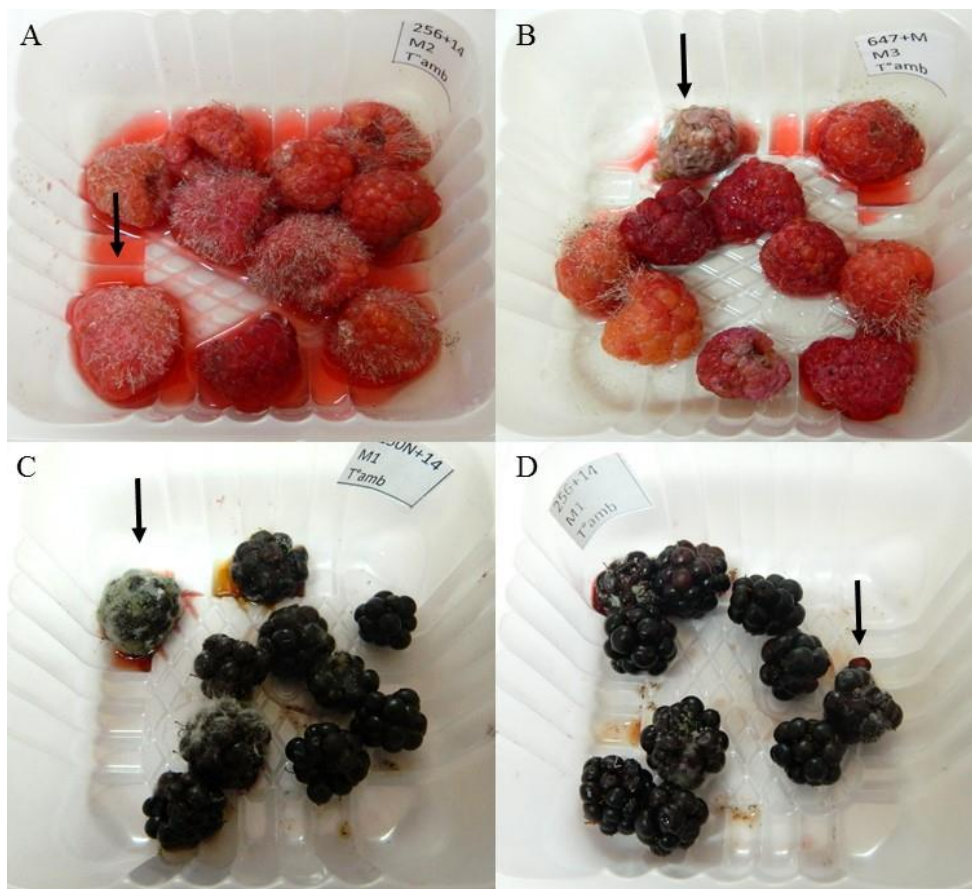


Figura 30. Ensayos de biocontrol sobre Berries A) frambuesas inoculadas con *Aureobasidium pullulans* SL256 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491, infectadas naturalmente con *Mucor piriformis* (se indica con la flecha negra); B) frambuesas inoculadas con ccSL647 y *Mucor piriformis* ccCIEFAP501, infectadas naturalmente con *Penicillium crustosum* (se indica con la flecha negra); C) zarzamoras inoculadas con NPCC1250 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491 infectadas naturalmente *Botrytis cinerea* (se indica con la flecha negra); D) zarzamoras inoculadas con *Aureobasidium pullulans* ccSL256 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491, infectadas naturalmente con *Mucor piriformis* (se indica con la flecha negra).

### 1.2.2 Ensayos de biocontrol sin inoculación de patógenos: infección natural

Sobre frambuesas y zarzamoras sanas se evaluó la capacidad biocontroladora de las mismas levaduras detalladas en la sección anterior. Los resultados del biocontrol con la aplicación de las levaduras se muestran en la Tabla 8.

Los resultados de este ensayo muestran que más del 70% de las frambuesas y zarzamoras trae una carga natural de patógenos capaces de desarrollarse cuando la fruta se encuentra a 8°C (temperatura de heladera). Mientras que, cuando la fruta se encuentra a 0°C los patógenos son capaces de desarrollarse en el 50% de la fruta. Dichos patógenos, fueron identificados morfológica y molecularmente como *Mucor piriformis*, *Penicillium crustosum* y *Botrytis cinerea*.

En la Tabla 8 se puede observar que, el 76.4% (13) y el 64.7% (11) de los aislamientos presentaron diferencias significativas con respecto al control cuando se aplicaron en frambuesas que se conservaron a 8°C y a 0°C, respectivamente. Cuando las levaduras se aplicaron en zarzamoras, el 35.3% (6) y el 11.76% (2) de los aislamientos presentaron diferencias significativas con respecto al control cuando se aplicaron en frambuesas que se conservaron a 8°C y a 0°C, respectivamente. Incluso en presencia de 3 levaduras nativas y 1 comercial (*Rhodosporidiobolus colostri* ccSL646, *Filobasidium wieringae* ccSL665, *Holtermanniella wattica* ccSL728 y *Cryptococcus albidus* Yield Plus) no hubo desarrollo de patógenos en ninguna de las dos temperaturas (Figura 31).

En presencia de las levaduras comerciales Boni Protect y Yield Plus y las levaduras biocontroladoras de los patógenos de pera, el desarrollo de patógenos en frambuesas, tanto a 8°C como a 0°C, fue igual o menor al 10%.

Por su parte, para las zarzamoras, la incidencia natural de patógenos en ausencia de las levaduras (control) en estas frutas fue el 6 y el 10% más alto que en frambuesas, a 0°C y a 8°C, respectivamente.

No hubo incidencia en estas frutas, en presencia de las levaduras *Rhodosporidiobolus colostri* ccSL646 y *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 cuando la fruta se conservó a 8°C y en presencia de *Vishniacozyma victoriae* ccSL201 cuando se almacenó a 0°C. La incidencia fue menor al 10% en presencia de *Curvibasidium cygneicollum* ccSL645 a 0°C. En comparación con lo ocurrido con las frambuesas, la incidencia de enfermedades en zarzamoras fue menor, a ambas temperaturas en fruta inoculada con *Aureobasidium pullulans* ccSL256 y *V. victoriae* ccSL201, pero las diferencias no fueron significativas



(Figura 32).

Tanto en frambuesas como en zarzamoras, el desarrollo de patógenos fue igual a cero en presencia de las levaduras *A. pullulans* ccSL1141 (aislada de cerezas) y *Rhodospordiobolus colostri* ccSL646 (aislada de zarzamora) cuando la temperatura de conservación fue de 8°C (Tabla 8 y Figura 32).

Tabla 8. Incidencia de las enfermedades causadas por patógenos desarrollados naturalmente en frambuesas y zarzamoras inoculadas con levaduras

Levadura	Incidencia (%) en frambuesas		Incidencia (%) en zarzamoras	
	T 8°C	T 0°C	T 8°C	T 0°C
<i>Aureobasidium pullulans</i> * ccSL256	30±17.3 ABC	63.3±21.8 c	26.6±6.6 A	30±0 abc
<i>Naganishia albidosimilis</i> ccSL636	13.3±13.3 AB	30±5.7 abc	43.3±12 ABCD	30±0 abc
<i>Naganishia antarcticus</i> ccSL619	3.3±3.3 A	13.3±8.8 ab	53.3±6.6 ABCD	36.6±3.3 abcd
<i>Filobasidium stepposum</i> ccSL614	30±15.2 ABC	20±10 ab	36.6±3.3 ABCD	20±5.7 abc
<i>Vishniacozyma victoriae</i> ccSL201	33.3±12 ABC	10±10 ab	26.6±3.3 A	0 a
<i>Holtermanniella wattica</i> ccSL728	0 A	0 a	46.6±12 ABCD	33.3±12 abcd
<i>Filobasidium wieringae</i> ccSL665	0 A	0 a	46.6±6.6 ABCD	30±5.7 abc
<i>Cystofilobasidium capitatum</i> ccSL679	13.3±6.6 AB	0 a	43.3±3.3 ABCD	36.6±3.3 abcd
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> ccSL657	60±5.7 BC	6.6±6.6 a	36.6±18.5 ABCD	33.3±3.3 abcd
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ccSL199	23.3±14.5 AB	4.3±2.9 a	56.6±18.5 ABCD	13.3±8.8 ab
<i>Naganishia globosa</i> ccSL631	30±11.5 ABC	3.3±3.3 a	66.6±8.8 BCD	43.3±12 abcd
<i>Rhodospordiobolus colostri</i> ccSL646	0 A	0 a	0 A	43.3±3.3 abcd
<i>Curvibasidium cygneicollum</i> ccSL645	40±11.5 ABC	0 a	46.6±8.8 ABCD	6.6±3.3 b
<i>Aureobasidium pullulans</i> * ccSL1141	0 A	50±10 bc	0 A	60±11.5 cd
<i>Cystofilobasidium capitatum</i> ccSL1204	13.3±8.8 AB	23.3±6.6 abc	13.3±3.3 AB	23.3±3.3 abc
<i>Pichia membranifaciens</i> NPCC1250	3.3±3.3 A	0 a	43.3±12 ABCD	36.6±17.6 abcd
<i>Vishniacozyma victoriae</i> NPCC1263	0 A	10±10 ab	60±5.7 BCD	63.3±13.3 cd
BP <i>Aureobasidium pullulans</i>	3.3±3.3 A	6.6±6.6 a	20±3.3 ABC	63.3±3.3 cd
YP <i>Cryptococcus albidus</i>	0 A	0 a	76.6±12 CD	76.6±12 d
Control	73.3±3.3 C	50±5.7 bc	83.3±16.6 D	56.6±3.3 bcd

T= temperatura. \*=Yeast-like. BP= Boni Protect. YP=Yield Plus. Los análisis estadísticos se realizaron por temperatura no entre ellas (letras en mayúsculas indican los análisis para 8°C y en minúscula para 0°C). Letras iguales en la misma columna indican que no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test Kruskal Wallis ( $P \geq 0.05$ ).

En este ensayo también pudo observarse que diferentes aislamientos de la misma especie

tuvieron diferentes capacidades para enfrentar a los patógenos. Esto puede observarse entre los aislamientos *Cystofilobasidium capitatum* ccSL679 proveniente del Paralelo 42° y ccSL1204 proveniente de Trevelin (Tabla 8 y Figura 32).

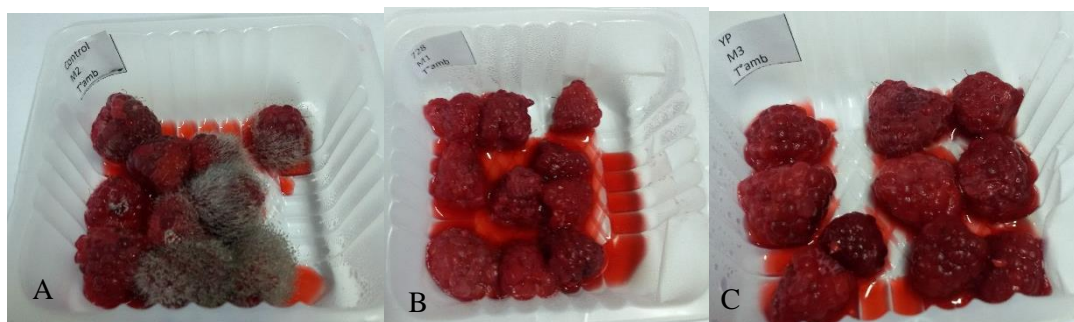


Figura 31. Ensayo de biocontrol sobre infección natural de patógenos de poscosecha de *Berries* conservadas a 8°C: A) frambuesas sin inocular (control positivo), B) frambuesas inoculadas con *H. wattica* ccSL728, C) frambuesas inoculadas con Yield Plus.

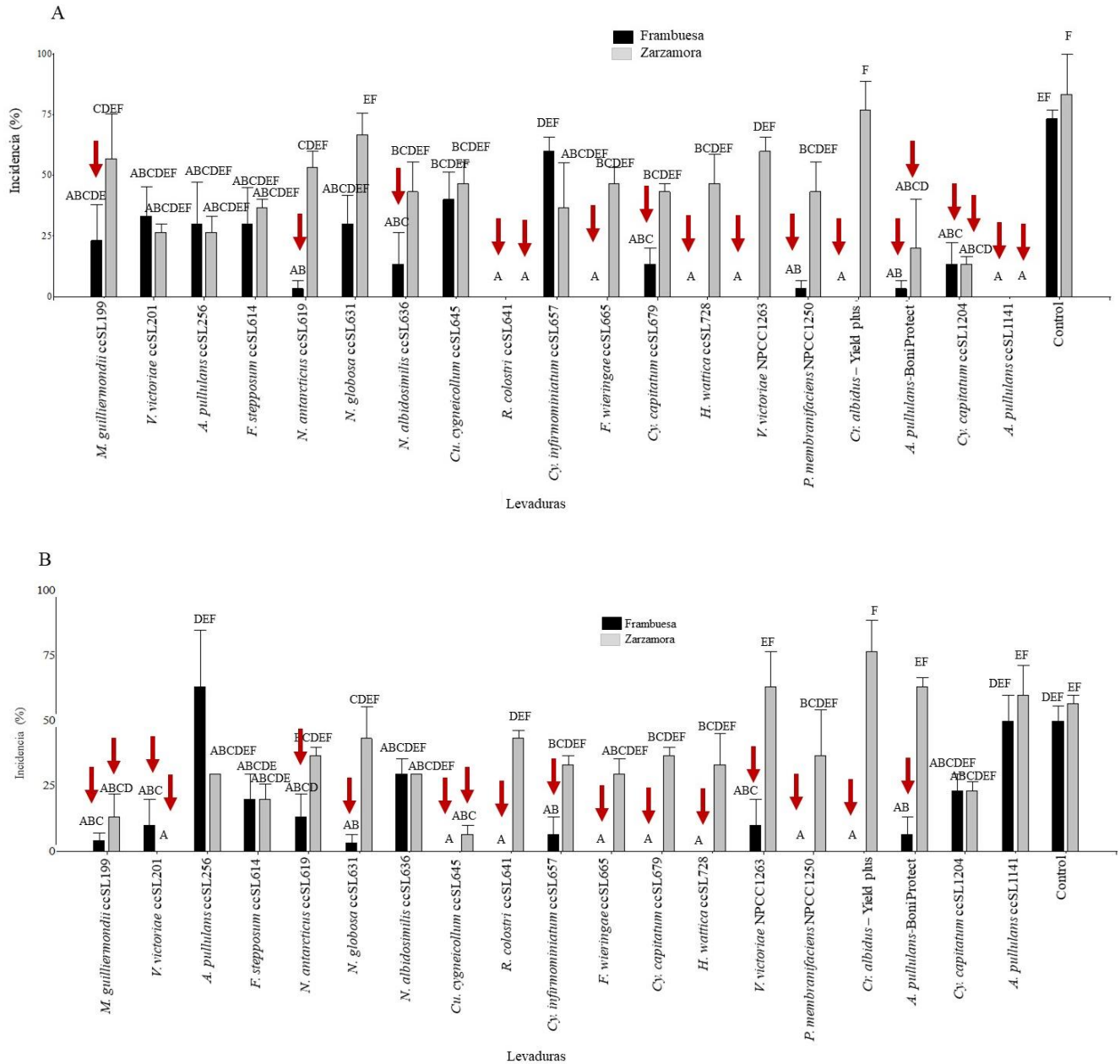


Figura 32. Comparación de la infección natural de patógenos en frambuesas y zarzamoras inoculadas con levaduras conservadas a dos temperaturas A) 8°C y B) 0°C. Las flechas rojas señalan a las levaduras consideradas con mayor potencial biocontrolador. Letras iguales sobre las barras indican que no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test Kruskal Wallis ( $P \geq 0.05$ ).

## 2. Combinación de levaduras: Co-inoculación en cerezas

Se realizaron mezclas con 11 levaduras de a pares resultando en 55 combinaciones. Las levaduras utilizadas para realizar las combinaciones fueron 10 nativas, *Vishniacozyma*

*victoriae* ccSL30, *N. adeliensis* ccSL154, *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199, *N. adeliensis* ccSL441, *Filobasidium stepposum* ccSL614, *Naganishia globosa* ccSL631, *V. victoriae* ccSL771, *Guehomyces pullulans* ccSL899, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141, *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 y una comercial, *Cryptococcus albidus*, Yield Plus. Las mismas fueron seleccionadas sobre las que mostraron previamente capacidad biocontroladora en el ensayo de biocontrol en cerezas sobre *Penicillium crustosum* y *Mucor piriformis* (Punto 1 de Resultados).

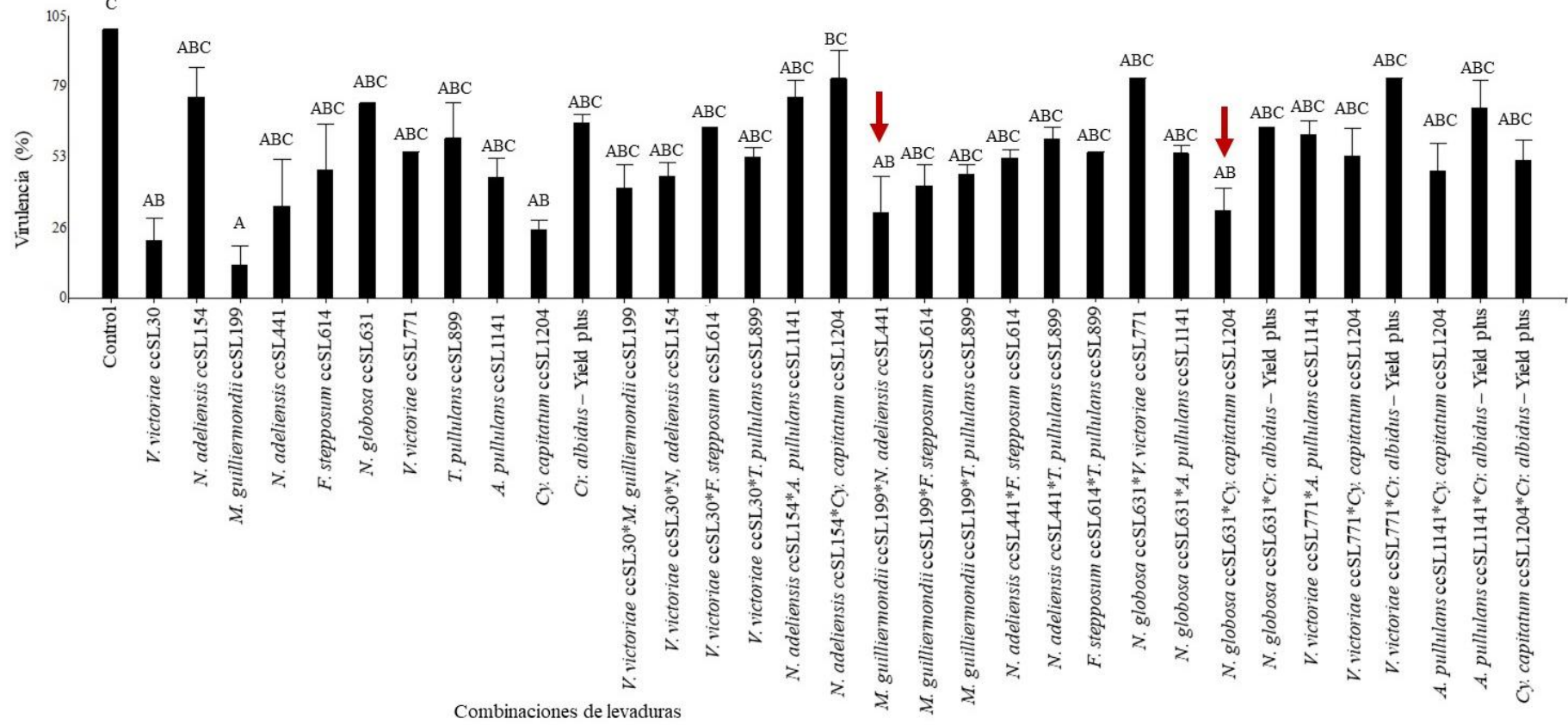
En la mayoría de los casos, el porcentaje experimental obtenido de las distintas combinaciones de levaduras fue menor que el Ee (Tabla 9)

Por la cantidad de datos obtenidos, para mayor claridad, los gráficos (Figuras 33 y 34) solo muestran los datos de aquellas combinaciones de levaduras en las que la virulencia fue menor a 100%.

Para *Penicillium crustosum* a 22°C (temperatura de comercialización) las combinaciones de levaduras a través de las que se obtuvieron una menor virulencia fueron *M. guilliermondii* ccSL199\**N. adeliensis* ccSL441 y *N. globosa* ccSL631\**Cy. capitatum* ccSL1204, tal como se puede observar en la Tabla 9 y la Figura 33A. Para la primera combinación, el efecto obtenido fue de 13.3%, menor al Ee que era de 66.6%. Para la segunda combinación, el efecto experimental observado fue del 30% mientras que el efecto esperado era del 6.6% (Tabla 9). Es importante resaltar que los resultados obtenidos con estas combinaciones de levaduras no mostraron una acción significativamente mayor frente a *P. crustosum* que la que mostraron las levaduras *Cy. capitatum* ccSL1204 y *M. guilliermondii* ccSL199 por separado (Figura 33A).

Al conservar las frutas inoculadas a temperatura de almacenamiento (0°C) las combinaciones de levaduras que mostraron menor virulencia fueron *V. victoriae* ccSL30\**F. stepposum* ccSL614, *M. guilliermondii* ccSL199\* *F. stepposum* ccSL614, *M. guilliermondii* ccSL199\**T. pullulans* ccSL899 y *F. stepposum* ccSL614\**T. pullulans* ccSL899 (Figura 33B). Ninguna estas combinaciones tuvieron un efecto observado mayor al Ee al enfrentarlas a *P. crustosum* (Tabla 9). Los efectos de estas combinaciones de levaduras no fueron significativamente mayores frente a *P. crustosum* que la que mostraron las levaduras por separado (Figura 33B).

A



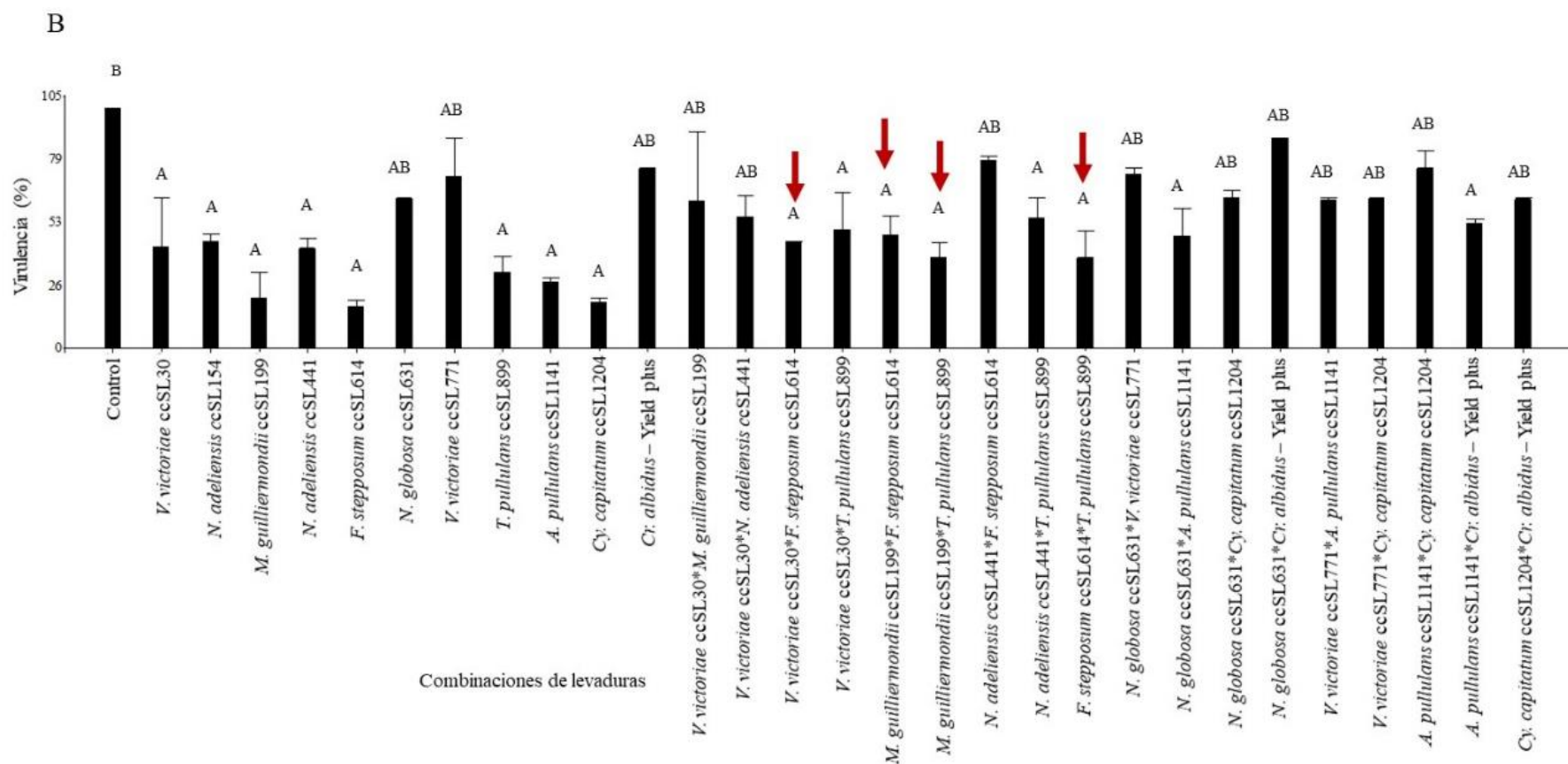
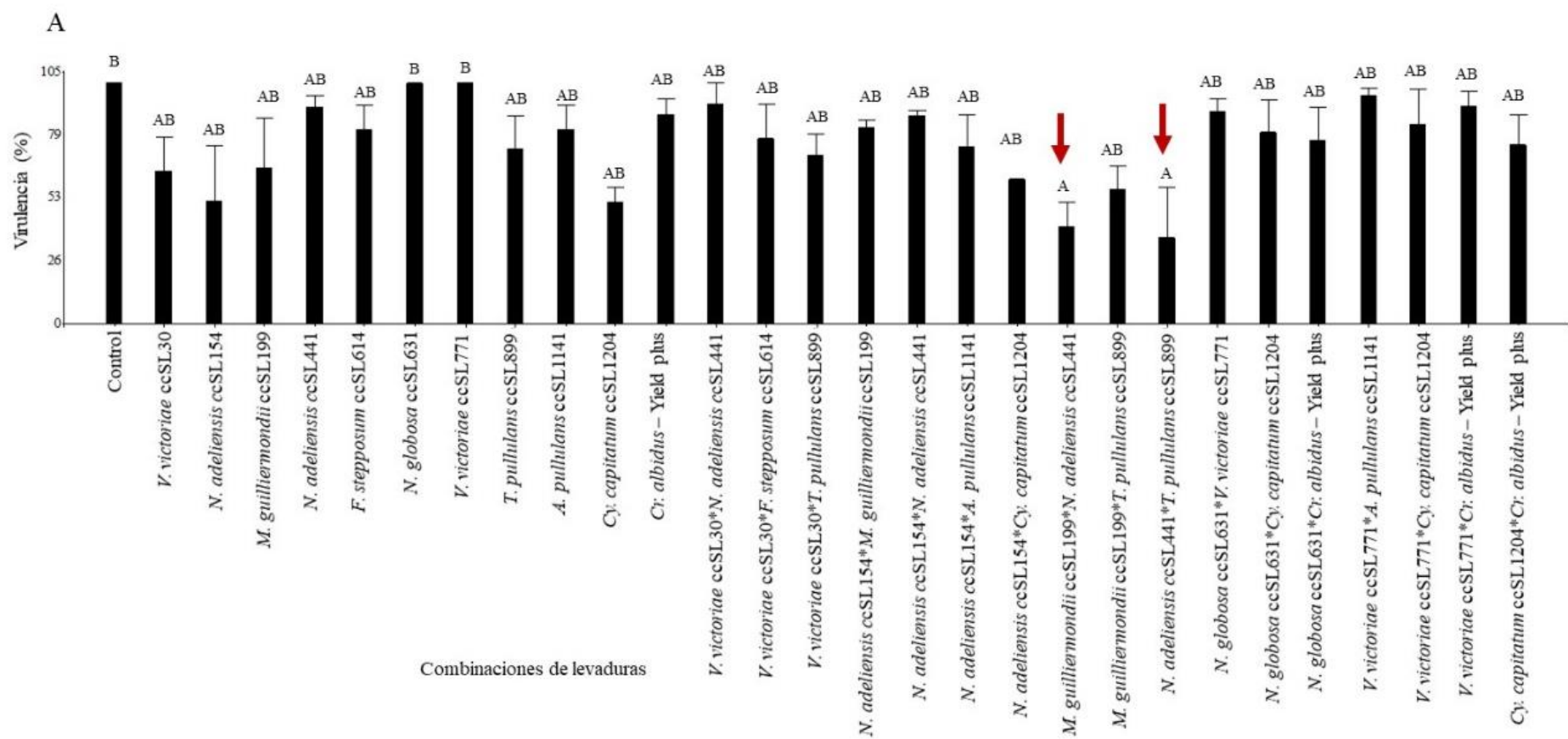


Figura 33. Virulencia en fruta conservada A) a 22°C y B) a 0°C, inoculada con diferentes combinaciones de levaduras y *P. crustosum*. Las flechas rojas señalan las combinaciones de levaduras con mayor potencial biocontrolador. Letras iguales sobre las barras indican que no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test Kruskal Wallis ( $P \geq 0.05$ ).



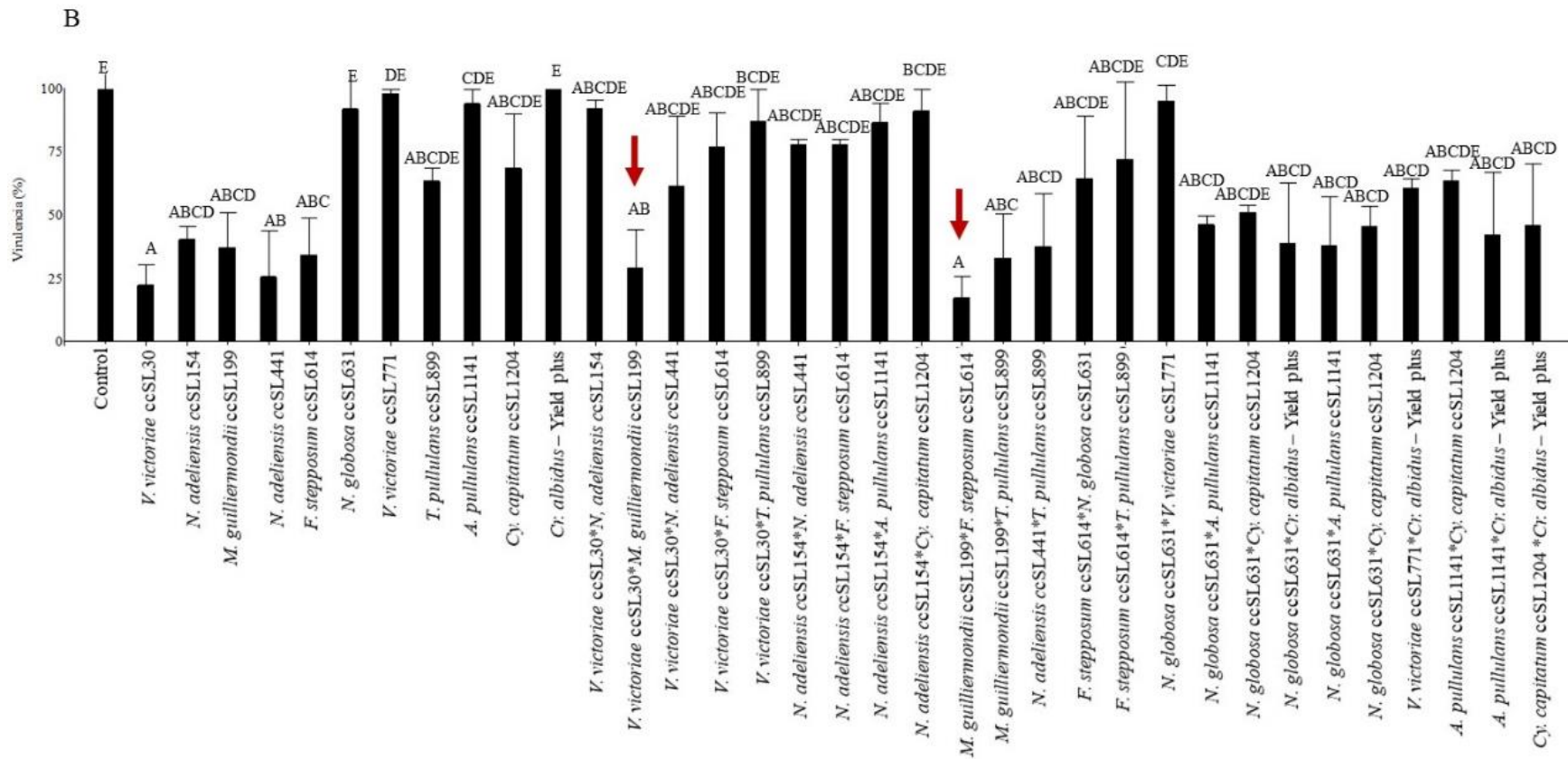


Figura 34. Virulencia en fruta conservada A) a 22°C y B) a 0°C, inoculada con diferentes combinaciones de levaduras y *M. piriformis*. Las flechas rojas señalan las combinaciones de levaduras con mayor potencial biocontrolador. Letras iguales sobre las barras indican que no son estadísticamente diferentes de acuerdo al Test Kruskal Wallis ( $P \geq 0.05$ ).



Cuando la fruta inoculada se mantuvo temperatura de comercialización (22°C), pero las combinaciones se enfrentaron a *M. piriformis*, las que redujeron en mayor medida la virulencia fueron *M. guilliermondii* ccSL199\**N. adeliensis* ccSL441 y *N. adeliensis* ccSL441\**T. pullulans* ccSL899. Los resultados de estas combinaciones fueron mejores que los obtenidos con las levaduras por separado, pero las diferencias no fueron significativas (Figura 34A). Los efectos obtenidos con *M. guilliermondii* ccSL199\**N. adeliensis* ccSL441, 36.6%, y *N. adeliensis* ccSL441\**T. pullulans* ccSL899, 26.6%, fueron mayores que los esperados, 20 y 13.3% respectivamente (Tabla 9).

En cambio, cuando las mezclas de levaduras se enfrentaron a *M. piriformis*, pero la fruta se mantuvo a temperatura de almacenamiento (0°C), las mejores combinaciones fueron las de *V. victoriae* ccSL30\**M. guilliermondii* ccSL199 y *M. guilliermondii* ccSL199\**F. stepposum* ccSL614. La segunda fue la que mostró una menor virulencia en la fruta inoculada (Figura 34B) y los resultados obtenidos con esta combinación fueron mejores que los obtenidos con las levaduras por separado, aunque las diferencias no fueron significativas. Además, el efecto experimental observado de la combinación *M. guilliermondii* ccSL199\**F. stepposum* ccSL614, fue de 66.6%, mayor al Ee (que era del 59.98%) (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto antagónico de distintas levaduras combinadas en sobre la virulencia de *P. crustosum* y *M. piriformis* a dos temperaturas diferentes.

Tratamiento	<i>Penicillium crustosum</i>						<i>Mucor piriformis</i>					
	22°C			0°C			22°C			0°C		
	C (%)	Ee	V (%)	C (%)	Ee	V (%)	C (%)	Ee	V (%)	C (%)	Ee	V (%)
CONTROL	0		100±0			100±0			100±0			100±0
<i>V. victoriae</i> ccSL30	26.66		21.15±15.14	60		42±35.51	13.3		66.83±29.88	60		22.15±14.92
<i>N. adeliensis</i> ccSL154	0		75.09±18.75	6.66		44.25±6.18	6.6		51±39.77	10		40.67±8.08
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	60		12±13.23	36.6		20.75±19.23	20		65.06±36.08	33.3		37.33±23.75
<i>N. adeliensis</i> ccSL441	13.3		34.61±29.95	0		41.67±7.22	0		90±8.66	43.3		25.64±31.16
<i>F. stepposum</i> ccSL614	13.33		47.83±29.9	36.6		17.25±4.68	6.6		80.5±18.19	40		34.46±25.43
<i>N. globosa</i> ccSL631	0		72.73±0	0		62.5±0	0		100±0	0		92.31±53.29
<i>A. pullulans</i> ccSL771	0		54.55±0	6.6		71.67±27.42	0		100±0	0		98.46±2.66
<i>T. pullulans</i> ccSL899	6.66		59.64±22.67	0		31.67±11.55	13.3		72.67±24.19	0		63.59±8.88
<i>A. pullulans</i> ccSL1141	0		45±12.46	0		27.92±2.82	3.3		81.08±17.65	10		94.36±9.77
<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	6,66		25.52±6.43	0		19.17±3.15	3.3		50.17±1196	13.3		68.76±36.66
Yield Plus	0		65.15±5.91	0		75.0±0	6.6		87.33±1	0		100±0
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>N. adeliensis</i> ccSL154	0	26.66	100±0	0	62.64	100±0	0	18.14	100±0	0	64	100±0
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>M. guilliermondii</i> ccSL199	10	70.66	40.86±15.25	10	58	61.25±50.36	0	30.64	100±0	40	73.32	29.33±25.7
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>N. adeliensis</i> ccSL 441	10	38.87	45.27±8.78	0	30	54.58±14.81	0	13.3	91.67±14.43	16.66	77.32	61.54±48.04
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>F. stepposum</i> ccSL614	0	36.43	63.64±0	0	58	43.75±1.25	13.3	19.02	77.02±25.21	0	76	77.44±22.31
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>N. globosa</i> ccSL631	0	26.66	100±0	0	30	100±0	0	13.3	100±0	0	60	100±0

<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>A. pullulans</i> ccSL771	0	26.66	100±0	0	34.62	100±0	0	13.3	100±0	0	60	100±0
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>T. pullulans</i> ccSL899	3.33	31.54	52.82±5.2	20	30	49.58±26.53	6.6	24.83	70.33±14.50	0	60	87.18±22.21
<i>V. victoriae</i> ccSL 30* <i>A. pullulans</i> ccSL1141	0	26.66	100±0	0	30	100±0	0	16.16	100±0	0	64	100±0
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	0	31.54	100±0	0	30	100±0	0	16.16	100±0	0	65.32	100±0
<i>V. victoriae</i> ccSL30* <i>Yield Plus</i>	0	26.66	100±0	0	30	100±0	0	19.02	100±0	0	60	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>M. guilliermondii</i> ccSL199	0	60	100±0	0	40.78	100±0	3.3	25.28	81.83±5.48	0	39.97	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>N. adeliensis</i> ccSL441	0	13.3	100±0	0	6.6	100±0	6.6	6.6	86.67±3.82	6.6	48.97	85.7±10.8
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>F. stepposum</i> ccSL614	0	13.3	100±0	0	40.76	100±0	0	12.76	100±0	6.6	46	77.95±3.55
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>N. globosa</i> ccSL631	0	0	100±0	0	6.6	100±0	0	6.6	100±0	0	10	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>A. pullulans</i> ccSL771	0	0	100±0	0	12.76	100±0	0	6.6	100±0	0	10	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>T. pullulans</i> ccSL899	0	6.6	100±0	0	6.6	100±0	0	19.02	100±0	0	10	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>A. pullulans</i> ccSL1141	6.6	0	75.15±10.01	0	6.6	100±0	10	9.68	73.67±23.46	3.3	10	86.67±13.08
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	6.6	6.6	81.82±18.18	0	6.6	100±0	6.6	9.68	86.67±23.09	3.3	21.97	91.28±15.10
<i>N. adeliensis</i> ccSL154* <i>Yield Plus</i>	0	0	100±0	0	6.6	100±0	0	12.76	100±0	0		100±0
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199* <i>N. adeliensis</i> ccSL441	13.33	66.66	32.64±13.64	0	40	53.33±17.74	36.6	20	36.42±13.29	23.3	62.18	65.74±49.80
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199- <i>F. stepposum</i> ccSL614	10	65.33	41.94±13.24	10	64	47.38±13.68	0	25.28	100±0	66.6	59.98	17.23±14.92
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199- <i>N. globosa</i> ccSL631	0	60	100±0	0	40	100±0	0	20	100±0	0	33.3	100±0
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199- <i>A. pullulans</i> ccSL771	0	60	100±0	0	43.96	100±0	0	20	100±0	0	33.3	100±0
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199- <i>T. pullulans</i> ccSL899	6.66	62.66	46.18±5.71	6.66	40	37.67±10.69	0	30.64	55.83±17.02	13.3	33.3	33.03±30.65
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199- <i>A. pullulans</i> ccSL1141	0	60	100±0	0	0	100±0	0	22.64	100±0	0	39.97	100±0
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199- <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	0	62.66	100±0	0	40	100±0	0	22.64	100±0	0	42.17	100±0
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199- <i>Yield Plus</i>	0	60	100±0	0	40	100±0	0	25.28	100±0	0	33.3	100±0

<i>N. adeliensis</i> ccSL441- <i>F. stepposum</i> ccSL614	0	27.76	52.12±5.84	0	40	77.92±3.15	0	6.6	100±0	0	65.98	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL441- <i>N. globosa</i> ccSL631	0	16.66	100±0	0	0	100±0	0	0	100±0	0	43.3	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL441- <i>A. pullulans</i> ccSL771	0	16.66	100±0	0	6.6	100±0	0	0	100±0	0	43.3	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL441- <i>T. pullulans</i> ccSL899	0	22.21	59.39±7.35	0	0	54.17±14.43	26.6	13.3	35.67±36.12	20	43.3	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL441- <i>A. pullulans</i> ccSL1141	0	16.66	100±0	0	40	100±0	0	3.3	100±0	0	48.97	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL441- <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	0	22.21	100±0	0	0	100±0	0	3.3	100±0	0	50.84	100±0
<i>N. adeliensis</i> ccSL441-Yield Plus	0	16.66	100±0	0	0	100±0	0	6.6	100±0	0	43.3	100±0
<i>F. stepposum</i> ccSL614- <i>N. globosa</i> ccSL631	0	13.33	100±0	0	40	100±0	0	6.6	100±0	0	40	64.51±43.06
<i>F. stepposum</i> ccSL614- <i>A. pullulans</i> ccSL771	0	13.33	100±0	0	43.96	100±0	0	6.6	100±0	0	40	100±0
<i>F. stepposum</i> ccSL614- <i>T. pullulans</i> ccSL899	0	19.1	54.55±0	10	40	100±0	0	19.02	100±0	13.3	40	72.21±53.39
<i>F. stepposum</i> ccSL614- <i>A. pullulans</i> ccSL1141	0	13.33	100±0	0	30	100±0	0	9.68	100±0	0	46	100±0
<i>F. stepposum</i> ccSL614- <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	0	19.1	100±0	0	40	100±0	0	9.68	100±0	0	47.98	100±0
<i>F. stepposum</i> ccSL614-Yield Plus	0	13.33	100±0	0	40	100±0	0	12.76	100±0	0	40	100±0
<i>N. globosa</i> ccSL631- <i>A. pullulans</i> ccSL771	0	0	81.82±0	0	6.6	72.5±4.33	0	0	88.33±9.46	3.3	0	95.26±11.15
<i>N. globosa</i> ccSL631- <i>T. pullulans</i> ccSL899	0	6.66	100±0	0	0	100±0	0	13.3	100±0	0	0	100±0
<i>N. globosa</i> ccSL631- <i>A. pullulans</i> ccSL1141	0	0	63.64±0	0	0	46.98±19.11	0	3.3	100±0	16.6	10	46.15±6.4
<i>N. globosa</i> ccSL631- <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	30	6.66	32.52±14.49	0	0	62.5±6.25	6.6	3.3	79.67±23.46	0	13.3	51.28±4.7
<i>N. globosa</i> ccSL631-Yield Plus	0	0	63.64±0	0	0	87.5±0	10	6.6	76.17±24	30	0	38.67±41.76
<i>A. pullulans</i> ccSL771- <i>T. pullulans</i> ccSL899	0	6.66	100±0	0	6.6	100±0	0	13.3	100±0	0	0	100±0
<i>A. pullulans</i> ccSL771-- <i>A. pullulans</i> ccSL1141	3.3	0	61.12±8.6	0	6.6	61.77±0.64	0	3.3	95±5	26.6	10	37.95±33.95
<i>A. pullulans</i> ccSL771- <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	0	6.66	53.18±17.27	0	6.6	62.5±0	3.3	3.3	83±25.24	6.6	13.3	45.25±14.63
<i>A. pullulans</i> ccSL771-Yield Plus	0	0	81.82±0	0	6.6	100±0	3.3	6.6	90.42±10.78	6.6	0	60.92±6.06

<i>T. pullulans</i> ccSL899- <i>A. pullulans</i> ccSL1141	0	6.66	100±0	0	0	100±0	0	16.16	100±0	0	10	100±0
<i>T. pullulans</i> ccSL899- <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	0	12.87	100±0	0	0	100±0	0	16.16	100±0	0	13.3	100±0
<i>T. pullulans</i> ccSL899-Yield Plus	0	6.66	100±0	0	0	100±0	0	19.46	100±0	0	0	100±0
<i>A. pullulans</i> ccSL1141- <i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	0	6.66	47.58±17.70	0	0	75±12.5	0	6.49	100±0	0	21.97	63.59±7.1
<i>A. pullulans</i> ccSL1141-Yield Plus	0	0	70.91±17.34	0	0	51.88±3.25	0	9.68	100±0	26.6	10	41.95±43.64
<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204-Yield Plus	6.66	6.66	51.27±13.23	0	0	61.96±0.64	10	9.68	74.5±21.98	23.6	13.3	46.05±41.78

C (%): control 100% - % I.; V: Virulencia; Ee: Efecto esperado, calculado de acuerdo a la formula detallada en métodos. 22°C: temperatura de comercialización. 0°C: temperatura de almacenamiento. ±: desvío estándar

## DISCUSIÓN

En esta Tesis se evaluó la eficacia biocontroladora de levaduras a dos temperaturas en las que se encuentra la fruta desde la cosecha hasta el consumo. A partir de esta evaluación se seleccionaron diez aislamientos nativos consideraron como los más prometedores para el control de los patógenos de poscosecha *P. crustosum* ccCIEFAP491 y *M. piriformis* ccCIEFAP501: *Naganishia adeliensis* ccSL154 y ccSL441, *Vishniacozyma victoriae* ccSL30 y ccSL771, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141, *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204, *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199, *Naganishia globosa* ccSL631, *Filobasidium stepposum* ccSL614, *Tausonia pullulans* ccSL899.

En los ensayos *in vivo* de cerezas, se probaron 56 levaduras frente a los patógenos de poscosecha *Penicillium crustosum* y *Mucor piriformis*, 52 de esos aislamientos se obtuvieron a partir de fruta de los sitios de estudio, mientras que dos corresponden a levaduras biocontroladoras comerciales y dos a levaduras patentadas para el control de enfermedades de pera en Neuquén. Los resultados de estos ensayos de biocontrol obtenidos en esta Tesis indican que existen aislamientos de levaduras nativos capaces de reducir el crecimiento de *P. crustosum* y *M. piriformis*, y que, además, existen levaduras presentes naturalmente en la fruta de la región con potencial biocontrolador que pueden controlar los patógenos de cereza en mayor o igual medida que las levaduras comerciales. Esto indicaría que los aislamientos nativos poseen mejor adaptación al ambiente y/o al sustrato, y que la estrategia de selección ha sido adecuada, ya que la fuente de antagonistas fueron sustratos específicos (frutos de *Cherries* y *Berries*) y las temperaturas analizadas fueron condiciones de almacenamiento (0°C) y de comercialización (22°C). Pérez et al., (2016), Grzegorzczuk et al., (2017) y Lutz et al., (2012) obtuvieron resultados similares con levaduras nativas para el control biológico de los patógenos de poscosecha *Penicillium* spp. en limones, *Monilinia* spp. en frutas de carozo y *B. cinerea* y *P. expansum* en pera, respectivamente. Entre los requisitos que deben cumplir los ACBs se incluyen que deben ser efectivos frente a un amplio rango de patógenos y sobrevivir a diferentes condiciones ambientales, como la temperatura (Barkai-Golan 2001, Liu et al., 2013). Teniendo en cuenta los efectos que tuvieron las levaduras sobre los patógenos a las temperaturas probadas, se seleccionaron diez aislamientos de levaduras nativas y una levadura comercial como las más prometedoras como potenciales agentes biocontroladores frente a una de las enfermedades regionales (*P. crustosum* o *M. piriformis*). La selección se basó en la capacidad de estos aislamientos de controlar, al menos, a

una de las enfermedades a ambas temperaturas o por su potencial para controlar ambas enfermedades, al menos, a una de las temperaturas probadas (22°C, temperatura de comercialización o 0°C, temperatura de almacenamiento). Esto da cuenta de la importancia de conocer la diversidad de levaduras y de probar agentes antagonistas nativos sobre los patógenos regionales, ya que estos mostraron mejores efectos que los antagonistas no nativos.

*Aureobasidium pullulans* es un hongo que tiene una gran plasticidad fenotípica y, dependiendo del medio ambiente, puede cambiar el crecimiento de la levadura a la forma micelial, así como el color y la morfología de la colonia (Zalar et al., 2008). Es, además, un agente de biocontrol de patógenos poscosecha de frutas reconocido en diferentes países. El interés sobre el uso de *A. pullulans* comenzó en los años '90 (Falconi y Mendgen 1994), a partir de allí ha sido muy prolifera la caracterización de cepas con potencial biocontrolador de patógenos de poscosecha, entre los cuales se ha reportado como biocontrolador de *Botrytis cinerea* y *Monilinia laxa* en cerezas (Schena et al., 2003, Ippolito et al., 2005, Mari et al., 2012). Uno de los productos llegó a comercializarse bajo el nombre de Boni Protect y se desarrolló a partir de dos cepas de *A. pullulans*, para el control de enfermedades causadas por *P. expansum*, *B. cinerea* y *Monilinia* sp. en manzanas (Weis et al., 2006). Actualmente, se siguen probando diferentes cepas de *A. pullulans* para el control del desarrollo de *Monilinia* en frutos de carozo, damasco, durazno y cereza (Di Francesco et al., 2020). En esta Tesis se probó el producto comercial antes mencionado, Boni Protect, pero no mostró poder biocontrolador sobre los patógenos de poscosecha probados en este trabajo, aportando así información nueva acerca de la acción de este producto frente a patógenos y sobre frutas diferentes para los cuales fue formulado. Una de las cepas nativas de *A. pullulans* SL1141, logró controlar el desarrollo de las enfermedades causadas por *P. crustosum* y *M. piriformis*. A diferencia de Boni Protect, *A. pullulans* SL1141, probablemente esté adaptada para sobrevivir y crecer sobre el hospedante aplicado (cerezas), en las temperaturas probadas (0°C y 22°C) pudiendo ejercer además su acción biocontroladora sobre los patógenos de poscosecha con los que se encuentra habitualmente en la naturaleza. *Vishniacozyma victoriae* ha sido aislada, identificada y caracterizada como ACB en condiciones similares a las de este trabajo en Patagonia por Lutz et al., (2012, 2013, 2020) y Gramisci et al., (2018) para el control de patógenos de poscosecha de pera. La cepa caracterizada por ese grupo de trabajo es una de las levaduras no nativas que fueron testeadas en los ensayos realizados para esta Tesis y se repitió lo reportado para *A. pullulans*, la cepa nativa *V. victoriae* ccSL30 mostró mejores resultados que la cepa NPCC1263 proveniente de Neuquén. Estos resultados refuerzan la teoría de que la mejor estrategia para el establecimiento de un programa de control biológico consiste en la utilización

de interacciones ecológicas que ya existen en la naturaleza, incluidas las interacciones entre las frutas, los microorganismos (ACB y patógenos) y los rangos de temperatura en los que deberán ejercer el efecto biocontrolador (Pimenta et al., 2009, Lutz et al., 2012).

Existen numerosos trabajos en distintos lugares del mundo en los cuales géneros de levaduras como *Cryptococcus* y *Cystofilobasidium* son utilizados como agentes de biocontrol de patógenos de poscosecha de fruta fina (Tian et al., 2004b, Qin et al., 2004, Spotts et al., 2009). *Cryptococcus sptepposus* y *Cystofilobasidium capitatum* son especies de levaduras psicrófilas, que se han sido aisladas del suelo de bosques patagónicos y *Naganishia globosa* y *Tausonia pullulans* de suelos de Antártida, que han utilizado con fines biotecnológicos por sus capacidades enzimáticas a bajas temperaturas (Nakagawa et al., 2002, Mestre et al., 2014, Libkind et al., 2016, Białkowska et al., 2017, Martorell et al., 2017, Kuddus 2018). Este trabajo aporta significativa información acerca de estas especies, ya que representa el primer registro de las mismas como potenciales agentes de biocontrol de patógenos de poscosecha en fruta.

*Meyerozyma guilliermondii* ha sido caracterizada previamente como ACB para el control de patógenos de poscosecha como *P. italicum* y *P. expansum* en cítricos y peras y *B. cinerea* y uvas (Arras et al., 1998, Lahlali et al., 2011b, Zhao et al., 2020). La especie *Naganishia adeliensis* reportada aquí con potencial para ser utilizada como ACB de patógenos de poscosecha, ha sido identificada como posible agente de control biológico de los patógenos de poscosecha *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. en rábanos (Chen et al., 2012). Este es el primer trabajo que reporta estas especies como potenciales ACB para el control de *P. crustosum* y *M. piriformis*.

Aunque es poco lo que se conoce acerca de la investigación y desarrollo de Yield Plus, basado en *Cr. albidus* (Janisiewicz y Korsten, 2002), se sabe que ha sido efectivo frente a *Botrytis*, *Penicillium* y *Mucor* en frutas de pepita (Spadaro y Droby et al., 2016). Este estudio muestra que *Cryptococcus albidus* podría ser un ACB eficaz de los patógenos de poscosecha *P. crustosum* y *M. piriformis* en cerezas.

En este trabajo se ha seguido la metodología de Qin et al., (2004) para el desarrollo de los ensayos de biocontrol, que es similar a la utilizada en una gran variedad de trabajos, la que consiste en provocar una herida en la fruta para luego inocular los microorganismos a testear. Las pruebas realizadas en frambuesas y zarzamoras pusieron de manifiesto la necesidad de mejorar la estrategia para estos tipos de fruta. Debido a las características de estas frutas durante la poscosecha, el cambio en la textura por la hidrólisis de almidones y pectinas, la reducción del contenido de fibra y por los procesos degradativos de las paredes celulares, las frutas se tornan más blandas y más susceptibles de ser dañadas y atacadas por patógenos durante la poscosecha



(Villegas y Albarracín 2016). En esta Tesis se desarrolló una metodología más apropiada para evitar provocar heridas en las frutas y para testear los efectos de las levaduras sobre la carga natural de patógenos que tienen las frambuesas y zarzamoras.

Dadas las características y dificultades de las frambuesas y zarzamoras, se seleccionó un número menor de levaduras para ser testeadas, dando prioridad a las que se aislaron de esos tipos de frutas. *M. guilliermondii* ccSL199 y *N. globosa* ccSL631, *A. pullulans* ccSL1141, *Cy. capitatum* ccSL1024 también fueron efectivos para controlar los patógenos que afectan a las frambuesas y zarzamoras, lo que convierte a estos aislamientos más prometedores como potenciales ACB.

Durante la realización de los ensayos de biocontrol sobre frambuesas y zarzamoras se detectó e identificó una alta incidencia natural de las enfermedades causadas por *P. crustosum*, *M. piriformis* y *B. cinerea*, lo que indica que estas frutas traen un alto nivel de inóculo desde el campo. La falta de saneamiento en las plantaciones, eliminando hojas y restos vegetales secos y podridos pueden ser factores que determinen una alta incidencia de enfermedades de poscosecha (Madrid y Beaudry 2020)

Para estos tipos de frutas, las levaduras no nativas *Pichia membranifaciens* NPCC1250, *Vishniacozyma victoriae* NPCC1263, también mostraron la capacidad de controlar el desarrollo de los patógenos de poscosecha *P. crustosum*, *B. cinerea* y *M. piriformis*. Estos resultados indican que estos ACB, seleccionados para el control de patógenos de poscosecha de peras (Lutz et al., 2013, 2020, Gramisci et al., 2018), pueden ser potenciales antagonistas de los patógenos que se desarrollan en frambuesas y zarzamoras, ampliando así su rango de aplicación.

En cuanto a la aplicación de mezclas de levaduras, si bien hay investigaciones recientes que indican que puede mejorar la eficacia del espectro de actividad y efectividad contra patógenos de poscosecha en diferentes frutas (Panebianco et al., 2015, Sylla et al., 2015, Rivas-Garcia et al., 2019), las pruebas realizadas en esta Tesis mostraron que, en las condiciones probadas, las combinaciones de levaduras no mejoraron la actividad que presentan las levaduras por separado. Estos resultados diferenciales entre el efecto de las levaduras por separado y las combinaciones de levaduras podría estar relacionado con los mecanismos utilizados por cada una para su acción antagónica, es decir que las levaduras competirían entre ellas en lugar de ejercer sinergia. El estudio de los mecanismos de acción de cada levadura antagónica podría ofrecer información importante que permita evaluar combinaciones de levaduras que no compitan entre ellas por nutrientes, espacio, etc (Guetsky et al., 2001). Otros factores que podrían haber influido en la falta de éxito de las combinaciones de levaduras probadas son, por un lado, los diferentes tiempos de crecimiento de las diferentes levaduras y por otro, la evaluación de diferentes proporciones en las

combinaciones de levaduras (Guetsky et al., 2001, Lutz 2015, Spadaro y Droby 2016). La levadura *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 ha sido evaluada en combinación con compuestos como cloruro de Calcio, quitosano y BTH (acibenzolar-S-metilo), mostrando un mejoramiento en la actividad biocontroladora en combinación con el BTH (Antieco et al., 2018, Amaturi et al., 2018).

De este modo, este Capítulo aporta información novedosa acerca de levaduras nativas/ indígenas con potencial como ACB, tanto de especies que aún no se habían reportado como potencialmente biocontroladoras como de especies ya probadas como antagonistas de patógenos de poscosecha en otras frutas o frente a otros patógenos. También aporta información acerca del efecto biocontrolador de dos productos comerciales y dos levaduras biocontroladoras de patógenos de pera, sobre patógenos de fruta fina. Además, pone en evidencia la importancia y necesidad de aislar y seleccionar levaduras nativas potencialmente antagonistas adaptadas al frío y aisladas a partir de las frutas en las que deberán ejercer su acción. Con respecto de los mecanismos de acción, estos serán evaluados para los 10 aislamientos seleccionados aquí en el Capítulo IV.

# **CAPITULO IV**

## **CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas de biocontrol se analizan y estudian principalmente de una manera centrada en especies/aislamientos: se prueban diferentes especies/aislamientos contra el patógeno objetivo y se estudia el organismo con mayor potencial biocontrolador. Sin embargo, para una aplicación exitosa de los ACB, primero tenemos que comprender los mecanismos que les confieren la actividad de biocontrol (Droby y Chalutz 1994; Spadaro y Droby 2016).

Los sistemas de control biológico poscosecha son complejos y dinámicos, y están influenciados por una variedad de parámetros (Liu et al., 2013). El ambiente de poscosecha ha sido considerado propicio para la aplicación exitosa de este tipo de manejo 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 y al ser la poscosecha un ambiente 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 (Di Francesco et al., 2016). Resulta necesario entonces, conocer los mecanismos de acción involucrados en la inhibición de la infección y el desarrollo del o los patógenos que operan en un sistema tritrófico de interacción hospedador-patógeno-antagonista (Spadaro y Droby, 2016). El conocimiento de los modos de acción de los ACBs es esencial para mejorar su viabilidad y aumentar su potencial en el control de la enfermedad. Los antagonistas pueden mostrar una amplia gama de modos de acción, en diferentes etapas de su actividad, en relación con diferentes hospedadores y patógenos; a veces diferentes modos actúan simultáneamente y, por lo tanto, es difícil establecer qué mecanismo individual ha contribuido a una acción antifúngica específica (Di Francesco et al., 2016).

Hay una amplia gama de posibles modos de acción por los cuales las levaduras pueden controlar a los principales patógenos de frutas: la antibiosis (producción de compuestos antimicrobianos), la competencia por los nutrientes y el espacio, el parasitismo y la inducción de resistencia, la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV), la competencia de hierro (producción de sideróforos), la formación de biopelículas (biofilm), las enzimas degradantes de la pared celular y la implicación del estrés oxidativo y la inducción de la producción de ROS en el hospedador, entre otros (Di Francesco et al., 2016, Droby et al., 2016, Liu et al., 2013 Spadaro y Droby, 2016). Por estos motivos, una vez seleccionadas las cepas potencialmente antagonistas es necesario conocer el/ los mecanismos de biocontrol ya que esta información es de mucha utilidad, por ejemplo, en el caso de combinar diferentes levaduras o estrategias de control. De esta manera, en el presente Capítulo, se evaluarán varios mecanismos que han sido descritos como responsables

del control biológico (Janisiewicz y Korsten, 2002) en una serie de ensayos *in vitro*.

## **HIPÓTESIS**

Las levaduras antagonistas indígenas poseen diferentes mecanismos de acción útiles contra hongos causantes de enfermedades de poscosecha.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Caracterizar algunos de los mecanismos de acción involucrados en la capacidad antagónica de las levaduras seleccionadas, a través de ensayos *in vitro*.

## **MATERIALES**

Microorganismos

Los hongos patógenos utilizados fueron *Penicillium crustosum* CIEFAPcc491 y *Mucor piriformis* CIEFAPcc501, seleccionados según su patogenicidad en el Capítulo I.

Mientras que diez aislamientos de levaduras que presentaron mayor eficacia en el Capítulo III de acuerdo su comportamiento antagónico *in situ* frente a *Penicillium crustosum* CIEFAPcc491 y *Mucor piriformis* CIEFAPcc501, fueron las seleccionadas, para evaluar algunos de los mecanismos de acción que podrían estar involucrados (*Aureobasidium pullulans* ccSL1141, *Naganishia adeliensis* ccSL441 y ccSL154, *Vishniacozyma victoriae* ccSL30 y ccSL771, *Filobasidium. stepposum* ccSL614, *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204, *Tausonia pullulans* ccSL899, *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199 y *Naganishia globosa* ccSL631).

Otros microorganismos utilizados\*:

- la levadura *Candida glabrata* NPCC106 (cepa sensible a toxinas *killer*)
- las levaduras *Candida albicans* H18 (cepa productora de biofilms) como control positivo y H9 como control negativo
- la bacteria *Phyllobacterium ifrigiyense*, (cepa productora de sideróforos) como control positivo

\* todos estos microorganismos se encuentran depositados en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Levaduras del PROBIEN, Neuquén, Argentina, denominado North Patagonia Culture Collection (NPCC).

#### Medios de cultivo utilizados

Todos los medios de cultivo utilizados se prepararon con agua destilada y se esterilizaron por vapor saturado a presión en autoclave a 120°C y 2 atmósferas durante el tiempo especificado para cada medio de cultivo.

- Para el crecimiento de las levaduras se utilizó Agar, extracto de levadura, glucosa y peptona (GPY): agar 15g/L, extracto de levadura 5 g/L; peptona 5 g/L; glucosa 40 g/L.
- Para el crecimiento de los patógenos y para la producción de compuestos antifúngicos, se utilizó Agar, papa, dextrosa (APD) de formulación comercial de Laboratorios Britania, según especificaciones del producto (39 g/L). Para la inhibición de la germinación de mitosporas se utilizó extracto de papa glucosado (extracto de papa, 20 g de glucosa en 1 l de agua destilada)
- Para la producción de enzimas extracelulares se utilizaron: Agar-quitina (Souza et al., 2009), quitina coloidal (pH 7) 30 g/L obtenida por el método de Skujins et al., (1965); base nitrogenada para levaduras (YNB yeast nitrogen base) 0.67 g/L; agar 15 g/L; Agar-glucano: se evaluaron dos glucanos distintos en la misma concentración: curdulano y pustulano (Renwick et al., 1991), glucano 5 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.
- Para la producción de toxinas *killer* se utilizó medio YEPD-MB: Extracto de levadura 10 g/L; peptona 20 g/L; glucosa 20 g/L; agar 15 g/L; azul de metileno 0.003 g/L. Para la producción de sideróforos el medio de cultivo consistió en: sacarosa 25 g/L, ZnHSO<sub>4</sub> g/L, POHK<sub>3</sub> g/L; ácido cítrico 1 g/L, MgSO 0.08 g/L, ZnSO 0.002 g/L, Agar 20/L, pH 6.8 según Calvente et al., (2001).

#### Soluciones utilizadas:

- Rojo Congo 1% para revelar la actividad glucanasa
- Perclorato férrico para detección de sideróforos

## Enzimas comerciales

Se utilizaron las enzimas Zymolyasa (Seikagaku Corporation), Lafase fruit (Scott Laboratories) y Glucanex (Novozymes), como control positivo en la evaluación de la producción de enzimas líticas extracelulares.

## Reactivos

- Cristal violeta. Sigma
- Curdulano. Sigma
- Leche descremada. Sancor
- Pectina cítrica. Sigma
- Pectina de manzana. Sigma
- Pustulano. Sigma

## MÉTODOS

### 1. Producción de compuestos antifúngicos

#### 1.1 Inhibición de la germinación de mitosporas de los patógenos

Para evaluar la capacidad de las levaduras de producir compuestos inhibidores de la germinación y/o desarrollo de las mitosporas de *M. piriformis* y *P. crustosum* se prepararon tubos estériles con 4.8 mL de extracto de papa glucosado a los cuales se les adicionaron 100  $\mu$ L de suspensión de levaduras ( $10^8$  cél/mL) y 100  $\mu$ L del patógeno ( $10^6$  mitosporas/mL). Se utilizaron esas concentraciones de células para facilitar el recuento en la cámara de Neubauer. Los tubos se incubaron en posición inclinada ( $45^\circ$ ) en agitador orbital a 150 rpm y a  $20^\circ\text{C}$  durante 24 h para los cultivos con *M. piriformis* y 48 h para los cultivos con *P. crustosum*. Tubos en idénticas condiciones, pero sin levaduras se utilizaron como controles. El porcentaje de germinación se determinó por conteo de 100 mitosporas por tratamiento, utilizando microscopio óptico. Se consideró mitospora germinada, cuando el tubo germinativo fue del doble de longitud respecto al tamaño de la mitospora (Yao et al., 2004). Cada tratamiento se realizó por triplicado y todo el experimento se realizó dos veces.

## 1.2 Evaluación de producción de sustancias difusibles de las levaduras biocontroladoras

Se evaluó la capacidad de producir sustancias difusibles en el medio APD. Se sembraron en las placas 10  $\mu$ L de una suspensión de mitosporas/mL a la concentración infectiva mínima (CIM) de cada patógeno ( $10^2$  para *Mucor* y  $10^3$  para *Penicillium*) a 4 cm de la una solución sembrada en forma de estría conteniendo  $10^6$  cél/mL de cada levadura a evaluar (Figura 35), siguiendo la metodología propuesta por Mondino y Vero (2006). Placas inoculadas solamente con los patógenos se utilizaron como control. Las placas fueron incubadas a 22°C (temperatura de comercialización de la fruta) y 0°C (temperatura de almacenamiento) durante 3 y 30 días respectivamente. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento comparando el diámetro de desarrollo del patógeno enfrentado y no enfrentado con la levadura. El ensayo se realizó por triplicado.

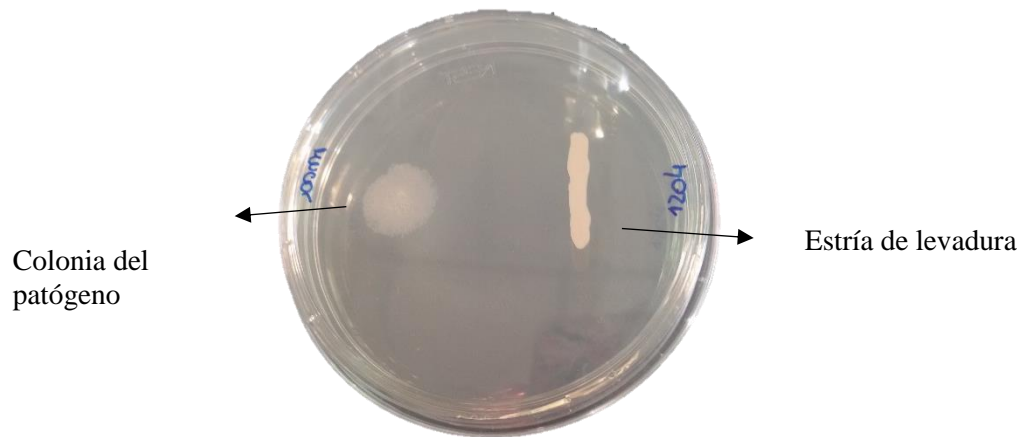


Figura 35. Placa de Petri con cultivo dual patógeno-levadura.

## 1.3 Evaluación de producción de compuestos orgánicos volátiles (COV) de las levaduras biocontroladoras

Se utilizó el método de placas enfrentadas (Lillbro 2005). Para ello, placas con GPY se sembraron con 100  $\mu$ L de una suspensión de  $10^6$  cél/mL de la levadura antagónica a evaluar y se enfrentaron con placas de APD inoculadas en la zona central con 10  $\mu$ L de una suspensión de mitosporas/mL a la CIM ( $10^2$  para *M. piriformis* y  $10^3$  para *P. crustosum*). Las placas enfrentadas se sellaron con parafilm y se incubaron a 22°C (temperatura de comercialización de la fruta) y 0°C (temperatura de almacenamiento) durante 3 y 30 días respectivamente (Figura 36). Placas inoculadas con los patógenos solos enfrentadas a placas sin levaduras, se utilizaron como control. El porcentaje de inhibición se determinó de la misma manera que en el ensayo anterior. El experimento se realizó



por triplicado.

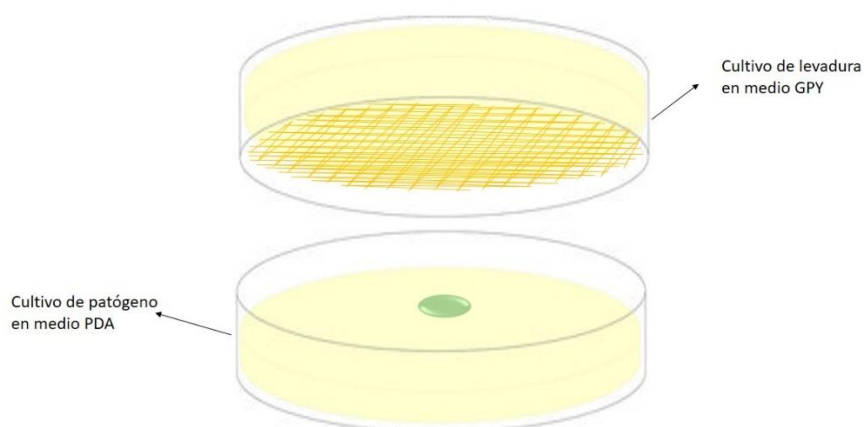


Figura 36. Esquema del método de placas enfrentadas

## 2. Producción de enzimas líticas extracelulares de las levaduras antagonicas analizadas

Se evaluó la capacidad de las levaduras para producir enzimas que puedan provocar la lisis de las paredes de las hifas de los patógenos (quitinasas, proteasas y glucanasas)

### 2.1. Actividad quitinasa

Se adoptó la metodología descrita por Sousa et al., (2009) utilizando agar-quitina como medio, ajustado a pH 7. Los aislamientos con actividad quitinasa positiva producen un halo transparente alrededor de las colonias. Como control positivo se utilizó el complejo enzimático Glucanex. Las placas se mantuvieron a 0°C y a 22°C durante 30 y 3 días respectivamente. El ensayo se realizó por triplicado.

### 2.2 Actividad proteasa

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 indica la presencia de enzimas degradadoras de proteínas. Las placas se mantuvieron a 0°C y a 22°C durante 30 y 3 días respectivamente. El ensayo se realizó por triplicado.

### 2.3 Actividad glucanasa

Se evaluó de acuerdo al método descrito por Renwick et al., (1991), utilizando los sustratos curdulano y pustulano, que permiten evidenciar las actividades enzimáticas  $\beta$ -1,4-Glucanasa y  $\beta$ -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 fue 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. Las placas se mantuvieron a 0°C y a 22°C durante 30 y 3 días respectivamente. El ensayo se realizó por triplicado.

### 3. Capacidad de formación de biofilms por parte de las levaduras antagónicas

Se inocularon placas de poliestireno de 96 pocillos conteniendo 190  $\mu$ L de medio de cultivo GPY con 10  $\mu$ L de una suspensión de levaduras ( $10^6$  cél/mL). Las placas se incubaron a 22°C por 3 días y a 0°C por 30 días. Finalizada la incubación se descartó el contenido de las placas y se adicionaron 25  $\mu$ L de cristal violeta (0.1% de etanol) a cada pocillo. Luego de 5 min el cristal violeta fue removido y la placa se lavó con agua estéril. El cristal violeta retenido en cada pocillo fue extraído con 125  $\mu$ 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). Se utilizó como control positivo la cepa H18 de *Candida albicans* capaz de formar biofilms. Se estableció el porcentaje de adherencia con respecto al control positivo (O'Toole et al., 2000). El experimento se realizó empleando cuatro pocillos por placa para cada levadura.

### 4. Producción de toxinas *killer* por parte de las levaduras antagónicas

Se evaluó la capacidad de las diferentes levaduras de producir toxinas *killer* siguiendo la metodología de Sangorrin et al., (2002). La evaluación se efectuó comparando con cepas de levaduras sensibles de referencia (*Candida glabrata* NCYC 388) y frente a los hongos patógenos, por inhibición de crecimiento en placas de agar GPY+azul de metileno. Las placas fueron incubadas a 20°C (laboratorio) y 0°C (en cámara) durante 3 y 30 días respectivamente. Las levaduras en estudio se consideraron productoras de toxinas *killer* cuando alrededor de la estría de la levadura evaluada se observó un halo de inhibición del crecimiento de las levaduras sensibles. La ausencia del halo de inhibición del crecimiento indicó que la levadura estudiada no

produce toxinas *killer*. El ensayo se realizó por triplicado.

## 5. Producción de sideróforos

Para demostrar la competencia por hierro *in vitro* se utilizó el método simplificado propuesto por Calvente et al., (2001). Se sembraron las levaduras a evaluar en medio específico para producción de sideróforos detallado en Materiales. Se dejaron crecer las levaduras 24-48 h y se realizaron en el agar orificios (de 2 mm de diámetro), los cuáles se llenaron con una solución ácida de perclorato férrico. Las placas fueron incubadas a 20°C (laboratorio) y 0°C (en cámara) durante 3 y 30 días respectivamente. Se detectó la producción de sideróforos por la presencia de halos rojizos en la parte inferior de las placas.

## 6. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de los ensayos de producción de compuestos antifúngicos y capacidad de formación de biofilms se analizaron usando el análisis de la varianza (ANOVA), dado que cumplieron con el supuesto de homocedasticidad, y las medias separadas de acuerdo al test de LSD Tukey ( $p < 0.05$ ) usando el programa Infostat, versión 2019p.

# RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de la evaluación de algunos posibles mecanismos de acción involucrados en el potencial biocontrolador de los diez aislamientos de levaduras nativas seleccionados en el Capítulo III de esta Tesis.

## 1. Producción de compuestos antifúngicos

Los resultados de los ensayos realizados para evaluar la producción de compuestos antifúngicos de las levaduras frente a *P. crustosum* ccCIEFAP491 se muestran en la Tabla 10. *Naganishia adeliensis* ccSL154, *M. guilliermondii* ccSL199, *A. pullulans* ccSL1141, *Cy. capitatum* ccSL1204 fueron capaces de inhibir la germinación de mitosporas de *P. crustosum* en más del 60% en ambas temperaturas.

*Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204, fueron los

tres aislamientos que lograron inhibir a través de producción de compuestos volátiles el crecimiento del *P. crustosum* en más del 40% tanto a 0°C como a 22°C

Cuando se evaluó la inhibición del crecimiento de *P. crustosum* por acción de compuestos difusibles a 0°C, los que mostraron un efecto mayor fueron *V. victoriae* ccSL30 (42.13%), *A. pullulans* ccSL1141 (56.34%) y *Cy. capitatum* ccSL1204 (57.86%), mientras que, a 22°C, los mejores porcentajes de inhibición del crecimiento se obtuvieron con *V. victoriae* ccSL771 (63.25%), *A. pullulans* ccSL1141 (48.56%) y *Cy. capitatum* ccSL1204 (53.03%).

Tabla10. Inhibición del crecimiento de *P. crustosum* frente a 10 aislamientos de levaduras a dos temperaturas diferentes

Levaduras	Inhibición del crecimiento (%) de <i>P. crustosum</i>					
	Mitosporas germinadas		Compuestos volátiles		Compuestos difusibles	
	0°C	22°C	0°C	22°C	0°C	22°C
<i>V. victoriae</i> ccSL30	30 B	0 A	46.7 F	61.02 E	42.13 D	0 A
<i>N. adeliensis</i> ccSL154	60 C	77.7 C	5.07 B	6.7 AB	2.53 A	0 A
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	96 E	66.6 B	6.59 B	7.98 AB	2 A	0 A
<i>N. adeliensis</i> ccSL 441	0 A	0 A	28.93 E	32.58 C	10.65 B	27.47 B
<i>F. stepposum</i> ccSL 614	0 A	0 A	0 A	9.25 B	34 C	44.4 C
<i>N. globosa</i> ccSL631	0 A	0 A	15.22 C	32.26 C	0 A	2.22 A
<i>V. victoriae</i> ccSL771	0 A	0 A	21.82 D	41.21 D	36.03 C	63.25 E
<i>T. pullulans</i> ccSL899	0 A	0 A	0 A	4.78 AB	0 A	0 A
<i>A. pullulans</i> ccSL1141	76.6 D	66.6 B	54.31 G	60.70 E	56.34 E	48.56 CD
<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	96 E	88.8 D	55.33 G	63.89 E	57.86 E	53.03 D
Control	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A

La inhibición del crecimiento por compuestos volátiles y difusibles fue calculada cómo % de la relación de la diferencia entre el diámetro de cada tratamiento (levadura y patógeno) y el control sin levaduras. La inhibición de la germinación: calculada como el porcentaje entre la relación de las mitosporas germinadas de cada tratamiento (levadura y patógeno) y el control sin levaduras, en extracto de papa glucosado. Letras iguales en la misma columna indican que no son estadísticamente diferentes (con respecto al control) por la prueba LSD (Fisher) ( $p < 0.05$ ).

Los resultados de los ensayos realizados para evaluar la producción de compuestos antifúngicos de las levaduras frente a *M. piriformis* ccCIEFAP501 se muestran en la Tabla 11 y la Figura 37. Las levaduras *M. guilliermondii* ccSL199, *N. adeliensis* ccSL441, *V. victoriae* ccSL771, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204, lograron reducir la germinación de mitosporas de *M. piriformis* entre un 50 y 96% tanto a 0°C como a 22°C.

Al evaluar la potencial producción de compuestos volátiles de los ACB sobre el crecimiento de *M. piriformis* a 0°C, las levaduras *V. victoriae* ccSL30, *N. adeliensis* ccSL154, *M. guilliermondii* ccSL199, *N. globosa* ccSL631, *T. pullulans* ccSL899, *A. pullulans* ccSL1141 y *C. capitatum* ccSL1204 inhibieron el crecimiento del patógeno en más del 49%. Por otro lado, cuándo las placas se incubaron a 22°C, los mejores resultados se observaron con *N. globosa* ccSL631 y *A. pullulans* ccSL1141, sin embargo, los porcentajes de inhibición fueron menores, de 34.78% y 34.11%, respectivamente.

Por último, cuando se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. piriformis* a través de la capacidad de las levaduras de producir compuestos difusibles, los mejores resultados se obtuvieron a 0°C. En estos ensayos las levaduras *V. victoriae* ccSL30, *N. adeliensis* ccSL154, *M. guilliermondii* ccSL199, *V. victoriae* ccSL771, *T. pullulans* ccSL899, *A. pullulans* ccSL1141, *C. capitatum* ccSL1204 redujeron el crecimiento del hongo en más del 40%. En los ensayos donde las placas se incubaron a 22°C, el mejor resultado se obtuvo con *T. pullulans* ccSL899, con un 29.14% de inhibición de crecimiento del hongo.

Tabla 11. Inhibición del crecimiento de *M. piriformis* frente a 10 aislamientos de levaduras a dos temperaturas diferentes

Levaduras	Inhibición del crecimiento (%) de <i>M. piriformis</i>					
	Mitosporas germinadas		Compuestos volátiles		Compuestos difusibles	
	0°C	22°C	0°C	22°C	0°C	22°C
<i>V. victoriae</i> ccSL30	22 B	0 A	49.17 D	24.41 E	59.05 J	5.52 C
<i>N. adeliensis</i> ccSL154	35.4 C	47.4 B	60.83 E	20.06 D	56.19 I	0.75 AB
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	96 G	50 C	60.42 E	20.73 D	51.43 G	1 AB
<i>N. adeliensis</i> ccSL441	75.2 E	73.7 D	13.75 B	16.05 C	37.14 D	1.75 AB
<i>F. stepposum</i> ccSL614	0 A	0 A	14.17 B	2.67 B	3.49 B	1 AB
<i>N. globosa</i> ccSL631	0 A	0 A	60.83 E	34.78 F	8.25 C	1.25 AB
<i>V. victoriae</i> ccSL771	70 D	94.9 G	34.58 C	21.7 D	53.02 H	0 A
<i>T. pullulans</i> ccSL899	0 A	0 A	75 F	0 A	55.56 I	29.14 D
<i>A. pullulans</i> ccSL1141	89.5 F	84.13 E	49.58 D	34.11 F	43.17 E	1.75 AB
<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	90.4 F	89.5 F	64.17 E	4.68 B	49.84 F	1.25 AB
<b>Control</b>	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A	0 A

La inhibición del crecimiento por compuestos volátiles y difusibles fue calculada como % de la relación de la diferencia entre el diámetro de cada tratamiento (levadura y patógeno) y el control sin levaduras. La inhibición de la germinación: calculada como el porcentaje entre la relación de las mitosporas germinadas de cada tratamiento (levadura y patógeno) y el control sin levaduras, en extracto de papa glucosado. Los

valores seguidos por letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes por la prueba LSD (Fisher) ( $p < 0,05$ ).

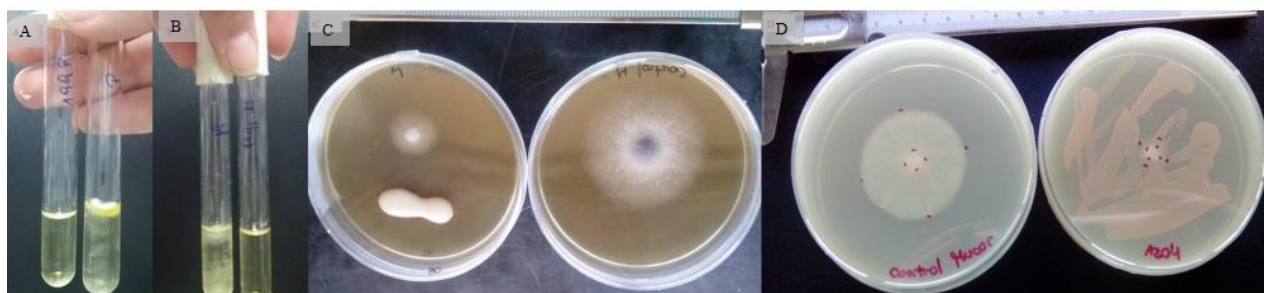


Figura 37. Evaluación de la producción de compuestos antifúngicos. A) Inhibición de la germinación de mitosporas, *M. guilliermondii* ccSL199 contra *P. crustosum* ccCIEFAP491 y su control a 0°C; B) Inhibición de la germinación de mitosporas, *A. pullulans* ccSL1141 contra *M. piriformis* ccCIEFAP501 y su control a 22°C; C) Producción de compuestos difusibles, *V. victoriae* ccSL30 contra *M. piriformis* ccCIEFAP501 y su control a 0°C; D) Producción de compuestos volátiles, *Cy. capitatum* ccSL1204 contra *M. piriformis* ccCIEFAP501 y su control a 0°C.

A temperatura de comercialización (22°C) los aislamientos que lograron inhibir o reducir el crecimiento de ambos patógenos a través de la producción de compuestos antifúngicos de volátiles y difusibles, como también la inhibición de la germinación de mitosporas fueron *N. adeliensis* ccSL154, *M. guilliermondii* ccSL199, *A. pullulans* ccSL1141 y *C. capitatum* ccSL1204. A temperatura de almacenamiento (0°C) se sumó, además, *V. victoriae* ccSL30. Los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron con *A. pullulans* ccSL1141 y *C. capitatum* ccSL1204, en ambas temperaturas y con *V. victoriae* ccSL30 a 0°C.

## 2. Producción de enzimas líticas extracelulares de las levaduras antagonicas analizadas

Los resultados de los ensayos realizados para evaluar la producción de enzimas líticas extracelulares se muestran en la Tabla 12.

Los aislamientos de levaduras *V. victoriae* ccSL30, *T. pullulans* ccSL899, *A. pullulans* ccSL1141 fueron capaces de producir quitinasas a ambas temperaturas, mientras que *N. adeliensis* ccSL154 solo lo hizo a 22°C.

Los aislamientos de levaduras *N. adeliensis* ccSL154, *N. adeliensis* ccSL441, *T. pullulans* ccSL899 y *A. pullulans* ccSL1141 tuvieron la capacidad de producir proteasas en ambas

temperaturas, mientras que *C. capitatum* ccSL1204 solo lo hizo a 0°C (Figura 38).

En la evaluación de producción de glucanasas, todas las levaduras probadas mostraron actividad glucanasa en al menos una de las temperaturas probadas. *T. pullulans* ccSL899 fue la única capaz de producir  $\beta$ -1,4-Glucanasa y  $\beta$ -1,6-Glucanasa, en ambas temperaturas.

El único aislamiento que presentó actividad para todas las enzimas probadas fue *A. pullulans* ccSL1141. Mientras que, *M. guilliermondii* ccSL199 fue el aislamiento que mostró menor actividad enzimática,  $\beta$ -1,6-Glucanasa solo a 0°C.

Tabla 12. Producción de enzimas líticas extracelulares de levaduras a dos temperaturas diferentes

Especie de levadura	Quitinasas		Proteasas		Glucanasas			
					Curdulano ( $\beta$ -1,4- Glucanasa)		Pustulano ( $\beta$ -1,6- Glucanasa)	
	22°C	0°C	22°C	0°C	22°C	0°C	22°C	0°C
<i>V. victoriae</i> ccSL30	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>N. adeliensis</i> ccSL154	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>N. adeliensis</i> ccSL441	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>F. stepposum</i> ccSL614	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>N. globosa</i> ccSL631	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>V. victoriae</i> ccSL771	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>T. pullulans</i> ccSL899	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. pullulans</i> ccSL1141	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	-	-	-	+	+	+	+	-

La presencia de enzimas degradadoras de proteínas se detectó por presencia de halo transparente alrededor de la colonia de levadura, donde + = indica presencia de halo y - = ausencia de halo.

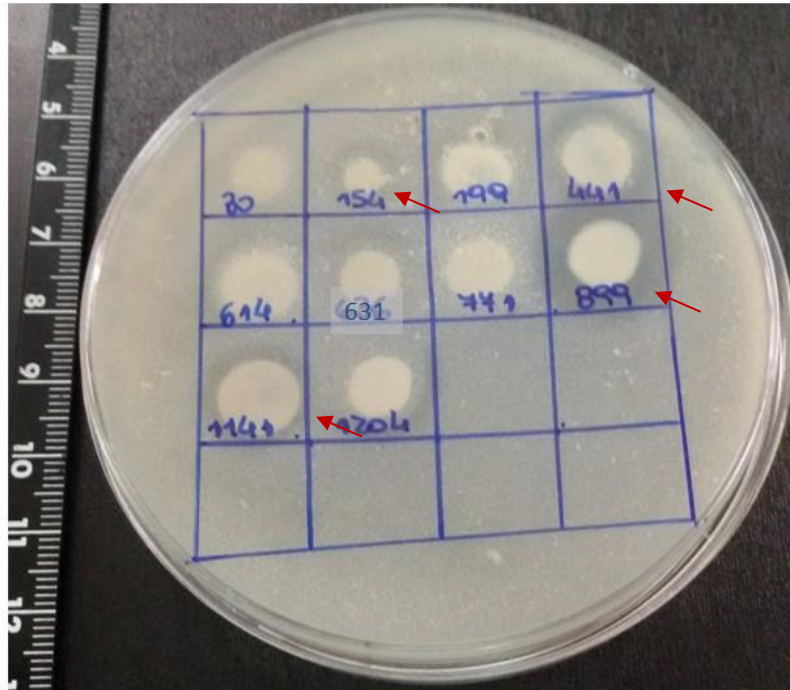


Figura 38. Producción de proteasas a 0°C por parte de las levaduras. Las flechas rojas señalan los resultados positivos (presencia de halos)

### 3. Capacidad de formación de biofilms por parte de las levaduras antagonicas

La técnica de adhesión de las levaduras a una superficie de poliestireno se utilizó para evaluar la capacidad de formar biofilms. A 22°C todos los aislamientos probados mostraron porcentaje de adhesión a la placa de poliestireno, siendo *V. victoriae* ccSL30 la levadura que presentó la mayor capacidad de formación de biofilms (64.94%) y la única que presentó diferencias significativas en relación a los nueve aislamientos restantes (Figura 39A). Mientras que la capacidad de adhesión de las restantes varió entre el 35 y 43%.

Cuando la producción de biofilms se probó a 0°C el mayor porcentaje de adhesión a la placa la presentaron *V. victoriae* ccSL30 y *N. globosa* ccSL631, con 89.69% y 59.23% respectivamente. Por otro lado, a esta temperatura la diferencia entre el control positivo y *V. victoriae* ccSL30 resultó menor (19%) (Figuras 39 B y 40).



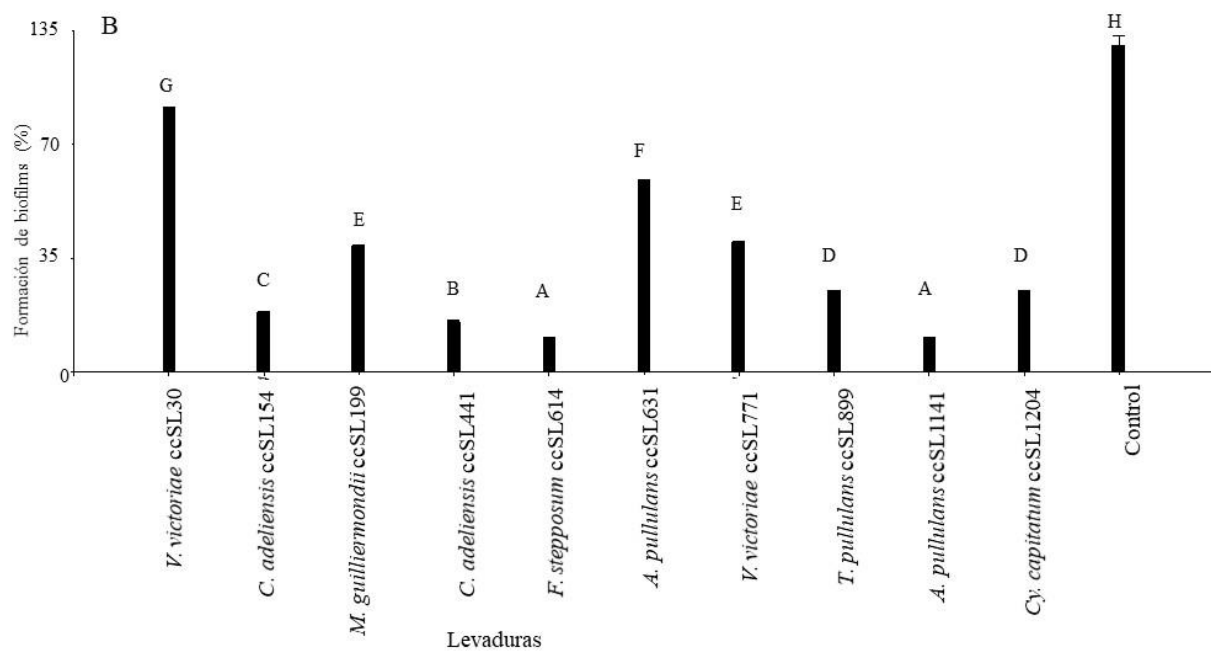
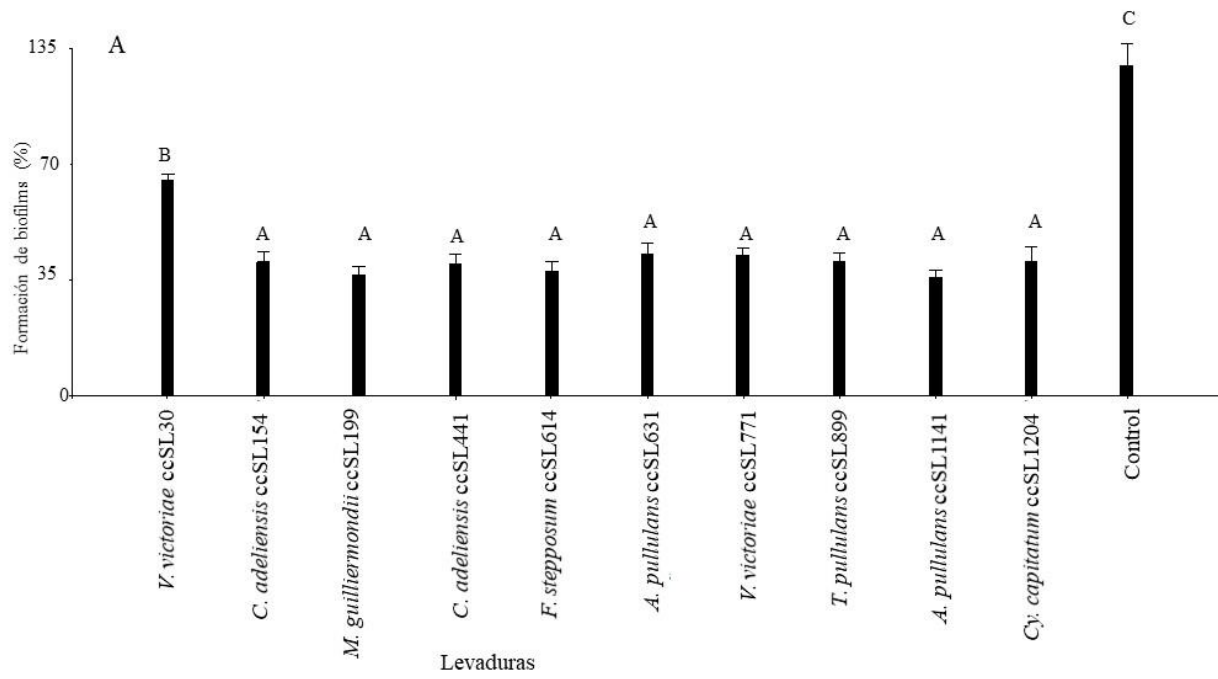


Figura 39. Capacidad de formar biofilm de diez aislamientos de levaduras según porcentaje de adhesión de levaduras a la superficie de la placa de 96 pocillos a: A) 22°C y B) 0°C

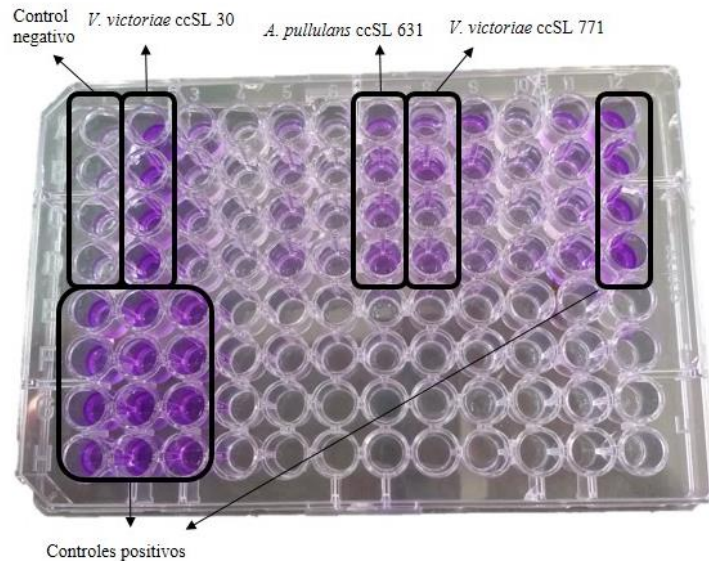


Figura 40. Producción de biofilms en placa de 96 pocillos a 0°C

#### 4. Producción de toxinas *killer* y sideróforos por parte de las levaduras antagónicas

Ninguna de las levaduras evaluadas presentó actividad *killer* ni frente a la levadura sensible, ni a los patógenos y en ninguna de las temperaturas evaluadas. Por otro lado, tampoco se detectó producción de sideróforos por parte de las levaduras evaluadas, a través de la técnica utilizada.

## DISCUSION

Los ensayos *in vitro* probados en este trabajo mostraron que los diez aislamientos, seleccionados por su potencial como ACBs a partir de los resultados presentados en el Capítulo III de esta Tesis, posiblemente podrían poner en juego una amplia gama de mecanismos de acción para evitar el desarrollo de los hongos patógenos. *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 fueron los aislamientos que presentaron más mecanismos de acción dentro de los ensayos *in vitro* probados.

Al estudiar los mecanismos de acción, se deben tener en cuenta las interacciones que tienen lugar entre la levadura y el patógeno (Zhang et al., 2017). Las levaduras antagonistas pueden inhibir la germinación de esporas y el crecimiento micelial de los patógenos por la actividad antifúngica directa (Parafati et al., 2016). Todos los aislamientos probados mostraron la capacidad de producir alguno de los compuestos antifúngicos evaluados en alguna de las dos temperaturas ensayadas.

*Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 mostraron capacidad para inhibir

la germinación y el desarrollo del micelio de *P. crustosum* ccCIEFAP491 en ambas temperaturas. Cuando la evaluación de la germinación de mitosporas y la producción de compuestos difusibles se realizó sobre *M. piriformis*, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204, se sumaron *M. guilliermondii* ccSL199, *V. victoriae* ccSL771. Agirman y Erten (2020) evaluaron la inhibición de la germinación de mitosporas y del crecimiento del micelio de *P. expansum* y *P. digitatum* a través de *A. pullulans* y *M. guilliermondii*. En dicho estudio obtuvieron inhibición de la germinación de mitosporas de más del 74% por ambas levaduras frente a *P. digitatum* y de *A. pullulans* frente a *P. expansum*. Los diámetros de los micelios se redujeron en un 50% por *M. guilliermondii* y más del 70% por *A. pullulans*. Di Francesco et al., (2017) evaluaron otra cepa de *A. pullulans* frente a *M. laxa* y obtuvieron inhibiciones de la germinación de mitosporas de entre 12 y 35% dependiendo del medio de cultivo utilizado. La capacidad de inhibir la germinación de mitosporas y el desarrollo del micelio de los hongos, convierte al antagonista en un buen competidor al momento de colonizar la herida en la fruta, durante las primeras horas de ocurrida la infección, al evitar que el patógeno se desarrolle (Liu et al., 2013).

Entre las sustancias producidas por ACB, los compuestos orgánicos volátiles (COV) están frecuentemente involucrados en el control biológico de varias enfermedades fúngicas de frutas en poscosecha. En los ensayos *in vitro* realizados, los aislamientos *V. victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 mostraron la capacidad de producir estos compuestos al reducir el crecimiento de *P. crustosum* ccCIEFAP491. A estos aislamientos se sumaron, *N. adeliensis* ccSL154, *M. guilliermondii* ccSL199, *N. globosa* ccSL631, *T. pullulans* ccSL899, ya que también mostraron esta característica cuando se las enfrentó a *M. piriformis* ccCIEFAP501. Ya existen reportes donde levaduras con potencial como ACBs pueden inhibir el crecimiento de los patógenos de poscosecha a través de COVs. La actividad antifúngica de los COVs producidos *in vitro* por aislamientos de *A. pullulans* y especies del género *Cryptococcus*, entre otros, fue evaluada y propuesta como una estrategia efectiva de control biológico contra *Monilinia* spp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Penicillium* spp. (Lutz et al., 2013, Parafati et al., 2017, Reyes-Bravo et al., 2019, Di Francesco et al., 2020, Ruiz-Moyano et al., 2020). A partir de estudios de determinación química se sabe que levaduras producen una amplia variedad de COVs, identificados principalmente como alcoholes, aldehídos y ésteres (Buzzini et al., 2003, Fialho et al., 2010). El estudio de los compuestos químicos volátiles producidos por las levaduras seleccionadas en esta Tesis permitiría en un futuro conocer mejor el mecanismo de acción de estas levaduras y optimizar la producción de los compuestos volátiles para mejorar la capacidad antagonista de las levaduras como ACB.

La evaluación de la producción de enzimas líticas mostró que los diez aislamientos de levaduras ensayados tienen la capacidad de producir alguna de las enzimas capaces de degradar las paredes celulares de los hongos patógenos. Todos los aislamientos probados fueron capaces de producir glucanasas en una o en ambas temperaturas evaluadas. La presencia de la actividad enzimática en múltiples estudios realizados para caracterizar ACB muestra que las glucanasas, quitinasas y proteasas pueden estar involucradas directa o indirectamente en el mecanismo de varias de levadura antagonistas de patógenos de poscosecha (Spadaro y Droby 2016). La actividad producida por las glucanasas ha sido informada para *Candida oleophila* como ACB de *P. digitatum* en naranjas (Bar-Shimon et al., 2004), para *Cr. albidus* para el control de *Monilinia fructicola* y *P. expansum* en manzanas (Chan y Tian 2005), para *Meyerozyma guilliermondii* para el control de *B. cinerea* en manzanas (Zhang et al., 2011). La actividad producida por las quitinasas se ha reportado para *A. pullulans* para el control de *B. cinerea* y *P. expansum* (Zhang et al., 2010), *Cr. laurentii* para controlar *P. expansum* en peras (Yu et al., 2008) y la actividad de las proteasas para *A. pullulans* para el control de *P. expansum*, *B. cinerea*, *M. fructicola* y *Alternaria alternata* (Zhang et al., 2012, Banani et al., 2014).

En el ensayo realizado para evaluar la capacidad de formar biofilm, *V. victoriae* ccSL30 y *N. globosacc*SL631 fueron los aislamientos que mostraron mejores resultados. La capacidad de los ACB para formar biofilm, creando una barrera mecánica interpuesta entre la superficie de la herida y el patógeno, puede considerarse un sistema de exclusión del sitio (Di Francesco et al., 2016, Spadaro y Droby 2016). La formación de biofilms se ha propuesto como un posible mecanismo de biocontrol de *V. victoriae* también ha sido reportado por Lutz et al., (2013).

Tanto *V. victoriae* como *A. pullulans* ya han sido reportados como agentes de biocontrol y sus posibles mecanismos de acción han sido estudiados (Lutz et al., 2013, 2020, Di Francesco et al., 2018, Zajc et al., 2020). Este es el primer estudio que aporta información acerca de los posibles mecanismos de acción las especies *Naganishia adeliensis*, *Filobasidium stepposum*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Tausomia pullulans* y *Naganishia globosa*, como agentes de control biológicos de patógenos de poscosecha en frutas.

Los resultados obtenidos confirman la necesidad de evaluar los mecanismos de acción de los potenciales ACB, en las dos temperaturas en las que se encontrarán las frutas durante la poscosecha. Por un lado, el hecho de que los mecanismos de acción de los aislamientos seleccionados en esta Tesis estén activos a bajas temperaturas (0°C) indicaría que los potenciales ACBs podrían ser eficaces a la temperatura de almacenamiento y, por otro lado, que los mecanismos de acción de los ACB muestren actividad a 22°C indica que también podrían proteger

la fruta durante el período de comercialización. Un paso complementario a estos ensayos sería la evaluación de los posibles mecanismos de acción en condiciones *in vivo*, como también análisis proteómicos y transcriptómicos para identificar proteínas expresadas diferencialmente (DEP) y los cambios en la expresión de los genes en el sistema de biocontrol poscosecha (Zhang et al., 2020b).

Los antagonistas eficaces deben mostrar una amplia gama de modos de acción, en diferentes etapas de su actividad, en relación con diferentes hospedadores y patógenos (Di Francesco et al., 2016). El conocimiento de los mecanismos de acción de las levaduras antagonicas es importante como criterio de selección de nuevos aislamientos potenciales como ACB y para mejorar su rendimiento (Liu et al., 2013). Por este motivo, a partir de los resultados obtenidos en estos ensayos, los aislamientos *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204, han sido seleccionados por sus posibles múltiples modos de acción sobre los patógenos de poscosecha *P. crustosum* ccCIEFAP491 y *M. piriformis* ccCIEFAP501, para llevar a cabo estudios fisiológicos *in vitro* (disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH) y para determinar la concentración efectiva mínima (CEM) en el Capítulo V.

**CAPITULO V**  
**RESPUESTA FISIOLÓGICA Y**  
**CONCENTRACIÓN MÍNIMA**  
**EFFECTIVA DE LOS**  
**POTENCIALES ACB**

## INTRODUCCIÓN

Estudios recientes sugieren que para predecir los resultados del biocontrol, necesitamos comprender no solo los principales mecanismos de biocontrol involucrados, sino también la supervivencia de los ACB en relación con las condiciones externas (Xu y Jeger 2020). Sorprendentemente, existen escasos trabajos en los cuales se hayan determinado los parámetros ecológicos y los límites en los que los ACB podrían actuar eficazmente. Los parámetros ambientales más importantes son la disponibilidad de agua (actividad de agua,  $a_w$ ), las temperaturas predominantes y el pH del tejido del fruto. Estos tres factores interactúan e influyen directamente en la capacidad de crecimiento y establecimiento en la superficie de la fruta (Teixidó et al., 1998). La información del nicho ambiental en el que el agente de control biológico es capaz de crecer, es esencial para establecer las condiciones básicas para el crecimiento de la biomasa y escalado del antagonista y además de que contribuye con la caracterización profunda requerida en el proceso de registro para el desarrollo de un producto basado en microorganismos (Gotor-Vila et al., 2017) El desarrollo de cepas que sean capaces de sobrevivir y prosperar bajo condiciones ambientales fluctuantes (cámaras de conservación y las condiciones de comercialización) las convierte en microorganismos altamente deseables para su aplicación en sistemas de control biológico (Zajc et al., 2019)

Por otro lado, un atributo importante de un ACB exitoso es que sea eficaz a bajas concentraciones (Wisniewski y Wilson 1992), es por ello que la determinación de la concentración efectiva mínima (CEM), es importante para aplicar la cantidad suficiente de levaduras, evitando la aplicación extra de producto. Además, es un dato necesario para producir biomasa de levaduras a una escala mayor. La concentración de levaduras aplicada está, además, estrechamente relacionada con mecanismos de acción como la competencia por nutrientes y la formación de biofilms (Gutiérrez Pérez 2017). Se ha reportado que las levaduras son eficaces cuando se aplican a una concentración de entre  $10^7$  y  $10^9$  UFC/mL y rara vez son necesarias concentraciones más elevadas (McLaughlin et al., 1990b, Droby et al., 1997, El-Ghaouth et al., 2004).

## **HIPÓTESIS**

Los aislamientos de levaduras con potencial como ACB son capaces de crecer en condiciones ambientales fluctuantes y son efectivos a bajas concentraciones

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el efecto de la disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH, y su interacción en el crecimiento *in vitro* de las levaduras seleccionadas por su capacidad biocontroladora
- Determinar la concentración efectiva mínima (CEM) de levaduras seleccionadas por su capacidad biocontroladora

## **MATERIALES**

### Material vegetal

Las cerezas utilizadas pertenecen a las variedades Bing y Lapins, fueron cosechadas a madurez comercial y obtenidas de centros de acopio en la localidad de Trevelin (entre enero y febrero de 2016).

### Microorganismos

A partir de los resultados obtenidos en los Capítulos III y IV se seleccionaron tres aislamientos nativos *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204, considerados los más prometedores como agentes de biocontrol. Los mismos se encuentran depositados en el cepario particular SL.

Los hongos patógenos utilizados para los ensayos de determinación de concentración efectiva mínima (CEM) sobre cerezas fueron *Penicillium crustosum* CIEFAPcc491 y *Mucor piriformis* CIEFAPcc501, estos aislamientos fueron seleccionadas según su patogenicidad en el Capítulo I, y se encuentran depositados en el cepario del CIEFAP. Adicionalmente, se incluyó en este ensayo un aislamiento de *Botrytis cinerea* (*B. cinerea* ccSL57) por su incidencia natural en frambuesas y zarzamoras (Punto 3.3 Capítulo III).



El mismo se aisló de frambuesas del Paralelo 42° siguiendo la misma metodología descrita Punto 4 del Capítulo I.

Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos

Todos los medios de cultivo utilizados se prepararon con agua destilada y se esterilizaron por vapor saturado a presión en autoclave a 120°C y 2 atmósferas durante el tiempo especificado para cada medio de cultivo.

- Para el crecimiento de las levaduras se utilizaron Agar, extracto de levadura, glucosa y peptona (GPY): agar 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L; peptona 5 g/L; glucosa 40 g/L.
- Para la determinación del efecto de la disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH, y su interacción en el crecimiento *in vitro* de las levaduras se utilizó medio caldo nutritivo 8 g/L, extracto de levadura 5 g/L y glucosa 10 g/L (NYDB). Al mismo se le modificó la  $a_w$  con glucosa o glicerol y el pH con ácido málico 5 molar.
- Para el crecimiento de los patógenos se utilizó Agar, papa, dextrosa (APD) de formulación comercial de Laboratorios Britania, según especificaciones del producto (39 g/L).
- Para la preparación de las suspensiones de células de levaduras se utilizó tampón fosfato potásico: 70 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 M; 30 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 M, 300 mL de agua destilada, v / v / v, pH 6.5).

## MÉTODOS

1. Crecimiento y producción de inóculo de los hongos patógenos y levaduras con potencial biocontrolador

Los patógenos *P. crustosum*, *M. piriformis* y *B. cinerea* se hicieron crecer en APD, a partir de los cultivos mantenidos en cepario. Los hongos se incubaron en cámara de cultivo durante siete días en oscuridad a 24°C. Las suspensiones de mitosporas de cada patógeno se realizaron por raspado de la superficie de la colonia con un asa estéril en agua destilada estéril (ADE) con 0.01% (v/v) de Tween 80%. Posteriormente, se filtraron a

través de malla de tela estéril para eliminar restos de micelio. Las suspensiones se ajustaron de acuerdo a su CIM, por recuento directo con cámara de Neubauer al microscopio óptico.

Las levaduras se hicieron crecer a partir de los cultivos conservados en GPY. Los aislamientos en placas de Petri se incubaron en cámaras de cultivo durante 72 hs en oscuridad a 15°C y 24°C (teniendo en cuenta su naturaleza psicrófila, analizada en el Capítulo II). Las suspensiones de células de levaduras se obtuvieron por raspado con un asa estéril en tampón fosfato. Las suspensiones se ajustaron por recuento directo con cámara Thoma a microscopio óptico para obtener una concentración de  $10^5$  cél/mL para el ensayo descrito en el Punto 2.

## 2. Determinación del efecto de la disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH, y su interacción en el crecimiento *in vitro* de las levaduras

Estos ensayos fueron realizados en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) Subprograma de Patología de la Poscosecha, en la Línea de investigación: Producción y formulación de microorganismos de interés agroalimentario (Lleida, España) bajo la supervisión de la Dra. Neus Teixidó.

El pH del medio NYDB se ajustó a niveles de pH de 7.0 (control) a 3.5 usando ácido málico 5 molar/L con el medidor de pH GLP 21 (Crison Instruments S.A., Barcelona, España). Se evaluaron siete niveles de pH: 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0 y 3.5. Para cada estudio  $a_w$ , el medio NYDB fue modificado osmóticamente agregando los solutos no iónicos glicerol o glucosa en un amplio rango  $a_w$  de 0.998 (control) a 0.940 siguiendo la metodología descrita por Dallyn y Fox (1980) y Scott (1957), respectivamente. Específicamente, los niveles de  $a_w$  se ajustaron a 0.995, 0.990, 0.980, 0.970, 0.960, 0.950 y 0.940 y se verificaron con un medidor de  $a_w$  Aqualab (Decagon Devices, Pullman, Washington, EE. UU.) con una precisión de  $\pm 0.003$ . Para cada una de las condiciones de pH y  $a_w$  descritas, 150  $\mu$ L de los medios NYDB modificados fueron contenidos en microplacas de 96 pocillos e inoculados con 50 $\mu$ L de suspensiones de levaduras ( $n=3$ ) ajustada con cámara Thoma para obtener una concentración final de  $10^5$  UFC/mL (Figura 40). Las placas, una para cada levadura ( $n=3$ ) para cada temperatura ( $n=5$ ), se incubaron a 0, 5, 10, 20, 30°C. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los aislamientos de crecer a 37°C (temperatura del cuerpo humano) solo en el medio utilizado como control. Para

controlar el crecimiento de las levaduras, se determinaron los cambios en la absorbancia de todos los cultivos con un espectrofotómetro de microplacas PowerWave HT (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) a 640 nm y con 15 s de agitación antes de la medición. Una solución no inoculada de la misma composición para cada condición de pH o  $a_w$  sirvió como control negativo. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

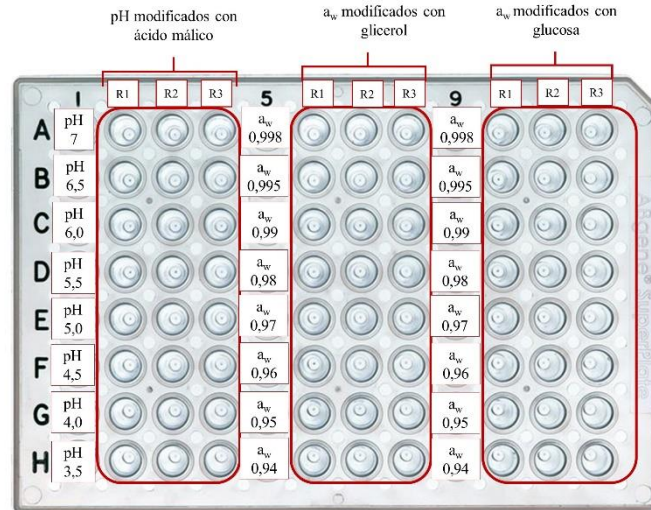


Figura 40. Esquema de inoculación en microplacas de 96 pocillos con medios de cultivo NYDB modificados para cada una de las levaduras para cada temperatura. R: Replica

Sobre los datos obtenidos se determinó la tasa específica de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$  h<sup>-1</sup>) para cada levadura en cada medio para cada temperatura, se determinó a partir del cálculo de  $\mu$  utilizando la siguiente fórmula (Levenspiel 2004)

$$\mu = \frac{\ln(X_2 / X_1)}{\Delta t}$$

Dónde:

ln: Logaritmo natural

X1: Concentración de biomasa de levadura al tiempo 1 (DO)

X2: Concentración de biomasa de levadura al tiempo 2 (DO).

$\Delta t$ : Intervalo de tiempo t2 – t1 (h)

### 3. Determinación de la concentración efectiva mínima en ensayos de biocontrol en cerezas

Se emplearon frutas sanas esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio (2%), a las cuales se les provocó una herida artificial en la zona ecuatorial (de 3 mm de ancho x 3 mm de largo) siguiendo la misma metodología detallada en el Punto 2 del Capítulo III. Las frutas se inocularon en la herida con 20  $\mu\text{L}$  de las levaduras ( $n=3$ ) en diferentes concentraciones ( $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  cél/mL), con posterior inoculación de 10  $\mu\text{L}$  de los patógenos a la CIM (*P. crustosum*  $1 \times 10^3$ , *M. piriformis*  $1 \times 10^2$  y *B. cinerea*  $1 \times 10^3$ ). La determinación de la CIM de *B. cinerea* ccSL57 se realizó utilizando la misma metodología que en el Punto 6 del Capítulo I.

Como control negativo se inoculó agua destilada sola y como positivo se inocularon los patógenos solos. Con el fin de determinar si las levaduras podrían producir síntomas similares a los causados por los patógenos se inocularon heridas con las levaduras solamente (Rist y Rosenberger 1995). Las frutas tratadas se colocaron en bandejas de plástico de 100 mm  $\times$  150 mm  $\times$  50 mm dentro de bolsas de polipropileno con cierre hermético de 140 mm  $\times$  220 mm. Las frutas se conservaron a 0°C por 30 días y 3 días a 22°C (condiciones de almacenamiento), y a 22°C por 7 días (condiciones de comercialización). Se determinó la incidencia (% de heridas enfermas) y severidad (diámetro de lesión) de pudriciones para cada caso. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento con 10 frutas cada uno.

### 4. Análisis estadísticos

Se realizaron los análisis correspondientes de los datos obtenidos utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2019p. Para el análisis de las  $\mu_{\text{max}}$   $\text{h}^{-1}$  y para los datos de CEM se utilizaron los análisis no paramétricos de Kruskal Wallis con comparación de a pares ( $p < 0.05$ ) (dado que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad) y de la varianza (ANOVA) y las medias separadas de acuerdo al test de LSD Tukey ( $p < 0.05$ ), respectivamente.

## RESULTADOS

## 1. Determinación del efecto de la disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH, y su interacción en el crecimiento *in vitro* de las levaduras

Ninguno de los aislamientos de levaduras analizados fue capaz de crecer a 37°C. Las curvas de crecimiento, obtenidas por absorbancia para los rangos de pH,  $a_w$  y temperatura (0-30°C) para *V. victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 se presentan en las Figuras 41, 42, 43, 44 y 45. En el Anexo 6 se muestra la máxima densidad óptica para cada levadura en cada temperatura, según el soluto usado para modificar la actividad agua y para el pH. Mientras que en la Figura 46 se muestran las tasas específicas de crecimiento máximo ( $\mu_{\max} \text{ h}^{-1}$ ) para cada levadura en cada temperatura.

El crecimiento de las levaduras no mostró diferencias significativas ante las modificaciones de pH en ninguna de las temperaturas probadas, con excepción de *V. victoriae* a 5°C, donde se observó una disminución del crecimiento significativa estadísticamente a pH bajos de entre 4.5 y 3.5 (Figura 44 A).

La variación de la temperatura (0-30°C) y el estrés hídrico causado por las  $a_w$  bajas (entre 0.96 y 0.94) afectaron de igual manera a las tres levaduras analizadas, y resultaron las variables que más influyeron sobre el crecimiento.

En las  $a_w$  bajas (entre 0.96 y 0.94) a bajas temperaturas (0°C y 5°C), independientemente del soluto, el crecimiento observado para las levaduras fue bajo con una fase *lag* más larga en comparación con las demás  $a_w$  y temperaturas analizadas. En las temperaturas bajas, 0°C y 5°C, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 mostraron mayor crecimiento que *V. victoriae* ccSL30, en todos los pH y a  $a_w$  entre 0.995-0.97 (Figuras 41 y 42). *Vishniacozyma victoriae* ccSL30 fue la levadura que mostró el crecimiento más bajo a 0°C, mientras que a 5°C el mayor crecimiento de esta levadura ocurrió en los pH ácidos (entre 3.5 y 4.5). A 10°C, los mayores crecimientos de los tres aislamientos, también se obtuvieron en el medio  $a_w$  0.995 modificado con glucosa (Figura 43).

Las combinaciones  $a_w$ -temperatura en las que las tres levaduras mostraron mayor crecimiento en menor tiempo fueron 0.995 y 0.99 a 20°C, en los medios modificados con glucosa (Figura 44 D, E, F), siendo *Cy. capitatum* ccSL1204 la levadura que mostró mayor crecimiento (medio  $a_w$  0.995 modificado con glucosa). Por otro lado, a esta

temperatura, *V. victoriae* ccSL30 mostró mayor crecimiento a  $a_w$  bajos modificados con glucosa (0.94-0.96) que *Cy. capitatum* y *A. pullulans*.

A 30°C, el menor crecimiento de los tres aislamientos se observó en  $a_w$  bajas (entre 0.96 y 0.94). *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 fue el aislamiento que mostró mayor susceptibilidad a esta temperatura. Mientras que *Cy. capitatum* ccSL1204 fue la que mostró mayor crecimiento a 30°C a  $a_w$  altos (entre 0.998 y 0.99) tanto con glucosa como con glicerol como soluto (Figura 45 F e I). Puede observarse, además, que los aislamientos estudiados llegan a la fase estacionaria (agotan los nutrientes y deja de haber crecimiento poblacional) en un menor tiempo que en temperaturas inferiores, pero con un crecimiento menor celular (menor densidad óptica).

De los tres aislamientos probados, *A. pullulans* ccSL1141 fue el que presentó mayor crecimiento (mayor DO) a 0, 10 y 20°C, en el medio modificado a pH 5.5 en la primera temperatura y en el medio modificado con glucosa a  $a_w$  0.995 en las dos restantes (Anexo 6). Mientras que *Cy. capitatum* ccSL1204 fue la que mostró mayor crecimiento (mayor DO) a 5°C y 30°C, en el medio modificado a pH 5.5 en la primera temperatura y en los medios control y en el medio modificado a pH 6.5 en la temperatura restante.

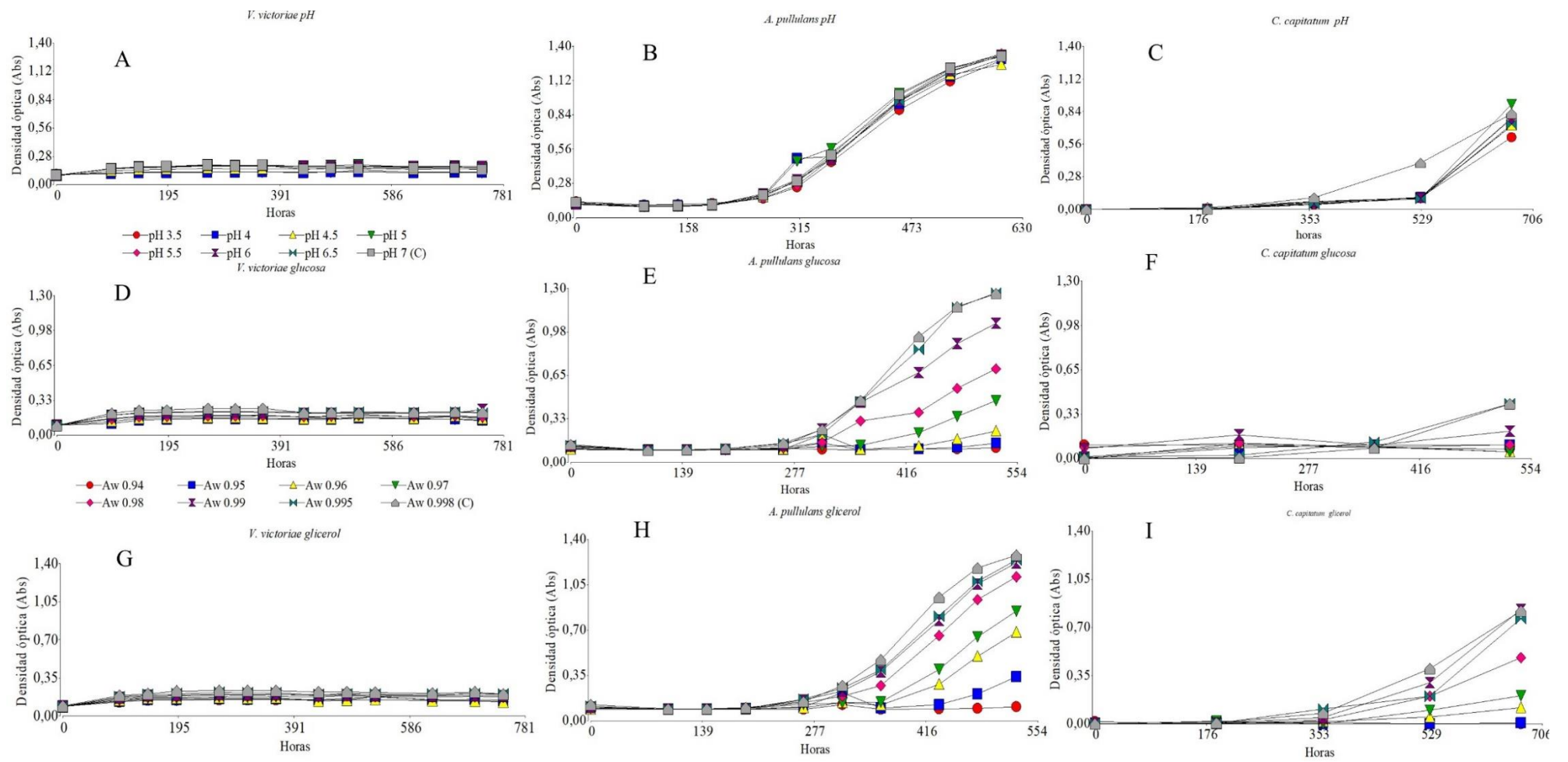


Figura 41. Curvas de crecimiento a 0°C de: A) *V. victorae* ccSL30, B) *A. pullulans* ccSL1141 y C) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes pH; D) *V. victorae* ccSL30, E) *A. pullulans* ccSL1141 y F) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glucosa; y G) *V. victorae* ccSL30, H) *A. pullulans* ccSL1141 y I) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glicerol.

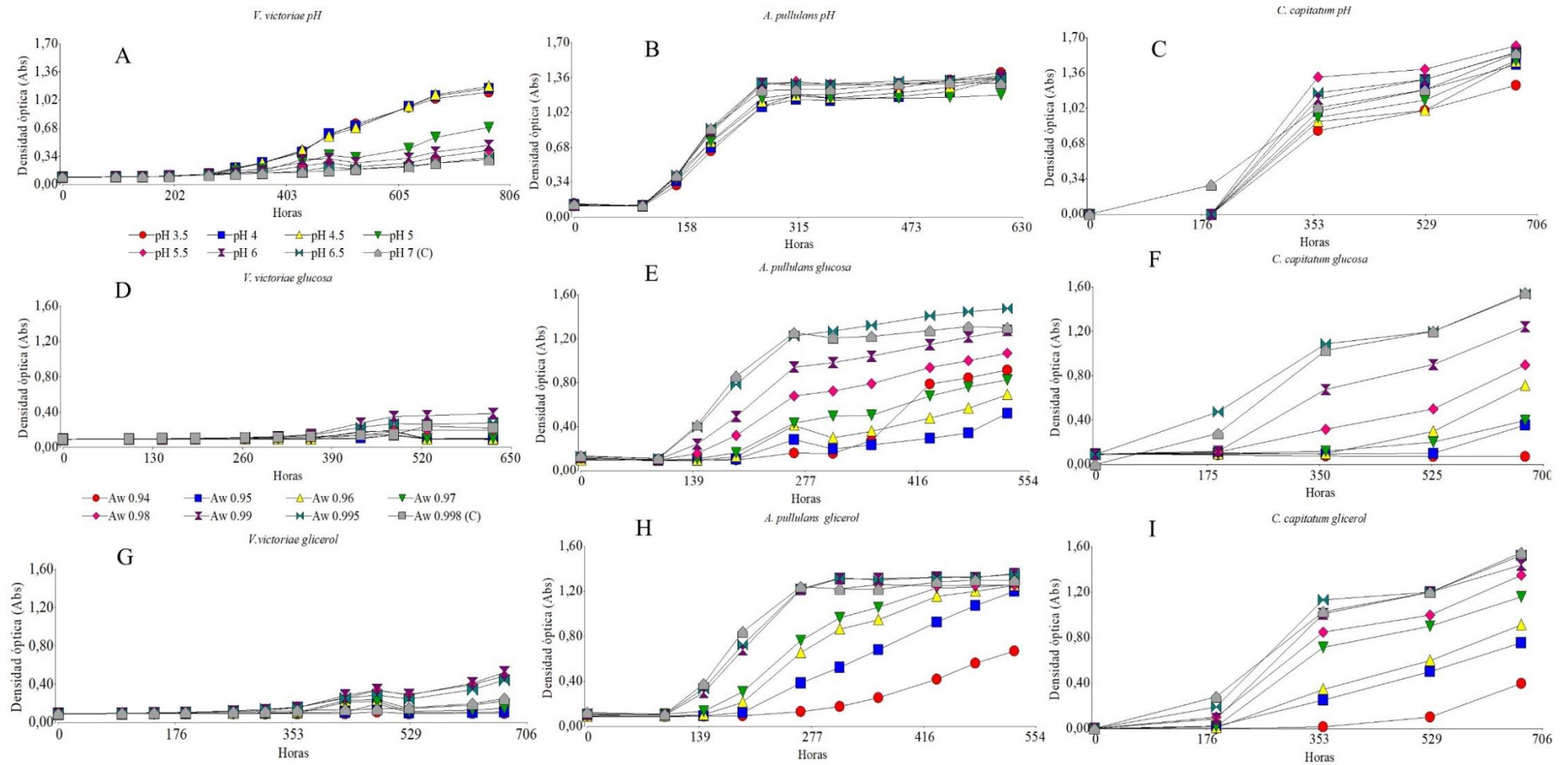


Figura 42. Curvas de crecimiento a 5°C de: A) *V. victoriae* ccSL30, B) *A. pullulans* ccSL1141 y C) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes pH; D) *V. victoriae* ccSL30, E) *A. pullulans* ccSL1141 y F) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glucosa; y G) *V. victoriae* ccSL 30, H) *A. pullulans* ccSL1141 y I) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glicerol.



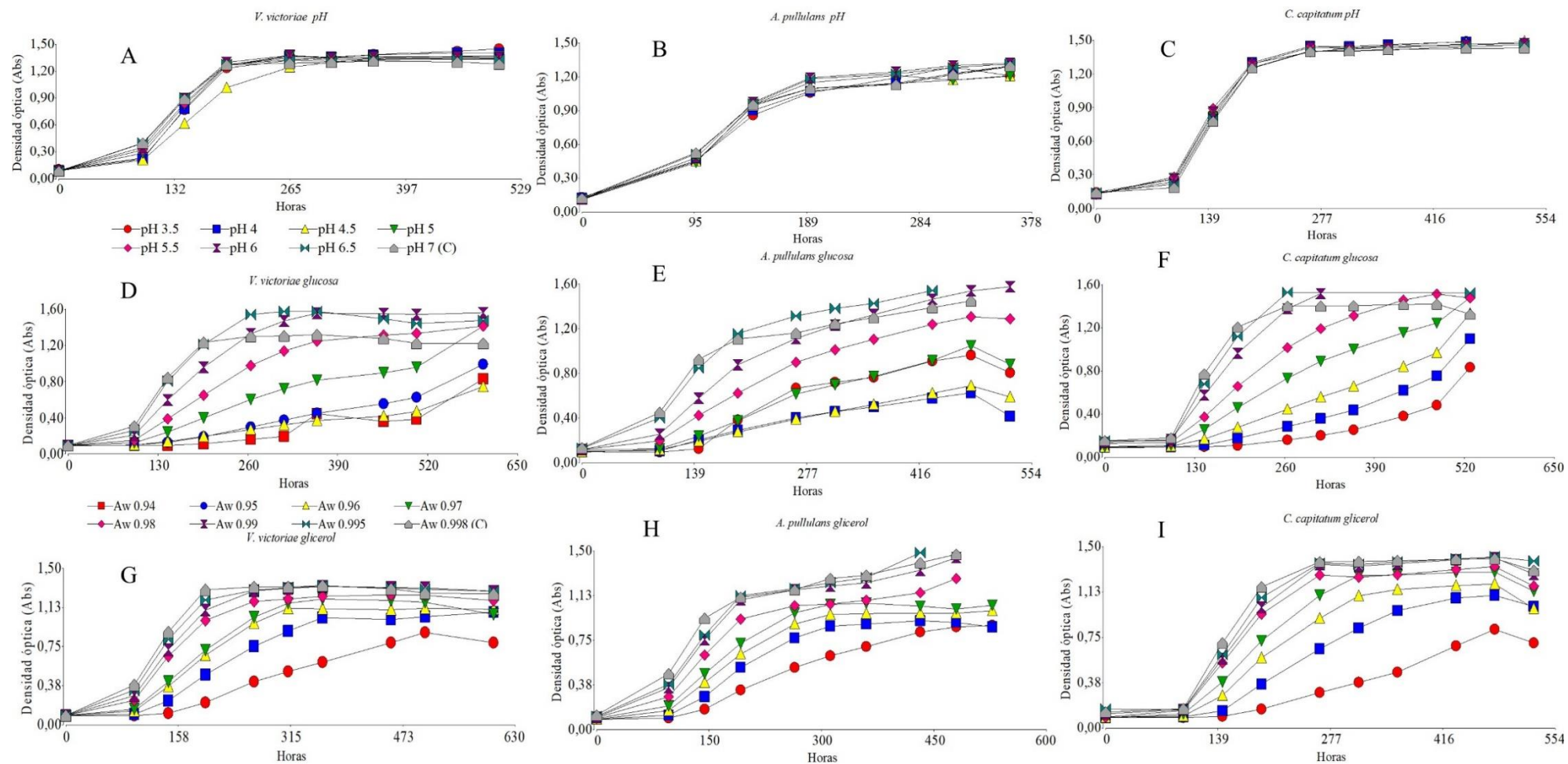


Figura 43. Curvas de crecimiento a 10°C de: A) *V. victoriae* ccSL30, B) *A. pullulans* ccSL1141 y C) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes pH; D) *V. victoriae* ccSL30, E) *A. pullulans* ccSL1141 y F) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glucosa; y G) *V. victoriae* ccSL30, H) *A. pullulans* ccSL1141 y I) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glicerol.

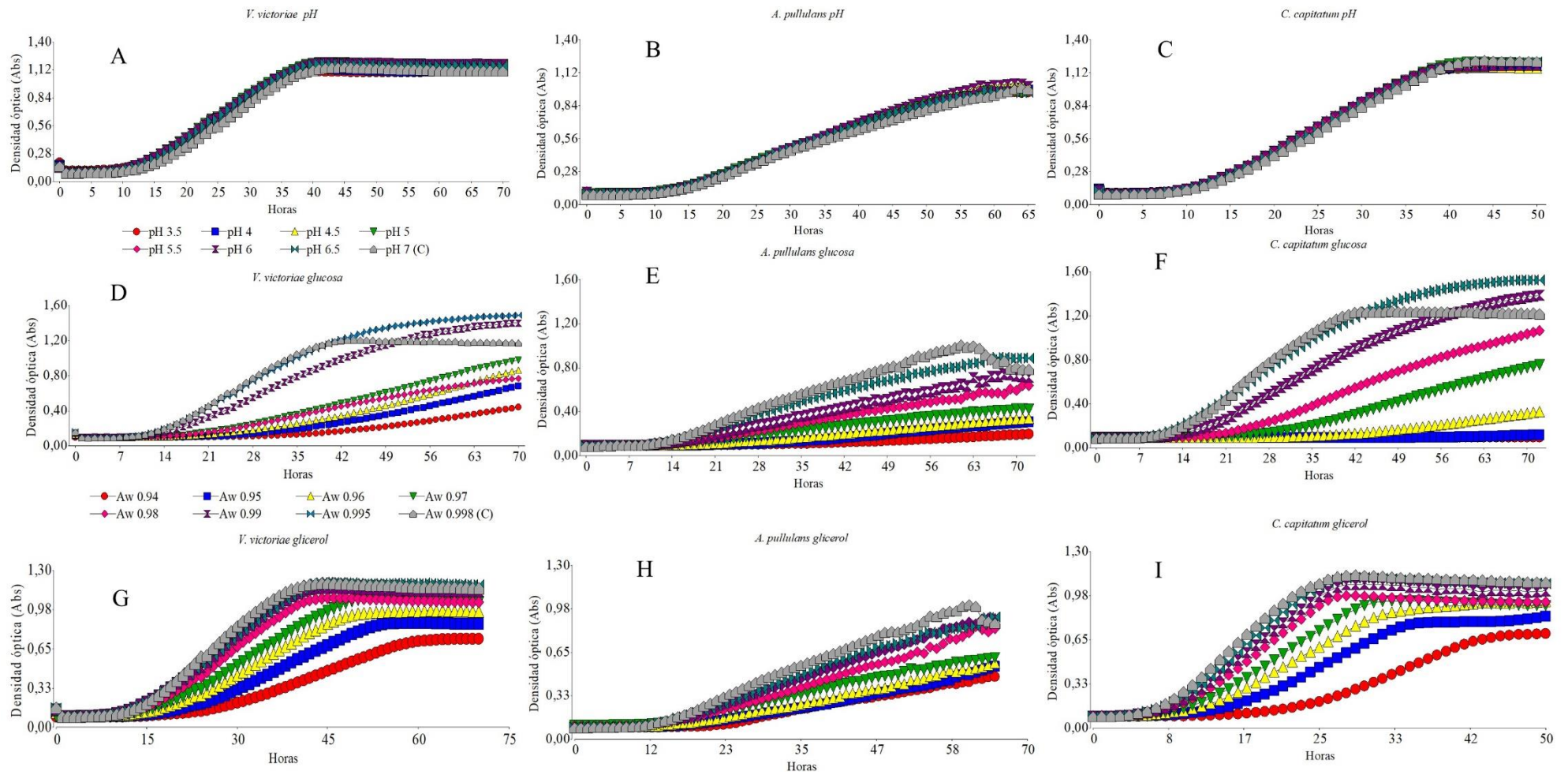


Figura 44. Curvas de crecimiento a 20°C de: A) *V. victoriae* ccSL30, B) *A. pullulans* ccSL1141 y C) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes pH; D) *V. victoriae* ccSL30, E) *A. pullulans* ccSL1141 y F) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glucosa; y G) *V. victoriae* ccSL30, H) *A. pullulans* ccSL1141 y I) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glicerol.

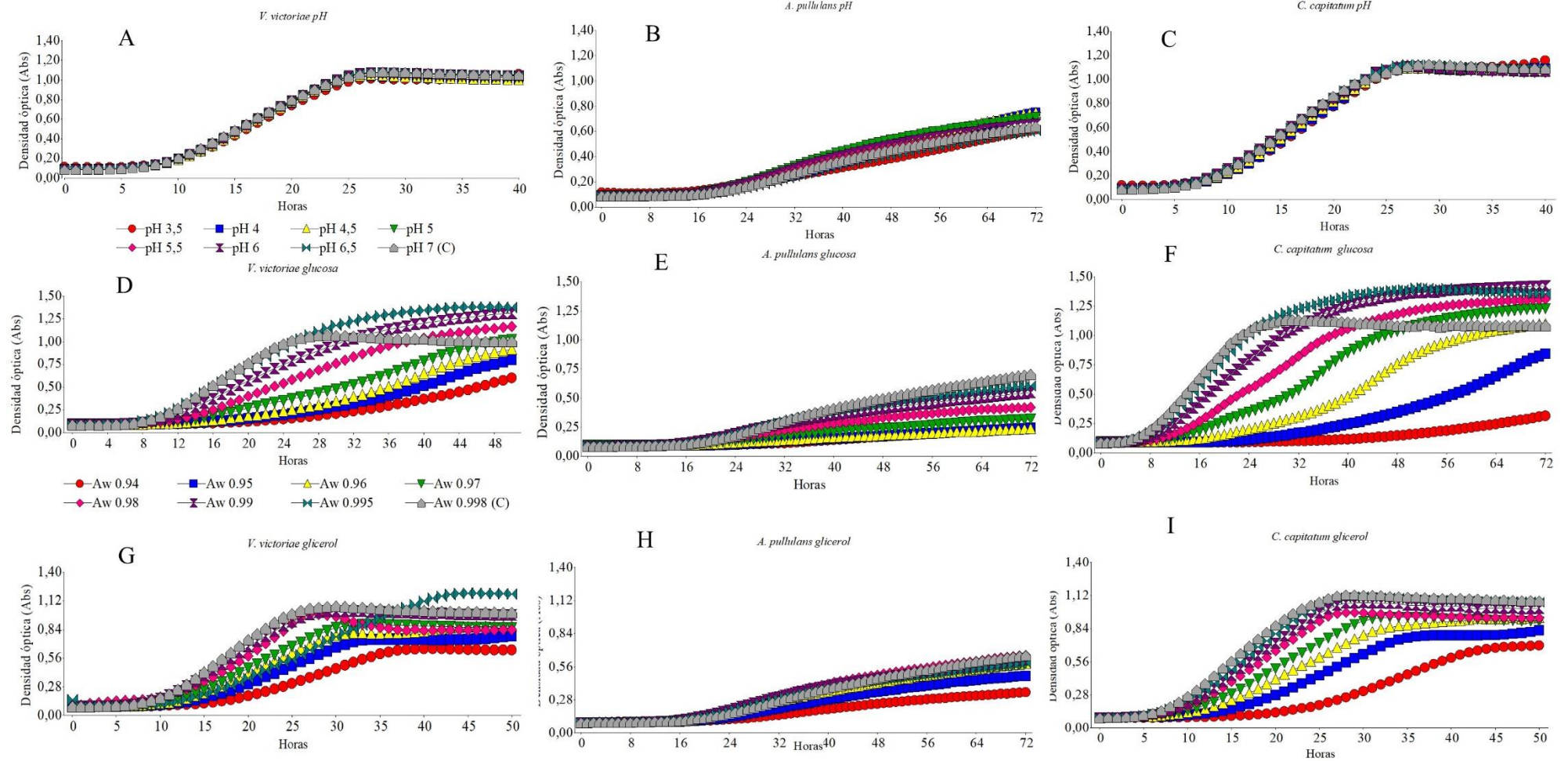


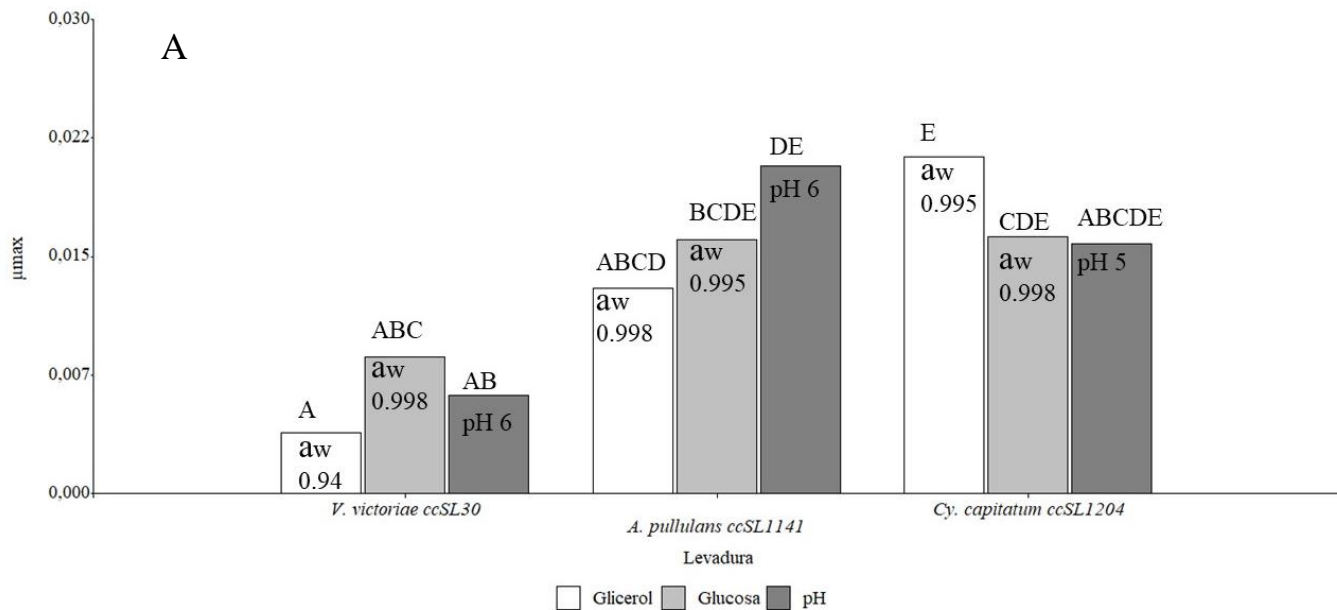
Figura 45. Curvas de crecimiento a 30°C de: A) *V. victoriae* ccSL30, B) *A. pullulans* ccSL1141 y C) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes pH; D) *V. victoriae* ccSL30, E) *A. pullulans* ccSL1141 y F) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glucosa; y G) *V. victoriae* ccSL30, H) *A. pullulans* ccSL 1141 y I) *Cy. capitatum* ccSL1204 a diferentes  $a_w$  modificadas con glicerol.

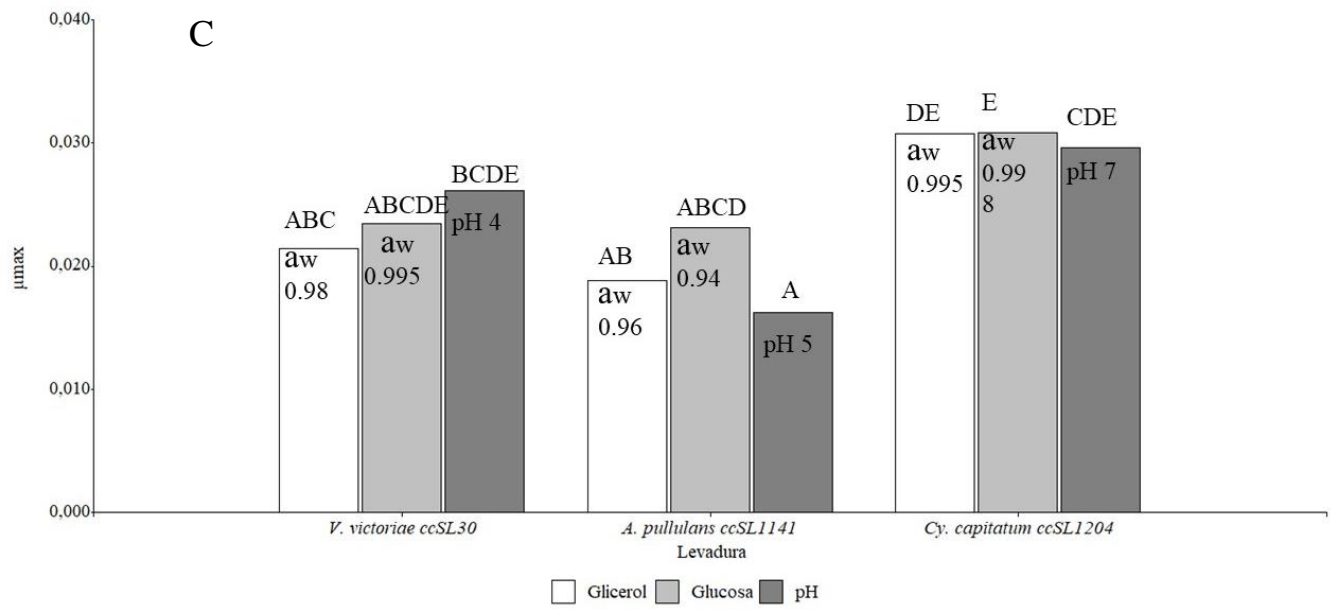
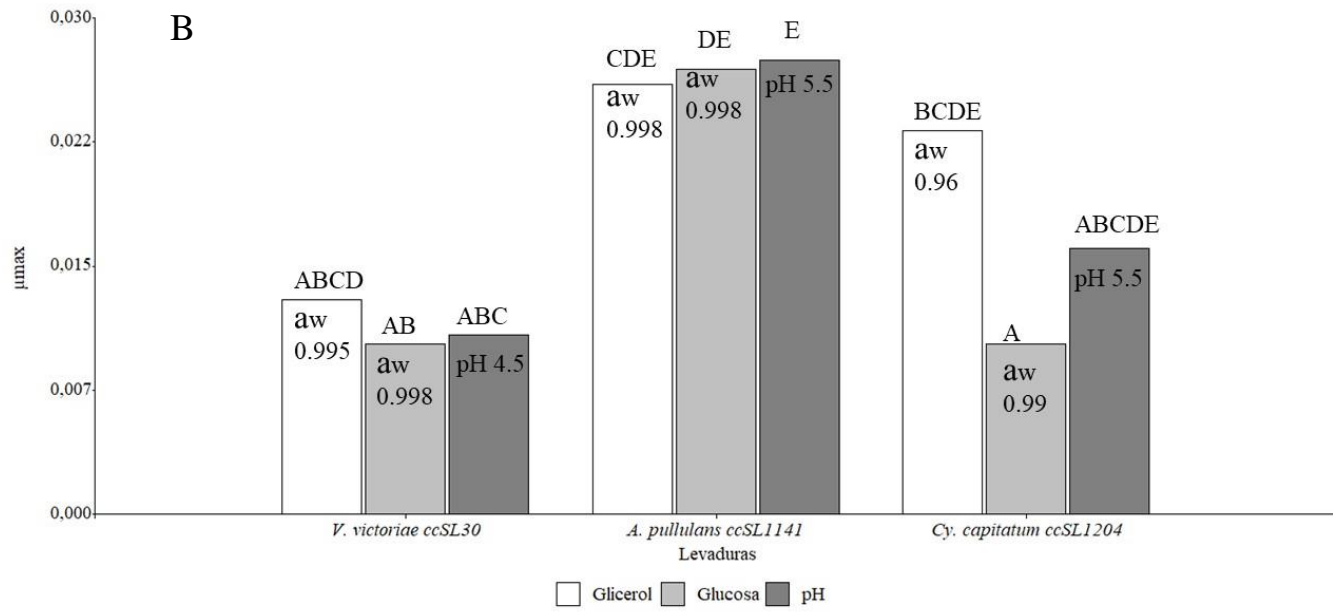
Para complementar los resultados presentados en las Figuras 41, 42, 43, 44 y 45, en la Figura 46 se muestran los valores de la tasa específica de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$  h<sup>-1</sup>) determinados a partir de la pendiente de la curva logarítmica contra el tiempo en la región de crecimiento exponencial a cada una de las condiciones estudiadas. En todas las temperaturas estudiadas la tasa de crecimiento máxima se observó en las  $a_w$  más altas, tanto en los medios con glicerol como con glucosa, excepto para *A. pullulans* ccSL1141 a 10°C temperatura en la cual la  $\mu_{\max}$  se presentó en medio con reducción de  $a_w$  (Figura 41C).

En concordancia con lo que mostraron las curvas de crecimiento (Figuras 41 y 42), a 0°C y 5°C *A. pullulans* ccSL1141 y *C. capitatum* ccSL1204 mostraron las  $\mu_{\max}$  más altas y presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con las  $\mu_{\max}$  de *V. victoriae* ccSL30 (Figuras 41 y 46 A y B). A medida que aumentó la temperatura, la  $\mu_{\max}$  de *V. victoriae* ccSL30 comenzó a aumentar (Figura 46 C, D y E).

Para *V. victoriae* ccSL30 y *C. capitatum* ccSL1204 la  $\mu_{\max}$  h<sup>-1</sup> se observó a 30°C y fueron diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ) con *A. pullulans* ccSL1141, coincidiendo con lo observado en las Figuras 44 y 45.

Mientras que para *A. pullulans* ccSL1141 la  $\mu_{\max}$  h<sup>-1</sup> fue a los 20°C, en los medios de cultivo con pH y  $a_w$  sin modificaciones (controles) (Figura 41D y E). A dicha temperatura no se observaron diferencias significativas entre las especies.





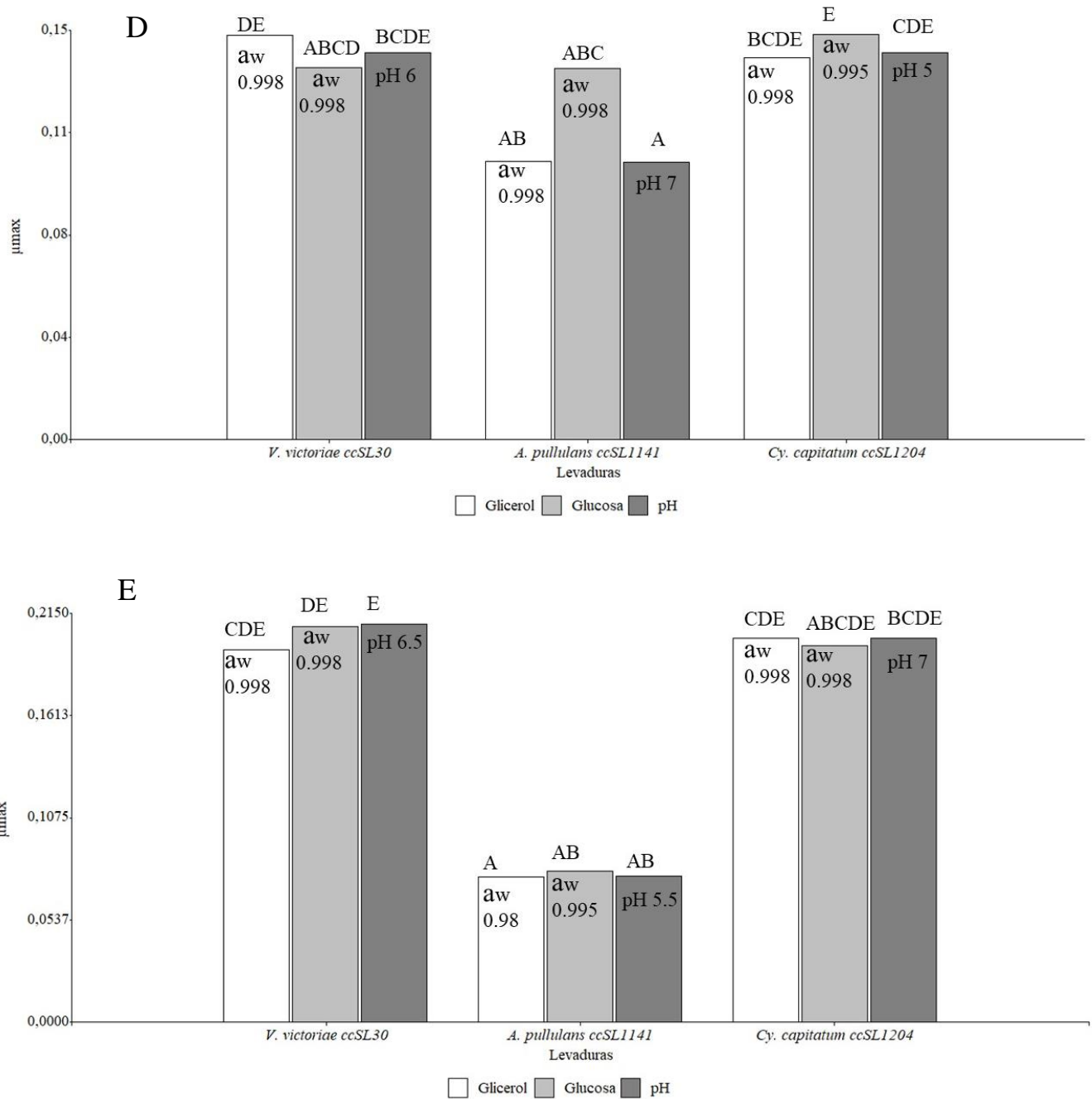


Figura 46. Tasa específica de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$ ) de *V. victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 en medios modificados con glicerol, glucosa y ác. málico a diferentes temperaturas. A) 0°C, B) 5°C, C) 10°C, D) 20°C y E) 30°C.

## 2. Determinación de la concentración efectiva mínima en ensayos de biocontrol en cerezas

Los resultados obtenidos para la determinación de la concentración efectiva mínima de los tres aislamientos seleccionados frente a tres patógenos de poscosecha se presentan en las Figuras 46 y 47.

A temperatura de almacenamiento (0°C) se observa que las concentraciones  $5 \times 10^7$  cél/mL y  $1 \times 10^8$  cél/mL de las tres levaduras fueron las que tuvieron un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el desarrollo de *P. crustosum* ccCIEFAP491, siendo *A. pullulans* ccSL1141 el aislamiento que redujo la virulencia en mayor porcentaje (Figura 46A). Los resultados de este ensayo son similares a los obtenidos en el Capítulo III de esta Tesis. Para este patógeno la reducción de la virulencia obtenida con la concentración del ACB del orden de  $5 \times 10^7$  cél/mL (78.19%) no tuvo diferencias significativas con respecto a la concentración de  $1 \times 10^8$  cél/mL (93.09%). Cuando se realizó la prueba sobre el efecto de las diferentes concentraciones de levaduras sobre *M. piriformis* ccCIEFAP501 nuevamente puede observarse que los tres aislamientos en las concentraciones entre  $1 \times 10^7$  cél/mL y  $1 \times 10^8$  cél/mL afectaron significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento del patógeno. Pudo observarse, además, que la concentración  $1 \times 10^8$  cél/mL de *V. victoriae* ccSL30 fue la que redujo en mayor porcentaje la virulencia (84%) (Figura 46B). Cuando las levaduras se enfrentaron a *B. cinerea* ccSL57, el desarrollo de este patógeno se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) sólo cuando se enfrentó a *Cy. capitatum* ccSL1204, en la concentración de  $10^8$  cél/mL (Figura 46C).

A temperatura de comercialización (22°C), la virulencia de *P. crustosum* ccCIEFAP491 las reducciones más significativas ( $p < 0,05$ ) sobre la virulencia la lograron *Cy. capitatum* ccSL1204 en concentraciones  $5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  cél/mL y concentraciones de entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  cél/mL de *A. pullulans* ccSL1141 (Figura 47A). Las concentraciones  $5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  cél/mL de *Cy. capitatum* ccSL1204 mostraron el mayor porcentaje de reducción de este patógeno, 77.74% y 64.11%, respectivamente. Cuando las levaduras se enfrentaron a *M. piriformis* ccSL501, en esta temperatura, *V. victoriae* ccSL30 en una concentración de  $1 \times 10^8$  fue la que redujo en mayor porcentaje (66.67%) el desarrollo de *M. piriformis* ccSL501, seguida por *Cy. capitatum* ccSL1204 en concentraciones de entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  cél/mL (43.67%) (Figura 47B). Por último, tal como ocurrió a 0°C, la levadura que más efecto tuvo sobre el desarrollo de *B. cinerea* ccSL57, fue *Cy. capitatum* ccSL1204, con una significativa ( $p < 0,05$ ) reducción del 32.5% del patógeno (Figura 47C).

La concentración efectiva mínima de los aislamientos analizados en este ensayo se encuentra en concentraciones del orden de  $1 \times 10^7$  cél/mL, debido a que la reducción de la virulencia de los patógenos a esta concentración no mostró diferencias significativas con concentraciones mayores ( $1 \times 10^8$  cél/mL).



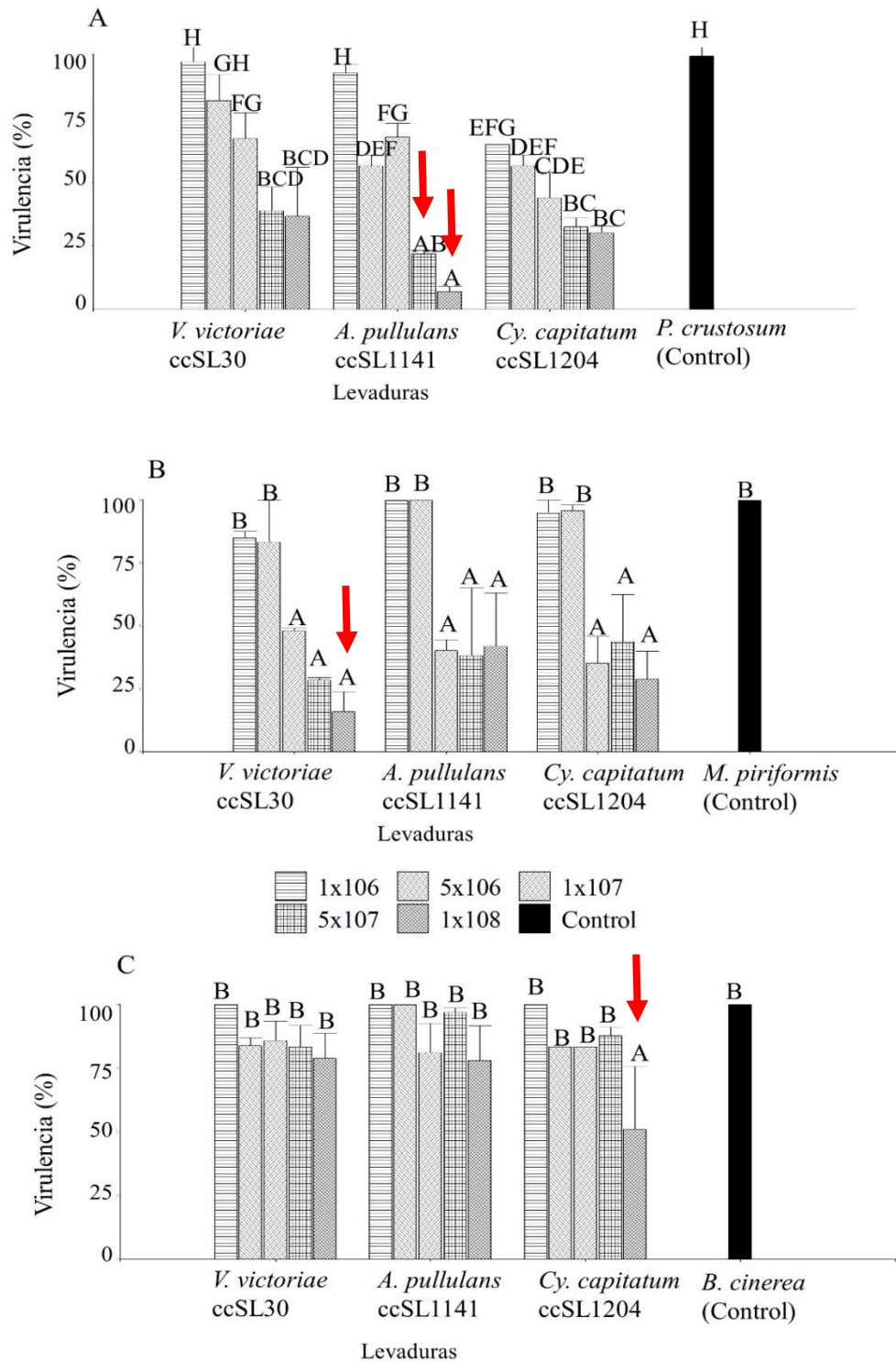


Figura 46. Efecto de distintas concentraciones de *V. victoriae*, *A. pullulans* y *Cy. capitatum* sobre la virulencia de A) *P. crustosum*, B) *M. piriformis* y C) *B. cinerea* sobre cerezas conservadas a 0°C (condiciones de almacenamiento). Las flechas rojas señalan los mejores resultados frente a cada patógeno. Barras con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) para el Test LSD de Fisher

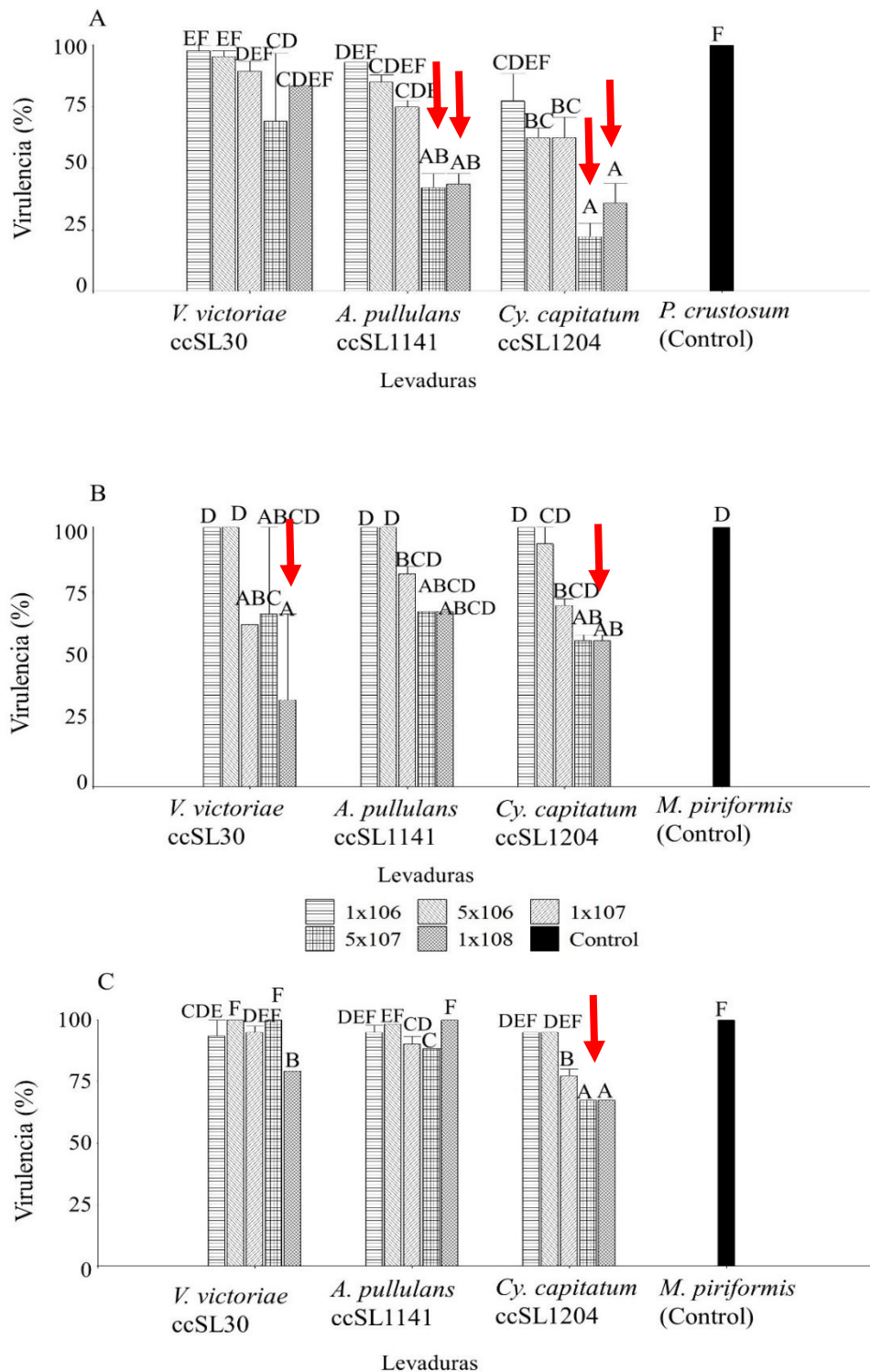


Figura47. Efecto de distintas concentraciones de *V. victoriae*, *A. pullulans* y *Cy. capitatum* sobre la virulencia de A) *P. crustosum*, B) *M. piriformis* y C) *B. cinerea* sobre cerezas conservadas a 22°C (condiciones de comercialización). Las flechas rojas señalan los mejores resultados frente a cada patógeno. Barras con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) para el Test LSD de Fisher

## DISCUSIÓN

Este estudio es el primer aporte detallado sobre la relación entre  $a_w$ , temperatura y pH y el crecimiento de aislamientos de las especies *V. victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204. Por lo que los resultados tienen un doble aporte: una mejor caracterización biológica de estas especies y generar información sobre la posible aplicación de estos potenciales agentes de biocontrol. Estos resultados informan las condiciones ambientales más favorables en las cuales los aislamientos nativos de *V. victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 pueden crecer, lo cual es importante para predecir la respuesta de biocontrol (Gotor-Vila et al., 2017).

Los resultados acerca de la incapacidad de los aislamientos de crecer a 37°C (temperatura corporal humana), son un primer indicio sobre la posibilidad de utilizar estos microorganismos en alimentos para consumo. Otros estudios complementarios que deben realizarse para evaluar su inocuidad incluyen capacidad para producir fosfolipasas y capacidad de crecimiento en las condiciones del estómago (pH 2) (Rigby 1981, de Llanos et al., 2006, Alegre et al., 2013). La ausencia de células viables de *A. pullulans* y *V. victoriae* a temperaturas mayores a 35°C ha sido demostrada previamente (Lima et al., 1997, Vero et al., 2009, Lutz et al., 2020).

Los aislamientos analizados en este estudio, fueron seleccionados en principio, por su capacidad de crecimiento a 0°C (Capítulo 2). En este Capítulo se analiza en profundidad los rangos de temperatura de crecimiento y detectando que son capaces de crecer entre 0 y 30°C. Esto indica que estamos frente a levaduras adaptadas al frío clasificadas como psicotolerantes, debido a que su  $\mu_{max}$  se encuentra entre los 20 y 30°C (Cavicchioli et al., 2002). Es importante señalar que distintas cepas de una misma especie pueden estar más o menos adaptadas al frío, debido a que para colonizar con éxito los ambientes fríos las cepas de levaduras expuestas durante varias generaciones a bajas temperaturas, han desarrollado una serie de respuestas adaptativas y de aclimatación basadas genéticamente, lo que hace necesario establecer el rango de crecimiento para las levaduras nativas (Buzzini y Margesin 2014). Estudios complementarios de variabilidad fenotípica y genotípica podrían ayudar a explicar los comportamientos disimiles entre aislamientos de la misma especie frente al crecimiento en diferentes rangos de temperatura.

Los datos obtenidos muestran que los aislamientos tienen tolerancia a los cambios de pH (3.5-7) y que la temperatura (0°-30°C) y la actividad del agua ( $a_w$  0.94–0.99) influyen más sobre el

crecimiento de los mismos. Resultados similares obtuvieron Teixidó et al., (1998) y Carbó et al., (2018) en sus estudios ecofisiológicos para *Candida sake* como ACB frente a los patógenos de poscosecha *Penicillium*, *Botrytis*, *Rhizopus* de frutos de pepita, y Lahlali et al., (2008) para *Pichia anomala* como ACB frente a *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en la poscosecha de cítricos. Es importante destacar, que la importancia de que los potenciales agentes de biocontrol puedan crecer en pH bajos radica en que esta característica les proporciona una ventaja para desarrollarse en los ambientes con pH ácidos comunes en las heridas de frutas (Teixidó et al., 1998).

Los tres aislamientos probados, tuvieron la capacidad de crecer en todas las  $a_w$  probadas en alguno de los dos solutos utilizados para modificar la disponibilidad de agua. La capacidad de tolerar bajas  $a_w$  y crecer en sustratos con muy poca disponibilidad de agua líquida es una característica de las levaduras adaptadas al frío (Boundy-Mills 2014). La capacidad para resistir el estrés osmótico, es una de las cualidades que hacen adecuada a una cepa para su uso como ACB, debido a que, una vez que la levadura se ha aplicado sobre la fruta, la  $a_w$  depende de las condiciones ambientales dentro del hospedador y cuanto más flexible sea el biocontrolador en este sentido mejor será su adaptación al sistema (Liu et al., 2013, Sui et al., 2015). Por otro lado, la información aportada servirá para establecer los parámetros iniciales para posteriores ensayos de producción de biomasa a mayor escala y para una posterior formulación conociendo la reacción de los potenciales ACB frente al estrés (Sui et al., 2015, Carbó et al., 2018). Este es el primer trabajo que evalúa la capacidad de las levaduras *V. victoriae*, *A. pullulans* y *Cy. capitatum* de crecer en un amplio rango de  $a_w$  (0.995-0.94).

En los ensayos realizados con *A. pullulans* ccSL1141 se determinó que la temperatura óptima de crecimiento fue de 20°C, en un rango de 0 a 30°C, lo que demuestra la versatilidad de este microorganismo. Vero et al., (2009) reportaron una adaptabilidad similar para una cepa de *A. pullulans*, probada para controlar a *P. expansum* y *B. cinerea* en manzanas, con una temperatura óptima de crecimiento de 25°C, con capacidad de crecer en un rango de temperatura de entre 5 y 25°C, con una disminución en el crecimiento a 30°C. Por otro lado, Mounir et al. (2007) observaron un rango de crecimiento entre 5 y 25°C, para una cepa de *A. pullulans* biocontroladora de *P. expansum* en manzanas.

Al analizar el rango de temperatura de crecimiento de *Vishniacozyma victoriae* ccSL30 se observa que su tasa de crecimiento a 0 y 5°C es bajo en comparación con las otras levaduras evaluadas

en las condiciones probadas y que su  $\mu_{\max}$  aumenta conforme aumenta la temperatura, alcanzando su mayor tasa de crecimiento a los 30°C. Carrasco et al., (2012) reportaron un rango de crecimiento más acotado para esta levadura, entre 4 y 15°C para una cepa de *V. victoriae* productora de enzimas extracelulares. Mientras que Unver et al., (2015) informaron un rango de crecimiento similar al nuestro, entre 5 y 35°C, con un mayor crecimiento entre 15 y 20°C, para una cepa de *V. victoriae* productora de proteasas. De acuerdo a nuestros resultados y estos trabajos resultados previos, donde se observa las bajas tasas de crecimiento de esta levadura a bajas temperaturas permitirían concluir que *Vishniacozyma victoriae* ccSL30 no sería una buena candidata para una futura aplicación en cámaras de conservación de fruta fina.

Por otro lado, *Cy. capitatum* ccSL1204 mostró tasas de crecimiento máximo más altas en comparación con las otras levaduras evaluadas en todo el rango de temperaturas probadas (0°-30°C). Si bien hay estudios que indican que esta especie crece a bajas temperaturas (Birgisson et al., 2003, Nakagawa et al., 2004), este es el primer estudio que reporta una cepa de la especie con capacidad de crecer en un amplio rango de temperatura. Nuestros resultados, sumados a los de otros investigadores citados, muestran la variabilidad intraespecífica que existe en estos microorganismos para los parámetros evaluados. Esto muestra la importancia de comparar los efectos de aislamientos de una misma especie procedentes de diferentes hospedantes, ambientes y prácticas agrícolas.

Los resultados obtenidos aquí sobre las más altas tasas de crecimiento máximo a 0 y 5°C de *Cy. capitatum* ccSL1204 y *A pullulans* ccSL1141, sumados sus capacidades biocontroladora *in vivo* a 0°C (Capítulo III) y posibles mecanismos de acción *in vitro* a 0°C (Capítulo IV), indican que estas levaduras serían mejores candidatos para ser aplicados en cámaras de conservación de frutas. Mientras que las mayores  $\mu_{\max}$  a 30°C de *Cy. capitatum* ccSL1204 y *V. victoriae* ccSL30, proporcionan una base de información sobre los mismos para poder ser evaluados como agentes de biocontrol durante la precosecha.

Estos ensayos fueron realizados en condiciones de conservación y comercialización lo que permite evaluar además la eficiencia el potencial como ACB, no sólo en la fase de producción sino una vez aplicado, lo cual es esencial para establecer las condiciones para producir los antagonistas y también para que sean altamente eficaces como ACBs.

En cuanto a la determinación de la concentración efectiva mínima, los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que los aislamientos seleccionados como potenciales agentes de biocontrol,

son efectivos a concentración inicial del orden de  $10^7$  UFC/mL, como a concentraciones de  $10^8$  UFC/mL. Datos similares han sido reportados para *V. victoriae* y *A. pullulans*, probados como ACB de patógenos de poscosecha de peras y manzanas, respectivamente (Mounir et al., 2007, Lutz et al., 2020) y por Oro et al., (2014) para *Metschnikowia pulcherrima* y *Wickerhamomyces anomalus* enfrentadas a *Monilinia laxa* en cerezas. Además, otros autores señalan que generalmente es necesario inocular las frutas con una concentración de levadura de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL (Lima et al., 2003, Long et al., 2006, Janisiewicz et al., 2008). La capacidad biocontroladora de estas levaduras en concentraciones de  $10^7$  UFC/mL, como a concentraciones de  $10^8$  UFC/mL indicaría que los mecanismos de acción por los cuales ejercen su antagonismo se mantienen a menores cantidades de inóculo que las analizadas en el Capítulo III. Además, el conocimiento de la CEM de estos aislamientos es importante para futuros ensayos tanto a escala de laboratorio como a escala semicomercial, asegurando el antagonismo y optimizando tiempo y recursos.

Por otro lado, los datos obtenidos en este Capítulo confirman los obtenidos en el Capítulo III de esta Tesis acerca de la capacidad de biocontrol de *V. victoriae* ccSL30, *A. pullulans* ccSL1141 y *Cy. capitatum* ccSL1204 sobre *P. crustosum* ccCIEFAP491 y *M. piriformis* ccCIEFAP501. Además, muestran que *Cy. capitatum* ccSL1204 y *A. pullulans* ccSL1141 son los aislamientos más eficaces frente a *P. crustosum* y *M. piriformis*, ya que son capaces de actuar a una concentración menor que *V. victoriae*. De los aislamientos de levaduras evaluadas, el más eficaz frente *B. cinerea* fue *Cy. capitatum* ccSL1204 a ambas temperaturas, siendo altamente eficaz cuando la fruta se encuentra en el período de conservación. Este es el primer registro sobre la capacidad mínima efectiva de *Cy. capitatum* como agente de biocontrol.

De nuestros resultados podemos concluir que el aislamiento *Cy. capitatum* ccSL1204, obtenida de cerezas de producción convencional con el método de aislamiento selectivo (Punto 1.3 del Capítulo II, Anexo 3), es un potencial ACB, ya que tiene una alta capacidad de desarrollo en un amplio rango de temperaturas con capacidad para desarrollarse exitosamente a las temperaturas críticas de las frutas finas ( $0^{\circ}\text{C}$  y  $22^{\circ}\text{C}$ ) y pH, bajos característicos de este tipo de frutas, además presenta un espectro de acción más amplio y es más efectivo a menores concentraciones que los otros dos aislamientos evaluados: *V. victoriae* ccSL30 y *A. pullulans* ccSL1141.

# CONCLUSIONES

En esta Tesis se aisló, identificó y caracterizó por primera vez la microbiota de levaduras y hongos asociada a la poscosecha de cerezas, frambuesas y zarzamoras en Argentina.

Se demostró que, en las condiciones analizadas, los hongos patógenos que más afectan las frutas por su virulencia, concentración mínima infectiva, resistencia a fungicida y frecuencia de aparición en las cerezas, frambuesas y zarzamoras durante la poscosecha, en Patagonia Sur son *Mucor piriformis* y *Penicillium crustosum*.

Diez aislamientos nativos mostraron ser los más versátiles como potenciales antagonistas frente *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491, por su efecto sobre la virulencia en dos temperaturas críticas para las frutas (la temperatura de almacenamiento, 0°C, y la temperatura de comercialización, 22°C).

Las levaduras nativas *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204, *Aureobasidium pullulans* ccSL 1141, *Naganishia adeliensis* ccSL154 y 441, *Filobasidium stepposum* ccSL614, *Vishniacozyma victoriae* ccSL30 y ccSL771, *Naganishia globosa* ccSL631, *Tausonia pullulans* ccSL899, *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199 y la levadura Yield Plus (*Cryptococcus albidus*) mostraron mejor control de la virulencia de *Mucor piriformis* ccCIEFAP501 y *Penicillium crustosum* ccCIEFAP491.

Las diez levaduras nativas fueron más eficaces que la levadura comercial Boni Protect y las seleccionadas para el control de patógenos de pera, demostrando la importancia de aislar ACB a partir de los sustratos a proteger.

Una nueva técnica fue desarrollada en esta Tesis para la evaluación del potencial biocontrolador para *Berries* a través del análisis de la infección natural de patógenos y resultó ser la estrategia más apropiada para la evaluar la capacidad antagonista en estas frambuesas y zarzamoras. La misma consistió en la aplicación de los potenciales ACB por la técnica de sprayado sin inoculación de mitosporas de los patógenos.

Los aislamientos nativos *Meyerozyma guilliermondii* ccSL199, *Naganishia globosa* ccSL631, *Aureobasidium pullulans* ccSL 1141, *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1024 resultaron efectivos para controlar el desarrollo de enfermedades de poscosecha en los tres tipos de frutas.



Se demostró que la inoculación conjunta de levaduras en iguales proporciones, capaces de crecer en las mismas condiciones no mejora la eficacia como ACBs para controlar el desarrollo de las enfermedades.

*Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 son los aislamientos nativos que presentan más mecanismos de acción frente al desarrollo de *Mucor piriformis* y *Penicillium crustosum* dentro de los ensayos *in vitro* probados, en las dos temperaturas críticas para la fruta fina.

El crecimiento de *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 se ve afectado en mayor medida por los cambios en la temperatura y la actividad de agua ( $a_w$ ) que por cambios en el rango de pH.

El crecimiento celular más veloz de *Vishniacozyma victoriae* ccSL30, *Aureobasidium pullulans* ccSL1141 y *Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204 se produce cuando la  $a_w$  es 0.995 y la temperatura es de 20°C.

La concentración mínima de inóculo necesaria para que estas levaduras nativas sean efectivas y logren desarrollar su capacidad antagonista frente a los patógenos de poscosecha se encuentra en el orden de  $10^7$  cél/mL.

*Cystofilobasidium capitatum* ccSL1204, podría ser considerado un potencial ACB con condiciones para continuar con las etapas de producción y desarrollo de un bioproducto por su capacidad de crecimiento en un amplio rango de temperaturas, pH y por tener un espectro de acción más amplio y ser efectivo a menores concentraciones que los otros dos aislamientos probados (*Vishniacozyma victoriae* ccSL30 y *Aureobasidium pullulans* ccSL1141).

Esta es la primera vez que se reporta y caracteriza a *Cystofilobasidium capitatum* como un potencial ACB.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abadias M., Teixidó N., Usall J., Viñas I. 2003. Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *J. Appl. Microbiol.* 95: 301–309.
- Abdelfattah A., Wisniewski M., Droby S., Schena L. 2016. Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture research.* 3(1): 1-12.
- Agirman B., Erten H. 2020. Biocontrol ability and action mechanisms of *Aureobasidium pullulans* GE17 and *Meyerozyma guilliermondii* KL3 against *Penicillium digitatum* DSM2750 and *Penicillium expansum* DSM62841 causing post-harvest diseases. *Yeast.* doi:10.1002/yea.3501.
- Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research.* 25:3389-3402.
- Alegre I., Viñas I., Usall J., Anguera A., Altisent R., Abadias M. 2013. Antagonistic effect of *Pseudomonas graminis* CPA-7 against foodborne pathogens in fresh-cut apples under simulated commercial conditions. *Food microbiology* 33:139-148.
- Alonso J., Alique R. 2006. Sweet Cherries. In Hui YH., Barta J., Cano MP., Gusek TW., Sidhu JS., Sinha NK (Eds.). *Handbook of Fruits and Fruit Processing.* (pp. 359-367). Oxford: Blackwell Publishing.
- Alves B. 2020. Argentina: fresh cherries production volume 2010-2019. Recuperado de: <https://www.statista.com/statistics/877036/argentina-fresh-cherries-production/#statisticContainer>
- Amaturi C., López S., Sangorrin M., Pildain M. 2018. Influencia de aditivos inorgánicos sobre la eficacia biocontroladora de *Cystofilobasidium capitatum* y *Meyerozyma guilliermondii* frente a patógenos de poscosecha. 6ta Jornadas Sudamericanas de biología y biotecnología de levaduras. Bariloche, Argentina.
- Antieco M., López S., Sangorrin M., Pildain M. 2018. Efecto del quitosano sobre la eficacia biocontroladora de la levadura indígena *Cystofilobasidium capitatum* ccCIEFAP1204 frente a patógenos de cereza. 6ta Jornadas Sudamericanas de biología y biotecnología de levaduras. Bariloche, Argentina, 1 al 4 de octubre de 2018.
- Arras G., Cicco VD., Arru S., Lima G. 1998. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 73(3): 413-418.
- Baker KJ., Cook RJ. 1974. *Biological control of plant pathogens.* Freeman. San Francisco.
- Barata A., Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153: 243-259.
- Barkai-Golan R. 2001. *Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control.* Netherlands. Elsevier.
- Bar-Shimon M., Yehuda H., Cohen L., Weiss B., Kobeshnikov A., Daus A. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics.* 45: 140-148.

- Bassam A., Fratamico Pina M., Smith JL. 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science*. 74 (1): 24-37.
- Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A., Velázquez-del Valle M., Hernández- López M., Ait Barka E., Bosquez-Molina E., Wilson C. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.* 25: 108–118.
- Benitez Ahrendts M., Carrillo L. 2004. Levaduras inhibidoras de *Penicillium*. *Rev. argent. microbiol.* 36 (4): 182-186.
- Białkowska A., Szulczewska K., Krysiak J., Florczak T., Gromek E., Kassassir H., Kur J., Turkiewicz M. 2017. Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. *Polar Biology*. 40(9): 1787-1803.
- Białkowska A., Turkiewicz M. 2014. Miscellaneous cold-active yeast enzymes of industrial importance. In: Buzzini P., Margesin R. *Cold-adapted yeasts: Miscellaneous Cold-Active Yeast Enzymes of Industrial Importance* (pp 377-395). New York. Springer.
- Biggs AR. 1999. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant disease*, 83(11), 1001-1005.
- Birgisson H., Delgado O., Arroyo LG., Hatti-Kaul R., Mattiasson B. 2003. Cold-adapted yeasts as producers of cold-active polygalacturonases. *Extremophiles*. 7(3): 185-193.
- Blachinsky D., Antonov J., Bercovitz A., Elad B., Feldman K., Husid A., Lazare M., Marcov N., Shamai I., Keren-Zur M., Droby S. 2007. Commercial applications of Shemer for the control of pre- and postharvest diseases. *IOBCWPRS Bull.* 30: 75–78.
- Bovi GG., Frohling A., Pathak N., Valdramidis VP., Schluter O. 2019. Safety control of whole berries by cold atmospheric pressure plasma processing: A review. *Journal of food protection*, 82(7): 1233-1243.
- Bonaterrea A., Badosa E., Cabrefiga J., Frances J., Montesinos E. 2012. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. *Trees* 26 (1):215–226.
- Børve J., Sekse L., Stensvand A. 2000. Cuticular fractures promote postharvest fruit rot in sweet cherries. *Plant Disease*. 84:1180-1184.
- Børve J., Stensvand A. 2019. Postharvest fungal fruit decay in sweet cherry graded in water with low chlorine content. *Eur. J. Hortic. Sci.* 84 (5): 274-81
- Boundy-Mills K. 2014. Methods for the isolation and investigation of the diversity of cold-adapted yeasts and their ex situ preservation in worldwide collections. In: Buzzini P., Margesin R. *Cold-adapted yeasts: Miscellaneous Cold-Active Yeast Enzymes of Industrial Importance* (pp 23-45). New York. Springer.
- Breinig F., Tipper D., Schmitt M. 2002. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*. 108: 395-405.
- Braun U., Crous P., Dugan F., Groenewald J., De Hoog G. 2003. Phylogeny and taxonomy of Cladosporium-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological Progress*. 2:3-18.

- Brizzio S., Turchetti B., de García V., Libkind D., Buzzini P., Gasparetti C., 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.
- Bruzone I. 2009. Frambuesas, moras y grosellas. *Alimentos Argentinos*. 44: 25-29.
- Bruzone I. 2007. Cadenas Alimentarias: Frutas Finas –Berries. *Alimentos Argentinos*. 39: 30-33.
- Bruzone I. 2006. Frambuesa, Análisis de cadena alimentaria. *Informe frutihortícola*. 249: 22-23.
- Buzzini P., Margesin R. 2014. Cold-adapted yeasts: a lesson from the cold and a challenge for the XXI century. In: Buzzini P., Margesin R. *Cold-adapted yeasts: Miscellaneous Cold-Active Yeast Enzymes of Industrial Importance* (pp 2-23). New York. Springer.
- Buzzini P., Martini A., Cappelli F., Pagnoni UM., Davoli P. 2003. A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. 84: 301–311.
- Cabrera A. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. En Kugler WF (Ed.) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo 2. 2ª edición. Fascículo 1. (pp. 1-85). Buenos Aires, Argentina. Acme.
- Calvente V., Orellano ME., Sansone G., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M. 2001. A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. *J Microbiol Methods*. 47: 273–279.
- Camatti-Sartori V., da Silva-Ribeiro R., Valdebenito-Sanhueza R., Pagnocca F., Echeverrigaray S., Azevedo J. 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of basic microbiology*. 45: 397-402.
- Combina M, Mercado L, Borgo P, Elia A, Jofré V, Ganga A, Martínez C, Catania C. 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1055-1061.
- Candan A. 2006. Cosecha y poscosecha de cerezas. *Fruticultura & Diversificación*. 12(50): 32-38.
- Candan A., Romero S., Jara G. 2007. Uso de Atmósferas modificadas en cerezas cv. Lapins. Informe técnico. INTA, EEA Alto Valle. 11 p
- Candan A., Raffo D., Gomila T., Colodner A. 2017. Pautas para el mantenimiento de la calidad de cerezas frescas. Alto Valle Río Negro. INTA Ediciones.
- Cañamás T., Viñas I., Usall J., Torres R., Anguera M., Teixidó N. 2008. Control of postharvest on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 96–106.
- Caminiti A. 2005. Berries: una alternativa para la región. *Fruticultura y Diversificación*. 11(46): 22-29.
- Carbó A., Torres R., Teixidó N., Usall J., Magan N., Medina A. 2018. Predicted ecological niches and environmental resilience of different formulations of the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 using the Bioscreen C. *BioControl*. 63(6): 855-866.
- Carmona M., Abello A., Sautua F. 2011. Resistencia de los hongos a los fungicidas. En: *Guía de Productos Fitosanitarios* (161-168). Buenos Aires. CASAFE.

- Carrasco M., Rozas JM., Barahona S., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M. 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC microbiology*. 12(1): 251.
- Casadevall A., Pirofski L. 1999. Host-Pathogen Interactions: The basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and Immunity*. 68:6511–6518.
- Castoria R., de Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S., 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.
- Cavello I., Albanesi A., Fratebianchi D., Garmedia G., Vero S., Cavalitto S. 2016. Pectinolytic yeasts from cold environments: novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*. 21(2): 319-329. doi:10.1007/s00792-016-0904-0.
- Cavicchioli R., Siddiqui KS., Andrews D., Sowers KR. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*. 13:253-261.
- Chan Z., Qin G., Xu X., Li B., Tian, S. 2007. Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. *Journal of Proteome Research*. 6: 1677-1678.
- Chan Z., Tian S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*. 36 (2): 215-223.
- Chavez-Diaz IF. 2011. Biocontrol de *Rhizopus stolonifer* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus*) empleando Microbiota Nativa, asociada a la planta. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Chen X., Li J., Zhang L., Xu X., Wang A., Yang Y. 2012. Control of postharvest radish decay using a *Cryptococcus albidus* yeast coating formulation. *Crop Protection*. 41: 88-95.
- Chiozza E., Figueira R. 1982. Atlas físico de la República Argentina. Buenos Aires. Centro Editor de América Latina.
- CIME-EEyN-UNSAM. 2012. Panorama económico y financiero 79. Escuela de Economía y Negocios. Universidad Nacional de San Martín. Buenos Aires. 65 pp.
- Cittadini ED., Sanz CE., Szlápelis SE., Manavella FA., San Martino L., Muñoz M., Pugh AM., Cárcamo MA., Mundet CA., Peri PL., de Ridder N., Kikuchi N., Ñancucheo JA., van Keulen H. 2008. Sweet Cherry Production in South Patagonia, Argentina. *Acta Horticulturae*. 795: 585-590.
- Cittadini E., San Martino L. (Eds). 2006. El cultivo de cerezos en Patagonia Sur. Tecnología de manejo, empaque y comercialización. Santa Cruz. INTA.
- Colodner AD., Candan AP. 2017. Reutilización del caldo de tratamiento vs. eficacia de control de podredumbres de poscosecha en cerezas ‘Regina’. En Libro de Resúmenes I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha: IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha. 1a ed. Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER. Facultad de Ciencias de la Alimentación. Concordia.
- Colodner AD., Candan AP. 2011. Control de podredumbres poscosecha en cerezas. *Fruticultura y diversificación*. 66: 40-45.

- Conte A., Scrocco C., Lecce L., Mastromatteo M., Del Nobile MA. 2009. Ready-to-eat sweet cherries: Study on different packaging systems. *Innovative Food Sci & Emerging Tech.* 10: 564-571.
- Conway WS., Sams CE., Hickey KD. 2002. Pre-and postharvest calcium treatment of apple fruit and its effect on quality. *Acta Hort.* 594: 413-419.
- Cook RJ., Baker KF. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* (pp 30-56). St. Paul, MN: Am. Phytopathol. Soc.
- Cordo, C. A., Consolo, V. F., Astiz Gassó, M., Simón, M. R., Kripelz, N. I., & Mónaco, C. I. (2014). Septoriosis del trigo en la Argentina: observaciones prácticas para el manejo de la enfermedad. *I Seminario Internacional de Trigo (La Estanzuela, Uruguay, 27 al 29 de agosto de 2014).*
- Cordo CA. 2014. Patologías del trigo. En Cordo, C.A & Sisterna M.N. (coordinadoras). *Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina.* Ed. Edulp. La Plata, Argentina. Pp 21-56.CPM. 2010. Bayer acquires biofungicide from Agrogreen. CPM 14.
- Crisosto C., Garner D., Doyle J., Day K. 1993. Relationship between fruit respiration, bruising susceptibility, and temperature in sweet cherries. *Hort Science.* 28(2): 132-135.
- Dal Bello G., Monaco C., Rollan MC., Lampugnani G., Arteta N., Abramoff C., Stocco M. 2008. Biocontrol of postharvest grey mould on tomato by yeasts. *Journal of Phytopathology.* 156(5): 257-263.
- Dallyn H., Fox A. 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Gould GH, Corry JEL (eds) *Society of applied bacteriology technical series* (pp 129–139). Academic Press Ltd., London.
- de García V., Brizzio S., Russo G., Rosa C., Boekhout T., Theelen B., Libkind D., van Broock M. 2010. *Cryptococcus spencermartinsiae* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from glacial waters and apple fruits. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 60:707-711.
- de Llanos R., Fernández-Espinar MT., 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.
- De Michelis A., Cardozo A., Marban MN., Echagüe D., Paulino C., Ochoa M. 2017. Moras dulces para consumo en fresco. Excelente reemplazo de las zarzamoras silvestres en la agroindustria regional. *Presencia* 68:37-41.
- DeVries J.W., Trucksess M.W., Jackson L. S. 2002. *Advances in Experimental Medicine and Biology Mycotoxins and Food Safety Volume 504 || Biology and Ecology of Toxicogenic Penicillium Species.* 10.1007/978-1-4615-0629-4(Chapter 4), 29–41. doi:10.1007/978-1-4615-0629-4\_4
- Demoz B., Korsten L. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biol. Control.* 37: 68–74.
- Dennis C. 1983. *Post-harvest pathology of fruits and vegetables.* Academic Press, London, England.
- Di Francesco A., Di Foggia M., Baraldi E. 2020. *Aureobasidium pullulans* volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *Food Microbiology.* 87:103395.

- Di Francesco A., Calassanzio M., Ratti C., Mari M., Folchi A., Baraldi E. 2018. Molecular characterization of the two postharvest biological control agents *Aureobasidium pullulans* L1 and L8. *Biological Control*. 123: 53-59.
- Di Francesco A., Ugolini L., D'Aquino S., Pagnotta E., Mari M. 2017. Biocontrol of *Monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: insights on competition for nutrients and space. *International journal of food microbiology*. 248: 32-38.
- Di Francesco A., Martini C., Mari M. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. *European Journal of Plant Pathology*. 145(4): 711-717. doi:10.1007/s10658-016-0867-0.
- Di Francesco A., Ugolini L., Lazzeri L., Mari M. 2014. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*. 81: 8-14.
- Droby S., Wisniewski M., Teixidó N., Spadaro D., Jijakli MH. 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*. 122: 22-29.
- Droby S., Wisniewski M., Macarisin D., Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52:137-145.
- Droby S., Wisniewski M., Cohen L., Weiss B., Touitou D., Eilam Y., Chalutz E. 1997. Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology*. 87(3): 310-315.
- Droby S., Chalutz E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice* (Ed. Wilson CL & Wisniewski ME), pp. 63–76. CRC Press Inc, Boca Raton (US).
- Droby S., Chalutz E., Wilson C., Wisniewski ME. 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica*. 20:1495–1503.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C., Wisniewski ME. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal Microbiology*. 35: 794–800.
- Ebrahimi L., Etebarian H., Aminian H., Sahebani N. 2012. Enhancement of biocontrol activity of *Torulasporea delbrueckii* with methyl jasmonate against apple blue mould disease. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 45: 2355–2363.
- Eckert J., Ogawa J. 1988. The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. *Annual review of phytopathology*. 26: 433-469.
- El-Ghaouth A., Wilson C., Wisniewski M. 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi SAMH. (Ed.). *Diseases of Fruit and Vegetables*, vol. 2 (pp 511-535). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- El-Ghaouth A., Wilson C., Wisniewski M., Droby S., Smilanick J., Korsten L. 2002. Biological control of post-harvest diseases of citrus fruit. In: Gnanamanickam SS. (Ed.) *Biological Control of Crop Diseases* (pp. 289– 312) Dekker Inc, New York.



- El-Ghaouth A., Smilanick J., Wilson C. 2000. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 19: 103-110.
- El-Ghaouth A., Wilson C., Wisniewski M. 1998. Ultra structural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathol.* 88: 282-291.
- Ellena M. 2012. Formación y sistemas de conducción del cerezo dulce. Instituto de investigación agropecuaria. Temuco, Chile. 201 pp.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 49: 329-337.
- Fan Q., Tian S. 2000. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranaefaciens*. *Plant Dis.* 84:1212–1216.
- Falconi CJ., 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 of Plant Diseases and Protection.* 101 (1): 38-47.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. Statistical Databases (FAOSTAT-Agriculture). <http://www.fao.org/faostat.2009>
- FAO. 2011. Global food losses and food waste-extent, causes and prevention. (<http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>). Rome, Italy: Food and Agriculture Organization.
- Feliziani E., Santini M., Landi L., Romanazzi G. 2013. Pre-and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology.* 78: 133-138.
- Fernández NV., Mestre MC., Marchelli P., Fontenla SB. 2012. Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. *FEMS microbiology ecology.* 80:179-192.
- Fialho MB., Toffano L., Pedroso MP., Augusto F., Pascholati SF. 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 925–932.
- Fogliano V., Ballio A., Gallo M, Woo S., Scala F., Lorito M. 2002. Pseudomonas lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Molecular plant-microbe interactions.* 15: 323-333.
- Franceschinis LE. 2016. Propiedades fisicoquímicas y funcionales de productos deshidratados en base a cerezas y zarzamoras de la Patagonia argentina. Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires.
- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2010. Pathogen risk list [Internet]. [revised 2015 Jun 2; cited 2015 Jun 17]. Available from: [www.frac.info](http://www.frac.info).
- Fravel DR. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 337-359.

- Freimoser FM., Rueda-Mejia MP., Tilocca B., Migheli Q. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35(10): 154.
- Frisvad JC., Samson RA. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49: 1- 174.
- Gardes M., Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. 2:113-118.
- Ghanbarzadeh B., Sampaio J. P., Arzanlou M. 2019. Biodiversity of epiphytic yeasts on post-harvest table grapes in markets of Tabriz, Iran. *Mycologia Iranica*, 6(2), 101-111.
- Giobbe S., Marceddu S., Scherm B., Zara G., Mazzarello V., Budroni M., Migheli Q. 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research* 7: 1389-1398.
- Glass NL., Donaldson GC. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*. 61: 1323-1330.
- Gonçalves B. 2007. Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*. 103: 976-984.
- Gotor-Vila A., Teixidó N., Sisquella M., Torres R., Usall J. 2017. Biological Characterization of the Biocontrol Agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8: The Effect of Temperature, pH and Water Activity on Growth, Susceptibility to Antibiotics and Detection of Enterotoxigenic Genes. *Current microbiology*. 74(9): 1089-1099.
- Gramisci B., Lutz MC., Lopes CA., Sangorrin MP. 2018. Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives. *Biological Control*. 121: 151-158.
- Granado J., Thürig B., Kieffer E., Petrini L., Fließbach A., Tamm L., Weibel FP., Wyss GS. 2008. Culturable fungi of stored 'golden delicious' apple fruits: a one-season comparison study of organic and integrated production systems in Switzerland. *Microbial ecology*. 56: 720-732.
- Griffiths E. 1981. Iatrogenic plant diseases. *Ann Rev Phytopathol*. 19: 69–82.
- Grzegorzczak M., Żarowska B., Restuccia C., Cirvilleri G. 2017. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology*. 61: 93-101.
- Guerreiro AC., Gago CML., Faleiro ML., Miguel MGC., Antunes, MDC. 2015. Raspberry fresh fruit quality as affected by pectin- and alginate-based edible coatings enriched with essential oils. *Sci. Hortic*. 194: 138–146.
- Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y., Dinoor A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91(7), 621-627.
- Guo LY., Michailides TJ., Morgan DP. 1999. Survival of *Mucor piriformis* in soil of apple orchards in California. *Plant Disease*. 83:189-193.

- Gutiérrez Pérez ED. 2017. Caracterización de los mecanismos antagónicos de *Debaryomyces hansenii* contra *Colletotrichum gloeosporioides* y su efecto en la protección poscosecha en papaya var. Maradol.
- HersHKovitz V., Sela N., Taha-Salaime L., Liu J., Rafael G., Kessler C. 2013. De-novo assemble and characterization of the transcriptome of *Metschnikowia fructicola* reveals differences in gene expression following interaction with *Penicillium digitatum* and grapefruit peel. *BMC Genomics*. 14:168.
- Hong C., Michailides TJ., Holtz BA. 1998. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. *Plant Disease*. 82:1210-1216.
- Horvitz S., Yommi A., López Camelo A., Godoy C. 2004. Efecto del estado de madurez y atmósferas modificadas sobre la calidad de cerezas cv. Sweetheart. *Rev. FCA UNCuyo*. 36(2): 39-48.
- Huang R., Che HJ., Zhang J., Yang L., Jiang DH., Li GQ. 2012. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on postharvest strawberry fruits. *Biol. Control*. 62: 53–63.
- Huang R., Li GQ., Zhang J., Yang L., Che HJ., Jiang DH., Huang HC. 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *The American Phytopathological Society*. 101: 859–869.
- IICA. 2009. La producción orgánica en la Argentina: compilación de experiencias institucionales y productivas, SENASA, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenos Aires. 144 p.
- Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*. 36(3): 245-252.
- Jamalizadeh M., Etebarian HR., Aminian H., 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 WJ., Jurick IWM., Peter KA., Kurtzman CP., Buyer JS. 2014. Yeasts associated with plums and their potential for controlling brown rot after harvest. *Yeast*. 31: 207–218.
- Janisiewicz W., Kurtzman C., Buyer J. 2010. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*. 27: 389-398.
- Janisiewicz W., Saftner RA., Conway WS., Yoder KS. 2008. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biol. Tec.* 49: 374-378. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.011>
- Janisiewicz, W., Korsten L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 411–441.
- Janisiewicz W., Jeffers S. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Prot.* 16, 629–633.
- Jensen B., Knudsen IM., Andersen B., Nielsen KF., Thrane U., Jensen DF., Larsen J. 2013. Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *International journal of food microbiology*. 160: 313-322.

- Johnson E., Echavarrri-Erasun C. 2011. Yeast biotechnology. Kurtzman, C., Fell, JW., Boekhout T. (Eds.). The yeasts: a taxonomic study. (pp. 21-44). Elsevier. USA.
- Johnson E. 2013. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. Applied Microbiology and Biotechnology. 97(17): 7563–7577. doi:10.1007/s00253-013-5046-z.
- Justo AM., Travadelo M., Mussari S. 2014. La innovación tecnológica de procesos agroindustriales en frambuesa. En: Congreso Regional de Economía Agraria. 4. Reunión Anual de la Asociación Argentina de Economía Agraria. 45. Congreso de Economistas Agrarios de Chile.
- Kamel S., Ebtsam MM., Massoud O. 2016. Potentiality of some Yeast Species as Biocontrol Agents against *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum* the Causal Agent of Cucumber Wilt. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 26 (2): 185-193.
- Karabulut O., Lurie AS., Droby S. 2001. Evaluation of the use of sodium bicarbonate, potassium sorbate and yeast antagonists for decreasing postharvest decay of sweet cherries. Postharvest Biology and Technology. 23:233-236.
- Karaoglanidis GS., Markoglou AN., Bardas GA., Doukas EG., Konstantinou S., Kalampokis JF. 2011. Sensitivity of *Penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. International journal of food microbiology. 145: 195-204.
- Kendall S., Hollomon D. 1998. Fungicide resistance. Fungicidal Activity-Chemical and Biological Approaches to Plant Protection. Chichester, Eng.: J Wiley. p: 87-108.
- Kim WK., Sang HK., Woo SK., Park MS., Paul NC., Yu SH. 2007. Six species of *Penicillium* associated with blue mold of grape. Mycobiology. 35: 180-185.
- Kirschbaum DS., Ruiz ADV. (9 de agosto de 2017). Situación de las frutas finas (berries) en diferentes regiones argentinas. INTA. Recuperado de <https://inta.gob.ar/noticias/situacion-de-las-frutas-finas-berries-en-diferentes-regiones-argentinas#:~:text=Argentina%20es%20el%20tercer%20pa%C3%ADs,de%20alrededor%20de%2045500%20t.&text=Argentina%20produce%20aproximadamente%201.500%20t,180%20t%20de%20otros%20berries>.
- Kramer E. 2016. Proyecto de comercialización internacional de frambuesas frescas. Tesis Doctoral. Universidad Siglo XXI. Buenos Aires.
- Kuddus M. 2018. Cold-active enzymes in food biotechnology: An updated mini review. J. Appl. Biol. Biotechnol. 6: 58-63.
- Kumar S., Baghel M., Yadav A., Dhakar MK. 2018. Postharvest biology and technology of berries. In: Ahmad Mir S. Postharvest biology and technology of temperate fruits (pp. 349-370). Springer, Cham.
- Kurtzman C., Fell JW., Boekhout T. (Eds.). 2011. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier. San Diego.
- Kurtzman C., Droby S. 2001. *Metschnikowia fructicola*, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots. Systematic and Applied Microbiology. 24(3): 395–399. doi:10.1078/0723-2020-00045.

- Kurtzman C., Robnett C. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of clinical microbiology*. 35:1216-1223.
- Kwasiborski A., Bajji M., Renaut J., Delaplace P., Jijakli, H. 2014. Identification of metabolic pathways expressed by *Pichia anomala* Kh6 in the presence of the pathogen *Botrytis cinerea* on apple: new possible targets for biocontrol improvement. *PLoS One*. 9(3): 1-12.
- Kwasna H., Elaine W., Bateman GL. 2006. Phylogenetic relationships among Zygomycetes from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. *Mycological research*. 110: 501-510.
- Kwon JH., Ahn GH., Park CS. 2004. Fruit soft rot of sweet persimmon caused by *Mucor piriformis* in Korea. *Mycobiology*, 32(2), 98-101.
- Lahlali R., Raffaele B., Jijakli MH. 2011 a. UV protectants for *Candida oleophila* (strain O), a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Plant Pathology*. 60: 288-295.
- Lahlali R., Hamadi Y., Jijakli MH. 2011 b. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. *Biological Control*. 56: 217-224.
- Lahlali R., Bajji M., Serrhini M., Jijakli M. 2008. Modelling the effect of temperature, water activity and solute on the in vitro growth of the biocontrol yeast *Pichia anomala* strain K. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 12(4), 353-359.
- Levenspiel O. 2004. *Ingenieria de las reacciones quimicas*. Mexico: Limusa Wiley.
- Libkind D., Moliné M., Trochine A., Bellora N., de Garcia V. 2016. Biotechnologically Relevant Yeasts from Patagonian Natural Environments. In: Olivera N., Libkind D., Donati E. (eds) *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms* (pp. 325-351.). Springer. Cham.
- 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.
- Lima G., Sanzani, SM., De Curtis F., Ippolito A. 2015. Biological control of postharvest diseases. In: Wills R., Golding J. (Eds.), *Advances in Postharvest Fruit and Vegetable Technology* (pp. 65–81). CRC Press. Boca Ratón.
- Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V. 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *Eur. J. Plant Pathol*. 109: 341–349. <https://doi.org/10.1023/A:1023595529142>.
- Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V. 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Sci. Technol*. 8: 257–267.
- Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*. 10(2): 169-178.
- Lima JR., Gondim DMF., Oliveira JTA., Oliveira FSA., Goncalves LRB., Viana FMP. 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*. 83: 58-64.

- Limpel LE., Schuldt PH, Lamont D. 1962. Proc. N. E. Weed Control Conf. 16: 48-53.
- Liu J., Sui Y., Wisniewski M., Droby S., Liu Y. 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology*. 167: 153-160.
- Liu J., Wisniewski M., Droby S., Norelli J., Hershkovitz V., Tian S., Farrell R., 2012. Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80: 578–590.
- Liu P., Cheng Y., Yang M., Liu Y., Chen K., Long C., Deng X. 2014. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiology*. 14: 242.
- Liu X., Wang J., Gou P., Mao C., Zhu ZR., Li H. 2007. In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 223- 229.
- Long C., Deng B., Deng X. 2006. Pilot testing of *Kloeckera apiculata* for the biological control of postharvest diseases of citrus. *Ann. Microbiol.* 56 (1):13-17. <https://doi.org/10.1007/BF03174963>.
- López S., Sangorrin M., Pildain MB. 2016. Fruit rot of sweet cherries and raspberries caused by *Penicillium crustosum* and *Mucor piriformis* in South Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(4): 511-516.
- Looney NE., Webster AD., Kupferman EM. 1996. Harvest and handling sweet cherries for fresh market. In: Webster AD., Looney NE (Eds.) *Cherries: Crop Physiology* (pp. 411-442). Production and Uses Cab International. Wallingford.
- Louw J., Korsten L. 2014. Pathogenic *Penicillium* spp. on apple and pear. *Plant Disease*. 98: 590-598.
- Lutz MC. 2015. Control biológico de hongos patógenos de peras en poscosecha utilizando levaduras indígenas en la Nor-Patagonia. Tesis de Doctorado. UNCo, Bariloche. 295 p.
- Lutz MC., Lopes, CA, Sosa MC., Sangorrin MP. 2020. Semi-commercial testing of native yeasts selected from north patagonia argentina for the biocontrol of pear postharvest decays. *Biological Control*. 104246.
- Lutz MC., Lopes CA., Rodriguez ME., Sosa MC., Sangorrin MP. 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International journal of food microbiology*. 164(2-3): 166-172.
- Lutz MC., Lopes CA., Sosa MC., Sangorrin MP. 2012. A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science and Technology*. 22:1465-1483.
- Madrid M., Beaudry R. 2020. Small fruits: Raspberries, blackberries, blueberries. *Controlled and Modified Atmospheres for Fresh and Fresh-Cut Produce*. 335–346. doi:10.1016/b978-0-12-804599-2.00020-x.
- Manavella FA. 2004. Desarrollo de la fruticultura intensiva en la Patagonia Sur. (PATSU04). Plan de Tecnología Regional Patagonia Sur. 27pp.

- Manso T., Nunes C., Raposo S., Lima-Costa ME. 2010. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* PBC-1 in a stirred tank reactor by batch and fedbatch cultures. *World J. Microbiol Biotechnol.* 26: 725–735.
- Maráz A., Kovács M. 2014. Food spoilage by cold-adapted yeasts. In: Buzzini P., Margesin R. *Cold-adapted yeasts: Miscellaneous Cold-Active Yeast Enzymes of Industrial Importance* (pp 497-532). New York. Springer.
- Margesin R., Fauster V., Fonteyne PA. 2005. Characterization of cold-active pectate lyases from psychrophilic *Mrakia frigida*. *Letters in applied microbiology.* 40: 453-459.
- Mari M., Spadaro D., Casals C., Collina M., De Cal A., Usall J. 2020. Stone Fruits. In: Palou L., Smilanick JL (Eds.) *Postharvest pathology of fresh horticultural produce* (pp 111-140). CRC Press. Boca Ratón.
- Mari M., Martini C., Guidarelli M., Neri F. 2012. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fruticola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biological Control.* 60: 132-140.
- Mari M., Cembali T., Casalini L., Pratella GC. 2000. *Mucor* species in orchard soil—population dynamics and pathogenicity on pear fruit. *European Journal of Plant Pathology.* 106: 449-454.
- Marquina D., Santos A., Peinado JM. 2002. Biology of killer yeasts. *International. Microbiology.* 5: 65-71.
- Martinez A., Cavello I., Garmendia G., Rufo C., Cavalitto S., Vero S. 2016. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles.* 20: 759-769.
- Martínez E. 2007. Programa de desarrollo de cultivos intensivos de los frutos del bosque en el noroeste de las Patagonia Argentina, para la exportación del producto fresco hacia Italia y Europa, en contra estación. “Relevamiento cuali-cuantitativo de la situación actual del sector de los frutos del bosque de la Norpatagonia” Análisis de las necesidades productivas, industriales, comerciales y organizativas del sector. 11 pp.
- Martorell M., Ruberto L., Fernández P., Castellanos de Figueroa L., Mac Cormack W. 2017. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Journal of basic microbiology.* 57(6): 504-516.
- Massart S., Martinez-Medina M., Jijakli M. 2015. Biological control in the microbiome era: challenges and opportunities. *Biol Control.* 89: 98-108.
- Masih E., Paul B. 2002. Secretion of b-1,3-glucanase by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology.* 44: 391-395.
- McCune LM., Kubota C., Stendell-Hollis NR., Thomson CA. 2011. Cherries and health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 51: 1-12.
- McLaughlin RJ., Wilson CL., Chalutz E., Kurtzman W., Osman SF. 1990. Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Journal of Applied Microbiology.* 56: 3583-3586.

- McLaughlin RJ., Wisniewski ME., Wilson CL., Chalutz E. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology*. 80(5): 456-461.
- Medina CM., Cristancho D., Uribe D. 2009. Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filoféricos de levaduras obtenidos en cultivos de mora (*Rubus glaucus*). *Acta Biológica Colombiana*. 14 (3): 179 – 196.
- Melin P., Håkansson S., Schnürer J., 2007. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 1008-1016.
- Meng XH., Qin GZ., Tian SP. 2010. Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 596-601.
- Merín MG., Mendoza LM., Morata de Ambrosini VI. 2014. Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases. *Journal of basic microbiology*. 54: 835-842.
- Mestre MC., Fontenla S., Rosa CA. 2014. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Canadian journal of microbiology*. 60(6): 371-382.
- Michailides T., Spotts R. 1990. Postharvest diseases of pome and stone fruits caused by *Mucor piriformis* in the Pacific Northwest and California. *Plant Disease*. 74: 537-543.
- Michailides T., Spotts R. 1986. Factors affecting dispersal of *Mucor piriformis* in pear orchards and into the packinghouse. *Plant disease*, 70 (11): 1060-1063.
- Michailides TJ., Morgan., DP., Luo Y. 2009. Epidemiological assessments and postharvest disease incidence. In *Postharvest pathology* (pp. 69-88). Springer. Dordrecht.
- Miller MA., Pfeiffer W., Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. (pp 1-8). IEEE. New Orleans
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2018. Las cerezas frescas ya pueden obtener el sello de calidad Alimentos Argentinos. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/noticias/las-cerezas-frescas-ya-pueden-obtener-el-sello-de-calidad-alimentos-argentinos>
- Miyazawa M., Kimura M., Yabe Y., Tsukamoto D., Sakamoto M., Horibe I. 2008. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling the volatile metabolites produced by *Glomerella cingulata*. *Journal of Oleo Science*. 57: 585-590.
- Moliné M., Libkind D., de Garcia V., Giraudo MR. 2014. Production of pigments and photo-protective compounds by cold-adapted yeasts. In: Buzzini P., Margesin R. *Cold-adapted yeasts: Miscellaneous Cold-Active Yeast Enzymes of Industrial Importance* (pp 193-224). New York. Springer.
- Mondino P., Vero S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Facultad de Agronomía Unidad de Educación Permanente, Uruguay. 158 pp.



- Mounir R., Durieux A., Bodo E., Allard C., Simon JP., Achbani EH., El Jaafari S., Douira A., Jijakli MH. 2007. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnol. Lett.* 29: 553–559.
- Murray RE., Candan AP., Vazquez DE. 2019. Manual de poscosecha de frutas: manejo integrado de patógenos. Ediciones INTA.
- Nakagawa T., Yamada K., Miyaji T., Tomizuka N. 2002. Cold-active pectinolytic activity of psychrophilic-basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Journal of bioscience and bioengineering.* 94: 175-177.
- Nakagawa T., Nagaoka T., Taniguchi S., Miyaji T., Tomizuka N. 2004. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. *Letters in applied microbiology.* 38(5): 383-387.
- Nally M., Pesce V., Maturano Y., Muñoz C., Combina M., Toro M., Castellanos de Figueroa L., Vazquez F. 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology.* 64:40–48.
- Narayanasamy P. 2013. *Biological Management of Diseases of Crops: Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents (Vol. 15)*. Dordrecht. Springer Science & Business Media.
- Narayanasamy P. 2006. Biocontrol agents for disease management. In: P. Narayanasamy *Biological Management of Diseases of Crops* (ed.) *Postharvest pathogens and disease management* (pp 282-291). Dordrecht. Springer.
- Nguyen TTT. 2015. S8-1: *Mucor* sp. nov., Isolated from Tangerine in Korea. *균학회소식.* 27: 65-65.
- Nicosia M., Pangallo S., Raphael G., Romeo FV., Strano MC., Rapisarda P., Schena L. 2016. Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biology and Technology,* 114, 54-61
- Nisiotou A.A., Nychas G.J.E. 2007. Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2765-2768.
- Nome Huespe SF., Docampo DM., Conci LR. 2012. Atlas Fitopatológico Argentino. Recuperado de <http://www.fitopatoatlas.org.ar>
- Nunes C., Duarte A., Manso T., Weiland C., García J., Cayuela J., Yousfi K., Martínez M., Salazar M. 2008. Relationship between postharvest diseases resistance and mineral composition of citrus fruit. In: Pestana M., Correia PJ. VI International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops (pp 417-422). ISHS Acta Horticulturae 868.Faro
- Nunes C., Usall J., Teixidó N., Torres R., Viñas I. 2002. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with a combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *Journal of Food Protection.* 65: 178–184.
- OECD. 2014. Market and trade impacts of food loss and waste reduction. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Ogawa J., Zehr E., Bird G., Ritchie D., Uriu K., Uyemato J. 1995. *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, St. Paul, MN, USA.

- Oliveira MJD, Laranjeira D, Câmara MPS, Laranjeira FF, Armengol J, Michereff SJ. 2014. Effects of wounding, humidity, temperature, and inoculum concentrations on the severity of corky dry rot caused by *Fusarium semitectum* in melon fruits. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 36(3), 281-289.
- Oro L., Feliziani E., Ciani M., Romanazzi G., Comitini F. 2014. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae*. Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biology and Technology*. 96: 64-68.
- O'Toole G., Kaplan H., Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1): 49-79.
- Palou L., Smilanick JL (Eds.) 2020. Postharvest pathology of fresh horticultural produce. CRC Press. Boca Ratón.
- Palou L., Smilanick JL., Crisosto CH. 2009. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. *Journal of Food Protection*. 72:1037-1046.
- Panebianco S., Vitale A., Polizzi G., Scala F., Cirvilleri G. 2015. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. *Biological Control*. 84: 19-27.
- Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G. 2017. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food microbiology*. 63: 191-198.
- Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G. 2016. The effect of locust bean gum (LBG)-based edible france coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. *Food microbiology*. 58: 87-94.
- Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isoalted yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 47: 85-92.
- Peralta ME. 2010. Boletín Electrónico de FRUTAS DE CAROZO N°14. Convenio de Cooperación Técnica celebrado entre el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y la Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. 14 pp.
- Pérez M., Ibarreche J., Isas A., Sepulveda M., Ramallo J., Dib J. 2017. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. *Biological Control*. 115: 135-140.
- Pérez M., Contreras L., Garnica N., Fernández-Zenoff M., Farías M., Sepulveda M., Ramallo J., Dib J. 2016. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PLoS One*. 11(10): e0165590.
- Perkins-Veazie P., Collins JK., Clark JR. 1997. Air shipment of 'Navaho' blackberry fruit to Europe is feasible. *HortScience, Alessandria*. 32 (1): 132.
- Pesce V., Nally M., Carrizo G., Rojo C., Pérez B., Toro M., Castellanos de Figueroa L., Vazquez F. 2017. Antifungal activity of native yeasts from different microenvironments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. *Biological Control*. 120: 43-51.

- Pianzola M., Moscatelli M., Vero S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease*. 88: 23-28.
- Piljac-Zegarac J., Samec D. 2010. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Research International*. 44: 345-350.
- Pimenta R., Morais P., Rosa C., Correa A. 2009. Utilization of yeasts in biological control programs. In Satyanarayana T., Kunze G. (Eds.). *Yeast biotechnology: diversity and applications* (pp. 199-214). Springer, Dordrecht.
- Pitt J., Hocking A. 2009. *Fungi and food spoilage*. Springer. New York.
- Pitt J. 2002. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. In DeVries J., Trucksess M., Jackson L. (Eds.) *Mycotoxins and food safety* (pp. 29-41). Springer, Boston, MA.
- Pitt J. 1979. The Genus *Penicillium* and its Teliomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, Inc., London.
- Pitt J. 1973. An Appraisal of Identification Methods for *Penicillium* Species: Novel Taxonomic Criteria Based on Temperature and Water Relations. *Mycologia*. 65(5): 1135-1157. doi:10.1080/00275514.1973.12019533.
- Ponsone M., Chiotta M., Combina M., Dalcero A., Chulze S. 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section Nigri in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 151: 70–77.
- Poovaliah B., Reddy A., Feldman L. 1993. Calcium and signal transduction in plants. *Critical reviews in plant sciences*. 12(3): 185-211.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25:1253-1256.
- Pryor B., Gilbertson R. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological research*. 104:1312-1321.
- Qin G., Tian S., Xu Y., Chan Z., Li B. 2006. Combination of antagonistic yeasts with two food additives for control of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on sweet cherry fruit. *Journal of Applied Microbiology*. 100(3): 508-515.
- Qin G., Tian S., 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.
- Qin G., Tian S., Xu Y., Wan Y. 2003. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62: 147-154.
- Raffo Benegas M. 2017. La producción de cerezas en la Patagonia Norte: el desafío de producir cerezas de calidad exportable. *Fruticultura*. 79:30-33.
- Raffo D., Villarreal P., Ballivián T., Barria J. 2006. Cerezas en Norpatagonia. *Fruticultura & Diversificación*. 50: 16-20.
- Ramírez J. 2012. La producción orgánica argentina camina con firmeza. *Alimentos Argentinos*. 12-17.
- Renwick A., Campbell R., Coe S. 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology* 40: 524-532.

- Reyes-Bravo P., Acuña-Fontecilla A., Rosales IM., Godoy L. 2019. Evaluation of Native Wine Yeast as Biocontrol Agents Against Fungal Pathogens Related to Postharvest Diseases. Preprints.
- Richardson M. 2009. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infection*. 15:2-9.
- Richer D.L. 1987. Synergism: a patent view. *Pesticide Science* 19: 309-315.
- Rigby G. 1981. An Egg-yolk Agar Diffusion Assay for Monitoring Phospholipase C in Cultures of *Clostridium welchii*. *Journal of applied microbiology* 50:11-19.
- Rist D., Rosenberger D. 1995. A storage decay of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans*. *Plant Disease*. 79:425.
- Rivas-Garcia T., Murillo-Amador B., Nieto-Garibay A., Rincon-Enriquez G., Chiquito-Contreras R., Hernandez-Montiel L. 2019. Enhanced biocontrol of fruit rot on muskmelon by combination treatment with marine *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* and their potential modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 151: 61-67.
- Robiglio A., Sosa MC., Lutz MC., Lopes CA, Sangorrin MP. 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *International journal of food microbiology*. 147:211-216.
- Robiglio A. 2010. Evaluacion de levaduras autóctonas y comerciales para el control biológico de patógenos de peras en poscosechakurtz en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Tesis de Maestria. Universidad Nacional del Comahue. Neuquén.
- Robledo P., Defilippi B., Becerra C. 2013. Cosecha y poscosecha de frambuesa. En: Manual de frambueso (pp. 97-104). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigacion Quilamapu.
- Rodriguez Assaf L., Pedrozo L., Nally M., Pesce V., Toro M., de Figueroa L., Vazquez F. 2020. Use of yeasts from different environments for the control of *Penicillium expansum* on table grapes at storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 320: 108520.
- Rogéria Antonioli L., Almeida da Silva G., Meirelles Alves S., Moro L. 2011. Controle alternativo de podridões póscolheita de framboesas. *Pesq. agropec. bras.* 46(9):979-984.
- Romanazzi G., Sanzani SM., Bi Y., Tian S., Martínez P., Alkan N. 2016. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 122: 82-94.
- Romanazzi G. 2010. Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries. *Fresh Produce—Special Issues: New Trends in Postharvest Management of Fresh Produce*. 4:111-115.
- Romanazzi G. 2001. Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grape, strawberries and sweet cherries. *Fresh Produce*. 4(1): 111-115
- Romano G., Pugh M. 2008. Calidad de cerezas, parámetros y puntos críticos de control. El cultivo de cerezos en Patagonia Sur. Sarmiento, Argentina.
- Rosa C.A., Morais P.B., Santos S.R., Peres Neto P.R., Mendonça Hagler L.C., Hagles A.N. 1995. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. *Mycological Research* 99: 1047e1054.

- Rossi M, Buzzini P., Cordisco L., Amaretti A., Sala M., Raimondi S., Ponzoni C., Pagnoni U., Matteuzzi D. 2009. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS microbiology ecology*. 69:363-372.
- Ruiz-Moyano S., Hernández A., Galvan AI., Córdoba M., Casquete R., Serradilla M., Martín A. 2020. Selection and application of antifungal VOCs-producing yeasts as biocontrol agents of grey mould in fruits. *Food Microbiology*.92:2-10.
- Ruiz-Moyano S., Martín A., Villalobos M., Calle A., Serradilla M., Córdoba M., Hernández A. 2016. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. 57: 45–53.
- Saito S., Michailides T., Xiao C. 2016. Mucor Rot—An Emerging Postharvest Disease of Mandarin Fruit Caused by *Mucor piriformis* and other *Mucor* spp. in California. *Plant Disease*. 100:1054-1063.
- Samson R., Hoekstra E., Frisvad J. 2004. Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Santos A., San Mauro M., Bravo E., 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.
- Sangorrin M., Lopes C., Vero S., Wisniewski M. 2014. Cold-adapted yeasts as biocontrol agents: Biodiversity, adaptation strategies and biocontrol potential. In: Buzzini, Pietro, and Rosa Margesin. *Cold-adapted yeasts: Miscellaneous Cold-Active Yeast Enzymes of Industrial Importance* (pp 441-464). New York. Springer.
- Sangorrin M., Zajonskovsky I., van Broock M., Caballero A. 2002. The use of killer biotyping in an old patagonian winery yeast ecological survey. *World J Microbiol Biotech*. 18: 115-120.
- Saravanakumar D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. 2009. Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. *European Journal of Plant Pathology*.123:183-193.
- Saravanakumar D., Ciavorella A., Spadaro D., Garibaldi A., 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.
- Scarpati O., Maio S., Puga Y. 2011. Cerezo: desarrollo de un cultivo no tradicional en Argentina. *Estudios geográficos*. 72(271): 591-610.
- Schena L., Nigro F., Pentimone I., Ligorio A., Ippolito A. 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol. Technol*. 30: 209-220.
- Scherm B., Ortu G., Muzzu A., Budroni M., Arras G., Migheli Q. 2003. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology*. 85:205-213.
- Schisler D., Slininger PJ. 1997. Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 19:172–79.

- Schmid F., Moser G., Müller H., Berg G. 2011. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. *Applied and environmental microbiology*. 77:2188-2191.
- Scorzetti G., Petrescu I., Yarrow D., Fell J. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek*. 77:153-157.
- Scott W. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv Food Res* 7:83–127
- Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*. 22: 36-42.
- Selitrennikoff CP. 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2883-2894.
- Serradilla M., del Carmen Villalobos M., Hernández A., Martín A., Lozano M., de Guía Córdoba M. 2013. Study of microbiological quality of controlled atmosphere packaged ‘Ambrunés’ sweet cherries and subsequent shelf-life. *International journal of food microbiology*. 166(1): 85-92.
- Serrano M., Martínez-Romero D., Castillo S., Guillén F., Valero D. 2005. The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 6: 115-123.
- Sharma R., Singh D., Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control*. 50:205–221.
- Shivaji S., Prasad G. 2009. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. In: Satyanarayanaqn T., Kunze G. (eds) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp 3-18). Dordrecht. Springer.
- Sholberg P., Michailides T. 1997. First Report of *Mucor* Rot in Commercially Sold Cherries Caused by *Mucor piriformis*. *Plant Disease*. 81:550-550.
- Skujins J., Potgieter H., Alexander M. 1965. Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and  $\beta$ -(1→3) glucanase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 111(2): 358-364.
- Slepecky R., Starmer W. 2009. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*. 101(6): 823–832.
- Smilanick J., Brown G., Eckert J. 2006. Postharvest citrus diseases and their control. In: Wardowski WF., Miller WM., Hall DJ., Grierson W. (Eds.). *Fresh Citrus Fruits* (pp. 339–396). Second ed. Florida Science Source, Inc., Longboat Key, FL, USA.
- Smith W. 1979. Studies with *Mucor* species causing postharvest decay of fresh produce. *Phytopathology*. 69(8): 865-869.
- Snowdon AL. 1990. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Volume 1: General introduction and fruits. Wolfe Scientific Ltd.
- Sonjak S., Frisvad JC., Gunde-Cimerman N. 2006. *Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. *Microbial ecology*, 52(2), 207-216.
- Sonjak S., Frisvad J., Gunde-Cimerman S. 2005. Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS microbiology ecology* 53:51-60.

- Souza C., Burbano-Rosero E., Almeida B., Martins G., Albertini L., Rivera I. 2009. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. *World journal of microbiology and biotechnology*. 25(11): 2079-2082.
- Spadaro D., Droby S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47: 39–49.
- Spadaro D., Ciavorella A., Zhang D., Garibaldi A., Gullino M. 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. *Can. J. Microbiol.* 56: 128–137.
- Spalla A. 2016. Competitividad Argentina dentro del sector frutiortícola orgánico mundial. Tesis de Grado. Universidad Empresarial Siglo 21. Buenos Aires.
- Spotts R., Wallis K., Serdani M., O’Gorman D., Sholberg P. 2009. Real time polymerase chain reaction for rapid and quantitative determination of *Cystofilobasidium infirmominiatum* on the surfaces of apple, pear, and sweet cherry fruit. *Postharvest biology and technology*. 51(2): 227-231.
- Spotts R., Cervantes L., Facticeau T. 2002. Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and cold storage temperature. *Postharvest Biology and Technology*. 24(3): 251-257.
- Spotts R., Cervantes L., Facticeau T., Chand-Goyal T. 1998. Control of brown rot and blue mold of sweet cherry with preharvest iprodione, postharvest *Cryptococcus infirmo-miniatus*, and modified atmosphere packaging. *Plant Disease*. 82:1158-1160.
- Spotts R. 1986. Relationships between inoculum concentrations of three decay fungi and pear fruit decay. *Plant Disease*. 70:387.
- Spotts R., Cervantes L. 1986. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant disease (USA)*. *Plant Disease*. 70(2):106-108.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30:1312-1313.
- Sterflinger K., Tesei D., Zakharova K. 2012. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal ecology* 5:453-462.
- Sui Y., Wisniewski M., Droby S., Liu J. 2015. Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9):2968-2975.
- Sylla J., Alsanius BW., Kruger E., Wohanka W. 2015. Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. *Eur. J. Plant Pathol.* 143: 461-471.
- Tafinta IY, Shehu K, Abdulganiyyu H, Rabe AM, Usman A. 2014. Isolation and Identification of Fungi Associated with the Spoilage of Sweet Orange (*Citrus Sinensis*) Fruits In Sokoto State. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 21(3), 193–. doi:10.4314/njbas.v21i3.4
- Teixidó N., Torres R., Viñas I., Abadias M., Usall J. 2011. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. In: Lacroix, C. (Ed.), *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and*

Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation (pp. 364–402). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 201. Cambridge.

- Teixidó N., Usall J., Palou L., Asensio A., Nunes C., Viñas I. 2001. Improving control of green and blue molds on oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 685–694.
- Teixidó N., Viñas I., Usall J., Sanchis V., Magan N. 1998. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. *J. Appl. Microbiol.* 84: 192–200.
- Tezotto-Uliana JV., Berno ND., Gómez ACS., Kluge RA. 2018. Evaluación del comportamiento poscosecha de Frambuesas en diferentes condiciones de almacenamiento refrigerado. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 19 (1): 62-73.
- Tezotto-Uliana JV., Fargoni GP., Geerdink GM., Kluge RA. 2014. Chitosan applications pre-or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. *Postharvest Biology and Technology.* 91:72-77.
- Tezotto-Uliana JV., Berno ND., Saji FRQ., Kluge RA. 2013. Gamma radiation: An efficient technology to conserve the quality of fresh raspberries. *Scientia Horticulturae.* 164: 348-352.
- Tian SP., Jiang AL., Xu Y., Wang YS. 2004a. Responses of physiology and quality of sweet cherry fruit to different atmospheres in storage. *Food Chemistry.* 87(1): 43-49.
- Tian S., Qin G., Xu Y. 2004b. Survival of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 33(3): 327-331.
- TIP (The Insight Partners). 2019. Dried Tart Cherry Market to 2027 - Global Analysis and Forecasts by Product Type Nature End Use Distribution Channel. Recuperado de: <https://www.reportlinker.com/p05828369/Dried-Tart-Cherry-Market-to-Global-Analysis-and-Forecasts-by-Product-Type-Nature-End-Use-Distribution-Channel.html>
- Tronsmo A., Dennis C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Neth J Plant Pathol.* 83: 449–455.
- Torres, R., Solsona, C., Viñas, I., Usall, J., Plaza, P., Teixidó, N., 2014. Optimization of packaging and storage conditions of a freeze-dried *Pantoea agglomerans* formulation for controlling postharvest diseases in fruit. *J. Appl. Microbiol.* 117, 173–184.
- UIA. 2008. FRUTAS FINAS (Arándanos, Cereza, Frambuesa y Frutilla). (<http://www.latinberries.net/2007/07/debilidades-y-desafios-del-sector.html>).
- Unver Y., Yildiz M., Taskin M., Arslan NP., Ortucu S. 2015. Protease production by free and immobilized cells of the cold-adapted yeast *Cryptococcus victoriae* CA-8. *Biocatalysis and Biotransformation.* 33(2):105–110.
- Usall J., Torres R., Teixidó N. 2016. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative?. *Current Opinion in Food Science.* 11: 51-55.
- Usall J., Torres R., Viñas I., Abadias M., Teixidó N. 2013. Principales enfermedades de poscosecha y su control. In: I. Viñas, J. Usall and J. Graell (eds.). *Poscosecha de Pera, Manzana y Melocotón* (pp 253–255). Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Venturini ME., Oria R., Blanco D. 2002. Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Sweetheart. *Food Microbiology.* 19(1): 15-21.



- Vero S., Garmendia G., Sangorrin M., Vargas M. 2016. Controle Biológico de Doenças em Pós-Colheita. En: Halfeld-Vieira BDA., Marinho-Prado JS, Nechet KDL., Morandi MAB., Bettiol W. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas (pp. 261-284). Embrapa Meio Ambiente-Livro científico. Brasília.
- Vero S., Garmendia G., Gonzalez NB., Bentancur O., Wisniewski W. 2013. 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.
- Vero S., Garmendia G., Garat M., de Aurrecoechea I., Wisniewski M., Garmendia G. 2010. *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. Pages 169-180 in International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities 905.
- Vero S., Garmendia G., González MB., Garat MF., Wisniewski M. 2009. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. Biocontrol Science and Technology, 19(10): 1033-1049.
- Vico I., Gaskins V., Duduk M., Vasic M., Yu J., Peter KA., Jurick WM. 2014. First report of *Penicillium crustosum* causing blue mold on stored apple fruit in Serbia. Plant Disease. 98:1430-1430.
- Villalba M., Lutz M., Lopez S., Pildain M., Sangorrin M. 2016. Patagonian Antagonist Yeasts for Food Biopreservation. In: Olivera NL., Libkind D., Donati E. Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms (pp. 301-323). Springer. Cham.
- Villareal P., Raffo M. 2020. Cerezas patagónicas con presencia internacional. Fruticultura & Diversificación. 84: 19-22.
- Villegas C., Albarracín W. 2016. Aplicación y efecto de un recubrimiento comestible sobre la vida útil de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). Vitae. 23(3): 202-209.
- Viñas I. 1990. Principios básicos de la patología de poscosecha. FRUT 5: 285-292.
- Viñas I., Usall J., Teixidó N., Sanchis V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Int. J. Food Microbiol. 40 (1–2):9–16
- Vishniac H. 1999. Psychrophilic yeasts. In Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments (pp. 315-321). Springer, Dordrecht.
- Visintin G., Gieco I., Garcia B., Fállico L. 2007. Bioactividad de microorganismos nativos sobre infecciones en naranjas de *Penicillium digitatum* resistente y sensible a fungicidas. Ciencia, Docencia y Tecnología. 18 (34): 229-242.
- Viteri L., Benes G. 2014. Conducta, dinámica y patrones tecnológicos de la cadena de frutas finas. Ministerio de Ciencia TeIP, editor. Buenos Aires: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Von Bernard T., de Obschatko E. 2003. Estudios agroalimentarios. Fortalezas y debilidades del sector agroalimentario: competitividad de las exportaciones argentinas de origen agropecuario según el modelo CAN-2000. Proyecto BID. Componentes macroeconómicos, sectoriales y microeconómicos para una estrategia nacional de desarrollo. Lineamientos para fortalecer las fuentes de crecimiento económico.

- Wang F., Qiu J., Dai M., Chen L., Zhao S., Xin X., Zhou Q. 2020. Isolation, identification and pathogenicity study of pathogens during postharvest storage of sweet cherries. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 46(1), 126-134.
- Wang S., Chen Y., Xu Y., Wu J., Xiao G., Fu M. 2014. Super atmospheric O<sub>2</sub> packaging maintains postharvest quality of cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*. 38: 2037-2046.
- Weiss A., Mögel G., Kunz S. 2006. Development of "Boni-Protect"-a yeast preparation for use in the control of postharvest diseases of apples. In *ecofruit-12th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 31st January to 2nd February 2006 at Weinsberg/Germany* (pp. 113-117). Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau eV (FÖKO).
- White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322.
- Wilson C., Chalutz E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia horticulturae* 40:105-112.
- Wilson CL., Wisniewski M. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:425–441.
- Wilson CL., Pusey PL. 1985. Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis.* 69, 375–378.
- Wills RB., Golding J. 2016. *Advances in postharvest fruit and vegetable technology*. CRC Press.
- Wisniewski M., Droby S., Norelli J., Liu J., Schena L. 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biol Technol.* 122: 3–10.
- Wisniewski M., Wilson C., Droby S., Chalutz E., El-Gaouth A., Stevens C. 2007. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: *Biological Control (262-273)*. Edited by Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G. CAB International.
- Wisniewski M., Wilson C. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*: 27(2): 94-98.
- Wisniewski M., Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C., Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 245–258.
- Woo S., Fogliano V., Scala V., Lorito M. 2002. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:353-356.
- Xu X., Jeger M. 2020. More Ecological Research Needed for Effective Biocontrol of Plant Pathogens. In *How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases* (pp. 15-30). Springer, Cham.
- Yáñez-Mendizábal V., Viñas I., Usall J., Torres R., Solsona C., Teixidó N. 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol. Control* 60, 280–289.

- Yang J., Brannen P., Schnabel G. 2015. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI fungicides causes rare disease outbreak in peach orchards. *Plant Disease* 99, 65–70.
- Yao H., Tian S., 2005a. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *J. Appl. Microbiol.* 98: 941–950.
- Yao H., Tian S. 2005b. Effects of pre-and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology* 35:253-262.
- Yao H., Tian S., Wang Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology* 93: 297-304.
- Yu T., Wang L., Yin Y., Wang Y., Zheng X. 2008. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 122: 44-48.
- Zajc J., Cernosa A., Di Francesco A., Casteria R., De Curtis F., Lima G., Zalar P. 2020. Characterization of *Aureobasidium pullulans* Isolates Selected as Biocontrol Agents Against Fruit Decay Pathogens. *Fungal Genomics and Biology*. 10(163):1-13.
- Zajc J., Gostinčar C., Černoša A., Gunde-Cimerman N. 2019. Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes*. 10(1):42.
- Zalar P., Gostinčar C., De Hoog G., Uršič V., Sudhadham M., Gunde-Cimerman N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in mycology*. 61: 21-38.
- Zhang X., Gao Z., Zhang X., Bai W., Zhang L., Pei H., Zhang Y. 2020a. Control effects of *Bacillus siamensis* G-3 volatile compounds on raspberry postharvest diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. *Biological Control*. 141:104-135.
- Zhang Q., Zhao L., Li B., Gu X., Zhang X., Boateng N., Zhang H. 2020b. Molecular dissection of defense response of pears induced by the biocontrol yeast, *Wickerhamomyces anomalus* using transcriptomics and proteomics approaches. *Biological Control*, 148, 104305.
- Zhang J., Xie J., Zhou Y., Deng L., Yao S., Zeng K. 2017. Inhibitory effect of *Pichia membranaefaciens* and *Kloeckera apiculata* against *Monilinia fructicola* and their biocontrol ability of brown rot in postharvest plum. *Biological Control*. 114: 51-58.
- Zhang D., Spadaro D., Valente S., Garibaldi A., Gullino M. 2012. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 453–464.
- Zhang D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mould of apples and its possible modes of action. *Biological Control*. 57: 193-201.
- Zhang D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*. 54: 172-180.
- Zhang H., Ma L., Turner M., Xu H., Dong Y., Jiang S. 2009. Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay of pears. *Food Chem.* 117:21–626.

- Zhang H., Zheng X., Fu C., Xi Y. 2005. Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*. *Postharvest Biology and Technology*, 35(1): 79-86.
- Zhao S., Guo Y., Wang Q., Luo H., He C., An B. 2020. Expression of flagellin at yeast surface increases biocontrol efficiency of yeast cells against postharvest disease of tomato caused by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 162: 1-7. doi:10.1016/j.postharvbio.2019.111112
- Zhao Y., K. Tu, Tu S., Liu M., Su J., Hou I. 2010. A combination of heat treatment and *Pichia guilliermondii* prevents cherry tomato spoilage by fungi. *International journal of food microbiology* 137:106-110.
- Zhao Y., Tu K., Su J., Tu S., Hou Y., Liu F., Zou X. 2009. Heat treatment in combination with antagonistic yeast reduces diseases and elicits the active defense responses in harvested cherry tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:7565-7570.

# **ANEXOS**

## Anexo 1

Secuencias de los primers utilizados para la amplificación del ADN:

Nombre del primer	Secuencia del primer (5'-3')	Gen objetivo
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG)	ITS
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS
Bt2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	$\beta$ tubulina
Bt2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	$\beta$ tubulina
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	D1/D2
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	D1/D2

## Anexo2 Condiciones de amplificación del ADN

Género	Condiciones de ciclado
<i>Alternaria</i>	1 ciclo de 5 min a 94°C. 35 ciclos de 1 min a 94°C, 90 s a 60°C y 2 min a 72°C. 1 ciclo de 15 min 72°C (Pryor y Gilbertson 2000)
<i>Botrytis</i>	1 ciclo de 85 s a 94°C. 13 ciclos de 35 s a 95°C, 55 s a 55°C y 45 s a 72°C. 11 ciclos de 35 s a 95°C, 55 s a 55°C y 120 s a 72°C 11 ciclos de 35 s a 95°C, 55 s a 55°C y 180 s a 72°C. 1 ciclo de 10 min a 72°C (Gardes y Bruns 1993)
<i>Cladosporium</i>	1 ciclo de 3 min a 94°C. 25 ciclos de 10 s a 96°C, 10 s a 55°C y 4 min a 60°. 1 ciclo de 30 s a 60°C (Braun et al., 2003)
<i>Mucor</i>	1 ciclo de 10 min a 94°C. 30 ciclos de 30 s a 94°C, 60 s a 42°C y 2 min a 72°C. 1 ciclo de 10 min 72°C (Kwasna et al., 2006)
<i>Penicillium</i>	1 ciclo de 5 min a 94°C. 30 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s a 72°C y 1 min a 72°C. 1 ciclo de 15 min 72°C (Kim et al., 2007)
Levaduras	1 ciclo de 5 min a 95°C 35 ciclos 1 min a 94°C, 2 min a 55.5°C y 2 min a 72°C 1 ciclo de 10 min a 72°C (Esteve-Zarzoso et al., 1999)

Anexo 3

Tabla. Identidad y origen de las levaduras capaces de crecer a 0°C

ccSL	Nombre	E value	Identidad	Acceso	Fruta/variedad	Sitio	Tipo de producción	Tipo de aislamiento	Tiempo a 0°
1141	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	100	<a href="#">KU350484</a>	Cereza Lapins	P42	Orgánica	Selectivo	45
256	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	100	FJ150942	Frambuesa	P42	Orgánica	Endo- Epifitico	3
335	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	100	<a href="#">KU350477.</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Epifitico	0
339	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	100	<a href="#">KU350480</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Epifitico	0
645	<i>Curvibasidium cygneicollum</i>	0	100	<a href="#">JQ964219</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	6
1111	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	100	<a href="#">NG_042347</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Selectivo	45
1204	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	96	<a href="#">NG_042347</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
1215	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	100	<a href="#">GO911511</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
881	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	99	<a href="#">KC433851</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
885	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	99	<a href="#">NG_042347</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
886	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	99	<a href="#">KP346924</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
1130	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	99	<a href="#">KC433851</a>	Cereza Lapins	P42	Orgánica	Selectivo	45
679	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0	99	<a href="#">KC433851</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	3
1040	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	0	99	<a href="#">AY158643</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Selectivo	45
1225	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	1,00E-111	99	<a href="#">KU179836</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
657	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	0	100	<a href="#">KU179836</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	3
659	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	0	99	<a href="#">KU179836</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	3
1104	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	0	100	<a href="#">KP346926</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Selectivo	45
1108	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	0	100	<a href="#">KP346926</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Selectivo	45
1110	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	0	100	<a href="#">KP346926</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Selectivo	45
1114	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	0	100	<a href="#">KC433777</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Selectivo	45
1026	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	0	100	<a href="#">KP346926</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Selectivo	45
1217	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	0	100	<a href="#">KT427611</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
16	<i>Filobasidium magnum</i>	0	100	KT970745	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	0
492	<i>Filobasidium magnum</i>	0	100	<a href="#">KC160631</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	60
614	<i>Filobasidium stepposum</i>	0	100	<a href="#">KT933347</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	0

665	<i>Filobasidium wieringae</i>	0	100	<a href="#">KT427574</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	3
752	<i>Filobasidium wieringae</i>	0	100	AF181541	Frambuesa	P42	Orgánica	Endo- Epifitico	6
772	<i>Gelidatrema spencermartinsiae</i>	0	98	<a href="#">DQ513279</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
949	<i>Gelidatrema spencermartinsiae</i>	0	98	<a href="#">DQ513279</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	60
696	<i>Gelidatrema spencermartinsiae</i>	0	98	<a href="#">DQ513279</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
728	<i>Holtermanniella wattica</i>	0	99	<a href="#">FJ748666</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	3
199	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0	100	<a href="#">KU316708</a>	Frambuesa	P42	Orgánica	Endo- Epifitico	3
1207	<i>Mrakia frigida</i>	0	99	<a href="#">AJ866978</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
1211	<i>Mrakia frigida</i>	0	99	<a href="#">AJ866978</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
1213	<i>Mrakia frigida</i>	0	99	<a href="#">AJ866978</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
1226	<i>Mrakia frigida</i>	0	99	<a href="#">AJ866978</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
442	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	30
905	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	60
154	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	0
163	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	0
168	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	0
413	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	30
441	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	30
502	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	60
443	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Endofitico	30
774	<i>Naganishia adeliensis</i>	0	100	<a href="#">KT239028</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
702	<i>Naganishia albidosimilis</i>	9,00E-38	100	<a href="#">KJ439600</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
636	<i>Naganishia albidosimilis</i>	0	100	<a href="#">KJ756744</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	6
642	<i>Naganishia albidosimilis</i>	0	100	<a href="#">KJ756744</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	6
619	<i>Naganishia antarcticus</i>	0	99	<a href="#">KT970767</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	0
770	<i>Naganishia globosa</i>	0	100	<a href="#">LC134296</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Endofitico	30
621	<i>Naganishia globosa</i>	0	100	<a href="#">LC134296</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	0
624	<i>Naganishia globosa</i>	0	100	<a href="#">LC134296</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	0
625	<i>Naganishia globosa</i>	0	100	<a href="#">LC134296</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	0
655	<i>Naganishia globosa</i>	0	100	<a href="#">LC134296</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	3
672	<i>Naganishia globosa</i>	0	99	<a href="#">LC134296</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	3
631	<i>Naganishia globosa</i>	0	99	<a href="#">KU316763</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	6



647	<i>Naganishia globosa</i>	0	100	<a href="#">LC134296</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	6
1039	<i>Piskurozyma capsuligena</i>	0	99	<a href="#">JN637174</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Selectivo	45
646	<i>Rhodospordiobolus colostri</i>	0	100	<a href="#">KF826525</a>	Zarzamora	P42	Asilvestrada	Endo- Epifitico	6
1206	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">NG_042352</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Selectivo	45
907	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	60
879	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
880	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
882	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
883	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
884	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
894	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
895	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
898	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
1033	<i>Tausonia pullulans</i>	0	99	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Selectivo	45
899	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	60
900	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	60
904	<i>Tausonia pullulans</i>	0	100	<a href="#">KP737853</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	60
21	<i>Vishniacozyma tephrensis</i>	0	100	<a href="#">KM891575</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	0
498	<i>Vishniacozyma tephrensis</i>	0	100	<a href="#">KM891575</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	60
166	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	0
263	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	99	<a href="#">KY110041</a>	Frambuesa	P42	Orgánica	Endo- Epifitico	3
427	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	30
771	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
777	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
781	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	99	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Bing	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
1109	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Selectivo	45
964	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	99	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Bing	P42	Orgánica	Epifitico	60
30	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KR995831</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	0
33	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	0
76	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970768</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	0
305	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Endofitico	30

307	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Endofitico	30
783	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
877	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Endofitico	30
501	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	60
504	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	60
505	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Lapins	Gaiman	Convencional	Epifitico	60
992	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	3,00E-144	98	<a href="#">KU145498</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	60
993	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	2,00E-166	98	<a href="#">AF363229</a>	Cereza Lapins	Trevelin	Convencional	Epifitico	60
703	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Cereza Rainier	Trevelin	Convencional	Epifitico	30
201	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0	100	<a href="#">KT970744</a>	Frambuesa	P42	Orgánica	Endo- Epifitico	3

P42: Paralelo 42°

#### Anexo 4

Severidad, incidencia y virulencia en frutas cerezas inoculadas con diferentes levaduras frente a *P. crustosum* ccCIEFAP491. Los resultados se presentan según el efecto sobre la virulencia, de menor a mayor porcentaje.

Levaduras	0°C				Levaduras	22°C			
	S (mm) **	I (%)	V (%)			S (mm) **	I (%)	V (%)	
<i>H. wattica</i> ccSL 728	1.20±0.26	43.3	10	Grupo 3	<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	1.41±0.11	96.6	18.6	Grupo 3
<i>A. pullulans</i> * ccSL1141	1.08±0.28	53.3	13.6		<i>A. pullulans</i> * ccSL1141	1.53±0.13	96.6	20.3	
<i>V. tephrensensis</i> ccSL498	2.90±0.33	30	16.8		<i>N. adeliensis</i> ccSL441	5.33±0.1	60	44.23	
<i>N. adeliensis</i> ccSL441	1.44±0.27	63.3	17.6		<i>F. stepposum</i> ccSL614	4.58±0.42	86.6	48.9	
<i>V. victoriae</i> ccSL771	2.00±0.5	53.3	20.6		<i>P. capsuligena</i> ccSL1039	4.39±0.22	100	60.2	
<i>Cy. capitatum</i> ccSL679	2.33±0.42	50	22.5		<i>N. globosa</i> ccSL647	4.72±0.19	100	64.7	Grupo 2
<i>N. globosa</i> ccSL631	1.80±0.34	63.3	26.9		<i>N. globosa</i> ccSL621	5.87±0.45	93.3	67.4	
<i>Cr. albidus</i> Yield Plus (YP)	1.27±0.11	93.3	27.9		<i>H. wattica</i> ccSL 728	5.53±0.42	100	68.0	
<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	1.53±0.11	93.3	33.6		<i>M. frígida</i> ccSL1207	4.98±0.28	100	68.2	
<i>Cy. infirmominiatum</i> ccSL657	2.44±0.38	73.3	34.6		<i>N. adeliensis</i> ccSL154	5.55±0.54	100	68.3	
<i>V. victoriae</i> ccSL166	2.17±0.43	83.3	34.9		<i>Cu. cygneicollum</i> ccSL645	5.01±0.23	100	68.7	
<i>V. victoriae</i> ccSL30	2.26±0.66	80	34.9		<i>N. albidosimilis</i> ccSL636	6.57±0.51	76.6	69.1	
<i>F. stepposum</i> ccSL614	2.01±0.22	90	34.9		<i>T. pullulans</i> ccSL1206	5.28±0.37	96.6	69.9	
<i>F. wieringae</i> ccSL665	2.45±0.35	76.6	36.3		<i>N. globosa</i> ccSL631	5.38±0.28	96.6	71.2	
<i>V. victoriae</i> ccSL501	2.41±0.31	80	37.3		<i>Cy. macerans</i> ccSL1026	5.22±0.22	100	71.5	
<i>F. magnum</i> ccSL16	2.28±0.27	90	39.6	<i>Cy. capitatum</i> ccSL679	6.09±0.49	96.6	72.5		
<i>V. victoriae</i> ccSL201	2.42±0.39	86.6	40.5	<i>T. pullulans</i> ccSL899	6.19±0.60	96.6	73.7		
<i>N. adeliensis</i> ccSL502	2.62±0.29	86.6	43.9	<i>A. pullulans</i> Bony Protect (BP)	5.46±0.37	100	74.8		
<i>V. tephrensensis</i> ccSL21	2.69±0.29	93.3	48.6	<i>N. adeliensis</i> ccSL502	6.10±0.17	100	75.1		
<i>N. adeliensis</i> ccSL154	3.23±0.38	86.6	54.2	<i>N. adeliensis</i> ccSL905	6.32±0.41	100	77.8	Grupo 1	
<i>F. magnum</i> ccSL492	3.18±0.26	93.3	57.5	<i>V. victoriae</i> ccSL703	6.36±0.43	100	78.3		
<i>V. victoriae</i> ccSL964	3.73±0.37	80	57.8	<i>V. victoriae</i> ccSL993	6.37±0.36	100	78.4		

<i>V. victoriae</i> ccSL703	3.85±0.67	80	59.6	Grupo 1	<i>Cy. macerans</i> ccSL1217	5.95±0.59	96.6	78.8
<i>V. victoriae</i> ccSL427	3.46±0.27	90	60.2		<i>P. membranifaciens</i> NPCC1250	5.76±0.20	100	78.9
<i>V. victoriae</i> ccSL993	3.93±0.42	83.3	63.4		<i>F. wieringae</i> ccSL665	6.43±0.80	100	79.1
<i>N. globosa</i> ccSL621	4.00±0.31	86.6	67.1		<i>Cy. infirmominiatum</i> ccSL657	6.68±0.45	100	82.2
<i>A. pullulans</i> Boni Protect (BP)	3.34±0.27	86.6	68.3		<i>V. victoriae</i> ccSL501	7.02±0.35	100	86.4
<i>A. pullulans</i> ccSL256	6.45±0.28	100	118		<i>F. magnum</i> ccSL492	7.03±0.37	100	86.5
<i>N. albidosimilis</i> ccSL636	4.29±0.33	80	81.1		<i>V. victoriae</i> NPCC1263	6.32±0.16	100	86.6
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	4.33±0.36	100	83.7		<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	7.27±0.31	100	89.5
<i>Cy. capitatum</i> ccSL881	5.32±0.48	90	92.6		<i>T. pullulans</i> ccSL879	7.33±0.44	100	90.2
<i>V. victoriae</i> NPCC1263	4.23±0.19	96.6	96.6		<i>F. magnum</i> ccSL16	7.38±0.65	100	90.9
<i>N. adeliensis</i> ccSL905	5.00±0	100	96.7		<i>V. tephrensis</i> ccSL498	7.43±0.34	100	91.5
<i>N. adeliensis</i> ccSL774	5.00±0	100	96.7		<i>V. tephrensis</i> ccSL21	7.44±0.39	100	91.6
<i>N. antarcticus</i> ccSL619	5.67±0.09	100	100		<i>N. globosa</i> ccSL770	7.47±0.30	100	91.9
<i>G. spencermartinsiae</i> ccSL696	7.33±0.18	100	100		<i>T. pullulans</i> ccSL1033	6.77±0.16	100	92.8
<i>V. victoriae</i> ccSL305	5.91±0.83	96.6	110.5		<i>V. victoriae</i> ccSL964	7.68±0.43	100	94.6
<i>N. globosa</i> ccSL770	6±0	100	116.1		<i>V. victoriae</i> ccSL771	7.78±0.49	100	95.8
<i>Cy. macerans</i> ccSL1217	5.6±0.76	93.3	123.4		<i>V. victoriae</i> ccSL30	7.97±0.54	100	98.1
<i>Cu. cygneicollum</i> ccSL645	6.04±0.60	90	128.4		<i>Cy. infirmominiatum</i> ccSL659	8.00±0.54	90	98.7
<i>P. membranifaciens</i> NPCC1250	6.71±0.49	93.3	148.0		<i>A. pullulans</i> ccSL256	7.3±0	100	100
<i>T. pullulans</i> ccSL879	8.20±0.01	100	160.8		<i>N. antarcticus</i> ccSL619	8.13±0.38	100	100.2
<i>T. pullulans</i> ccSL899	8.01±0.12	100	154.8		<i>V. victoriae</i> ccSL166	8.18±0.39	100	100.7
<i>N. globosa</i> ccSL647	7.78±0.43	96.6	177.7		<i>Cy. capitatum</i> ccSL881	8.47±0.30	100	104.3
<i>Cy. macerans</i> ccSL1026	7.67±0.38	100	181.1		<i>N. adeliensis</i> ccSL774	8.58±0.35	100	105.6
<i>V. victoriae</i> ccSL1109	10±0	100	236.2		<i>V. victoriae</i> ccSL1109	7.87±0.36	100	107.8
<i>C. capitatum</i> ccsSL1111	10±0	100	236.2		<i>V. victoriae</i> ccSL427	9.03±0.31	100	111.3
<i>C. capitatum</i> ccSL1130	10±0	100	236.2		<i>G. spencermartinsiae</i> ccSL696	9.27±0.39	100	114.1
<i>C. infirmominiatum</i> ccSL659	10±0	100	236.2		<i>Cr. albidus</i> Yield Pus (YP)	8.42±0.25	100	115.4
<i>C. infirmominiatum</i> ccSL1040	10±0	100	236.2		<i>V. victoriae</i> ccSL201	9.61±0.48	100	118.3
<i>C. macerans</i> ccSL1104	10±0	100	236.2		<i>R. colostri</i> ccSL646	8.94±0.33	100	122.6
<i>P. capsuligena</i> ccSL1039	10±0	100	236.2		<i>C. macerans</i> ccSL1104	9.10±0.26	100	124.8

<i>T. pullulans</i> ccSL1033	10±0	100	236.2	<i>C. capitatum</i> ccSL1130	10.00±0	100	137.1
<i>T. pullulans</i> ccSL11206	10±0	100	236.2	<i>Cy. capitatum</i> ccsSL1111	10.16±0.16	100	139.3
<i>M. frígida</i> ccSL1207	10±0	100	236.2	<i>Cy. infirmominiatum</i> ccSL1040	11.93±0.44	100	163.6
<i>R. colostri</i> ccSL646	10±0	100	236.2	<i>V. victoriae</i> ccSL305	13.53±0.39	100	166.7
Control	4.23±0.13	100	100	Control	7.29±0.31	100	100

S: severidad. I: incidencia. V: virulencia. \* Hongo tipo levadura o “yeast-like” \*\* ± Desvío estándar. Colores diferentes indican Grupos diferentes:

■ Grupo 1 ■ Grupo 2 ■ Grupo 3

Anexo 5. Severidad, incidencia y virulencia en frutas cerezas inoculadas con diferentes levaduras frente a *M. piriformis* ccCIEFAP501. Los resultados se presentan según el efecto sobre la virulencia, de menor a mayor porcentaje.

Levaduras	0°C			Levaduras	22°C		
	S (mm)**	I (%)	V (%)		S (mm)**	I (%)	V (%)
<i>N. globosa</i> ccSL631	1.48±0.80	13.3	0.98	<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	4±1.49	16.6	3.3
<i>T. pullulans</i> ccSL879	2.67±1.26	13.3	1.7	<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	6±1.70	20	9
<i>T. pullulans</i> ccSL899	4.67±1.57	23.3	5.4	<i>Cr. albidus</i> (YP)	8.67±1.84	43.3	18.7
<i>V. victoriae</i> ccSL30	6±1.70	30	9	<i>Cy. infirmominiatum</i> ccSL1040	9.33±1.85	46.6	21.7
<i>Cy. capitatum</i> ccSL1204	6.67±1.75	33.3	11.1	<i>Cy. macerans</i> ccSL1104	10±1.86	50	25
<i>N. albidosimilis</i> ccSL 636	7.67±1.77	40	15.3	<i>T. pullulans</i> ccSL899	10.67±1.85	53.3	28.4
<i>V. victoriae</i> ccSL771	8±1.82	40	16	<i>N. globosa</i> ccSL631	10.58±1.72	56.6	30
<i>M. guilliermondii</i> ccSL199	8±1.82	40	16	<i>R. colostri</i> ccSL646	12±1.82	60	36
<i>N. adeliensis</i> ccSL154	9.33±1.58	46.6	21.7	<i>V. victoriae</i> ccSL771	12.67±1.79	63.3	40.1
<i>A. pullulans</i> ccSL1141 *	12.67±1.79	66.6	44.4	<i>T. pullulans</i> ccSL1206	12.67±1.79	63.3	40.1
<i>Cr. albidus</i> (YP)	13.33±1.75	66.6	44.4	<i>N. adeliensis</i> ccSL 154	13.33±1.79	66.6	44.4
<i>F. magnum</i> ccSL16	15±1.75	66.6	50	<i>V. victoriae</i> ccSL201	14±0.93	73.3	51.3
<i>R. colostri</i> ccSL646	10.17±0.17	100	50.8	<i>F. magnum</i> ccSL16	11.33±1.84	100	56.6
<i>N. globosa</i> ccSL647	14.67±1.64	73.3	53.7	<i>V. victoriae</i> ccSL30	15.33±1.57	76.6	58.7
<i>F. wieringa</i> ccSL665	14.67±1.64	73.3	53.7	<i>V. victoriae</i> ccSL305	16±1.49	80	64
<i>V. victoriae</i> ccSL201	14±1.70	80	56	<i>Cy. capitatum</i> ccSL881	16.67±1.38	83.3	69.4

<i>V. victoriae</i> ccSL703	15.33±1.57	76.6	58.7	<i>V. victoriae</i> ccSL1109	18±1.11	80	72
<i>Cy. macerans</i> ccSL1026	15.33±1.50	80	61.3	<i>F. wieringae</i> ccSL665	17.33±1.26	86.6	75.1
<i>Cy. macerans</i> ccSL1207	15.67±1.49	80	62.6	<i>T. pullulans</i> ccSL1033	17.33±1.26	86.6	75.1
<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	17.33±1.26	80	69.3	<i>Cy. capitatum</i> ccSL1130	18.67±0.93	93.3	87.1
<i>V. victoriae</i> ccSL501	16.67±1.38	83.33	69.4	<i>A. pullulans</i> ccSL1141 *	20±0	100	100
<i>V. tephrensis</i> ccSL498	17.67±1.14	90	79.5	<i>A. pullulans</i> ccSL256	20±0	100	100
<i>A. pullulans</i> ccSL256	20±0	100	100	<i>N. adeliensis</i> ccSL441	20±0	100	100
<i>V. tephrensis</i> ccSL21	18±1.11	90	81	<i>N. adeliensis</i> ccSL502	20±0	100	100
<i>F. magnum</i> ccSL492	18.67±0.93	93.3	87.1	<i>N. adeliensis</i> ccSL774	20±0	100	100
<i>N. adeliensis</i> ccSL502	18.67±0.93	93.3	87.1	<i>N. adeliensis</i> ccSL905	20±0	100	100
<i>Cy. infirmominiatum</i> ccSL659	18.67±0.93	93.3	87.1	<i>F. magnum</i> ccSL492	20±0	100	100
<i>Cy. macerans</i> ccSL1104	17.67±1.71	100	88.3	<i>N. albidosimilis</i> ccSL 636	20±0	100	100
<i>Cy. capitatum</i> ccSL679	18±0.74	100	90	<i>N. antarcticus</i> ccSL619	20±0	100	100
<i>V. victoriae</i> ccSL166	19±0.67	96.6	91.8	<i>G. spencermartinsiae</i> ccSL696	20±0	100	100
<i>V. victoriae</i> NPCC1263	19.33±0.67	96.6	93.4	<i>F. stepposum</i> ccSL614	20±0	100	100
<i>N. adeliensis</i> ccSL441	20±0	100	100	<i>V. tephrensis</i> ccSL21	20±0	100	100
<i>N. adeliensis</i> ccSL774	20±0	100	100	<i>V. tephrensis</i> ccSL498	20±0	100	100
<i>N. adeliensis</i> ccSL905	20±0	100	100	<i>V. victoriae</i> ccSL166	20±0	100	100
<i>N. antarcticus</i> ccSL619	20±0	100	100	<i>V. victoriae</i> ccSL427	20±0	100	100
<i>G. spencermartinsiae</i> ccSL696	20±0	100	100	<i>V. victoriae</i> ccSL501	20±0	100	100
<i>F. stepposum</i> ccSL614	20±0	100	100	<i>V. victoriae</i> ccSL703	20±0	100	100
<i>V. victoriae</i> ccSL305	20±0	100	100	<i>H. wattica</i> ccSL728	20±0	100	100
<i>V. victoriae</i> ccSL427	20±0	100	100	<i>C. capitatum</i> ccSL679	20±0	100	100
<i>V. victoriae</i> ccSL964	20±0	100	100	<i>V. victoriae</i> ccSL964	20±0	100	100
<i>V. victoriae</i> ccSL993	20±0	100	100	<i>V. victoriae</i> ccSL993	20±0	100	100
<i>V. victoriae</i> ccSL1109	20±0	100	100	<i>C. capitatum</i> ccSL1111	20±0	100	100
<i>H. wattica</i> ccSL728	20±0	100	100	<i>C. infirmominiatum</i> ccSL657	20±0	100	100
<i>C. capitatum</i> ccSL881	20±0	100	100	<i>C. infirmominiatum</i> ccSL659	20±0	100	100
<i>C. capitatum</i> ccSL1111	20±0	100	100	<i>C. macerans</i> ccSL1026	20±0	100	100
<i>C. capitatum</i> ccSL1130	20±0	100	100	<i>C. macerans</i> ccSL1207	20±0	100	100

Grupo 1

Grupo 1

<i>C. infirmominiatum</i> ccSL657	20±0	100	100	<i>P. capsuligena</i> ccSL1039	20±0	100	100
<i>C. infirmominiatum</i> ccSL1040	20±0	100	100	<i>T. pullulans</i> ccSL879	20±0	100	100
<i>P. capsuligena</i> ccSL1039	20±0	100	100	<i>M. frigida</i> ccSL1207	20±0	100	100
<i>T. pullulans</i> ccSL1033	20±0	100	100	<i>N. globosa</i> ccSL621	20±0	100	100
<i>T. pullulans</i> ccSL1206	20±0	100	100	<i>N. globosa</i> ccSL647	20±0	100	100
<i>M. frigida</i> ccSL1207	20±0	100	100	<i>N. globosa</i> ccSL770	20±0	100	100
<i>N. globosa</i> ccSL621	20±0	100	100	<i>Cu. cygneicollum</i> ccSL645	20±0	100	100
<i>N. globosa</i> ccSL770	20±0	100	100	<i>P. membranifaciens</i> NPCC 1250	20±0	100	100
<i>Cu. cygneicollum</i> ccSL645	20±0	100	100	<i>V. victoriae</i> NPCC1263	20±0	100	100
<i>A. pullulans</i> (BP)	20±0	100	100	<i>A. pullulans</i> (BP)	20±0	100	100
Control	20±0	100	100	Control	20±	100	100

S: severidad. I: incidencia. V: virulencia. \* Hongo tipo levadura o “yeast-like” \*\* ± Desvío estándar. Colores diferentes indican Grupos diferentes:

■ Grupo 1   ■ Grupo 2   ■ Grupo 3

Anexo 6. Máxima densidad óptica para cada levadura en cada temperatura, según el soluto usado para modificar la actividad agua y para el pH.

Temperatura		<i>V. victoriae</i> ccSL30			<i>A. pullulans</i> ccSL1141			<i>C. Capitatum</i> ccSL 1204		
		Glucosa	Glicerol	pH	Glucosa	Glicerol	pH	Glucosa	Glicerol	pH
0°	Max DO	0.249	0.234	0.192	1.267	1.279	<b>1.338</b>	0.825	0.829	0.904
	Tratamiento	0.998 (C)	0.998 (C)	6	0.995	0.998 (C)	<b>5.5</b>	0.995	0.99	5
	Tiempo	15 d	15 d	11 d	25 d	25 d	25 d	28 d	28 d	28 d
5°	Max DO	0.544	0.608	1.184	1.475	1.358	1.41	1.548	1.548	<b>1.626</b>
	Tratamiento	0.99	0.99	4.5	0.995	0.99	3.5	0.998 (C)	0.998 (C)	<b>5.5</b>
	Tiempo	32 d	32 d	32 d	25 d	25 d	25 d	28 d	28 d	28 d
10°	Max DO	1.578	1.334	1.376	<b>1.824</b>	1.822	1.749	1.62	1.379	1.539
	Tratamiento	0.995	0.998 (C)	6	<b>0.995</b>	0.995	4	0.99	0.995	4
	Tiempo	13 d	15 d	11 d	25 d	25 d	25 d	25 d	25 d	25 d
20°	Max DO	1.502	1.195	1.188	1.585	1.005	1.08	1.544	1.24	1.23
	Tratamiento	0.995	0.995	6.5	0.995	0.998 (C)	6.5	0.99	0.995	6.5
	Tiempo	76 h	46 h	50 h	140 hs	61 hs	129 hs	144 hs	85 hs	65 hs
30°	Max DO	1.38	1.195	1.082	0.704	0.659	0.75	1.4	<b>1.126</b>	<b>1.126</b>
	Tratamiento	0.995	0.995	0.998 (C)	0.998 (C)	0.98	4.5	0.995	<b>0.998 (C)</b>	<b>6.5</b>
	Tiempo	45 hs	45 hs	28 hs	72 hs	72 hs	72 hs	51 hs	26 hs	28 hs

Max. DO: Máxima densidad óptica medida. (C): control. Datos en negrita señalan la mayor DO y el tratamiento para cada temperatura. Los cuadros grises señalan el tratamiento y el tiempo en el que se obtuvo la mayor DO en menor tiempo para cada levadura.



# **ARTÍCULO DE RESPALDO**

## Disease report/Rapport des maladies

# Fruit rot of sweet cherries and raspberries caused by *Penicillium crustosum* and *Mucor piriformis* in South Patagonia, Argentina

SOFÍA N. LÓPEZ<sup>1,2,4</sup>, MARCELA P. SANGORRIN<sup>1,3</sup> AND MARÍA BELÉN PILDAIN<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, Ruta 259 km 14.6, C.C. 14, 9200 Esquel, Chubut, Argentina

<sup>3</sup>Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, CONICET-UNCo), Buenos Aires 1440, Neuquén, Argentina

<sup>4</sup>Universidad Nacional de la Patagonia S.J. Bosco, Ruta 259 km 14.6, 9200 Esquel, Chubut, Argentina

(Accepted 27 September 2016)

**Abstract:** Cherries and raspberries are important fruit crops in Patagonia, Argentina. A high proportion (50%) of raspberry production is organic certified and sold for fresh and frozen domestic markets. Due to post-harvest rot diseases, cherries and raspberries from Patagonia are kept in cold storage for a short period of time. During the storage season of 2012–2013, fruit rot samples were obtained from conventional and organic sweet cherry and raspberry orchards in the Andean zone of Central Patagonia. *Penicillium crustosum* and *Mucor piriformis* were isolated from both types of production systems and identified through morphological and molecular analysis; their pathogenicity was confirmed based on their virulence (incidence and severity). To our knowledge, this is the first report confirming *Penicillium crustosum* and *Mucor piriformis* causing post-harvest disease on cherries and raspberries in Argentina, and it contributes to expanding the knowledge on emerging pathogens.

**Keywords:** adapted cold pathogens, organic production, post-harvest diseases, *Prunus avium*, *Rubus idaeus*

**Résumé:** Les cerises et les framboises sont des cultures importantes en Patagonie, en Argentine. Une forte proportion (50%) de la production de framboises est certifiée biologique et est vendue sur les marchés locaux de fruits frais et congelés. À cause de pourritures post-récoltes, les cerises et les framboises de la Patagonie sont entreposées sous froid pendant une courte période. Durant la saison d'entreposage 2012–2013, des échantillons de pourriture ont été prélevés dans des framboisières et dans des vergers des cerisiers sauvages, cultivés traditionnellement et biologiquement, dans la zone andine du centre de la Patagonie. *Penicillium crustosum* et *Mucor piriformis* ont été isolés dans les deux types de productions et identifiés par analyse morphologique et moléculaire; leur pathogénicité a été confirmée en se basant sur leur virulence (incidence et gravité). À notre connaissance, il s'agit du premier rapport confirmant l'incidence d'une maladie post-récolte causée par *Penicillium crustosum* et *Mucor piriformis* chez les cerises et les framboises en Argentine. Par ailleurs, il contribue à étendre les connaissances sur les agents pathogènes émergents.

**Mots clés:** agents pathogènes adaptés au froid, maladies post-récoltes, production biologique, *Prunus avium*, *Rubus idaeus*

## Introduction

Berries and cherries are widely consumed all over the world. In Argentinean Patagonia, these are important fruit crops as fresh season fruit and frozen fruit, while almost 90% of raspberry production supplies the local markets.

Argentinean exports of fresh cherries increased 12.4 times from 142 tons in 1994 to 1759 tons in 2013, and ranked tenth in the income generated by fresh fruit exports for the country (Bruzone 2009; Baudino 2013). In the Patagonian region, raspberry (*Rubus idaeus* L.) and

sweet cherry (*Prunus avium* L.) are conventional and certified organic products. Both types of commodities are very perishable and can be infected by different pathogens, both in the field and, even more so, during post-harvest storage (Crisosto et al. 1993; Vaughn et al. 1993). Leak rot and blue mould caused by *Mucor* and *Penicillium* species, respectively, have been reported several times in stored cherries and raspberries fruit. *Mucor mucedo* L., *M. piriformis* A. Fisch. and *M. hiemalis* Wehmer have been associated with leak rot of raspberries in the UK (Dennis & Mountford 1975; Snowdon 1990). *Mucor piriformis* has also been reported to cause rotting of cherries in Chile, California and Norway (Michailides & Spotts 1990; Børve et al. 2000). Blue mould decay may be caused by various *Penicillium* species, *Penicillium expansum* Link being the most aggressive and commonly encountered in sweet cherry fruit (Ceponis 1987; Spotts et al. 1998). In Italy, three *Penicillium* species, including *P. expansum*, *P. chrysogenum* Thom and *P. crustosum* Thom have been associated with soft rot of sweet cherries (Sanzani et al. 2013). During December 2012–February 2013, symptoms of decaying fruits from storage chambers at 0° in the Andean range zone of Southern Patagonia were analysed. Symptoms began as a soft and light to dark brown lesion. As infection advanced, the lesions became watery, with sporulating mycelia and, when the decayed cherry fruit was cut, the fruit flesh appeared to be completely rotten, light to dark brown, very soft or watery, and easily separated from the healthy tissue. Thus, the objectives of this study were to determine the causal agent and identify the pathogen based on morphological characteristics, pathogenicity tests and molecular biological techniques.

## Materials and methods

### *Pathogen isolation*

During surveys for post-harvest diseases of cherries and berries conducted on the Andean range zone of Patagonia, Argentina (Trevelin, 43°02'19S, 71°28'25W; Lago Puelo, 41°59'57S, 71°33'10W; El Bolsón, 41°56' 42S, 71°31'13W), cherry ('Bing', 'Lapins' and 'Rainier' varieties) and raspberry ('Autumn Bliss' variety) fruits with rot symptoms were obtained from storage chambers at 0–1°C (Fig. 1a,c). Both types of fruit came from organic and conventional fields in the west area of Patagonia (Andean range zone). Small pieces (3 mm<sup>2</sup>) of 50 symptomatic fruits were excised from the junction of diseased and healthy tissue, surface-sterilized in 70% ethanol for 30 s, washed in three changes of sterile distilled water, air dried, transferred to potato dextrose agar

(PDA) and incubated for 7–10 days at 22°C. A total of 18 isolates were subcultured in Petri dishes with PDA in a growth chamber at 22°C.

### *Morphological and molecular identification*

Fungi were morphologically identified according to macro and microscopic characteristics from cultures on PDA, Czapek yeast autolysate agar (CYA), malt extract agar (MEA) and yeast extract sucrose agar (YES) (Samson et al. 2004; Pitt & Hocking 2009). After the morphological examination, isolates were grown in 2 mL of malt-peptone, and genomic DNA was extracted using the commercial kit Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA). A part of the  $\beta$ -tubulin gene, and the Internal Transcribed Spacer (ITS) and the intervening 5.8S RNA gene were amplified with the primers Bt2a and Bt2b (Glass & Donaldson 1995) and ITS5-ITS4 (White et al. 1990), respectively. PCR amplification was carried out in a 25  $\mu$ L reaction mixture containing dNTPs (0.25 mM of each), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\times$  PCR buffer supplied with the polymerase enzyme; 0.1 mM each of primer; 100–500 ng DNA; 6% bovine serum albumin (BSA, Promega, Madison, WI) and 1.25 U GoTaq polymerase (Promega). PCR reactions were performed in a thermal cycler (MyCycler™, BioRad). Conditions for PCR amplification and sequencing were as described by Kim et al. (2007) and Kwasna et al. (2006). The amplified fragments were purified and sequenced with an ABI 3700 automated sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA) at the DNA Synthesis and Sequencing Facility, Macrogen (Seoul, Korea). Sequences were submitted to GenBank (KU961521–KU961529). Phylogenetic relationships were inferred with maximum likelihood (ML). The best-fit models of evolution were K80 (ITS dataset) and TrN +G ( $\beta$ -tubulin dataset), determined in jModelTest (Posada 2008). Branch support was determined with non-parametric bootstrapping implemented in RAxML 7.2.8 (Stamatakis 2014), using the default parameters, executed on the CIPRES (cyberinfrastructure for phylogenetic research) Science Gateway 3.1 (Miller et al. 2010) with bootstrap statistics calculated from 1000 bootstrap replicates.

### *Pathogenicity tests*

To determine pathogenicity, healthy cherry fruits 'Bing' were randomized and sterilized with 2% NaOCl for 30 s, wounded (3  $\times$  3 mm wound) with a sterile stick and inoculated with 10  $\mu$ L of 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup> from 7-day-old sporulating cultures of each isolate. Fruits were

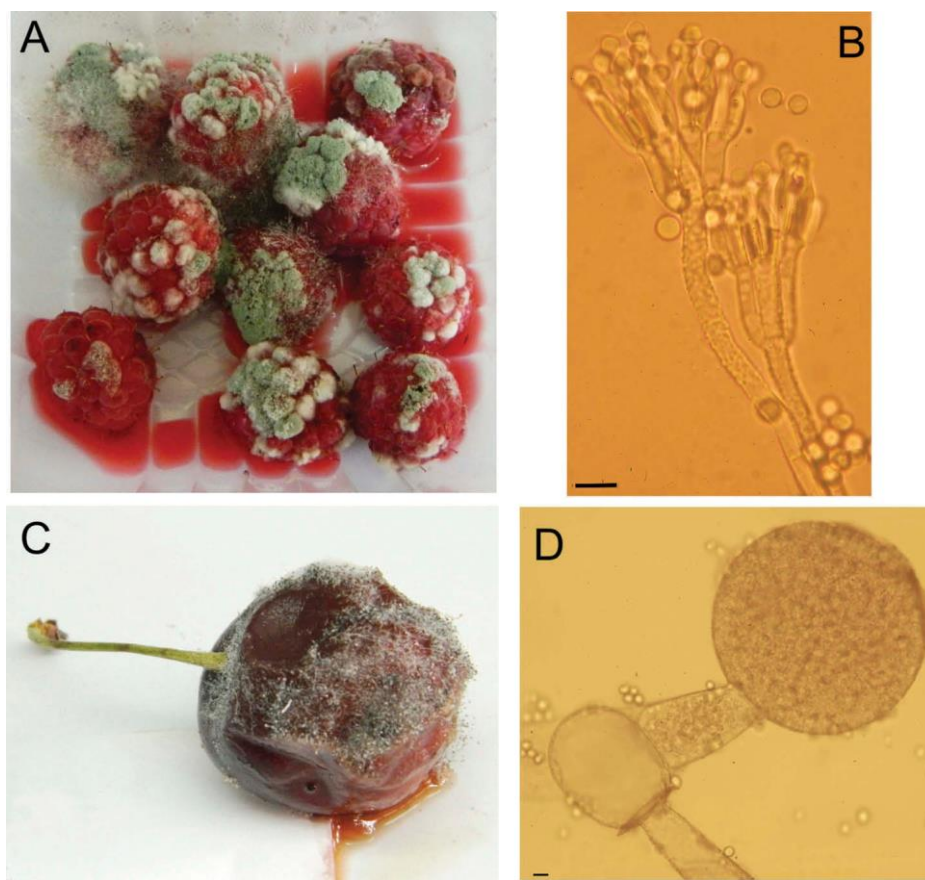


Fig. 1. (Colour online) Decay symptoms and morphological features. (a) *Penicillium crustosum* white mycelium and green sporulation and rot symptoms on inoculated raspberries in pathogenicity tests. (b) *Penicillium crustosum* conidiophores and conidia. (c) *Mucor piriformis* mycelia and symptoms in later stage on naturally infected cherry. (d) Sporangiophores, sporangia, collumelae and sporangiospores of *Mucor piriformis*. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

placed in plastic trays inside polyethylene bags, avoiding contact between wounds and bags, and kept in cold storage conditions (30 days at 0°C followed by 3 days at 22°C), and under ambient conditions (7 days at 22°C) in refrigeration chambers. Severity (wound diameter) was determined. Raspberry fruits 'Autumn Bliss' were spray-inoculated with a conidial suspension containing  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  from 7-day-old sporulating cultures of each isolate (Verma & Sen 2008). Fruits were placed in plastic trays inside polyethylene bags as with cherries, and kept in two storage conditions: (a) at 0°C for 5 days and for 2 days at 22°C, (b) at commercial conditions during 5 days at 22°C. Disease incidence was defined as the number of diseased wounds/total number of wounds  $\times$  100. Distilled water was used as negative control. Three replicates of 10 fruits were used. The pathogen was re-isolated; its morphology and DNA sequence was compared with the original isolate. The experiment was conducted in December 2013 and

repeated in February 2014 with a different lot of fruit, belonging to 'Lapins' variety, for confirmation.

## Results and discussion

### *Fungal identification and isolation*

From the sampled fruit, 23% of cherries and 16% of raspberries developed fungi different to *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (2%), the main worldwide post-harvest pathogen associated with both types of fruit. Two different fungi were identified in both fruits: *Penicillium crustosum* (five isolates: two from organic and conventional cherries, three from organic certified raspberries) and *Mucor piriformis* (10 isolates: two from organic cherries, five from conventional cherries and three from organic certified raspberries). Isolates of *P. crustosum* were morphologically identified according to Frisvad & Samson (2004). Isolates ccCIEFAP479 and ccCIEFAP483 presented

white mycelia, with sporulation, yielding greyish green colonies on all media. Colonies were radially sulcate and velutinous, with clear exudate, and produced a yellow to orange reverse colour on CYA and YES. Conidiophores were terverticillate, stipes septate with rough walls, and ampulliform phialides. Conidia were smooth, spherical to subglobose, in columns, measuring 2.9–4.9 (3.6)  $\mu\text{m}$  ( $n = 30$ ) (Fig. 1b). BLAST analysis revealed that the sequences were 100% identical to *Penicillium crustosum* (GenBank accession number AY674353, sequence of the type material CBS115503), and the phylogenetic analyses confirmed these relationships (Fig. 2a).

On the other hand, *M. piriformis* was determined based on cultural characteristics according to Michailides & Spotts (1990). Colonies of the isolates ccCIEFAP484

and ccCIEFAP569 were dark grey, fast growing, and produced dark brown sporangia on small peg-like branches of the vegetative hyphae. Sporangioophores were tall and short, branched and unbranched, short sporangioophores branched sympodially. Sporangia were globose, black-brown at maturity, 85–212  $\mu\text{m}$  in diameter. Collumelae were variable in shape, cylindrical-ellipsoidal or pyriform, 34.7–61.8 (43.1)  $\times$  23.2–60.8 (51.7)  $\mu\text{m}$ . Sporangiospores were ellipsoidal, subspherical and smooth 3.9–10.7 (6.2)  $\times$  4.9–12.6  $\mu\text{m}$  ( $n = 30$ ) (Fig. 1d). Chlamydospore-like resting structures, isogametangia and zygospores were not evident in culture. BLAST analysis of the DNA sequences identified the 10 isolates as *M. piriformis sensu lato* (99% identical to the ITS-5.8S rDNA sequence of *M. piriformis* isolate

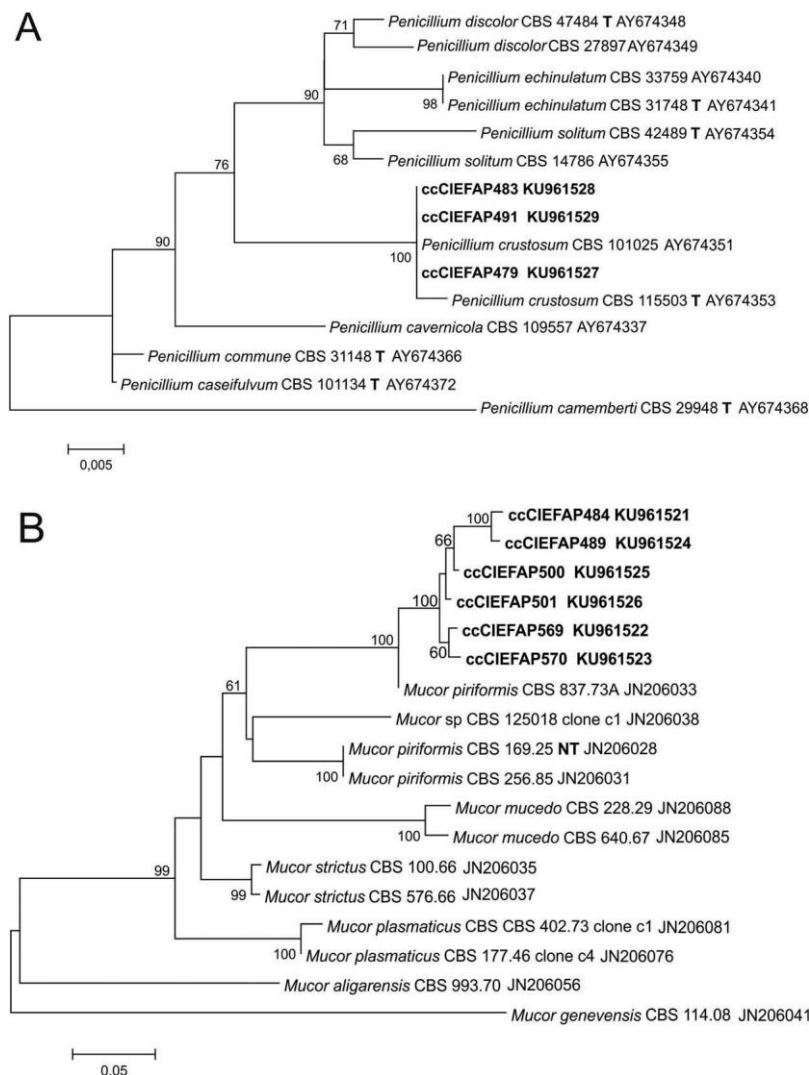


Fig. 2 Maximum likelihood trees from (a) *Penicillium crustosum* sequences and related species generated from  $\beta$ -tubulin gene data. (b) *Mucor piriformis* ITS sequences. Bootstrap values resulting from 1000 replicates are shown at the branch points.

CBS837.73A, GenBank accession number JN206033, from red currant). In the phylogenetic tree, the representative isolates were placed within a clade comprising the sequence of the neotype isolate of *M. piriformis* (GenBank accession number JN206028) (Fig. 2b).

#### Pathogenicity tests

Decay observed on inoculated fruits was similar to symptoms originally observed on 'Bing' cherries and 'Autumn Bliss' raspberries from storage and the pathogens were re-isolated from inoculated fruits. *Mucor piriformis* and *P. crustosum* isolates were able to cause symptoms on cherry under cold-storage and ambient conditions. The average severity rate ( $\pm$  SE) for *M. piriformis* on cherry fruits was  $20 \pm 0$  mm at both temperatures in both experiments. For *P. crustosum*, disease severity values were  $6.13 \pm 1.34$  and  $5.16 \pm 0.96$  mm at  $0^\circ\text{C}$ , and  $13.6 \pm 1.11$  and  $8.11 \pm 0.98$  mm at  $22^\circ\text{C}$  across both types of fruit, temperatures and experiments; the disease incidence was 100% for both pathogens. Symptoms of decay were observed in all inoculated fruits, but not in the controls. *Mucor piriformis* rot was light brown, watery, soft and covered with fuzzy mycelia. Coloured sporangio-phores bearing terminal sporangia protruded through the skin (Fig. 1c). Decayed areas produced by *P. crustosum* were light to medium brown, soft and watery, and with blue green sporulation on the surface of the lesion (Fig. 1a). Both fungi were re-isolated from infected tissues and showed the same morphological and molecular characteristics as the original isolates.

Both *Mucor* and *Penicillium* contain species considered as high risk for developing resistance to fungicides (FRAC 2010). Currently, there is no fungicide registered in Argentina to control post-harvest pathogens on cherries and raspberries. *Penicillium crustosum* causes blue mould on pome fruits and is also regularly found on cheese, nuts and in soil (Frisvad & Samson 2004; Pitt & Hocking 2009). The fungus produces a wide range of mycotoxins such as penitrem A, roquefortine C, terrestric acid and cyclophenol, which impact human health (Frisvad & Samson 2004). *Mucor piriformis* causes Mucor rot of pome and stone fruits during storage and has been reported in Australia, Canada, Germany, Northern Ireland, South Africa and the USA (Michailides & Spotts 1990; Sholberg & Michailides 1997). Cherries and raspberries are cold stored at  $0^\circ\text{C}$  to extend their shelf life in the markets. Our results show that both *M. piriformis* and *P. crustosum* isolates are pathogenic under ambient and cold-storage conditions. As a handling measure, the use of plastic bags and boxes help contain and prevent secondary spread. As far as we know, this is the

first report of rot caused by *P. crustosum* in cherries and raspberries in Argentina and worldwide. *Mucor piriformis* appears to be associated with Mucor rot of cherries in Chile and California, USA (Michailides & Spotts 1990). However, this is the first report for Argentina, and also for raspberries.

Isolates of *M. piriformis* and *P. crustosum* from organic and conventional cherries and raspberries proved to be pathogenic. Both production systems yielded the presence of pathogens, suggesting there is no effect of the type of production on the fungal diversity. Studies performed on vines under organic and conventional treatments have shown that fungal population was influenced by handling practices; on the contrary, for citrus in Portugal, different production systems had no influence on fungal communities (Nunes et al. 2010; Schmid et al. 2011).

#### Acknowledgements

This work was supported by the ANPCyT Grant PICT 2012-0733 and UNPSJB Grant FCN039/13. The authors are grateful to Humus, Valle del Medio, Gaiman cooperative and Hishashi fruit producer.

#### Funding

This work was supported by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [PICT 2012-0733]; Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco [FCN039/13];

#### References

- Baudino AM. 2013. International competitiveness of companies in the production sector and processing strawberries Coronda region during 2010-2012. Positioning through the formation of a cluster [dissertation]. Rosario (Argentina): Universidad Abierta Interamericana. Spanish.
- Børve J, Sekse L, Stensvand A. 2000. Cuticular fractures promote postharvest fruit rot in sweet cherries. *Plant Dis.* 84:1180-1184.
- Bruzzone A. 2009. Raspberries, blackberries and currants. *Aliment Argent.* 44:25-29. Spanish.
- Ceponis MJ. 1987. Disorders in sweet cherry and strawberry shipments to the New York market, 1972-1984. *Plant Dis.* 71:472-476.
- Crisosto CH, Garner D, Doyle J, Day KR. 1993. Relationship between fruit respiration, bruising susceptibility and temperature in sweet cherries. *Hort Sci.* 28:132-135.
- Dennis C, Mountford J. 1975. The fungal flora of soft fruits in relation to storage and spoilage. *Ann Appl Biol.* 79:141-147.
- [FRAC] Fungicide Resistance Action Committee. 2010. Pathogen risk list [Internet]. [revised 2015 Jun 2; cited 2015 Jun 17]. Available from: [www.frac.info](http://www.frac.info)
- Frisvad J, Samson R. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Mycol.* 49:1-52.

- Glass NL, Donaldson GC. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 61:1323–1330.
- Kim WK, Sang HK, Woo SK, Park MS, Paul NC, Yu SH. 2007. Six species of *Penicillium* associated with blue mold of grape. *Mycobiology.* 35:180–185.
- Kwasna H, Ward E, Bateman GL. 2006. Phylogenetic relationships among Zygomycetes from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. *Mycol Res.* 110:501–510.
- Michailides TJ, Spotts RA. 1990. Postharvest diseases of pome and stone fruits caused by *Mucor piriformis* in the Pacific Northwest and California. *Plant Dis.* 74:537–543.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE) New Orleans, USA. p. 1–8.
- Nunes C, Duarte A, Manso T, Weiland C, García JM, Cayuela JA, Salazar M. 2010. Relationship between postharvest diseases resistance and mineral composition of citrus fruit. In International symposium on mineral nutrition of fruit crops. VIth ed. Faro, Portugal. p. 417–422.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. New York: Springer.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 25:1253–1256.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, editors. 2004. *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Sanzani SM, Montemurro C, Di Rienzo V, Solfrizzo M, Ippolito A. 2013. Genetic structure and natural variation associated with host of origin in *Penicillium expansum* strains causing blue mould. *Int J Food Microbiol.* 165:111–120.
- Schmid F, Moser G, Müller H, Berg G. 2011. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl Environ Microb.* 77:2188–2191.
- Sholberg PL, Michailides TJ. 1997. First report of *Mucor* rot in commercially sold cherries caused by *Mucor piriformis*. *Plant Dis.* 81:550.
- Snowdon AL. 1990. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. In: Volume 1: General introduction and fruits. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Spotts RA, Cervantes LA, Facticeau TJ, Chand-Goyal T. 1998. Control of brown rot and blue mold of sweet cherry with preharvest iprodione, postharvest *Cryptococcus infirmo-miniatius*, and modified atmosphere packaging. *Plant Dis.* 82:1158–1160.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 30:1312–1313.
- Vaughn SF, Spencer GF, Shasha BS. 1993. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. *J Food Sci.* 58:793–796.
- Verma P, Sen N. 2008. The impact of plant growth regulators on growth and biochemical constituents of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *J Herbs Spices Med Plants.* 14:144–153.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. New York: Academic Press; p. 315–322.