

CAPÍTULO 2.

SELECCIÓN DE LEVADURAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN LA MORA

Jimmy Alexander Zapata Narváez, Marcia Catalina Acosta Peña y Maritza Alejandra Bermúdez Díaz

Resumen

A partir de una colección de 100 levaduras previamente aisladas de la filósfera de mora y caracterizadas fisiológicamente en estudios previos por su capacidad de crecimiento a temperaturas entre 5°C y 37°C, rangos de pH de 3 a 9, actividad de agua de 0,92 y 0,94, por su tolerancia a la luz ultravioleta (UVB - UVC), adherencia a la superficie foliar y actividad biocontroladora sobre *B. cinerea* en pétalos de rosa, se seleccionaron las levaduras *Pichia mychis* cepas Lv027, Lv297 y LvF20 y *Rhodotorula glutinis* cepas LvCo7, LvSi6 y LvSi29.

A estas levaduras se les evaluó su actividad biocontroladora contra *B. cinerea* en flores de mora, se inocularon a una concentración de 1×10^7 células. mL⁻¹, simultáneamente con el patógeno, 8 y 24 horas antes a la inoculación de éste a una concentración de 1×10^4 conidios. mL⁻¹. Cuando *B. cinerea* se inoculó simultáneamente con las levaduras, se observó una reducción de la incidencia del moho gris de entre el 10% y 28%, mientras que cuando éstas se inocularon 8 horas antes de la inoculación del patógeno, la reducción de la incidencia estuvo entre 37% y 56%. Con la levadura LvCo7 se observó la mayor protección con una incidencia de la enfermedad del 31%, seguida por las levaduras Lv297, LvF20 y LvSi6, con las que obtuvo una incidencia de entre 40% y 43%. Al inocularlas 24 horas antes que *B. cinerea*, las levaduras redujeron la incidencia de la enfermedad entre un 75% y 49%,

siendo nuevamente la levadura LvCo7 la que presentó mayor protección (incidencia de 18%), seguida por las levaduras Lv297, LvF20 y LvSi6 con incidencias del 33%, 35% y 36%, respectivamente.

Igualmente se determinó la compatibilidad entre las levaduras con siete fungicidas, mediante el cultivo en caldo de extracto de malta y levadura, suplementado con cada fungicida, observando que su crecimiento no se afectó en presencia de Benomil, Carbendazim, Difeconazol e Iprodión, en tanto que solo las levaduras LvCo7 y LvSi6 presentaron crecimiento en el medio con Procloraz. Por otra parte, Captan y Mancozeb inhibieron el crecimiento de las levaduras. De acuerdo con estos resultados se seleccionó la levadura *R. glutinis* cepa LvCo7 para desarrollar un prototipo de bioplaguicida para el control de *B. cinerea* en cultivos de mora.

Introducción

El control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de mora se efectúa mediante el uso de fungicidas como Captan, Benomil, Clorotalonil y Botrycidas de última generación como Procloraz, Cyprodinil y Fludioxonil. Sin embargo, debido a su modo de acción (inhibición de la síntesis de Ergosterol, inhibición del crecimiento micelial y de la germinación) han ocasionado el desarrollo de resistencia por parte del hongo, haciendo ineficaces las aplicaciones (Elad *et al.*, 1992; Stehmann y De Waard, 1996; Rosslenbroich y Stuebler, 2000).

Adicionalmente, son cada vez mayores las objeciones de orden sanitario que se plantean sobre el uso excesivo de estos productos, debido al riesgo que representan como potenciales agentes oncogénicos al ser aplicados continuamente al cultivo, más aún teniendo en cuenta que en algunos casos las aplicaciones se realizan incluso un día antes de la cosecha. La preocupación por sus posibles efectos nocivos adquiere especial importancia, dado que la fruta suele ser consumida en fresco y la proximidad temporal entre la aplicación de los fungicidas y su consumo es muy corta.

De acuerdo con lo anterior, es necesario desarrollar alternativas para el manejo integrado del moho gris, en este contexto el control biológico, utilizando microorganismos con características fisiológicas y metabólicas eficientes, alta actividad biocontroladora sobre *B. cinerea*, y que puedan combinarse con fungicidas de baja categoría toxicológica, surge como la opción más importante ya que puede implementarse desde el establecimiento del cultivo hasta la etapa de producción.

En este sentido, las levaduras se ubican como microorganismos ideales para el control biológico de patógenos, tanto en campo como en poscosecha, debido a que pueden establecerse en la superficie de los frutos y hortalizas, inhibiendo el desarrollo de microorganismos patógenos. Las levaduras son genéticamente estables, efectivas a bajas concentraciones, con requerimientos nutricionales comunes, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas, no producen metabolitos que puedan comprometer la salud humana, no son patógenos de vegetales, animales o del hombre y muchos no presentan inhibición en su crecimiento al ser expuestas a diferentes fungicidas (Andrews y Back, 2004). Esto permitiría combinar el uso de las levaduras con fungicidas de baja categoría toxicológica, dentro de esquemas de manejo integrado del moho gris, permitiendo una producción más limpia y más acorde con la tendencia actual del mercado, que exige una agricultura menos agresiva contra el medio ambiente e inocua para el agricultor y para el consumidor.

Dado que el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica cuenta con una colección de levaduras, las cuales presentan deseables características fisiológicas y alta actividad biocontroladora contra *B. cinerea*, el propósito de este trabajo fue el de seleccionar levaduras que además de presentar control del patógeno, sean efectivas en bajas concentraciones y compatibles con los fungicidas utilizados para el control de *B. cinerea*, con el fin de desarrollar un bioplaguicida que se pueda integrar en programas de manejo integrado.

Metodología

De acuerdo con las capacidad de crecer a diferentes temperaturas, rangos de pH, tolerancia a la luz ultravioleta (UV-B), alta adherencia a la superficie foliar y alta actividad biocontroladora sobre *B. cinerea* en pétalos de rosa variedad Vendela (Colciencias, 2008), para este trabajo se seleccionaron las levaduras *P. onychis* cepas Lv027, Lv297 y LvF20, aisladas en trabajos previos de la rizosfera de cebolla de bulbo (García, *et al.*, 2002), de flores de mora (Zapata, 2003), y las levaduras *R. glutinis* cepas LvCo7, LvSi6 y LvSi29, aisladas de hojas de mora (Uribe, 2008; García, 2008).

Determinación de la compatibilidad in vitro entre las levaduras antagonistas y fungicidas

Se determinó la compatibilidad de las levaduras seleccionadas con siete fungicidas (Tabla 1) utilizados con mayor frecuencia por los moricultores en

los municipios de Silvania (Cundinamarca) y La Ceja (Antioquia). Para esto se evaluó el crecimiento de las levaduras expuestas a tres diferentes dosis del fungicida (los cálculos para cada fungicida se realizaron de acuerdo con la dosis recomendada en la Tabla 1) Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de caldo de extracto de malta y levadura (YM), suplementado con cada fungicida y con la levadura a una concentración inicial de 1×10^6 células. mL^{-1} . Los cultivos se incubaron a 28°C durante 72 h con agitación constante (100 rpm). El crecimiento de las levaduras se midió mediante conteo de células en cámara de Neubauer cada 24 horas. Como tratamiento de control se utilizó el medio de crecimiento sin fungicida y se tuvieron tres réplicas por tratamiento, bajo un diseño completamente al azar con estructura factorial. Se hizo un análisis estadístico Anova a los datos de cada tiempo y se comparó el crecimiento obtenido en cada tratamiento contra el testigo por comparación de medias, usando el test Tukey con $\alpha: 0,05$.

Determinación del tiempo de aplicación y selección de levaduras

Para determinar el tiempo óptimo de aplicación de las levaduras para reducir la incidencia del moho gris, se probaron diferentes tiempos entre su aplicación y la inoculación de *B. cinerea*, así: inoculación simultánea e inoculación de la levadura 8 y 24 h antes de la inoculación del patógeno. Se utilizó como modelo *in planta* flores de mora obtenidas a partir de botones florales completamente cerrados, colectados en un cultivo comercial de Silvania.

Para la inoculación simultánea se preparó un inóculo mixto de cada levadura y el patógeno en agua destilada estéril en concentraciones de 1×10^7 células. mL^{-1} y de 1×10^4 conidios. mL^{-1} , respectivamente. Para los demás tiempos de inoculación se prepararon suspensiones individuales en las mismas concentraciones. La inoculación de las flores se realizó mediante la aspersión de 3,3 mL de cada inóculo por cada unidad experimental (para la aspersión se utilizó un atomizador). La unidad experimental consistió en una rejilla con 10 flores (en una cámara húmeda). Se llevó a incubación a 17°C y a oscuridad durante cinco días. La variable medida fue la incidencia de la enfermedad en las flores.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con estructura factorial y con tres réplicas; se incluyó un testigo patógeno y un testigo absoluto. El experimento se repitió tres veces en el tiempo. Se hizo Anova a los datos registrados y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($\alpha: 0,05$). Para los siguientes estudios se seleccionaron dos cepas de levadura con la eficacia más alta de control de la enfermedad.

Concentración mínima efectiva de los biocontroladores

Utilizando el mismo modelo de bioensayo, se evaluaron las levaduras *P. onychis* Lv297 y *R. glutinis* LvCo7. El inóculo de las levaduras consistió en suspensiones de células a concentraciones de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 células.mL⁻¹. Adicionalmente se evaluó un bioplaguicida a base del hongo *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003, cuyas suspensiones se ajustaron a concentraciones de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 conidios.mL⁻¹. El inóculo de *B. cinerea* se preparó como se describió en el bioensayo anterior y se inoculó 24 horas después de la aplicación de las levaduras. El volumen de aspersión fue el mismo utilizado en el bioensayo anterior.

El experimento tuvo un arreglo completamente al azar con estructura anidada, los factores fueron microorganismos biocontroladores (levadura y moho) y concentraciones (cinco para las levaduras y cuatro para el moho); se contó con tres repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en una rejilla con 10 flores en una cámara húmeda. Se incluyó un testigo patógeno y un testigo absoluto. Las cámaras se incubaron a 17°C, en oscuridad durante cinco días. La variable evaluada fue la incidencia de la enfermedad. Se realizaron tres repeticiones en el tiempo y los datos se analizaron mediante Anova y la comparación de medias usando la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

Combinación de antagonistas con fungicidas para el control de *B. cinerea*

Este experimento tuvo como fin determinar el efecto de la aplicación combinada de fungicidas con antagonistas sobre la incidencia de la enfermedad moho gris. De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de susceptibilidad de *B. cinerea* a fungicidas y de compatibilidad de las levaduras con los fungicidas, se seleccionaron los fungicidas Difenoconazol y Procloraz por inhibir la germinación de los conidios y el crecimiento de *B. cinerea* *in vitro* y por presentar compatibilidad con las levaduras *P. onychis* Lv297 y *R. glutinis* LvCo7.

El modelo de bioensayo utilizado fue el mismo descrito anteriormente, sin embargo, en este caso las células o conidios se suspendieron en las soluciones de los fungicidas utilizados en la dosis recomendada en la etiqueta de los productos comerciales (Tabla 1). Las suspensiones de los microorganismos se ajustaron en concentración de 1×10^7 células o conidios.mL⁻¹ y la inoculación del patógeno se realizó 24 horas después a la inoculación de los biocontroladores.

Se utilizó un diseño experimental completamente a azar con estructura factorial que contó con tres réplicas. La unidad experimental consistió en una rejilla con 10 flores en una cámara húmeda. Se incluyó un testigo patógeno y un testigo absoluto. Las condiciones de incubación y la variable de respuesta fueron las mismas descritas antes. Estos bioensayos se realizaron tres veces en el tiempo y los resultados se analizaron mediante Anova y la comparación de medias, usando la prueba de Tukey (α : 0,05).

*Combinación de biocontroladores para aumentar la eficacia de control biológico sobre *B. cinerea**

Con el mismo modelo de bioensayos, las levaduras Lv297 y LvCo7 y el bioplaguicida a base de Th003 fueron evaluados en concentración de 1×10^6 y 1×10^7 células o conidios.mL⁻¹, bajo las combinaciones descritas en la Tabla 3 El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones.

Tabla 3. Combinaciones de biocontroladores utilizadas para evaluar su eficacia sobre *B. cinerea* en flores de mora

Tratamiento	Combinación
A	Lv297 + LvCo7 a 1×10^7 células.mL ⁻¹
B	Lv297 + LvCo7 a 1×10^6 células.mL ⁻¹
C	Lv297 a 1×10^7 células.mL ⁻¹ + LvCo7 a 1×10^6 células.mL ⁻¹
D	Lv297 a 1×10^6 células.mL ⁻¹ + LvCo7 a 1×10^7 células.mL ⁻¹
E	Th003 a 1×10^7 conidios.mL ⁻¹ + Lv297 a 1×10^7 células.mL ⁻¹
F	Th003 a 1×10^6 conidios.mL ⁻¹ + Lv297 a 1×10^6 células.mL ⁻¹
G	Th003 a 1×10^7 conidios.mL ⁻¹ + Lv297 a 1×10^6 células.mL ⁻¹
H	Th003 a 1×10^6 conidios.mL ⁻¹ + Lv297 a 1×10^7 células.mL ⁻¹
I	Th003 a 1×10^7 conidios.mL ⁻¹ + LvCo7 a 1×10^7 células.mL ⁻¹
J	Th003 a 1×10^6 conidios.mL ⁻¹ + LvCo7 a 1×10^6 células.mL ⁻¹
K	Th003 a 1×10^7 conidios.mL ⁻¹ + LvCo7 a 1×10^6 células.mL ⁻¹
L	Th003 a 1×10^6 conidios.mL ⁻¹ + LvCo7 a 1×10^7 células.mL ⁻¹

Resultados

Determinación de la compatibilidad in vitro entre las levaduras antagonistas y fungicidas

Se presentó una tendencia clara en el crecimiento de las levaduras frente a los grupos químicos, ya que en los medios de cultivo suplementados con los fungicidas Benomil, Carbendazim e Iprodión en las tres dosis evaluadas, las

levaduras presentaron alto crecimiento después de 72 horas de incubación y no fue significativamente diferente del control (Figura 9).

Las cepas de *P. onychis* presentaron un crecimiento entre 2×10^8 células.mL⁻¹ y 1×10^9 células.mL⁻¹ en los medios con estos fungicidas, siendo mayor la concentración de levadura crecida en el medio de cultivo suplementado con un cuarto de la dosis, mientras que para el control el crecimiento fue de 2×10^9 células.mL⁻¹.

Por otra parte, las cepas de *R. glutinis* expuestas a Benomil, Carbendazim e Iprodión presentaron un crecimiento entre 2×10^8 células.mL⁻¹ y 6×10^8 células.mL⁻¹, mientras que para el control fue de 1×10^9 células.mL⁻¹, siendo estas levaduras las que presentaron la menor inhibición del crecimiento al ser expuestas a estos fungicidas (Figuras 9).

Respecto a estos tres fungicidas, de acuerdo con estudios realizados sobre su efecto en el crecimiento y proceso de fermentación durante la elaboración de vino, se reportó que ninguno presentó un efecto negativo significativo sobre el crecimiento de las levaduras y el desarrollo de los procesos de la fermentación (Becerra *et al.*, 1995), en el presente trabajo también se observó que el crecimiento de las levaduras no fue altamente inhibido por estos fungicidas (en el peor de los casos se observó la pérdida de un exponente), lo que sugiere que podrían ser utilizados en esquemas de aplicación para el control de *B. cinerea* en mora.

Por otro lado, en el medio suplementado con Difenoconazole en la dosis completa, únicamente las levaduras Lv297, LvF20 LvCo7 y LvSi6 presentaron un crecimiento que osciló entre 2×10^8 células.mL⁻¹ y 3×10^7 células.mL⁻¹ al final de las 72 horas de incubación (Figuras 1 y 2), en tanto que en el medio con Procloraz, en la dosis completa, solamente las levaduras LvCo7 y LvSi6 presentaron crecimiento (2×10^8 células.mL⁻¹ y 3×10^7 células.mL⁻¹, respectivamente), mientras que a un cuarto de las dosis la levadura LvSi29 presentó un crecimiento de 2×10^8 células.mL⁻¹ (Figura 9).

Respecto a este fungicida, Fokkema (1988) encontró que este inhibidor de la síntesis de Ergosterol presenta un moderado o nulo efecto sobre el crecimiento de las levaduras de la filósfera, principalmente de especies pertenecientes a los géneros *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* y *Rhodotorula*.

En los medios con Captan y Mancozeb, en las dosis completa y media, el crecimiento de las levaduras fue inhibido; sin embargo, en el medio suplementado con Mancozeb, en un cuarto de la dosis, las levaduras Lv027, Lv297, LvF20 y LvCo7 presentaron crecimiento entre 9×10^6 y 1×10^8 células.mL⁻¹ (Figura 9).

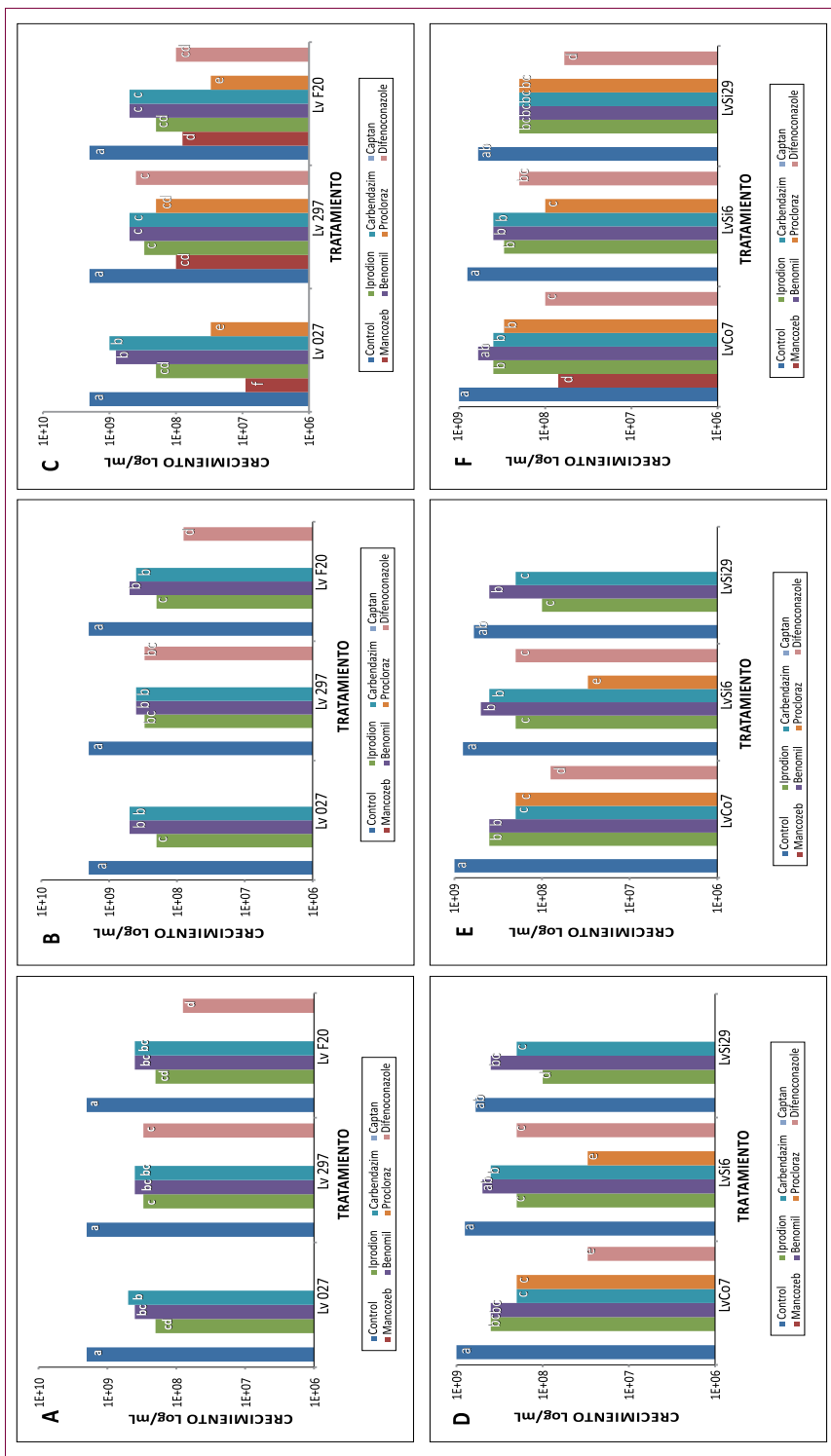


Figura 9. Efecto de siete fungicidas usados para el control de *B. cinerea* en el cultivo de mora en tres dosis sobre el crecimiento de tres cepas de *P. onychis* (A, B y C) y tres de *R. glutinis* (D, E y F), después de 72 horas de incubación. Dosis de fungicida completa (A y D), media (B y E) y un cuarto (C y F). Las columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey α : 0,05.

Determinación del tiempo de aplicación y selección de levaduras

Al ser inoculadas simultáneamente con el patógeno, todas las levaduras presentaron algún grado de control, ya que redujeron la incidencia del moho gris entre 10% y 28%, siendo las levaduras Lv027 y LvSi6 las que presentaron los valores más bajos de incidencia de la enfermedad con 64%, los cuales fueron significativamente diferentes a los presentados con las demás levaduras (Figura 10). Sin embargo, aunque no se presentó una reducción considerable de la incidencia con las levaduras, con respecto al testigo patógeno, es necesario tener en cuenta que éstas se inocularon simultáneamente con el patógeno, sin permitir su establecimiento en los tejidos florales, los cuales son altamente susceptibles a la infección de *B. cinerea*.

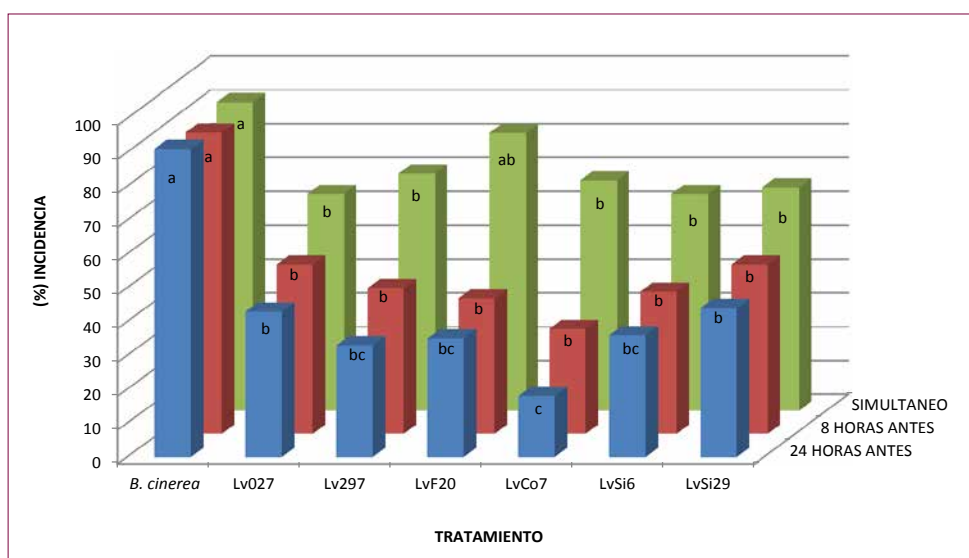


Figura 10. Incidencia del moho gris en flores de mora después de cinco días de inoculación, evaluando tres tiempos de aplicación de las levaduras respecto a la inoculación de *B. cinerea*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con $\alpha: 0,05$.

Por otra parte, cuando las levaduras fueron inoculadas ocho horas antes que el patógeno, redujeron la incidencia del moho gris entre 37% y 56%, sin presentar diferencias significativas entre sí. La levadura LvCo7, la que mayor protección presentó con una incidencia de moho gris de 18%, seguida por las levaduras Lv297, LvF20 y LvSi6, con las que la incidencia estuvo entre 40% y 43% (Figura 10).

Al ser inoculadas 24 horas antes que el patógeno, las levaduras redujeron la incidencia del moho gris entre 75% y 49%, siendo la levadura LvCo7, con

la que se obtuvo una incidencia de 18%, la que mayor protección presentó, seguida por las levaduras Lv297, LvF20 y LvSi6, con las que la incidencia fue de 33%, 35% y 36%, respectivamente (Figura 10).

La reducción de la incidencia del moho gris fue mayor cuando las levaduras se inocularon 8 y 24 horas antes a la inoculación de *B. cinerea* (siendo en este último tiempo en el que menor incidencia se presentó), respecto al control registrado por las levaduras que fueron inoculadas simultáneamente con el patógeno. Por otro lado, en las flores inoculadas con las levaduras (sin importar el tiempo de aplicación), que presentaron desarrollo de *B. cinerea*, se observó una menor cantidad de conidióforos y poca esporulación sobre el receptáculo floral y los estambres, comparado con el testigo patógeno (Figura 11).

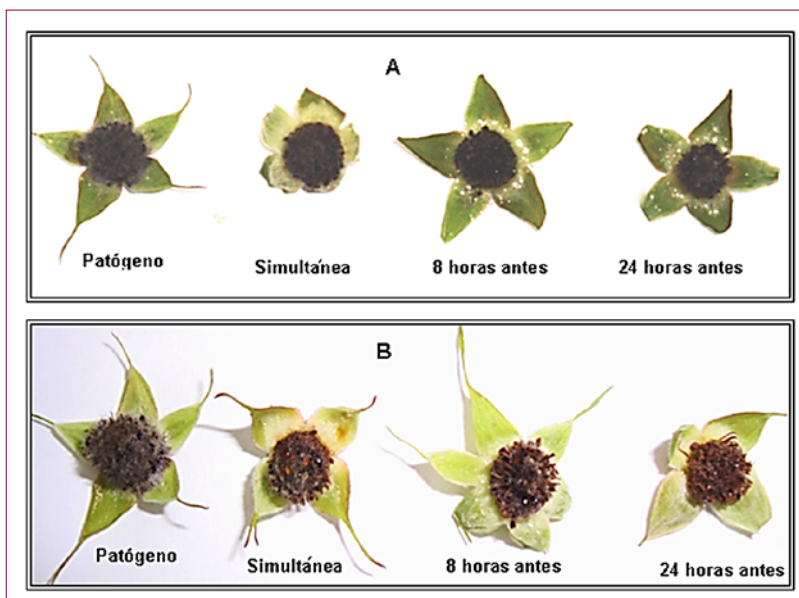


Figura 11. Control de *B. cinerea* con las levaduras en los tres periodos de tiempo evaluados. A. Flores inoculadas con la levadura LvCo7. B. Flores inoculadas con la levadura Lv297.

De acuerdo con los resultados obtenidos y teniendo en cuenta los mecanismos de acción por los cuales las levaduras inhiben el desarrollo de los hongos fitopatógenos, se puede sugerir un fenómeno de competencia por espacio y por nutrientes como azúcares simples, aminoácidos, ácidos orgánicos, elementos trazas y vitaminas presentes en la superficie de las estructuras florales (Mercier y Lindow, 2000). Este mecanismo de control se ha atribuido con frecuencia a las levaduras, debido a su capacidad de desarrollarse y multiplicarse rápidamente, consumiendo los nutrientes que se encuentren en la superficie de los tejidos (Elad, 1996).

De esta forma se puede suponer que las levaduras se establecieron sobre el receptáculo floral y los estambres, ocupando los lugares donde posiblemente se establecerían los conidios del patógeno, además de consumir los nutrientes que éstos requieren para su germinación.

Patógenos necrótrofos como *B. cinerea*, *Septoria* sp. y *Alternaria* sp., entre otros, tienden a crecer saprofiticamente en el filoplano donde utilizan nutrientes exógenos, presentado una fase epifítica de crecimiento antes de que puedan penetrar en el tejido vegetal; la reducción de las concentraciones de nutrientes en la fase epifítica generalmente provoca una disminución de la germinación de los conidios y del desarrollo del tubo germinal de los patógenos; todo esto reduce los sitios de infección, haciendo de esta fase el momento óptimo para controlar al patógeno (Elad, 1996).

Estos resultados demuestran que cuando las levaduras se aplican de manera preventiva a la llegada del inóculo de *B. cinerea* sobre las flores o frutos, ejercen mayor control sobre el patógeno, a diferencia que cuando éste se encuentra ya establecido en estos órganos.

Resultados similares se han descrito cuando el biocontrolador es inoculado antes que el patógeno. Salijkarias y colaboradores (2002) reportaron la reducción de la enfermedad del moho gris en tallos de tomate mediante aplicaciones de la levadura *C. guilliermondii* cepa 101, obteniendo la reducción de la enfermedad en 61% cuando ésta se inoculó simultáneamente con el patógeno, y una reducción del 83% cuando ésta fue inoculada 24 h antes de la inoculación de *B. cinerea*.

Concentración mínima efectiva de los biocontroladores

Todas las concentraciones del bioplaguicida redujeron la incidencia de *B. cinerea* (a excepción de 1×10^4 conidios.mL⁻¹, la cual presentó una incidencia del moho gris similar a la que se presentó en el testigo patógeno), sin embargo, con las concentraciones de 1×10^6 y 1×10^7 conidios.mL⁻¹ se obtuvo la mayor reducción en la incidencia del moho gris, con un control de 70% y 82%, respectivamente (Figura 12).

T. koningiopsis presentó un crecimiento sobre las estructuras florales inoculadas (Figura 13), no obstante, es necesario tener en cuenta que *Trichoderma* spp. es un género de hongo saprofito que coloniza el material vegetal senescente, estado en el que se encontraban las flores de mora después de cinco días de incubación; sin embargo, al aplicar el hongo sobre flores de plantas en campo, no se presenta crecimiento ni colonización de

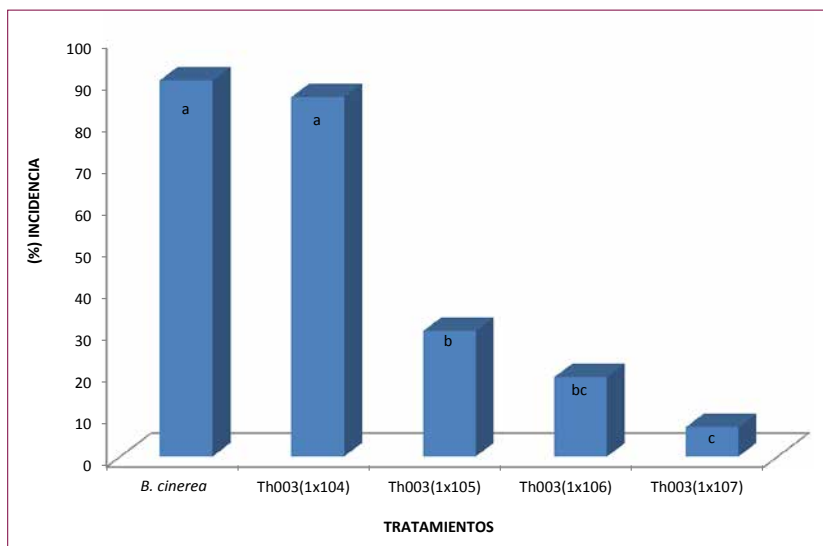


Figura 12. Concentración mínima efectiva del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003 sobre el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con α : 0,05.

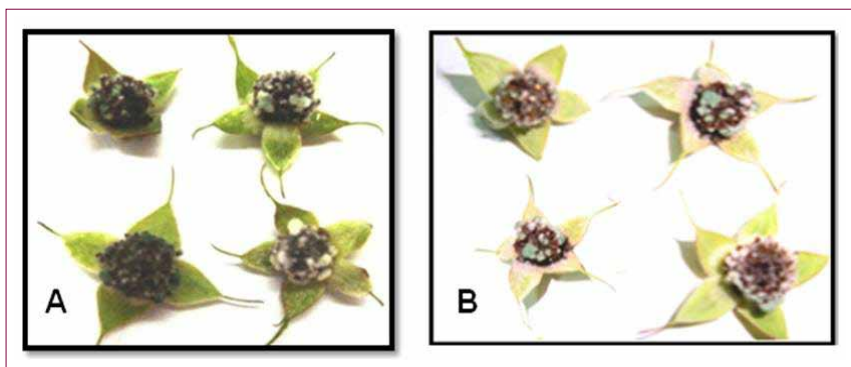


Figura 13. Flores de mora tratadas con el bioplaguicida a una concentración de (A) 1×10^6 conidios.mL⁻¹ y (B) 1×10^7 conidios.mL⁻¹, después de cinco días de incubación.

las mismas, debido a que fisiológicamente se encuentran en proceso de producción del fruto. La aplicación del bioplaguicida sobre las estructuras florales las protegería de la infección de *B. cinerea* y del posterior desarrollo del moho gris, tanto en campo como en poscosecha.

El uso de *Trichoderma* spp. para reducir la infección y los daños producidos por *B. cinerea* en diferentes sistemas productivos ha sido ampliamente estudiado y documentado. Elad y colaboradores (1993)

al aplicar *T. harzianum*, cepa T39, obtuvieron un control de *B. cinerea* del 90% al ser aplicado en pepino; del mismo modo, Tatagiba y colaboradores (1998) realizaron evaluaciones para controlar el moho gris en botones florales de rosa, encontrando que *T. hamatum* y *G. roseum* aplicados a una concentración de 1×10^7 conidios.mL⁻¹ redujeron entre un 46 y 65% el número de las lesiones. Por otro lado, con aplicaciones de *T. koningiopsis* se redujo en un 85% la incidencia de *B. cinerea* en flores abiertas y senescentes de begonia, en 90% en pétalos de ciclamen y entre un 93% a 95% en flores de geranio (Sirjusingh *et al.*, 1996, citado por Sutton *et al.*, 1997).

Al evaluar las diferentes concentraciones de las levaduras, en todas se presentó reducción de la incidencia del moho gris, sin embargo, se presentaron diferencias significativas en los tratamientos correspondientes a la levadura Lv297 aplicada a una concentración de 1×10^8 células.mL⁻¹, con una reducción de la incidencia del 62% y a la levadura LvCo7 aplicada a concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 células.mL⁻¹, con una reducción de la incidencia del patógeno del 67% (Figura 14).

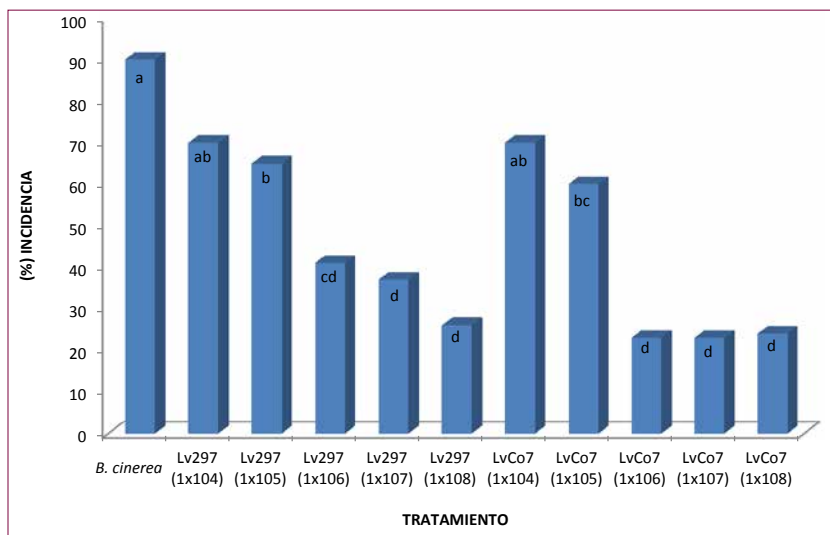


Figura 14. Concentración mínima efectiva de las levaduras en el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con α : 0,05.

Resultados similares fueron descritos por Salijkarias y colaboradores (2002) para las levaduras *C. guilliermondii* cepas 101 y US 7, inoculadas en concentraciones de $2,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^6$ y $2,5 \times 10^7$ células.cm² en secciones de tallos de tomate (*B. cinerea* se inoculó a una concentración de 1×10^4 conidios.mL⁻¹), encontrando una reducción de la incidencia de entre

el 60% y el 58%. De igual forma, en investigaciones realizadas por Elad y colaboradores (1994) con la levadura *R. glutinis* cepa F147, aplicada en concentraciones de 1×10^6 y 1×10^7 células.mL⁻¹, inhibió la germinación de los conidios de *B. cinerea* y redujo la incidencia del moho gris en hojas de frijón y tomate en 92% y 95%, respectivamente.

Los resultados descritos en este trabajo demostraron que la levadura LvCo7, a una concentración de 1×10^6 y 1×10^7 células.mL⁻¹, fue eficiente en el control de *B. cinerea* y que cualquiera de estas dos concentraciones puede ser usada para reducir la incidencia del moho gris en las flores de mora. Por otro lado, a una concentración de 1×10^4 no se presentaron diferencias significativas con respecto al testigo patógeno y la concentración de 1×10^5 células.mL⁻¹, aunque presentaron reducción de la enfermedad, en comparación con el testigo patógeno ésta no superó el 40%.

Combinación de antagonistas con fungicidas para el control de B. cinerea

Todas las combinaciones evaluadas mostraron alta inhibición de *B. cinerea*, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos, observándose una reducción de la incidencia de entre 76% y 86%. Sin embargo, la menor incidencia se presentó en los tratamientos con Plocloraz, Difenoconazol, combinación entre la levadura Lv297 y Difenoconazol y combinación entre la levadura LvCo7 y Difenoconazol (8%, 4%, 8% y 8%, respectivamente). Por otro lado, la mayor incidencia se obtuvo al combinar el bioplaguicida a base del hongo con los fungicidas (Figura 15).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se sugiere que la combinación de los biocontroladores con los fungicidas no presenta ningún efecto sinérgico al comparar los resultados obtenidos de las combinaciones, con los obtenidos al aplicar el fungicida solo, el cual presenta un control eficiente del moho gris (Figuras 15 y 16).

Se ha estudiado el posible efecto sinérgico que microorganismos como las levaduras pueden presentar al combinarse con algunos fungicidas en bajas dosis durante la poscosecha de frutas y hortalizas, por ejemplo, la combinación en bajas dosis del fungicida Tiabendazol (200 ppm) con *P. guilliermondii* cepa US-7 redujo la pudrición de frutas cítricas causada por *Penicillium digitatum* (Droby *et al.*, 1993). Buck y Jeffers, en 2004, reportaron la reducción del diámetro de lesión de 0 a 2,6 mm, producida por 10 aislamientos de *B. cinerea* resistentes y sensibles a los dicarboximidas, por la aplicación de *R. glutinis* PM4 en combinación con una baja dosis de Vinclozolin (50 µg a.i.

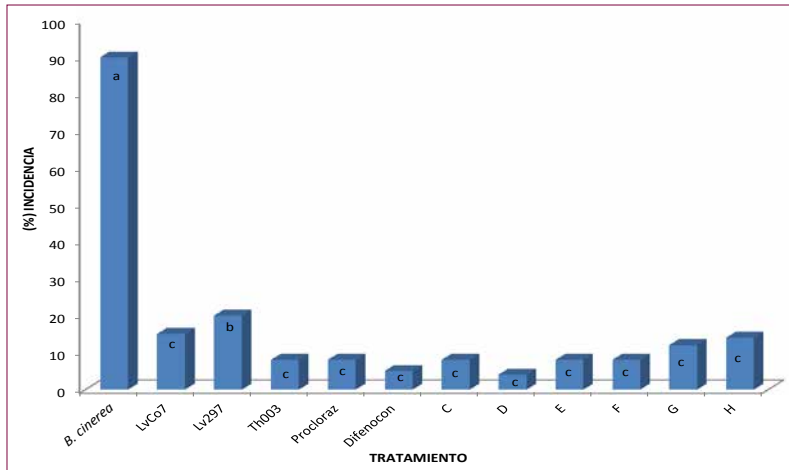


Figura 15. Efecto de la combinación de los antagonistas con dos fungicidas sobre el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. C. (Lv297 + Plocloraz) D. (Lv297 + Difenconazol) E. (LvCo7 + Plocloraz) F. (LvCo7 + Difenconazol) G. (Th003 + Plocloraz) H. (Th003 + Difenconazol). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con α : 0,05.

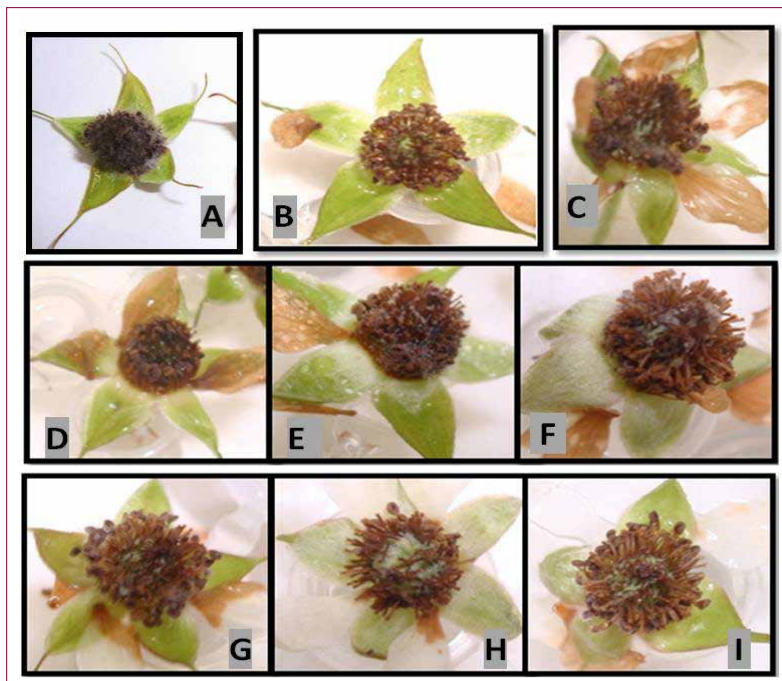


Figura 16. Efecto de la combinación entre los antagonistas y dos fungicidas en el control de *B. cinerea* en flores de mora después de 5 días de incubación. A. Testigo patógeno. B. Procloraz. C. Difenconazol. D. Lv297 + Procloraz. E. LvCo7 + Procloraz. F. LvCo7 + Procloraz. G. Th003 + Procloraz. H. Lv297+Difenconazol. I. LvCo7+Difenconazol.

mL⁻¹) en plántulas de geranio. Similarmente, tratamientos con la levadura en combinación con Azoxystrobin o Trifloxystrobin en una décima parte de la dosis (7.5µg a.i. mL⁻¹) o toda la dosis (75µg a.i. mL⁻¹), redujo el desarrollo de la lesión en 2 mm, comparado con tratamientos con la levadura (3-6 mm) o con el fungicida solo (6-8 mm) (Buck y Jeffers, 2004).

Es importante tener en cuenta que en determinadas circunstancias, las condiciones de poscosecha pueden ser controladas, ya sea mediante el uso de atmósferas controladas y/o bajas temperaturas que retrasan el crecimiento de los fitopatógenos, lo que hace eficiente el uso de fungicidas en dosis inferiores a las recomendadas y su combinación con microorganismos antagonistas, aunque en condiciones de campo el ambiente limita o inhibe el crecimiento, tanto de los microorganismos antagonistas como de los fitopatógenos; a pesar de esto, los patógenos están más adaptados a las condiciones adversas que se puedan presentar, ya que muchos de ellos presentan estados de latencia o forman estructuras de resistencia como los esclerocios, que les permiten soportar condiciones adversas y desarrollarse una vez las condiciones sean adecuadas.

Bajo estas condiciones, el uso de fungicidas en una dosis menor a la recomendada o subdosis, puede producir la aparición de cepas o razas de hongos resistentes a los fungicidas, por la aparición de mutaciones que alteran el sitio de acción de determinado fungicida y de aquellos que actúan en forma similar (Stehmann y Waard, 1996).

Teniendo esto en cuenta, Shtienberg y Elad (1997) desarrollaron una estrategia de manejo integrado de *B. cinerea* denominado sistema Botman (BOTrytis MANager), en el que se integra el control químico y el biológico en cultivos de tomate y pepino. Según este sistema, la decisión de tratar con medidas biológicas o químicas se toma semanalmente, de acuerdo con las predicciones meteorológicas, a partir de que se evidencia la infección. Si el tiempo es muy favorable para el desarrollo de *B. cinerea* (altas humedad relativa y temperatura), se aplica un fungicida; en caso de que las condiciones ambientales sean poco favorables para el desarrollo de *B. cinerea*, se recomienda aplicar un producto biológico (en este caso el bioplaguicida desarrollado por los autores, a base de *T. harzianum* cepa T39).

Por consiguiente, considerando las condiciones en las cuales es cultivada la mora, se propone usar el control biológico con la aplicación de los antagonistas, cuando la incidencia del moho gris sea baja, y en épocas de lluvias y alta humedad relativa se reforzaría el control biológico con la aplicación de fungicidas efectivos y de baja categoría toxicológica, en este caso productos con principio activo como Difenoconazol y Procloraz.

Combinación de biocontroladores para aumentar la eficacia de control biológico sobre *B. cinerea*

Al combinar los biocontroladores, las combinaciones correspondientes a los tratamientos H, I y K (Tabla 2), en las que se combinó el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003 con *R. glutinis* LvCo7, presentaron diferencias significativas (reducción de la incidencia entre 65% y 73%) con varias de las demás combinaciones evaluadas, pero no revelaron diferencias significativas con respecto a cuando se evaluaron individualmente (Figura 17). Por otra parte, las combinaciones correspondientes a la mezcla de las levaduras presentaron un control menor al observado, cuando fueron aplicadas de forma individual, fenómeno que puede estar relacionado con la competencia entre ellas, impidiendo el efectivo control del patógeno.

Williamson y Fokkema, en 1985, evaluaron la inoculación mixta de las levaduras *Sporobolomyces roseus* y *C. laurentii*, encontrando un control de *Colletotrichum graminiicola* de 50% en hojas de maíz, mientras que al ser evaluadas separadamente presentaron un control del 70% y 85%, respectivamente, sugiriendo que al combinar dos microorganismos con similares características y mecanismos de acción se inhiben entre sí limitando el control.

Al combinar y aplicar la levadura *P. guilliermondii* y la bacteria *Bacillus mycoides* a una concentración de 1×10^7 UFC.mL⁻¹, se obtuvo un control de *B. cinerea* de 91% en hojas de fresa (Guetsky *et al.*, 2002). Esta eficacia se debe

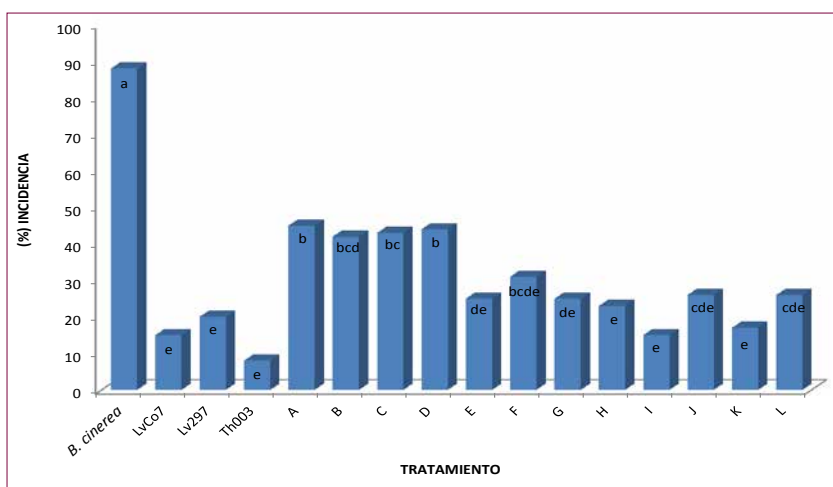


Figura 17. Efecto de la combinación de biocontroladores en el control de *B. cinerea* en flores de mora. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con α : 0,05.

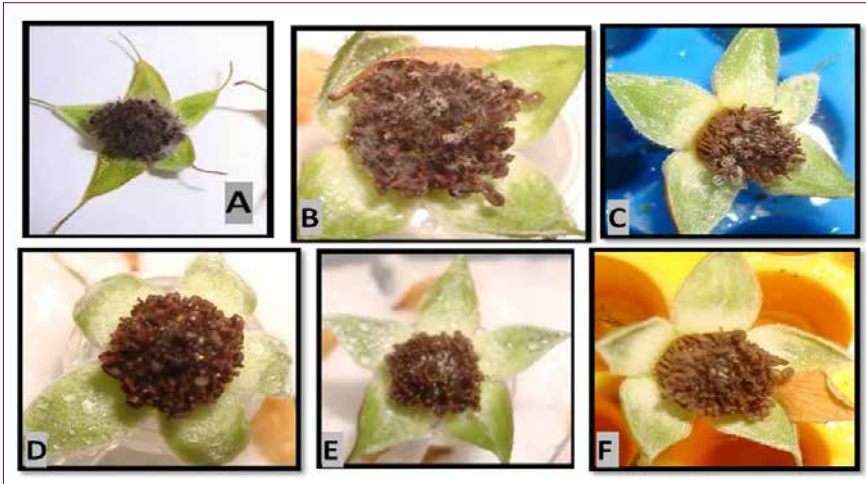


Figura 18. Efecto de la combinación de los biocontroladores en el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. A. Testigo patógeno. B. Combinación de las levaduras a 1×10^6 células.mL⁻¹. C. Combinación de las levaduras Lv297 (1×10^7 células.mL⁻¹) y LvCo7 (1×10^6 células.mL⁻¹). D. Combinación del bioplaguicida (1×10^6 conidios.mL⁻¹) y *P. onychis* Lv297 (1×10^7 células.mL⁻¹). E. Combinación del bioplaguicida (1×10^7 conidios.mL⁻¹) y *R. glutinis* LvCo7 (1×10^7 células.mL⁻¹). F. Combinación del bioplaguicida (1×10^7 conidios.mL⁻¹) y *R. glutinis* LvCo7 (1×10^6 células.mL⁻¹).

posiblemente a la presencia de diferentes mecanismos de acción utilizados por estos microorganismos; es decir, que mientras las levaduras inhiben al patógeno por competencia por nutrientes y espacio, las bacterias producen antibióticos o sustancias que ocasionan rompimiento y destrucción de los conidios y micelio del patógeno; posiblemente en la combinación de *T. koningiopsis* con las levaduras ocurrió algo similar, donde el hongo podría parasitar el micelio de *B. cinerea*, en tanto que la levadura lo inhibiría por competencia.

Conclusiones

Las levaduras redujeron la incidencia del moho gris en las flores de mora, al ser aplicadas previa y simultáneamente con el patógeno, sin embargo, el mayor control se observó cuando las levaduras *P. onychis* cepa Lv297 y *R. glutinis* cepa LvCo7 fueron inoculadas 24 horas antes que el patógeno.

Teniendo en cuenta la posible disminución de la población de los biocontroladores al ser expuestos a las diferentes condiciones agroecológicas en campo (temperatura, humedad relativa, radiación ultravioleta), la concentración elegida para realizar la evaluación de la eficacia en el control

de *B. cinerea* en campo para el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003, como para las levaduras, fue de 1×10^7 conidios o células.mL⁻¹.

Por su compatibilidad con la levadura *R. glutinis* cepa LvCo7 se seleccionaron los fungicidas Difenoconazol y Procloraz para realizar bioensayos en cultivos comerciales, tendientes a desarrollar una estrategia de manejo integrado de *B. cinerea*.

Referencias bibliográficas

- Andrews, J. & Back, J. (2004). Adhesion of Yeast to Leaf Surfaces. Chapter 4 in *Phyllosphere Microbiology*. Edited: Lindow, S.E.; Hecht-Poinar, E.I. & Elliott, V.J. Saint Paul, MN, USA: APS press.
- Becerra, V.; Catania, C.; Navarro, R.; del Monte, M. E.; Manzano, H. & Gargantini, R. (1995). Uso de pesticidas en el cultivo de la vid y su influencia en la vinificación. Curvas de degradación de procimidone, vinclozolin e iprodione. Vinífera. En: *Revista del Instituto Nacional de Vitinicultura*. Año 1. Nº 2. P. 86-96.
- Buck, J. & Jeffers, S. (2004). Effect of Pathogen Aggressiveness and Vinclozolin on Efficacy of *Rhodotorula glutinis* PM4 Against *Botrytis cinerea* on Geranium Leaf Disks and Seedlings. The American Phytopathological Society. En: *Plant Disease*, 88(11). P. 1262-1268.
- Colciencias. (2008). Informe técnico final. Proyecto: *Estudio de la diversidad funcional de levaduras habitantes de las superficies foliares en mora y su relación con el control biológico de Botrytis cinerea*. Contrato número 204-2005.
- Droby, S.; Hofstein, R.; Wilson, C.; Wisniewski, M.; Fridlender, B.; Cohen, L.; Weiss, B.; Daus, A.; Timar, D. & Chalutz, E. (1993). Pilot Testing of *Pichia guilliermondii*: A Biocontrol Agent of Postharvest Diseases of Citrus Fruit. En: *Biological Control*, 3, p. 47-52.
- Elad, Y.; Yunis, H. & Katan, T. (1992). Multiple Fungicide Resistance to Benzimidazoles, Dicarboximides and Diethofencarb in Field Isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. En: *Plant Pathology* 41: 41-46.
- Elad, Y.; Zimand, G.; Zags, Y.; Yuriel, S. & Chet, I. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in Combination or Alternation with Fungicides to Control Cucumber Grey Mould (*Botrytis cinerea*) Under Commercial Greenhouse Conditions. En: *Plant Pathology*, 43, 324-332.
- Elad, Y.; Kohl, J. & Fokkema, N. (1994). Control of Infection and Sporulation of *Botrytis cinerea* on Bean and Tomato by Saprophytic Yeasts. En: *Phytopathology*, 84, p. 1193-1200.
- Elad, Y. (1996). Mechanism Involved in the Biological Control of *Botrytis cinerea* Incited Diseases. En: *European Journal of Plant Pathology* 102: 719-732.
- Fokkema, N.J. (1988). Agrochemicals and the Beneficial Role of Phyllospere Yeasts in Disease Control. En: *Ecol. Bull.* 39, p. 91-93.
- García, P.G.; Jiménez, Y.; Neisa, A. & Cotes, A.M. (2002). Selection of Native Yeasts for Biological Control of Postharvest Rots Caused by *Botrytis allii* in Onion and *Rhizopus stolonifer* in Tomato. En: *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC wprs Bulletin*. 24: 181-184.
- García, M. (2008). *Selección de levaduras nativas con potencial biocontrolador de Botrytis cinerea*. Tesis de Maestría en Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y.; Fischer, E. & Dinooor, A. (2002). Improving Biological

- Control by Combining Biocontrol Agents Each with Several Mechanisms of Disease Suppression. En: *Phytopathology*, 92, p. 976-985.
- Mercier, J. & Lindow, E. (2000). Role of Leaf Surface Sugar in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. En: *Applied and Environmental Microbiology* 66: 369-374.
- Rosslensbroich, H. & Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea* –History of Chemical Control and Novel Fungicides for its Management. En: *Crop Protection*. 19, p. 557-561.
- Salijkarias, I.; Gravanis, F. & Epton H. (2002). Biological Control of *Botrytis cinerea* on Tomato Plants by the Use of Epiphytic Yeast *Candida guilliermondii* Strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* Strain I-182 in Vivo Studies. En: *Biological Control*, 25, p. 143-150.
- Shtienberg, D. & Elad, Y. (1997). Incorporation of Weather Forecasting in Integrated, Biological-Chemical Management of *Botrytis cinerea*. En: *Phytopathology* 87: 332-340.
- Stehman, C. & De Waard, M. (1996). Sensitivity of Population of *Botrytis cinerea* to Triazoles, Benomyl and Vinclozolin. En: *European Journal of Plant Pathology* 102: 171-180.
- Sutton, J.; De-Wei, L.; Peng, G.; Zhang, P. & Yu, H. (1997). *Gliocladium roseum*: A Cosmopolitan Antagonist of *Botrytis cinerea* and Other Pathogens in Crops. En: *Plant disease*, 81(4), p. 316-328.
- Tatagiba, J.; Maffia, L.; Barreto, R.; Alfenas, A. & Sutton, J. (1998). Biological Control of *Botrytis cinerea* in Residues and Flowers of Rose (*Rosa hybrida*). En: *Phytoparasitica* 26 (1): 319-330.
- Uribe, L. (2007). *Caracterización metabólica y fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora*. Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Colombia. 154 p.
- Williamson, M. & Fokkema, N. (1985). Phyllosphere Yeasts Antagonize Penetration from Appressoria and Subsequent Infection of Maize Leaves by *Colletotrichum graminicola*. Neth. En: *Journal Plant Pathology*. 91: 268-276.
- Zapata, J. (2003). *Estudio preliminar de la microflora asociada a la estructura reproductiva de la mora de castilla (Rubus glaucus, Benth) y su relación con el moho gris producido por Botrytis cinerea*. Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Colombia. P. 62-83.