



MinAgricultura
Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural

PROSPERIDAD
PARA TODOS



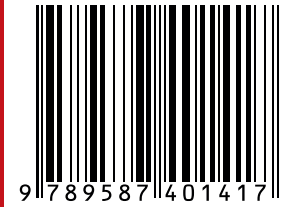
Corpoica
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
www.corpoica.org.co



**DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE BIOPLAGUICIDA
A BASE DE *Rhodotorula glutinis* LvCo7 PARA
EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN CULTIVOS DE MORA**

www.corpoica.org.co

ISBN: 978-958-740-141-7



9 789587 401417



BAC

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

Correo: bac@corpoica.org.co
Teléfono: (57 1) 4 227300 ext. 1257 o 1274
Skype: biblioteca.agropecuaria



MinAgricultura
Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural

**PROSPERIDAD
PARA TODOS**



Desarrollo de prototipos de bioplaguicida a base de *Rhodotorula glutinis* LvCo7 para el control de *Botrytis cinerea* en cultivos de mora

EQUIPO TÉCNICO

Investigadores

Alba Marina Cotes Prado, Ph.D.¹; Jimmy Alexander Zapata Narváez, Microbiólogo.¹;
Liz Alejandra Uribe Gutiérrez, Microbióloga.¹; Andrés Díaz García, I. Q, M.Sc.¹;
Laura Fernanda Villamizar Rivero, Ph.D.¹; Martha Isabel Gómez Álvarez, Ph.D.¹;
Alegria Saldarriaga Cardona, I. A, M.Sc.²; Roberto Álvarez Zambrano, Ingeniero Agrónomo.³;
Elsa Gómez, Microbióloga.¹

Estudiantes

Marcia Catalina Acosta Peña, Microbióloga Industrial.⁴;
Carol Andrea Bolaños Almeida, Microbióloga Industrial.⁴; Maritza Alejandra Bermúdez Díaz, Bióloga.⁵;
Cindy Mejía Maldonado, Microbióloga Industrial.⁴

Auxiliares

Darwin Vásquez.¹; Hugo Cárdenas.¹; Albeiro Macías.²

¹ Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB.

² Centro de Investigación La Selva.

³ Centro de Investigación Tibaitatá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica.

⁴ Pontificia Universidad Javeriana.

⁵ Universidad del Tolima.

Zapata Narváez, Jimmy Alexander; Cotes Prado, Alba Marina; Uribe Gutiérrez, Liz Alejandra; Díaz García, Andrés; Villamizar Rivero, Laura Fernanda; Gómez Álvarez, Martha Isabel; Saldarriaga Cardona, Alegría; Álvarez Zambrano, Roberto; Gómez, Elsa / Desarrollo de prototipos de bioplaguicida a base de *Rhodotorula glutinis* LvCo7 para el control de *Botrytis cinerea* en cultivos de mora. Bogotá (Colombia): CORPOICA, 2013. 80 p.

Palabras clave: MORA, BIOPLAGUICIDAS, *RHODOTORULA GLUTINIS*, *BOTRYTIS CINEREA*, TRICHODERMA.



MinAgricultura
Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural

**PROSPERIDAD
PARA TODOS**



La presente publicación ha sido elaborada con la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, MADR; el contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los investigadores y en ningún caso debe considerarse que refleja los puntos de vista del MADR.



© Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA
Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB.

ISBN: 978-958-740-141-7
CUI: 1427
CA: C00130
Primera edición: Mayo de 2013
Editores: Jimmy Alexander Zapata Narváez
Alba Marina Cotes, Ph.D.
Tiraje: 800 ejemplares

Línea de atención al cliente: 018000121515
atencionalcliente@corpoica.org.co
www.corpoica.org.co

Diseño: Dannahite

Impreso en Colombia
Printed in Colombia

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud:

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

Al personal de Corpoica, particularmente a los investigadores Alegría Saldarriaga y Roberto Álvarez, y a los auxiliares Darwin Vásquez, Hugo Cárdenas y Albeiro Macías, por su acompañamiento y contribución, que permitieron llevar a feliz término este proyecto. Así mismo, al personal administrativo perteneciente a la sede Central y a los centros de investigación La Selva, Tibaitatá y Centro de Biotecnología y Bioindustria, por su valioso apoyo y positiva disposición durante el desarrollo del proyecto.

A Juan Carlos Aguirre, Enrique Rodríguez y Nuvia Garzón, propietarios de los lotes donde se establecieron las parcelas experimentales de mora para la evaluación de los prototipos de bioplaguicidas en el control de *Botrytis cinerea*, en las veredas Agua Bonita y Monterrico, del municipio Silvania (Cundinamarca), por facilitar la logística requerida para llevar a cabo las evaluaciones en campo.

A Jesús Villamizar, por su valioso apoyo y buena disposición durante el desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 1. SENSIBILIDAD DE <i>Botrytis cinerea</i> A SIETE FUNGICIDAS COMÚNMENTE EMPLEADOS PARA SU CONTROL EN CULTIVOS DE MORA	11
CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE LEVADURAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL DE <i>Botrytis cinerea</i> EN LA MORA	26
CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN MASIVA DE <i>Rhodotorula glutinis</i> CEPA LvCo7	46
CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE LA LEVADURA <i>Rhodotorula glutinis</i> LvCo7 PARA EL CONTROL DE <i>Botrytis cinerea</i> EN MORA	58
CAPÍTULO 5. EFICACIA DE DOS PROTOTIPOS DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE <i>R. glutinis</i> CEPA LvCo7 Y UN BIOPLAGUICIDA A BASE DE <i>T. koningiopsis</i> CEPA TH003 EN EL CONTROL DE <i>B. cinerea</i> EN CULTIVOS DE MORA	69
A EFICACIA DE DOS PROTOTIPOS DE BIOPLAGUICIDAS A BASE DE <i>R. glutinis</i> Y DE <i>T. koningiopsis</i> EN EL CONTROL DE <i>B. cinerea</i> EN CULTIVOS DE MORA	73

INTRODUCCIÓN

Jimmy Alexander Zapata Narváez

La mora (*Rubus glaucus*, Benth) en Colombia es una de las frutas más importantes y con mayor proyección comercial. Es cultivada por pequeños y medianos agricultores, constituyendo una de las principales fuentes de ingresos, empleo rural y de alternativa agroindustrial (Botero y Franco, 2007). Su producción creció de 20.000 ton/año en 1992 a 99.280 ton/año en 2010; en ese mismo periodo, el área sembrada pasó de 3.000 ha a 12.216 ha y su crecimiento anual ha sido de 8,8% en producción y de 7,8% en área sembrada (Ruiz y del Valle, 2009; Leyva *et al.*, 2010).

No obstante, el cultivo presenta problemas fitopatológicos que ocasionan pérdidas de la fruta tanto en campo como en poscosecha. Una de las enfermedades más limitantes es el moho gris causado por el hongo *Botrytis cinerea*, el cual infecta estructuras florales como los estambres, los pistilos y el receptáculo floral, en los cuales el micelio se establece durante la floración, permaneciendo quiescente hasta la formación del fruto. Una vez el fruto madura, el hongo se desarrolla agresivamente, produciendo abundantes conidios, los cuales, a su vez, infectarán otros frutos, ocasionando su pérdida en campo y/o poscosecha. La mayoría de los frutos, aunque están infectados, son asintomáticos en el momento de su recolección (Mason y Dennis, 1978; Molina *et al.*, 2004), lo que provoca pérdidas que pueden oscilar entre el 50% y el 76% de la fruta cosechada (Tamayo *et al.*, 2002).

El control de esta enfermedad se efectúa mediante el uso de fungicidas como Captan, Benomil, Clorotalonil y Botrycidas de última generación; sin embargo, debido a su modo de acción (inhibición de la síntesis de Ergosterol, 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 *et al.*, 2000), además

su acumulación en la fruta es tóxica para personas y animales (EPA, 2005), afectando el posicionamiento de la fruta en el mercado internacional.

Al ser una planta de fructificación continua, el cultivo de mora produce dos cosechas por semana y, al igual que la mayoría de cultivos en Colombia, no presenta periodos de carencia entre las aplicaciones de pesticidas y la cosecha de la fruta, lo que posibilita que la fruta comercializada en los diferentes mercados tenga residuos de productos químicos.

Dado que cada vez son mayores las objeciones de orden fitosanitario que se plantean sobre el uso excesivo de plaguicidas de síntesis, debido al riesgo que representan para la salud humana, la preocupación por sus posibles efectos nocivos adquiere especial importancia, si tenemos en cuenta que gran parte de la fruta cosechada es consumida en fresco y es muy corta la proximidad temporal entre la aplicación de los pesticidas y su consumo. Debido al peligro que representan los residuos de pesticidas para la salud humana, los consumidores en el mundo están exigiendo que el uso de productos químicos en la producción agrícola se reduzca significativamente.

El control biológico utilizando microorganismos antagonistas se ha considerado como una alternativa para reducir las pérdidas producidas por *B. cinerea* en campo, ya que ha demostrado ventajas frente al uso de moléculas químicas, puesto que no presentan problemas de toxicidad humana, no generan riesgos para el medioambiente, no presentan problemas de residualidad y no afectan a los enemigos naturales de las plagas (Van Lenteren, 2000); además su eficacia ha sido comparable a la de muchos productos químicos recomendados (Shtienberg *et al.*, 2002).

Dentro de los microorganismos utilizados como agentes de control biológico, las levaduras se destacan, debido a que crecen de forma saprofítica en una gran variedad de sustratos y no requieren de grandes cantidades de agua disponible (Andrews y Back, 2004), sumado a la capacidad que poseen para colonizar y reproducirse rápidamente sobre las diferentes estructuras vegetales. Además, pueden inhibir el crecimiento de patógenos necrótrofos como *B. cinerea*, que necesitan de nutrientes exógenos para que sus conidios germinen y puedan crecer sobre la superficie vegetal, para posteriormente penetrar sus tejidos, siendo en este momento susceptible a la ausencia de nutrientes como azúcares simples, aminoácidos, ácidos orgánicos, elementos trazas y vitaminas (Elad, 1996; Mercier y Lindow, 2000).

Algunas levaduras se han probado con éxito ante *B. cinerea* bajo condiciones de cultivo, por ejemplo, *Pichia guilliermondii* fue evaluada

contra *B. cinerea* en hojas de fresa, encontrando una reducción de la germinación de los conidios del patógeno entre el 70% y 80% a temperaturas de 10° C y 25° C, y de la misma forma redujo las lesiones en un 70% a temperaturas de 20°C y 23°C, y a una humedad relativa de 80% y 100% (Guetsky *et al.*, 2001). En investigaciones realizadas por Elad y colaboradores (1994) con las levaduras *Rhodotorula glutinis* F147 y *Cryptococcus albidus* F131 y 053, se encontró alta efectividad, al inhibir la germinación de los conidios de *B. cinerea* y reducir los síntomas del moho gris en hojas de fríjol en 92%, 80% y 81%, y en hojas de tomate en 95%, 96% y 100%, respectivamente; las levaduras *R. glutinis* y *Cryptococcus sp.*, aisladas de hojas de trigo también mostraron ser efectivas en el control de otros patógenos foliares como *Septoria tritici* y *Bipolaris sorokiana*, sobre hojas de trigo, en las que redujeron la esporulación de estos patógenos en 69% y la severidad de la enfermedad producida por estos hongos hasta en un 85% (Parrello *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta los resultados exitosos que a nivel mundial se han logrado con el control biológico de *B. cinerea*, y dada la posibilidad de encontrar microorganismos adaptados al ambiente foliar en condiciones de cultivo, el laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, ha trabajado en el aislamiento, caracterización y selección de levaduras de la filósfera de mora con miras al desarrollo de bioplaguicidas para el control de *B. cinerea* en el cultivo de mora, así como en otros sistemas productivos.

De esta forma se han aislado y seleccionado levaduras como *Pichia onychis* cepas Lv027, Lv297 y LvF20, y *R. glutinis* cepas LvCo7, LvSi6 y LvSi29, las cuales presentan óptimo crecimiento a temperaturas entre 5° C y 37° C, rangos de pH de 3 a 9, actividad de agua (a_w) de 0,94 y 0,92; además, muestran tolerancia a la luz ultravioleta (UVB), alta adherencia a la superficie foliar y actividad biocontroladora superior al 70% sobre *B. cinerea* en bioensayos desarrollados en pétalos de rosa y flores de mora (Zapata, 2003; Zapata *et al.*, 2011).

Por lo anterior, en el presente documento se muestran los resultados generados en el proyecto *Desarrollo de una estrategia de control biológico de Botrytis cinerea en mora en campo*, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural durante los años 2008 y 2011, en el cual se realizaron trabajos que permitieron el desarrollo de un prototipo de bioplaguicida a base de la levadura *R. glutinis* cepa LvCo7, como componente central en el manejo integrado del moho gris, combinado con el uso de fungicidas de baja categoría toxicológica, para los cuales el patógeno no presente

resistencia, con semilla de alta calidad (vitroplántulas) y con diferentes prácticas culturales como podas y sistemas de tutorado, constituyen los principales componentes de la estrategia propuesta.

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.
- Botero, M. & Franco, G. (2007). Identificación y caracterización preliminar del agente causal de la mancha necrótica de las hojas de la mora (*Rubus glaucus*) en el municipio de Trujillo (Valle del Cauca, Colombia). En: *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(2): 22-25.
- 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.; Köhl, J. & Fokkema, N. (1994). Control of Infection and Sporulation of *Botrytis cinerea* on Bean and Tomato by Saprophytic Yeast. En: *Phytopathology* 84: 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.
- EPA. (2005). *Pesticide Registration Status of the United States of America*. [En línea]. <http://www.cpub.epa.gov/appref/rereg/status.cfm?show=rereg#c>. [Consultada: agosto de 2009].
- 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: 976-985.
- Leyva, F.; Arciniegas, E.; Velásquez, E.; Arias, C.; Lozano, M.; López, H.; Hernández, I. & Pereira, C. (2010). *Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2006 – 2010 y sus calendarios de siembras y cosechas*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Edición: Dirección de Política Sectorial - Grupo Sistemas de Información.
- Mason, D. & Dennis, C. (1978). Post-harvest Spoilage of Scottish Raspberries in Relation to Pre-harvest Fungicide Sprays. En: *Horticultural Research* 18: 41-53.
- 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.
- Molina, S.; de La Rotta, M. & Torres, E. (2004). Incidencia de infecciones quiescentes de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth.). En: *Agronomía Colombiana* 22(2): 101-109.
- Parello, A.; Simón, M. & Arambarri, M. (2002). Interactions Between Foliar Pathogens and the Saprophytic Microfora of the Wheat (*Triticum aestivum* L) Phylloplane. En: *Journal of Phytopathology* 150: 232-243.
- Rosslénbroich, H. & Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea* – History of Chemical Control and Novel Fungicides for its Management. En: *Crop Protection* 19: 557-561.
- Ruiz, M. & del Valle M. (2009). *Situación actual y perspectivas del mercado de la mora*. Componente de Agronegocios - Programa Midas, Economic Research Service- ERS.

- Shtienberg, D.; Elad, Y.; Fischer, E. & Dinoor, A. (2002). Improving Biological Control by Combining Biocontrol Agents Each with Several Mechanisms of Disease Suppression. En: *Phytopathology* 92: 976-985.
- Stehmann, C. & De Waard, M. (1996). Sensitivity of Populations of *Botrytis cinerea* to Triazoles, Benomyl and Vinclozolin. En: *European Journal of Plant Pathology* 102: 171-180.
- Tamayo, M.; Bernardo, G. & Becerra, D. (2002). Enfermedades de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*, Benth) en Antioquia. En: *Boletín Bimestral Ascofi Informa* 28: 16-19.
- Van Lenteren, J. C. (2000). Measures of Success in Biological Control of Arthropods by Augmentation of Natural Enemies. Pp. 77-103. In: Wratten, S. and Gurr, G. (eds). *Measures of Success in Biological Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 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. Pp. 62 - 83.
- Zapata, J.; Acosta, C.; Díaz, A.; Villamizar, L. & Cotes, A.M. (2011). Characterization of *Rhodotorula glutinis* and *Pichia onychis* Isolates with Potential to Develop a Biopesticide for Controlling *Botrytis cinerea*. Proc. IS on *Biological Control of Postharvest Diseases*. Eds.: Wisniewski, M. and Droby, S. Acta Hort. 905, ISHS, p. 155-160.

CAPÍTULO 1.

SENSIBILIDAD DE *Botrytis cinerea* A SIETE FUNGICIDAS COMÚNMENTE EMPLEADOS PARA SU CONTROL EN CULTIVOS DE MORA

Liz Alejandra Uribe Gutiérrez, Jimmy Alexander Zapata Narváez y
Alba Marina Cotes Prado

Resumen

El principal método de control de *Botrytis cinerea* se basa en el uso de fungicidas de síntesis química. Sin embargo, el rápido desarrollo de resistencia por parte del patógeno hacia la mayoría de fungicidas empleados para su control, debido a su alta variabilidad genética, ha vuelto ineficiente su manejo. Para evaluar la sensibilidad de diferentes aislamientos de *B. cinerea* frente a siete fungicidas comúnmente empleados para el control de este patógeno en cultivos de mora, se determinó *in vitro* el porcentaje de inhibición del crecimiento diametral para 25 morfotipos, el porcentaje de inhibición de la germinación para 24 morfotipos y la incidencia sobre discos de hojas de mora de 11 morfotipos, así como la resistencia tomada de ensayos desarrollados en cultivos comerciales. Todos los aislamientos presentaron diferente sensibilidad frente a los fungicidas evaluados. El 12,5% de los conidios fueron sensibles a Benomil y el 8,3% a Carbendazim, en tanto que el 100% fue sensible a Difenconazole, Procloraz, Mancozeb, Captán e Iprodión, al no evidenciarse germinación. Al evaluar el crecimiento diametral, el 16% de los aislamientos fueron sensibles a Benomil y Carbendazim, el 21% a Captán, el 72% a Iprodión, el 36% a Mancozeb y el 100% a Difenconazol y Procloraz, al inhibir totalmente el crecimiento. Al evaluar la sensibilidad sobre discos de hojas se presentó mayor incidencia en los discos tratados con Benomil, Carbendazim y Mancozeb, y una menor o ninguna incidencia en los discos tratados con Difenconazole y Procloraz.

Introducción

El control de *Botrytis cinerea* se realiza principalmente mediante aplicaciones de agentes químicos (Benito *et al.*, 2000; Mikani *et al.*, 2007), sin embargo, la utilización de fungicidas es cada vez más restringida debido a problemas asociados con la contaminación ambiental que derivan de su aplicación y al rápido desarrollo de resistencia hacia los fungicidas utilizados para su control (Benito *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2002). Por estas razones, el control químico de *B. cinerea* es difícil y las estrategias de manejo para retrasar la aparición de resistencia en el patógeno son importantes.

Actualmente, a nivel mundial se encuentran en el mercado varios grupos de fungicidas para el control de *B. cinerea*, los cuales se clasifican según su modo de acción en cinco categorías: 1) Los que afectan la respiración fúngica. 2) Los antimicrotubulares que afectan la mitosis y la división celular. 3) Los que afectan la osmorregulación, pues inhiben la síntesis de lípidos y membranas. 4) Los que afectan la síntesis de aminoácidos y de proteínas, y 5) Los inhibidores de la biosíntesis de esterol en las membranas. Para todos estos, las dosis de aplicación recomendadas para cada grupo varían de 400-500g/Ha a 2000-3000g/Ha, según las recomendaciones de la casa comercial (Elad *et al.*, 2004).

Para el control de la pudrición del fruto de mora en Colombia no se encuentra registrado ningún producto. Sin embargo, se realizan aplicaciones de Captan, Benomil, Mancozeb, Carbendazim, Iprodión, Difenconazole y Procloraz, entre otros, siendo estos siete fungicidas los más utilizados para el control del moho gris en este cultivo en Cundinamarca y Antioquia, dos de los principales departamentos productores de mora a nivel nacional.

Actualmente, en estas regiones no se ha registrado resistencia del patógeno frente a estos fungicidas, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar bajo condiciones controladas (*in vitro* e *in planta*) la sensibilidad de diferentes aislamientos de *B. cinerea* provenientes de estas dos regiones, expuestos a los principios activos ya mencionados.

Metodología

Aislamiento de morfotipos de B. cinerea en cultivos comerciales

Con el objetivo de establecer una colección de aislamientos de *B. cinerea* para desarrollar bioensayos tendientes a determinar la sensibilidad de este patógeno a los diferentes fungicidas utilizados para su control, se realizaron

colectas de frutos de mora que presentaban signos y síntomas de moho gris, en cultivos comerciales de los municipios de La Ceja (Antioquia) y Silvania (Cundinamarca).

El aislamiento del patógeno se realizó en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA), suplementado con ácido tánico al 0,5%, incubadas a 23°C durante seis días, bajo condiciones de oscuridad. Las colonias de *B. cinerea* fueron identificadas por la formación de un halo marrón, debido a la degradación del ácido tánico por la enzima lacasa producida por el patógeno. Todos los aislamientos se mantuvieron en PDA y se almacenaron a 18°C durante 10 días (Kerssies, 1990).

Sensibilidad in vitro de B. cinerea a fungicidas utilizados para su control en el cultivo de mora

Los principios activos evaluados corresponden a los fungicidas que presentan mayor frecuencia de uso para el control del moho gris en los municipios de La Ceja y Silvania (Tabla 1).

Los ensayos se realizaron en PDA suplementado con cada uno de los fungicidas en la dosis recomendada; teniendo en cuenta su solubilidad, los solventes empleados fueron: agua destilada para Mancozeb y Carbendazim, y acetona para Benomil, Difenoconazol, Procloraz, Captan e Iprodión (Jiang *et al.*, 2009). Las cajas correspondientes a los fungicidas solubilizados en acetona se dejaron abiertas durante 15 minutos en una cabina de flujo laminar, para facilitar la evaporación del solvente.

Se determinó el efecto de los fungicidas sobre la germinación de los conidios para 24 aislamientos de *B. cinerea* seleccionados, por presentar abundante esporulación. Para cada aislamiento, a partir de cultivos en PDA de 15 días de edad, se colectaron los conidios y se realizó una suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹, posteriormente se sembraron de cada una 100µL en el medio, con y sin adición de fungicida (control). Las cajas se incubaron durante 72 horas a 23°C y cada 24 horas se realizaron lecturas correspondientes al número de conidios germinados y no germinados. El porcentaje de germinación se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Germinación (\%)} = \left(\frac{\text{Conidios germinados}}{\text{Total conidios}} \right) \times 100$$

Tabla 1. Ingrediente activo y dosis empleada en la evaluación de la sensibilidad

Ingrediente activo y categoría toxicológica	Producto	Dosis ppm*	Grupo químico	Modo de acción
Carbendazim IV	Derosal	600	Benzimidazoles	Proceso de división celular (mitosis).
Mancozeb IV	Mancozeb	2000	Ditiocarbamatos	Multisitio.
Difenoconazol III	Score	625	Triazoles	Inhibe la biosíntesis de Ergosterol.
Benomil IV	Benlate	750	Benzimidazoles	Proceso de división celular.
Procloraz II	Sportak	246	Imidiazol	Inhibe la biosíntesis de Ergosterol.
Iprodión III	Rovral	1500	Dicarboximidaz	Inhibe la germinación de las esporas y el desarrollo de micelio.
Captan IV	Captan	750	Ftalimidaz	Reacciona con las enzimas sulfhídricas con producción de Tiofosgeno e interfiere en el proceso de respiración celular.

* Corresponde a la dosis más alta recomendada en la etiqueta del producto comercial.

Por otra parte, se determinó el efecto de cada fungicida sobre el crecimiento micelial de 25 aislamientos seleccionados por presentar mayor crecimiento. Se cortaron discos de agar de 5,3 mm de diámetro, obtenidos de cultivos esporulados de 10 días de edad. Cada disco se colocó en el centro de una caja Petri con PDA, con y sin adición de fungicida (control). Las cajas se incubaron a 23°C durante 15 días y cada tercer día se midió el crecimiento diametral (dos diámetros perpendiculares que fueron promediados), con la ayuda de un micrómetro digital. El porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó mediante la siguiente fórmula: donde, % IM: Porcentaje de inhibición crecimiento micelial; CML: Crecimiento diametral de la colonia en el testigo; CM: Diámetro inicial del inóculo (disco con micelio) y CMF: Crecimiento diametral de la colonia expuesta al fungicida.

$$IM (\%) = \left(\frac{(CM - CM) - (CMF - CM)}{(CML - CM)} \right) \times 100$$

Los resultados obtenidos para el crecimiento diametral fueron sometidos a un análisis de varianza (Anova). Las diferencias que presentaron valores de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas y se les realizó una comparación de medias por Tukey. Todos los ensayos se realizaron mediante un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en una caja Petri.

Sensibilidad in planta de B. cinerea a fungicidas utilizados para su control en el cultivo de mora

Se evaluó la sensibilidad *in planta* para 11 aislamientos de *B. cinerea* previamente seleccionados por presentar mayor esporulación en PDA.

Los foliolos se colectaron en un cultivo comercial ubicado en la vereda Monterrico, del municipio de Silvania. Este material fue previamente desinfestado, sumergiendo las hojas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto, seguido de dos lavados con agua estéril. Posteriormente se sumergieron en una solución de glifosato (dosis recomendada), seguido de dos lavados sucesivos con agua estéril, para así promover la muerte del tejido y facilitar la infección del patógeno. Finalmente, los foliolos se secaron en una cabina de flujo laminar y se cortaron discos de 1,7 cm de diámetro, con la ayuda de un sacabocados estéril. Los discos se sumergieron durante 30 minutos en las soluciones de fungicidas ajustadas a la dosis recomendada (Tabla 1) y se dejaron secar dentro de una cabina de flujo laminar. Posteriormente se ubicaron tres discos por tratamiento dentro de una cámara húmeda y se inocularon con una gota de 10 μ L ajustada a una concentración de 1x10⁴ conidios.mL⁻¹ de cada aislamiento. Las cámaras húmedas se llevaron a incubación durante 10 días a 23°C. Transcurrido este tiempo, se evaluó la incidencia de la enfermedad, mediante la observación de la esporulación sobre cada uno de los discos inoculados. Los experimentos se realizaron mediante un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en una cámara húmeda con tres discos.

Sensibilidad en campo de B. cinerea a fungicidas utilizados para su control en el cultivo de mora en los municipios de La Ceja y Silvania

Estos bioensayos se desarrollaron entre los meses de junio y julio de 2009, durante la estación de lluvias (época de mayor incidencia de moho gris), en los cultivos de mora que fueron seleccionados para colectar muestras de material vegetal para el aislamiento de *B. cinerea* en los municipios de La Ceja y Silvania.

La evaluación de la resistencia de *B. cinerea* en campo se realizó mediante la exposición de cajas Petri con agar BSM (medio de cultivo selectivo para *Botrytis* spp.) (Edwards y Seddon, 2001), preparado con las dosis completa y media de cada uno de los fungicidas.

En cada cultivo se seleccionaron, por surcos, plantas en las cuales se dejaron expuestas (en los diferentes estratos de la planta) las cajas Petri por un periodo de dos horas (Figura 1). De igual forma, también se dejaron algunas cajas sobre el material de poda que comúnmente no es retirado del cultivo. La evaluación se realizó por triplicado y se contó con un testigo que consistió en cajas Petri con medio BSM sin fungicida.



Figura 1. Ubicación de las cajas Petri en las plantas de mora, para evaluar la sensibilidad de *B. cinerea* a siete fungicidas utilizados para su control en cultivos comerciales.

Una vez en el laboratorio, las cajas Petri se incubaron a 22°C, en completa oscuridad, durante 8 días; posteriormente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) de *B. cinerea*, teniendo en cuenta las características macroscópicas de las colonias obtenidas (para diferenciarlas de otros hongos que se desarrollaron en los medios), que para el caso de *B. cinerea* se caracterizan por presentar colonias esparcidas, inicialmente blancas, que con el tiempo se tornan grises polvosas, micelio inmerso o superficial, así como la formación de esclerocios de color oscuro y de tamaño medio (Pardo, 1995; Ellis *et al.*, 1991).

De igual forma, debido al ácido tánico presente en el medio (un compuesto de glucosa y ácidos fenólicos cuya fórmula es $C_{76}H_{52}O_{46}$), éste se torna oscuro alrededor de las colonias de *B. cinerea*, debido a la degradación del ácido por la enzima lacasa producida por el patógeno (Keressies, 1990). Para cada uno de los tratamientos se promedió el número de UFC obtenidas por caja Petri.

Resultados

Aislamiento de morfotipos de Botrytis cinerea en cultivos comerciales

Se estableció una colección de 40 aislamientos de *B. cinerea*, 20 procedentes del municipio de Silvania y 20 del municipio de La Ceja. Todos los aislamientos

fueron crioconservados a -70°C , siguiendo el procedimiento operativo estándar (IN-R-251) del Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico, de Corpoica.

Los aislamientos de *B. cinerea* presentaron diferencias en su crecimiento en el medio de cultivo. Los que provenían de La Ceja se caracterizaron por un pobre desarrollo de micelio, así como poca producción de conidios; en tanto que los aislados a partir de las muestras colectadas en Sylvania presentaron un abundante y rápido crecimiento del micelio y producción de conidios (Figura 2). Esto puede atribuirse a la diferencia en la humedad relativa y temperatura entre las dos zonas donde se realizaron los muestreos, siendo Sylvania la que presentó mayor humedad relativa ($>92\%$) y una menor temperatura (15°C). Rotem y colaboradores (1978) (Citado por Elad *et al.*, 2004) encontraron que fluctuaciones en la humedad relativa y en la temperatura influían en el desarrollo y producción de los conidios de *B. cinerea*.

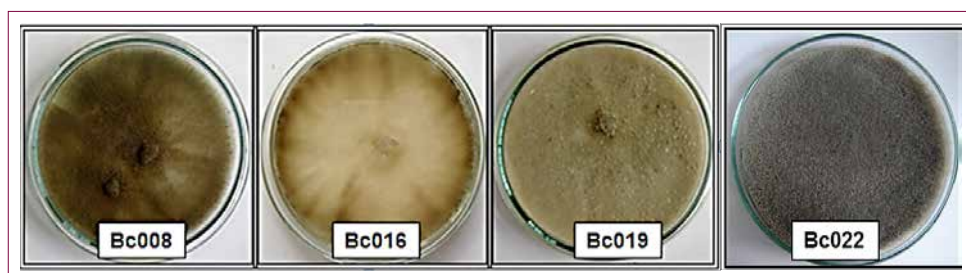


Figura 2. Aislamientos de *B. cinerea* provenientes de La Ceja (Bc016) y Sylvania (Bc008, Bc019 y Bc022).

Sensibilidad in vitro de B. cinerea a fungicidas utilizados para su control en el cultivo de mora

Para todos los aislamientos en el tratamiento control, los conidios presentaron una germinación superior al 95% después de 24 horas de incubación (Figura 3A).

Al exponer los conidios a Benomil, el 83% de los aislamientos mostró baja sensibilidad, ya que se obtuvo un porcentaje de germinación superior al 95% después de 24 horas de incubación, similar al obtenido en el control. Sin embargo, con este fungicida se observó la reducción del tubo germinal, lo que pudo deberse a su modo de acción, ya que interfiere en funciones celulares como la división celular y el transporte intracelular (RAP-AL, 2008) (Figura 3C), mientras que el 17% de los aislamientos presentó alta sensibilidad, ya que los conidios no germinaron después del periodo de incubación.

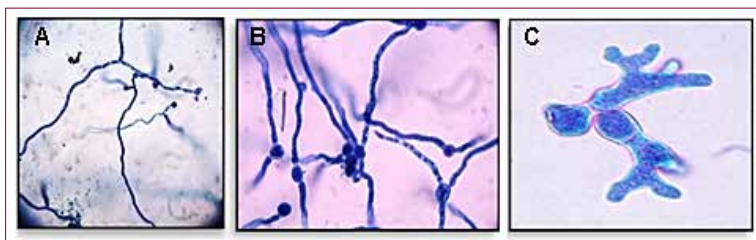


Figura 3. Observación microscópica (objetivo 40X) de la germinación de los conidios en diferentes tratamientos: A. Control, aislamiento BcS001. B. Aislamiento BcS004 en el tratamiento con Carbendazim. C. Aislamiento BcS003 en el tratamiento con Benomil.

En el medio con Carbendazim, el 79% de los aislamientos no presentó sensibilidad, pues sus conidios mostraron un porcentaje de germinación superior al 95% después de 24 horas de incubación (Figura 3B). Por otro lado, el 13% de los aislamientos mostró sensibilidad media, expresada como el retraso en la germinación (95% después de 48 horas), en tanto que el 8% de los aislamientos fue sensible, si se tiene en cuenta que sus conidios no germinaron.

Por otra parte, todos los aislamientos fueron sensibles a Difenoconazol, Procloraz, Mancozeb, Captan e Iprodión, dado que no se presentó germinación de los conidios (Figura 4).

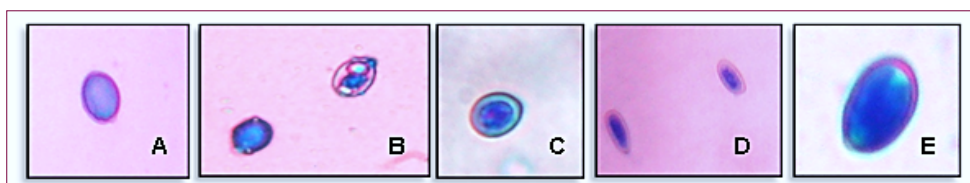


Figura 4. Observación microscópica (40X) de la germinación de los conidios. A. Aislamiento Bc008 expuesto a Difenoconazol. B. Aislamiento Bc011 expuesto a Procloraz. C. Aislamiento Bc011 expuesto a Iprodión. D. Aislamiento Bc008 expuesto a Mancozeb. E. Aislamiento Bc008 expuesto a Captan.

Respecto al crecimiento diametral, todos los aislamientos en el tratamiento de control presentaron un crecimiento de 90 mm y abundante esporulación (Figura 5A, B y C).

Al exponer los aislamientos a Benomil, el 72% no presentó sensibilidad, ya que su crecimiento fue similar al control; el 12% presentó baja sensibilidad y el 16% mostró alta sensibilidad. Por otra parte, al exponer los aislamientos al medio con Iprodión, el 16% y el 84% presentaron media y alta sensibilidad, respectivamente (Tabla 2). Para Carbendazim, el 36% de

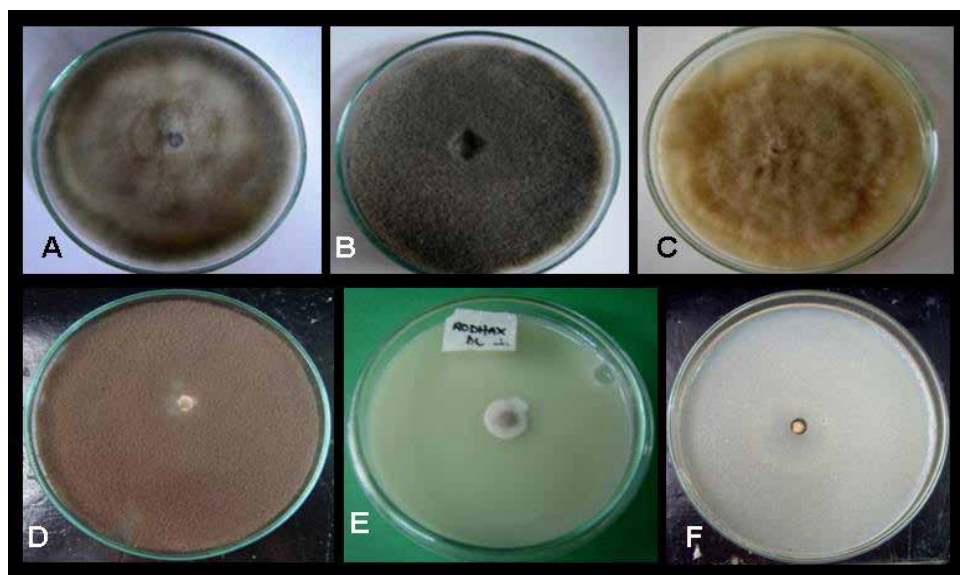


Figura 5. Crecimiento diametral de los controles: A. Bc019. B. Bc008. C. Bc043. D. Crecimiento diametral del aislamiento Bc008 en Carbendazim. E. Mancozeb. F. Difenconazol.

Tabla 2. Porcentaje de aislamientos clasificados según su sensibilidad a los fungicidas evaluados

Sensibilidad	(%) Inhibición	Carbendazim	Mancozeb	Difenconazol	Benomil	Procloraz	Iprodión	Captan
Nula	0	36	20	0	72	0	0	0
Baja	1 - 40	48	36	0	12	0	0	0
Media	41 - 80	0	4	0	0	0	16	26
Alta	81 - 100	16	40	100	16	100	84	74

los aislamientos no fue sensible, el 48% presentó baja sensibilidad y el 16% fue sensible al inhibir completamente su crecimiento (Tabla 2 y Figura 5D).

En el medio con Mancozeb, el 20% de los aislamientos no mostró sensibilidad, pues su crecimiento no fue inhibido, el 36% presentó baja sensibilidad; el 4%, sensibilidad media, y el 40%, sensibilidad alta (Tabla 2 y Figura 5E).

Al exponer los aislamientos a Captan, el 26% presentó sensibilidad media, en tanto que el 74% fue altamente sensible (Tabla 2). Por otra parte, todos los aislamientos fueron sensibles a Difenconazol y Procloraz, al inhibir completamente el crecimiento (Figura 5F).

La germinación de los conidios y la elongación del tubo germinal no se vio afectada en los medios con fungicidas pertenecientes al grupo químico de los benzimidazoles como Carbendazim (Figura 3B), en tanto que en presencia de Benomil se evidenció la germinación de los conidios, pero una notoria inhibición del tubo germinal (Figura 3C).

Es importante resaltar que la baja sensibilidad presentada por la mayoría de los aislamientos frente a Carbendazim y Benomil, puede atribuirse a su uso recurrente y a la ausencia de esquemas de rotación por parte de los productores de mora.

Por otro lado, la germinación de los conidios para todos los aislamientos fue inhibida en algún grado por Mancozeb, Iprodión, Difenconazole, Procloraz y Captán, siendo Iprodión la única molécula que actúa directamente sobre la germinación, en tanto que las demás están dirigidas a impedir el desarrollo subcuticular del micelio e inhibir la síntesis de Ergosterol.

En cuanto al crecimiento diametral, los aislamientos presentaron baja sensibilidad a los fungicidas pertenecientes a los grupos químicos de los benzimidazoles y ditiocarbamatos. Es importante resaltar que el modo de acción de estos tres fungicidas es similar, actúan interfiriendo en la síntesis del ADN, la mitosis y en el proceso de transcripción (De Liñán, 1997). La baja sensibilidad que presentan los aislamientos frente a estas moléculas puede ser resultado de un fenómeno de resistencia negativa y cruzada, al presentar el mismo modo de acción. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Latorre y colaboradores (2002) para aislamientos resistentes de *B. cinerea*, demostrando que el uso frecuente de una molécula similar a las empleadas en otros fungicidas puede generar resistencia negativa y cruzada hacia las otras moléculas, aun sin haberlas usado, como ocurrió con los grupos anilino piridinas, mepanipirinas y pirimetanil.

En este estudio, los aislamientos presentaron una sensibilidad media frente a las moléculas que pertenecen a los grupos químicos de las ftalimidazoles y dicarboximidazoles, en tanto que fueron sensibles a los triazoles e imidazoles.

Sensibilidad in planta de B. cinerea a fungicidas utilizados para su control en el cultivo de mora

Al evaluar la incidencia de los aislamientos sobre los discos de foliolos tratados con los fungicidas, se obtuvo que para Benomil, el 27% de los aislamientos presentó baja sensibilidad; el 64%, sensibilidad media, y el 9%, alta sensibilidad;

con Carbendazim, el 9% de los aislamientos no fue sensible, el 64% presentó baja sensibilidad y el 27%, sensibilidad media; con Mancozeb, el 18% no fue sensible, el 64% presentó baja sensibilidad y el 18%, sensibilidad media. Por otro lado, todos los aislamientos fueron sensibles a Difenconazol, Procloraz, Captan e Iprodión, pues no se evidenció crecimiento ni esporulación sobre los discos de hoja tratados con estos (Figura 6).

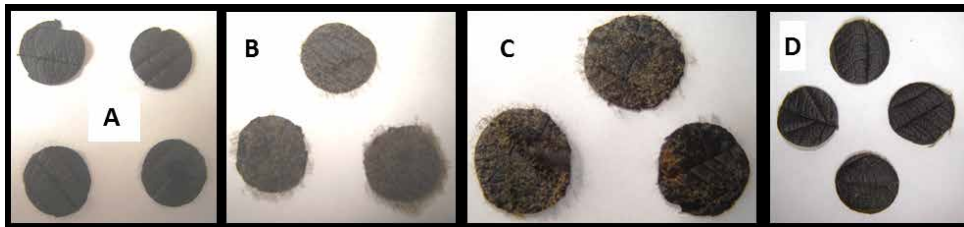


Figura 6. A. Testigo absoluto. B. Testigo patógeno. C. Incidencia de *B. cinerea* sobre discos tratados con Carbendazim. D. Incidencia de *B. cinerea* sobre discos tratados con difenoconazole.

Teniendo en cuenta el comportamiento de cada aislamiento, de los 11 evaluados, se encontró que los aislamientos Bc008 y Bc027 presentaron la mayor incidencia en los discos tratados con Benomil, con 78% y 89%, respectivamente. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la evaluación de la inhibición del crecimiento diametral y la germinación de los conidios, los dos aislamientos mostraron tolerancia frente a este fungicida, ya que presentaron un crecimiento diametral similar al obtenido en el control (90 mm) y un porcentaje de germinación superior al 95%, después de 24 horas de incubación. Sin embargo, aunque el aislamiento Bc027 mostró un retraso en la germinación con un porcentaje superior al 95%, después de 72 horas, fue el aislamiento que presentó la mayor incidencia sobre los discos.

El aislamiento Bc024 presentó la mayor incidencia del moho gris sobre los discos tratados con Carbendazim, con un 78%, seguido de los aislamientos Bc022 y Bc023 con un 56%. El aislamiento Bc024, de igual forma, presentó menor inhibición del crecimiento diametral y una germinación superior al 95%, después de 24 horas.

La mayor incidencia del moho gris sobre los discos tratados con Mancozeb fue para los aislamientos Bc012 y Bc019 con un 44% y Bc008, Bc014 y Bc017 con un 33%.

Es importante tener en cuenta que los principios activos evaluados corresponden a los fungicidas que actualmente usan los productores

de mora para el control de *B. cinerea* en sus cultivos, en los municipios de Silvania y La Ceja; por lo tanto, los resultados obtenidos mostraron que los aislamientos, independientemente de su origen, fueron principalmente sensibles a Difenconazol y a Procloraz, posiblemente debido a su corto tiempo de uso; en tanto que mostraron tolerancia a Carbendazim, Benomil y Mancozeb, por ser los principios activos que presentan mayor tiempo de uso. Consecuentemente, es importante resaltar que el uso frecuente, la no rotación del producto o el abuso en las dosis, podría generar resistencia por parte del patógeno a los diferentes principios activos y, como consecuencia, una posible resistencia negativa y cruzada.

Sensibilidad en campo de B. cinerea a fungicidas utilizados para su control en el cultivo de mora en los municipios de La Ceja y Silvania

En los cultivos donde se desarrollaron los bioensayos, tanto en La Ceja como en Silvania, se presentó una alta incidencia de moho gris, debido a las constantes lluvias. La mayor incidencia de la enfermedad fue evidente en los cultivos de Silvania, donde los productores reportaron pérdidas en la producción hasta de un 50%. Tanto en La Ceja como en Silvania se desarrollaron colonias de *B. cinerea* en las cajas Petri correspondientes al control, siendo mayor la presencia de colonias en las cajas expuestas en los cultivos de Silvania (entre 6 y 14 UFC), con respecto a las cajas expuestas en los cultivos de La Ceja (entre 4 y 10 UFC) (Figura 7).

De los siete fungicidas evaluados, Carbendazim, Benomil y Difenconazole fueron los principios activos que registraron la mayor cantidad de UFC de *B. cinerea*, siendo mayor para los cultivos de Silvania (entre 4 y 11 UFC para Carbendazim, entre 1 y 7 para Benomil y entre 1 y 5 para Difenconazole), en tanto que para los cultivos de La Ceja se encontró entre 3 y 7 UFC para Carbendazim, entre 1 y 3 para Benomil y entre 1 y 3 para Difenconazole (Figura 7).

En cuanto a Captan, en la dosis completa se registró 1 UFC en uno de los cultivos de Silvania, mientras que para la dosis media se encontró 1 UFC para uno de los cultivos de La Ceja, y entre 2 y 3 UFC para dos cultivos de Silvania. Por otra parte, para Iprodión, en la dosis completa, se presentó 1 UFC en uno de los cultivos, tanto de La Ceja como de Silvania, en tanto que para la dosis media solo tres cultivos de La Ceja presentaron desarrollo de, al menos, 1 UFC (Figura 7).

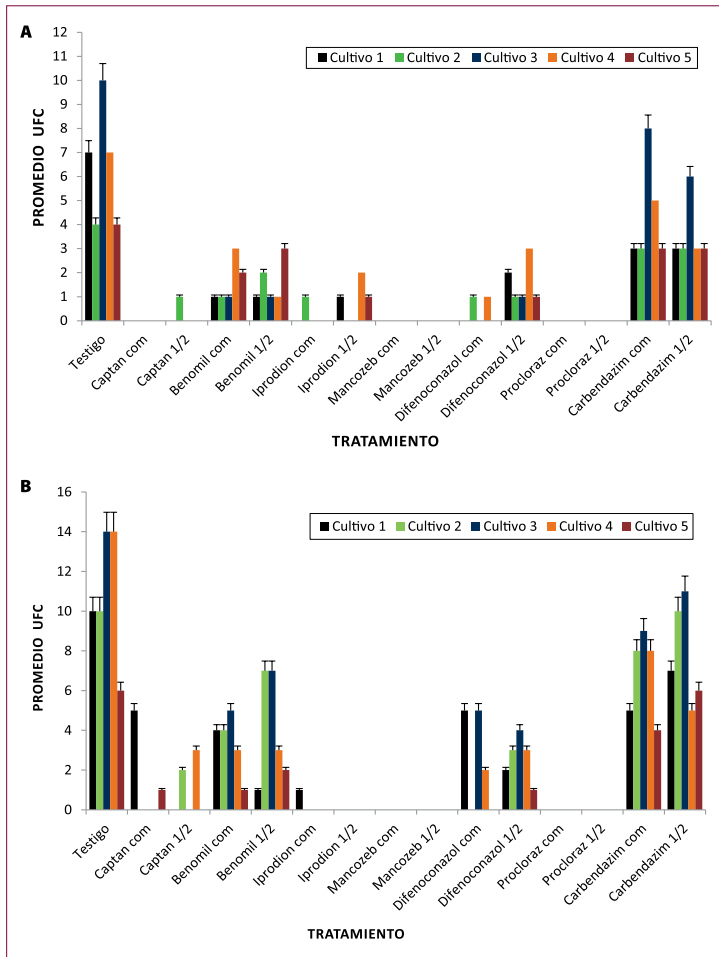


Figura 7. Unidades formadoras de colonia de *B. cinerea* obtenidas en las cajas Petri expuestas en cultivos de mora: **A.** Municipio de La Ceja. **B.** Municipio de Silvania.

Por otro lado, para Procloraz y Mancozeb no se registró el crecimiento de *B. cinerea* en ninguno de los cultivos de los dos municipios, planteando la posibilidad de que en estos cultivos no existen poblaciones del patógeno resistentes a estos productos (Figura 7).

Carbendazim, Benomil y Difenoconazol fueron los fungicidas que presentaron la mayor cantidad de UFC en todos los cultivos; con respecto a Captan e Iprodión, con estos, aunque se evidenció desarrollo del patógeno, fue limitado tanto en la cantidad de UFC como en la cantidad de cultivos. Si bien Carbendazim, Benomil y Difenoconazol no tienen efecto sobre la germinación de los conidios (lo que haría suponer que una vez que el

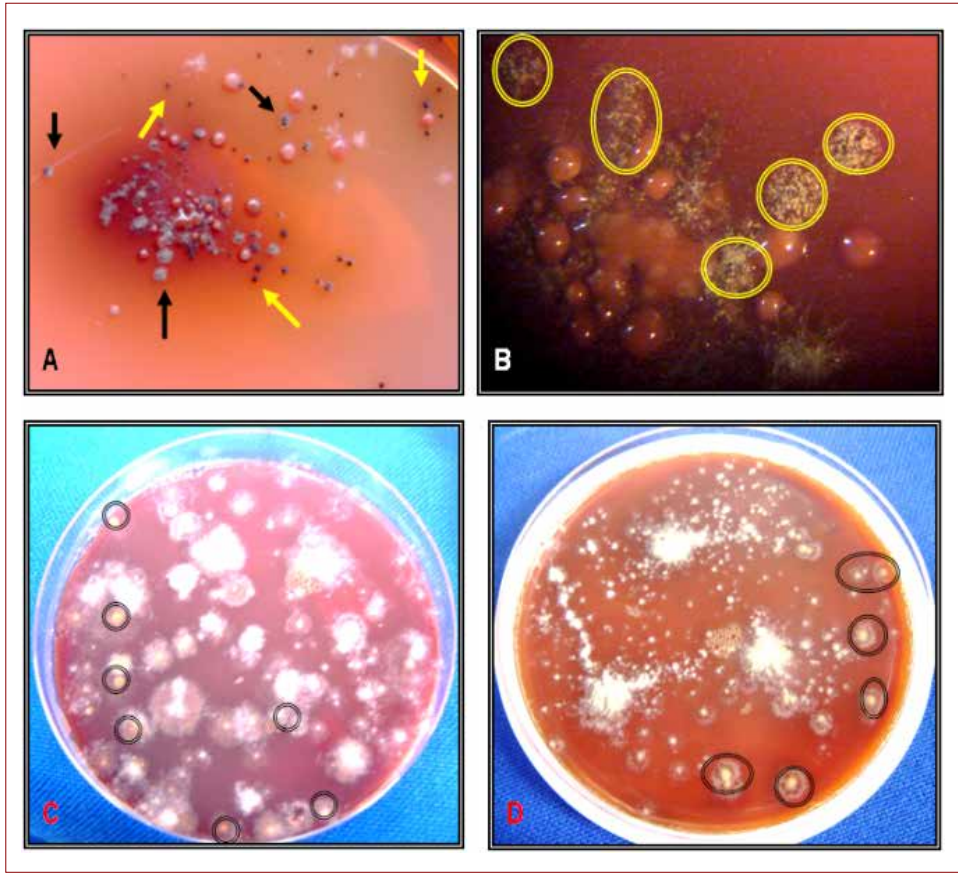


Figura 8. Crecimiento de *B. cinerea* en medio BSM con tres fungicidas en su dosis completa. A. Colonias (flechas negras) y esclerocios (flechas amarillas) en medio con Difenconazole. B. Imagen aumentada de las colonias en el mismo medio, en la que se observa en las colonias (círculos amarillos), los conidióforos y los conidios del hongo. C. Colonias (círculos negros) en medio con Benomil. D. Colonias (círculos negros) en medio con Carbendazim. Se observa el cambio de color del medio de cultivo por acción de la degradación del ácido tánico por la enzima lacasa.

conidio alcanza el medio de cultivo, podría germinar pero no alcanzar un desarrollo notable). Los resultados obtenidos sugieren que podría haber un fenómeno de resistencia de este patógeno a los tres productos mencionados.

Conclusiones

Los aislamientos de *B. cinerea* evaluados presentaron tolerancia a los fungicidas Benomil, Carbendazim y Mancozeb, ya que la germinación de los conidios, el crecimiento diametral, la colonización y el crecimiento

del hongo en los discos de foliolos no se vio afectado. De igual forma, en la evaluación de la tolerancia de *B. cinerea* en campo, estos fungicidas mostraron no ser efectivos en el control del patógeno.

Los fungicidas Difenoconazol y Procloraz fueron efectivos para el control de *B. cinerea*, ya que inhibieron la germinación de los conidios y el crecimiento del hongo *in vitro*.

Referencias bibliográficas

- Benito, P.; Arranz, M. & Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. En: *Rev. Iberoam. Micol* 17: S43-S46.
- De Liñán, V. (1997). *Farmacología vegetal*. Ediciones Agrotécnicas, S.L. España. Pp. 108, 177, 182, 368, 663, 708 y 909.
- Edwards, S.G. & Seddon, B. (2001). Selective Media for the Specific Isolation and Enumeration of *Botrytis cinerea* Conidia. En: *The Society for Applied Microbiology* 32: 63-66.
- Elad, E.; Williamson, P.; Tudzynski, P. & Delen, N. (2004). *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. En: *Springer* 13: 195-217.
- Ellis, M.; Converse, R.; William, R. & Williamson, B. (1991). *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects*. APS Press. The American Phytopathological Society, USA. Pp. 21-23.
- Hayashi, K.; Schoonbeek H. & Waard, M. (2002). Expression of the ABC Transporter BcatrD From *Botrytis cinerea* Reduces Sensitivity to Sterol Demethylation Inhibitor Fungicides. En: *Pesticide Biochemistry & Physiology* 73: 110-121.
- Jiang, J.; Ding, L.; Michailides, T.; Li, H. & Ma, Z. (2009). Molecular Characterization of Field Azoxystrobin-resistant Isolates of *Botrytis cinerea*. En: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 72-76.
- Kerssies, A. (1990). A Selective Medium for *Botrytis cinerea* to be Used in a Spore-trap. En: *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96: 247-250.
- Latorre, B.A.; Spadaro, I. & Rioja, M.E. (2002). Occurrence of Resistant Strains of *Botrytis cinerea* to Anilinopyridine Fungicides in Table Grapes in Chile. En: *Crop Protection* 21: 957- 961.
- Mikani, A.; Etebarian, H.R.; Sholberg, P.L.; O`Gorman, D.T.; Sotkes, S. & Alizadeh, A. (2007). Biological Control of Apple Gray Mold Caused by *Botrytis allii* with *Pseudomonas fluorescens* Strains. En: *Postharvest Biology and Technology* 48: 107-112.
- Pardo C., Víctor M. (1995). *Hongos fitopatógenos de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Medellín. 54 p.
- (RAP-AL) *Red de acción en plaguicidas y sus alternativas para América Latina*. Oficina de Comunicaciones y Administración. (2008). [En línea]
http://www.rap-al.org/articulos_files/Benomil_Enlace_81.pdf. [Consultado: diciembre de 2011].

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 Difenconazol 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).

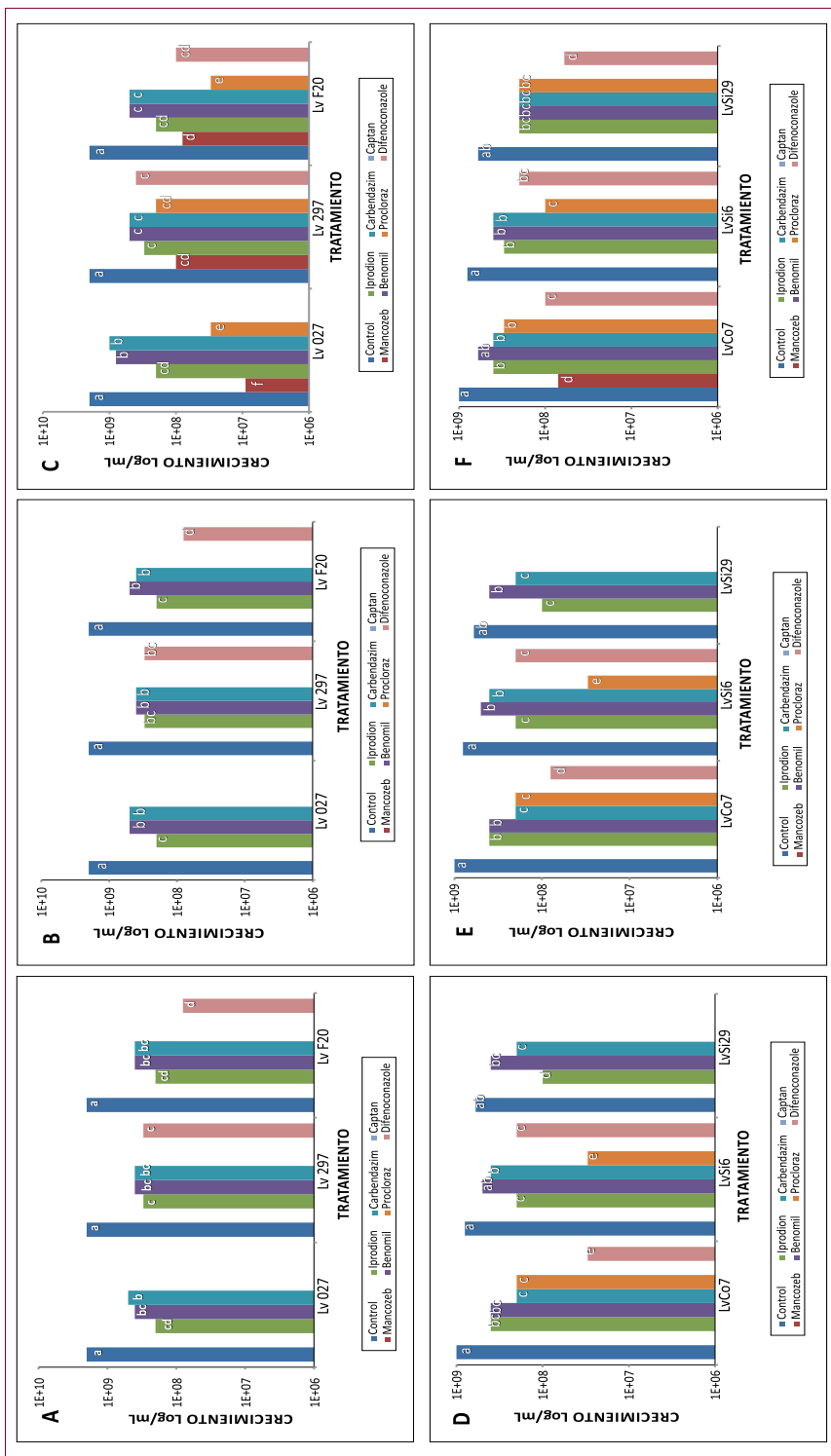


Figura 9. Efecto de siete fungicidas usados para el control de *B. cinerea* en el cultivo de mora en tres dosis sobre el crecimiento de tres cepas de *P. onychis* (A, B y C) y tres de *R. glutinis* (D, E y F), después de 72 horas de incubación. Dosis de fungicida completa (A y D), media (B y E) y un 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*.

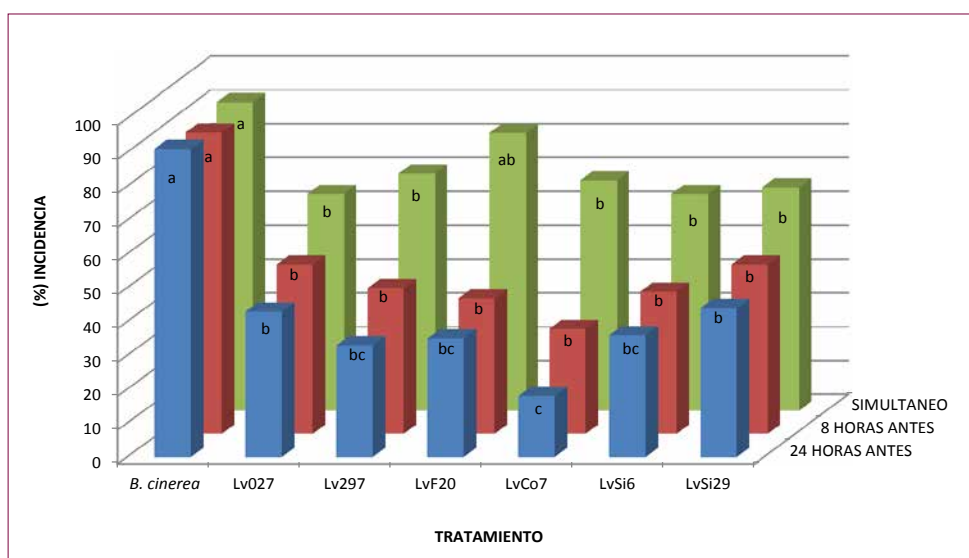


Figura 10. Incidencia del moho gris en flores de mora después de cinco días de inoculación, evaluando tres tiempos de aplicación de las levaduras respecto a la inoculación de *B. cinerea*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con $\alpha: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

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).

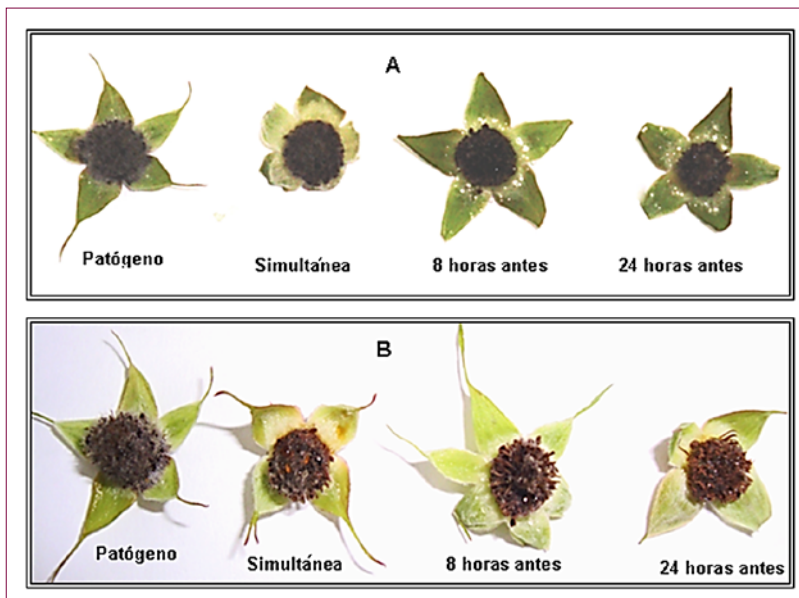


Figura 11. Control de *B. cinerea* con las levaduras en los tres periodos de tiempo evaluados. A. Flores inoculadas con la levadura LvCo7. B. Flores inoculadas con la levadura Lv297.

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

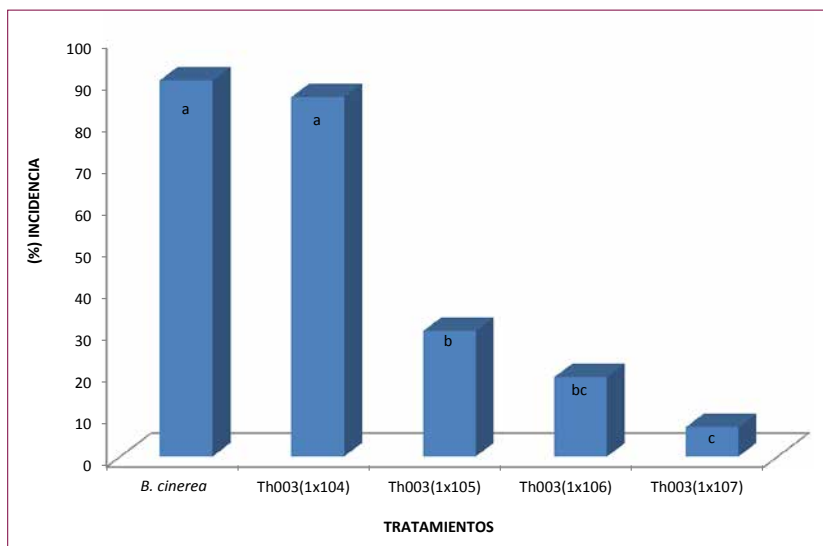


Figura 12. Concentración mínima efectiva del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003 sobre el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con α : 0,05.

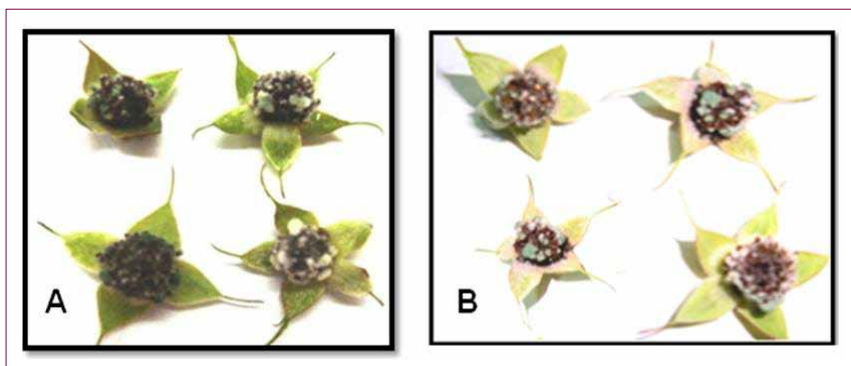


Figura 13. Flores de mora tratadas con el bioplaguicida a una concentración de (A) 1×10^6 conidios.mL⁻¹ y (B) 1×10^7 conidios.mL⁻¹, después de cinco días de incubación.

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).

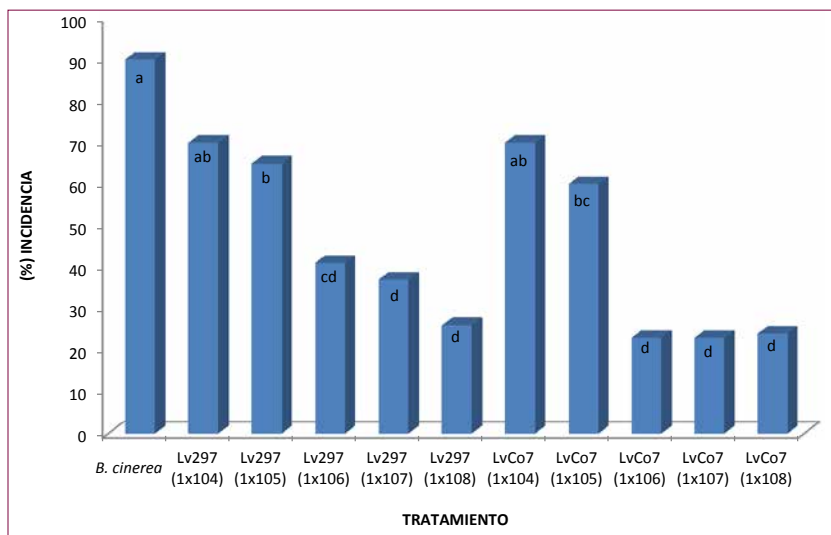


Figura 14. Concentración mínima efectiva de las levaduras en el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con α : 0,05.

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.

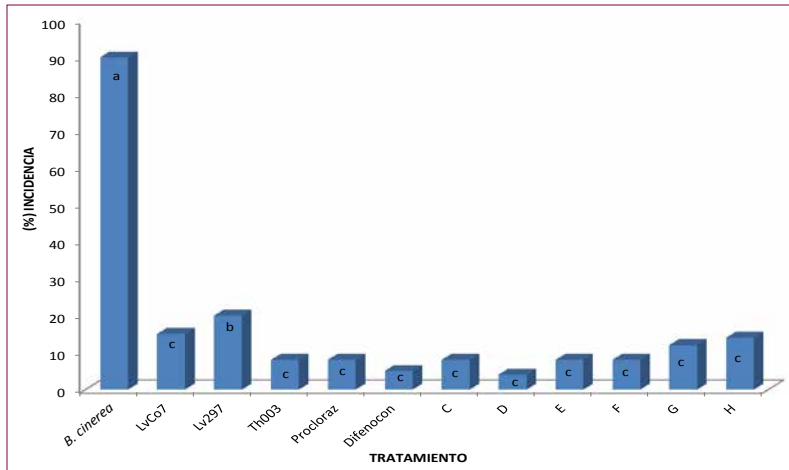


Figura 15. Efecto de la combinación de los antagonistas con dos fungicidas sobre el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. C. (Lv297 + Plocloraz) D. (Lv297 + Difenconazol) E. (LvCo7 + Plocloraz) F. (LvCo7 + Difenconazol) G. (Th003 + Plocloraz) H. (Th003 + Difenconazol).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

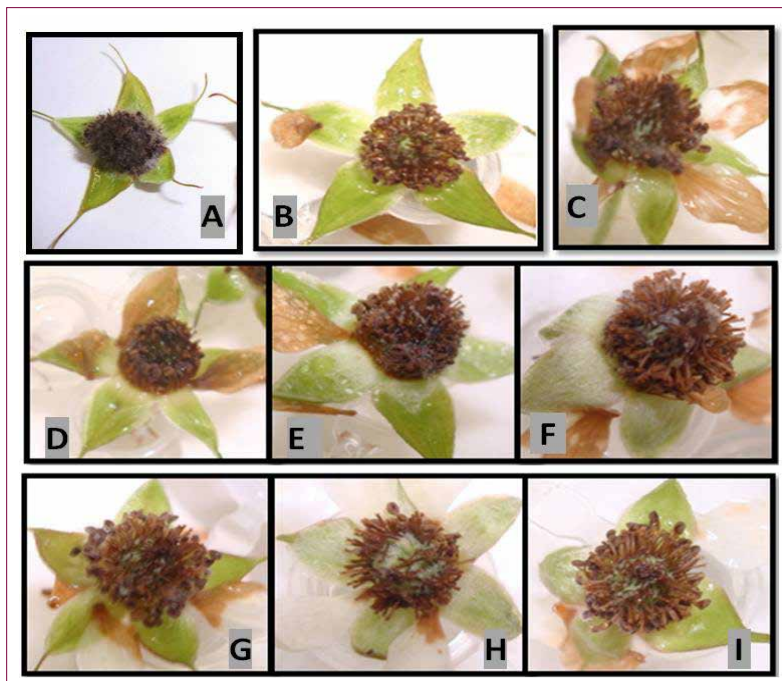


Figura 16. Efecto de la combinación entre los antagonistas y dos fungicidas en el control de *B. cinerea* en flores de mora después de 5 días de incubación. A. Testigo patógeno. B. Procloraz. C. Difenconazol. D. Lv297 + Procloraz. E. LvCo7 + Procloraz. F. LvCo7 + Procloraz. G. Th003 + Procloraz. H. Lv297+Difenconazol.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

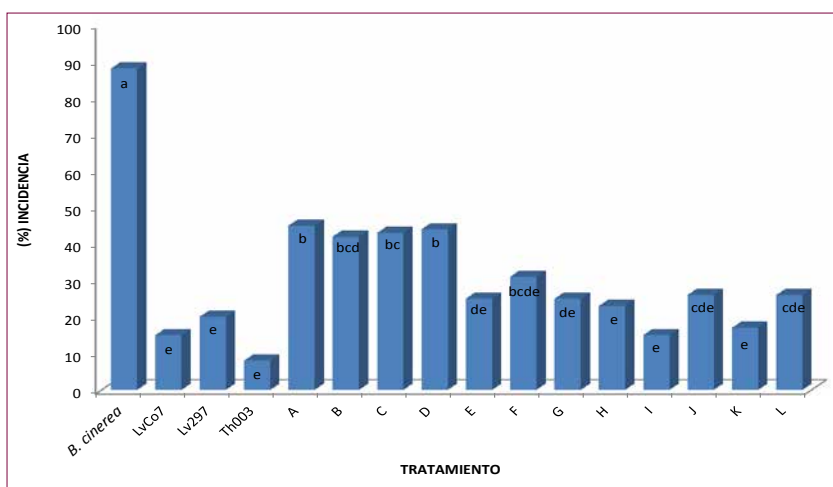


Figura 17. Efecto de la combinación de biocontroladores en el control de *B. cinerea* en flores de mora. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey con α : 0,05.

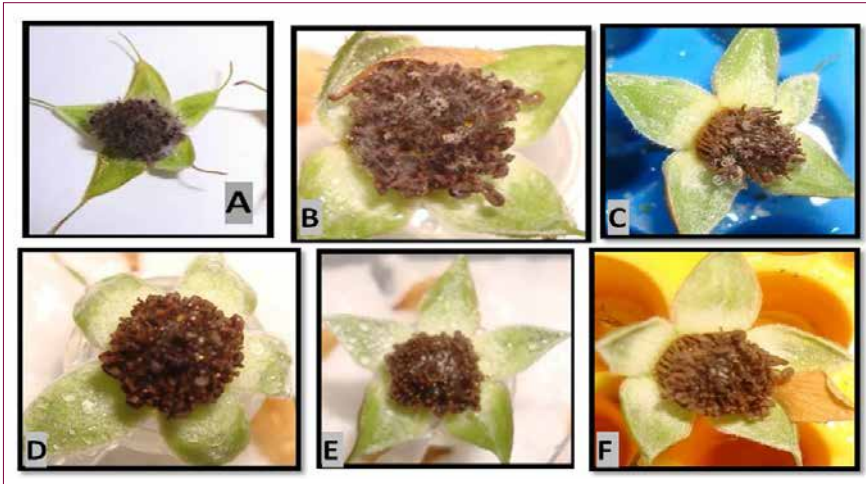


Figura 18. Efecto de la combinación de los biocontroladores en el control de *B. cinerea* en flores de mora después de cinco días de incubación. A. Testigo patógeno. B. Combinación de las levaduras a 1×10^6 células.mL⁻¹. C. Combinación de las levaduras Lv297 (1×10^7 células.mL⁻¹) y LvCo7 (1×10^6 células.mL⁻¹). 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. N° 2. P. 86-96.
- Buck, J. & Jeffers, S. (2004). Effect of Pathogen Aggressiveness and Vinclozolin on Efficacy of *Rhodothrauxa 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 Phyllosphere 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.

CAPÍTULO 3.

PRODUCCIÓN MASIVA DE *Rhodotorula glutinis* CEPA LVCo7

Andrés Díaz García y Cindy Mejía Maldonado

Resumen

Para el diseño de un medio de cultivo adecuado para la producción de biomasa de la levadura *Rhodotorula glutinis* LvCo7 se aplicaron experimentos secuenciales a nivel de laboratorio, primero, un diseño exploratorio usando la técnica de microfermentación, para determinar el rango de concentraciones adecuadas de fuente de carbono, nitrógeno, sales y pH; posteriormente se aplicaron diseños eficientes para estandarizar las concentraciones de nutrientes y generar los parámetros de rendimiento y eficiencia del proceso en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL; por último, se validaron los resultados obtenidos en biorreactor STR con ajustes iniciales en los parámetros fisicoquímicos de la fermentación (agitación, aireación y pH).

Estas condiciones fueron utilizadas para la producción rutinaria de la biomasa requerida para los procesos de formulación del prototipo que fue aplicado en campo en el cultivo de mora.

Introducción

La producción masiva de un microorganismo para el desarrollo de un bioplaguicida es una etapa crítica del proceso de obtención de un bioproducto, ya que, dependiendo de la calidad de la biomasa producida en esta etapa, se podrán cumplir los requerimientos mínimos de concentración y pureza requeridos por las operaciones “aguas abajo” del proceso de fermentación; es decir, aquellas relacionadas con la formulación del bioproducto.

La estandarización de la producción masiva conlleva a la aplicación de múltiples herramientas metodológicas, técnicas analíticas y análisis estadísticos, por un lado, y requiere del conocimiento y la experiencia del investigador a cargo, por el otro.

El objetivo final es la definición de una estrategia detallada de la operación unitaria de fermentación, lo que involucra no solo el diseño de un medio de cultivo específico para el microorganismo, sino la determinación experimental de las condiciones fisicoquímicas clave (agitación, aireación, pH) que deben ser aplicadas en el transcurso del proceso, para alcanzar la productividad deseada.

Metodología

Diseño del medio de cultivo por microfermentación

Se determinó el efecto de la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, así como el pH, sobre el crecimiento de *R. glutinis* LvCo7, expresado como absorbancia y utilizando como microfermentador una placa de Elisa de 96 pozos de 400µL. Se aplicó un diseño factorial completo, evaluando tres niveles por factor (Tabla 4), lo que equivale a $3^3=27$ tratamientos por triplicado, es decir, 81 pozos.

Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los siguientes tratamientos: un control absoluto (pozo vacío), un control negativo (250 µl de agua estéril), un control positivo 1 (200 µl de caldo YM estéril), un control positivo 2 (200 µl de caldo YPD estéril) y un tratamiento sin sales en el que se dispensaron 25 µl del nivel alto de las soluciones de carbono y nitrógeno y 150 µl de agua, el pH se ajustó por adición de ácido o base. Las condiciones de fermentación fueron: temperatura de 28°C, agitación constante a 100 rpm y volumen de trabajo de 250µl.

Tabla 4. Niveles de los factores evaluados en el proceso de microfermentación para *R. glutinis* LvCo7

Nivel	Carbono (g.l ⁻¹)	Nitrógeno (g.l ⁻¹)	pH
-1	2,5	1	4
0	10	4	7
1	20	8	9

Se realizaron mediciones de absorbancia cada hora, durante 48 horas, en un lector de Elisa Asys Hitech® Expert 96 a 450 nm.

Los datos ajustados se sometieron inicialmente a un análisis de varianza, para determinar si alguno de los factores presentó un efecto significativo; posteriormente se realizó un análisis de Pareto para determinar la magnitud de dicho efecto y se analizaron los coeficientes del modelo generado, para determinar la dirección del efecto (positivo o negativo) sobre la variable de respuesta. Finalmente, se graficaron las respuestas por pares de factores, para generar las superficies de respuesta que permitieron visualizar en tres dimensiones hacia qué región se presentó el factor óptimo de la respuesta (absorbancia).

Resultado

Del análisis de varianza se concluyó que solamente el factor nitrógeno presentó un efecto significativo sobre la absorbancia. Al complementar este análisis con la interpretación de la gráfica de Pareto (Figura 19), se obtuvo que el nitrógeno presentó un efecto aproximadamente dos veces superior con respecto al carbono y ocho veces con respecto al pH; este resultado indica que los niveles seleccionados de los factores fueron adecuados, ya que los efectos estandarizados estuvieron muy similares y poco significativos.

Igualmente, al analizar los coeficientes del modelo de predicción (datos no mostrados), se observó que todos los factores presentaron un efecto positivo, es decir, directamente proporcional sobre la respuesta. Sin

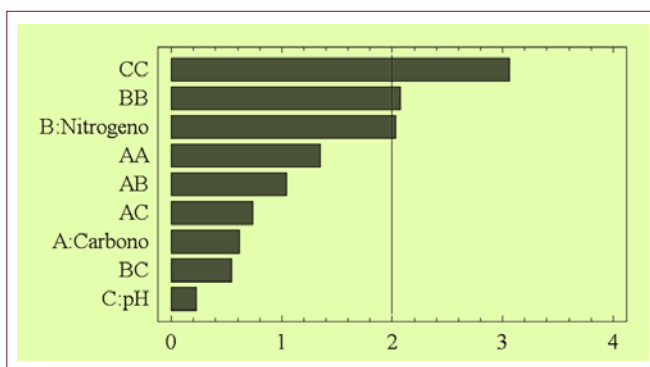


Figura 19. Gráfica de Pareto. En el eje Y se presentan los factores e interacciones evaluadas, y en el eje X, el efecto estandarizado de las mismas. La línea vertical azul representa la significancia del factor con un nivel de confianza del 95%.

embargo, el modelo generado presentó un bajo poder de predicción (15,6% de la variabilidad experimental), además de que el modelo está restringido al espacio experimental evaluado.

Al realizar el análisis individual de las superficies de respuesta, se pudo observar que la mejor respuesta se dirigió hacia los siguientes niveles: carbono, 0; nitrógeno, 0; pH, -1 o +1, puesto que la respuesta para carbono y nitrógeno es cóncava hacia arriba, mientras que la respuesta para pH es cóncava hacia abajo. También cabe resaltar el efecto del pH sobre la variable de respuesta, ya que, a pesar de que no es significativo, sí es muy importante su ajuste inicial en el nivel -1 o +1, puesto que si se usa el nivel cero, se cae en un “valle profundo” que disminuye la respuesta, como se observa en las gráficas tipo “silla de montar invertida”, que son muy similares para las interacciones pH-carbono (Figura 20).

De acuerdo con el análisis gráfico, se formuló el medio de cultivo codificado como ML7 (fuente de carbono de 12,9 g.L⁻¹, de nitrógeno de 4,6 g.L⁻¹, una solución concentrada de sales 1X y pH inicial ajustado a 9,0), el cual se utilizó para estandarizar la producción masiva de la levadura en Erlenmeyer y biorreactores.

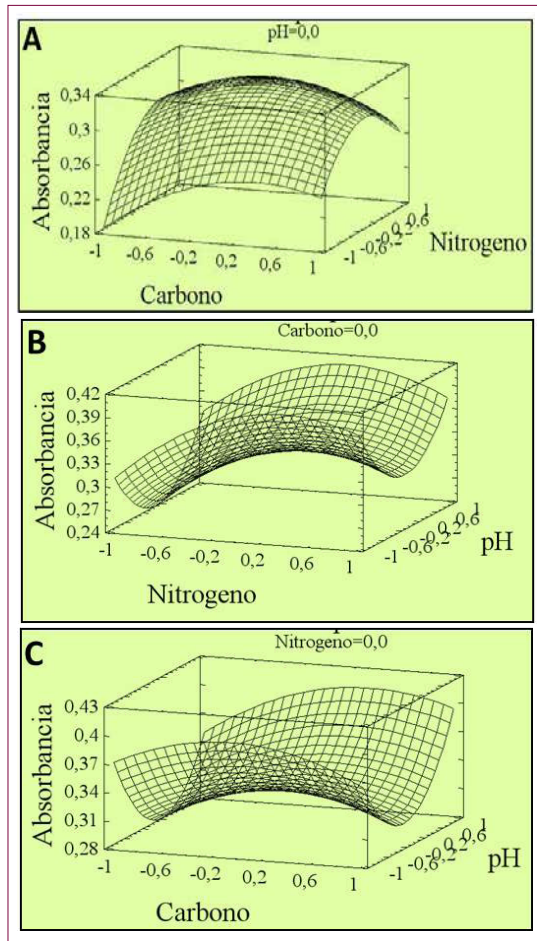


Figura 20. Comportamiento de la variable de respuesta en el espacio experimental. A. Factor pH. B. Factor nitrógeno. C. Factor carbono.

Metodología

Estandarización del proceso de producción masiva en Erlenmeyer

Se evaluó el crecimiento de la levadura en el medio ML7 en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL, en volúmenes de trabajo de 25 mL y 100 mL, respectivamente, con una concentración inicial de 1×10^7 células.mL⁻¹, una temperatura de incubación 28°C y una agitación de 150 rpm. Para determinar

el crecimiento se realizaron muestreos hasta las 96 horas de fermentación y se les realizó su recuento en cámara de Neubauer. Al final de la cinética de crecimiento se cuantificaron los azúcares reductores mediante la técnica de DNS modificada (Godoy, 2002) y la viabilidad de las células, mediante el recuento en placa.

Adicionalmente se determinó el peso seco para los tiempos de fermentación óptimo y total; para esto se tomaron 1,5 mL de medio de cultivo y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se determinó el porcentaje de humedad de la biomasa para posteriormente establecer el peso seco generado.

Resultado

Sin importar el volumen de trabajo, *R. glutinis* LvCo7 presentó una cinética de crecimiento con una primera fase caracterizada por un rápido crecimiento, seguida por una fase de disminución en la velocidad de crecimiento, hasta llegar al inicio de la fase estacionaria a la hora 42 (Figura 21), demostrando un efecto poco significativo del cambio de volumen sobre el crecimiento de la levadura, lo cual puede atribuirse a la similitud en la geometría y en el volumen de líquido y aire dentro de los Erlenmeyers, que se mantuvo proporcional en los dos niveles.

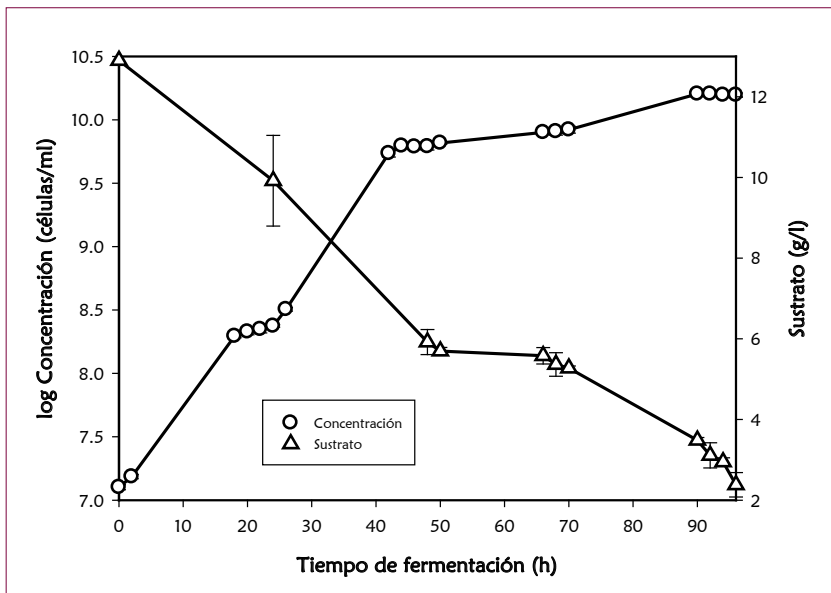


Figura 21. Cinética de crecimiento de *R. glutinis* LvCo7 en Erlenmeyer de 500 mL.

Al finalizar el tiempo de fermentación se presentó un consumo de sustrato superior al 97% y 82% en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL, respectivamente; esto indica que el medio de cultivo es eficiente y que los requisitos nutricionales que las células de levadura requieren para su crecimiento y división (carbono, nitrógeno y microelementos) se encuentran balanceados (Tabla 5); adicionalmente, este hecho garantiza una concentración de sustrato residual muy baja en la biomasa final, facilitando el diseño de las operaciones unitarias de concentración y purificación. Al comparar las magnitudes obtenidas, se observó en Erlenmeyer de 500 mL una disminución en la biomasa seca, que conllevó a un descenso de la productividad y a un menor consumo de sustrato (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de eficiencia de *R. glutinis* LvCo7 en Erlenmeyers de 125mL y 500mL

Volumen mL	Hora	Biomasa seca (g.L ⁻¹)	Productividad (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimiento (g.g ⁻¹)	Sustrato consumido (%)
125	96	11,30	0,11	0,89	97
500	96	9,38	0,10	0,89	82

En esta etapa se dilucidaron las cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para la levadura y se clarificaron algunas tendencias y fenómenos que deben ser corroborados a nivel de biorreactor, en los que las condiciones de agitación y aireación son muy diferentes. Por ahora, los resultados son promisorios, ya que la concentración celular final está cercana a 1×10^{10} células.mL⁻¹ al final de la fermentación, que es el objetivo para poder llevar a cabo las operaciones unitarias “aguas abajo”.

Metodología

Validación del proceso de producción de biomasa en biorreactor Airlift

Para validar la producción de la levadura se utilizó un biorreactor Airlift con una capacidad de 20 litros de lazo interno, con tubos concéntricos diseñado por Flórez y Díaz (2002) y que consta de tres secciones: una de ascenso, otra de descenso y otra de desgasificación (Figura 22). Este tipo de equipos tienen la particularidad de no usar agitación mecánica, dado que el aire que se inyecta al sistema cumple con las funciones de aireación, agitación y homogeneización.

Se realizó la cinética de crecimiento de *R. glutinis* LvCo7, utilizando un volumen efectivo de trabajo de 10 litros, con una concentración inicial de

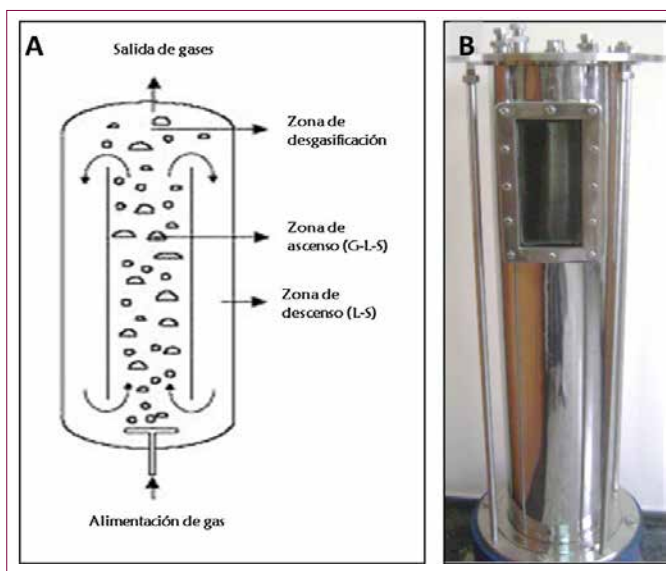


Figura 22. A. Vista esquemática de las secciones de un biorreactor Airlift de lazo interno con tubos concéntricos (Fuente: <http://www.revistavirtualpro.com/revista/index.php?ed=2006-01-01&pag=18>). B. Vista general del equipo utilizado en el presente trabajo (Fuente: Díaz, 2011).

$1,3 \times 10^7$ células.mL⁻¹ y una temperatura de incubación de 28°C. Se realizaron muestreos regulares hasta la hora 96, para determinar la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer, azúcares reductores, pH y peso seco a las 24, 52 y 72 horas.

Resultado

La cinética de crecimiento es típica con tres fases: una inicial de crecimiento exponencial, una intermedia de desaceleración y una final cuasi-estacionaria, para alcanzar una concentración celular final de $1,3 \times 10^9$ células.mL⁻¹. Este valor es inferior con respecto al obtenido en Erlenmeyer de 500 mL, en el que se alcanzaban valores de 1×10^{10} células.mL⁻¹.

Hasta la hora 52 de fermentación solo se presentó un consumo del 40% de la fuente de carbono (Tabla 5), a diferencia de la fermentación en Erlenmeyer de 500 mL, en la que fue superior al 80%, obteniéndose un rendimiento de 0,7 g.g⁻¹.

Por otra parte, el consumo de sustrato al finalizar el tiempo de fermentación establecido fue de 52%, manteniendo el rendimiento a través del tiempo, sin

embargo en este lapso de tiempo la productividad disminuyó de 0,16 g.L⁻¹.h⁻¹ a 0,09 g.L⁻¹.h⁻¹, debido a la disminución en la velocidad de crecimiento (Tabla 6). El valor de consumo de sustrato fue inferior en un 21% con respecto al obtenido en Erlenmeyer de 500 ml; este fenómeno, aunado con la concentración celular final, es indicadores de que el proceso de fermentación en biorreactor Airlift demostró ser menos eficiente que el llevado a cabo en Erlenmeyer, bajo las condiciones evaluadas. Esto se podría atribuir a que la luz es un factor importante en el crecimiento de las levaduras del género *Rhodotorula* (Yen *et al.*, 2011), y en el caso del biorreactor Airlift, debido a su diseño, las levaduras no están expuestas a una fuente de luz constante, lo que pudo tener un efecto negativo sobre el crecimiento microbiano.

Tabla 6. Parámetros de eficiencia obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor Airlift de 20 litros

Hora	Peso seco (g.L ⁻¹)	Productividad (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimiento (g.g ⁻¹)	Sustrato consumido (%)
72	6,70	0,09	0,9	52

En la cinética de crecimiento se observó una fase de crecimiento exponencial hasta la hora 26, cuando se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento (0,13 h⁻¹), con un tiempo de duplicación de 5,4 horas, seguida de una fase de desaceleración del crecimiento hasta 0,05 h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 13,7 h a partir de la hora 26 (Figura 23). Finalmente, a partir de la hora 50 se presentó una fase cuasi-estacionaria, con una disminución de la velocidad específica de crecimiento hasta 0,02 h⁻¹, con aumento en

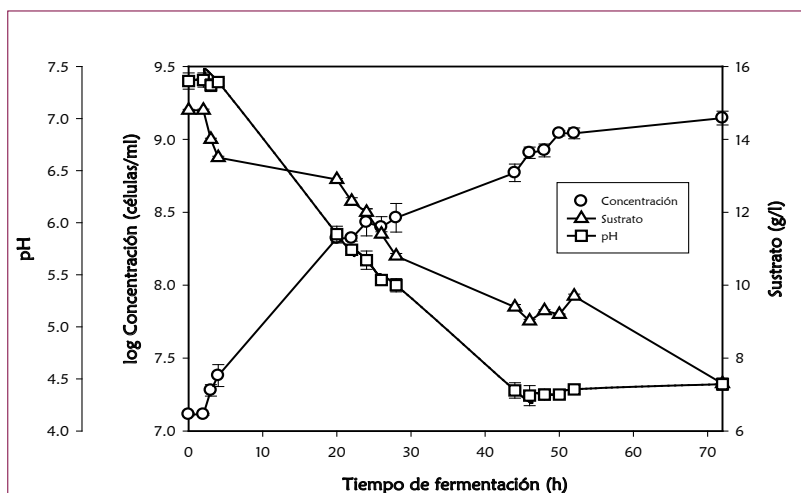


Figura 23. Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y evolución del pH para *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor Airlift de 20 litros.

el tiempo de duplicación hasta un valor de 43,3 h, para un total de ocho generaciones a través de todo el proceso (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor Airlift de 20 litros

Variable	Fase I (hora 0-26)	Fase II (hora 26-50)	Fase III (hora 50-72)
Modelo cinético	$0,1291x - 0,0204$ $R^2 = 0,98$	$0,0506x + 1,7105$ $R^2 = 0,98$	$0,0157x + 3,4911$ $R^2 = 0,97$
Velocidad específica μ_x	0,13 h ⁻¹	0,05 h ⁻¹	0,02 h ⁻¹
Tiempo de duplicación t_d	5,4 h	13,7 h	43,3 h
No. de generaciones	5	2	1
No. total de generaciones	8		

Los cambios en las cinéticas obtenidas en biorreactor, en comparación con la obtenida con Erlenmeyer, son resultado del cambio en el tipo de aireación y en los patrones de flujo y agitación, así como el cambio de volumen de producción.

Metodología

Validación del proceso de producción de biomasa en biorreactor STR

Para validar la producción de la levadura se utilizó un biorreactor STR Infors, modelo Labfors 3® (Figura 24). Se realizó la cinética de crecimiento de *R. glutinis* LvCo7, utilizando un volumen efectivo de trabajo de ocho litros con una concentración inicial de 1×10^7 células.mL⁻¹, una temperatura de incubación de 28°C, aireación de 0,5 vvm y agitación de 150 rpm. Se realizaron muestreos regulares hasta la hora 66, para determinar la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer, azúcares reductores, pH y peso seco.

Resultados

La aireación y agitación mecánica favorecieron la transferencia de sustrato y de oxígeno a través de todo el medio de cultivo, ya que se presentó una mayor velocidad de crecimiento durante las primeras 18 horas, correspondiente a 0,22 h⁻¹, es decir, casi el doble de la velocidad de crecimiento, en comparación con el biorreactor Airlift; sin embargo, posteriormente se presentó un fenómeno similar de desaceleración del crecimiento que se reflejó en una velocidad de 0,05 h⁻¹ (Tabla 8), que disminuyó hasta 0,02 h⁻¹ y que se puede

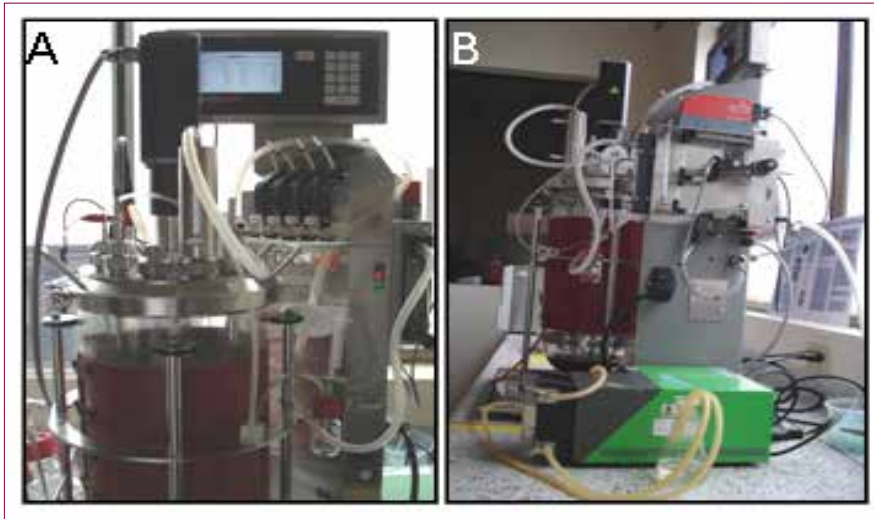


Figura 24. A. Vista frontal del biorreactor Labfors 3[®]; se observa el display LCD que permite el monitoreo y control de las variables de la fermentación, los sistemas de acople del vaso de vidrio con la tapa en acero inoxidable con 12 puertos, el acople del motor que suministra la agitación y las cuatro bombas peristálticas disponibles. B. Vista lateral del biorreactor; se observa el sistema de mezclados de gases, la conexión a la fuente de poder, la chaqueta para el control de la temperatura y el acople con una bomba peristáltica externa (Fuente: Díaz, 2011).

considerar como fase estacionaria. El pH final estuvo en el orden de 4,7, valor que estuvo 0,2 por encima en comparación con el biorreactor Airlift (Figura 25); por otra parte, la concentración celular final fue de 3×10^9 cél. mL⁻¹, tres veces mayor a la concentración obtenida en el biorreactor Airlift.

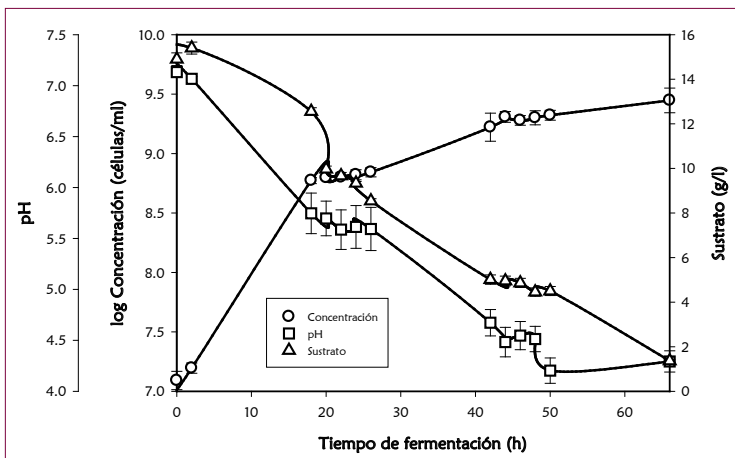


Figura 25. Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y evolución del pH para *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor STR de 13 litros.

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor STR de 13 litros

Variable	Fase I (hora 0-18)	Fase II (hora 18-44)	Fase III (hora 44-66)
Modelo cinético	$0,2171x - 0,1284$ $R^2 = 0,99$	$0,0485x + 2,8179$ $R^2 = 0,97$	$0,0169x + 4,2238$ $R^2 = 0,94$
Velocidad específica μ_x	0,22 h ⁻¹	0,05 h ⁻¹	0,02 h ⁻¹
Tiempo de duplicación t_d	3,2 h	14 h	41 h
No. de generaciones	6	2	1
No. total de generaciones	9		

Adicionalmente, en el sistema de tanque agitado se observó un mayor consumo de sustrato (superior al 90%), en un menor tiempo (66 horas), cuando se comparó con el sistema Airlift, en el que apenas se alcanzó un consumo de 52% en 72 horas de fermentación. En procesos de fermentación similares se ha demostrado que la agitación mecánica (en el orden de 200 rpm) favoreció la producción de biomasa de la levadura *R. glutinis*, hasta alcanzar una concentración celular de 10,35 g.L⁻¹ en un periodo de tiempo de 94 horas (Tinoi *et al.*, 2005).

Al analizar los parámetros de eficiencia se observó que la productividad fue de 0,14g.L⁻¹.h⁻¹, que es un 60% superior a la obtenida en Airlift (0,09 g.L⁻¹.h⁻¹) (Tabla 9). Por otro lado, la biomasa final obtenida en el biorreactor STR fue 37% mayor, en comparación con la obtenida después de 72 horas en el biorreactor Airlift, lo que indica que las condiciones de agitación y aireación son adecuadas para la producción de biomasa; esto se ha demostrado para aislamientos de esta levadura (Aksu *et al.*, 2007).

Tabla 9. Parámetros de eficiencia obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor STR de 13 litros

Hora	Peso seco g/L	Productividad (g.L ⁻¹ . h ⁻¹)	Rendimiento (g.g ⁻¹)	Sustrato consumido (%)
66	9,17	0,14	0,65	91,17

Conclusión

Se diseñó un medio de cultivo económico y eficiente para la producción de biomasa de la levadura *R. glutinis* LvCo7 a nivel de laboratorio y se estandarizó una metodología de producción masiva que incluyó el ajuste de condiciones fisicoquímicas en dos tipos de biorreactores (tanque agitado y Airlift). Con los resultados obtenidos se seleccionó el sistema de tanque agitado como el ideal para la producción de biomasa, en ensayos que

involucren esta levadura a nivel de invernadero y campo, ya que con éste se presentó la mayor productividad (0,14 g biomasa.litro⁻¹.hora⁻¹), con un aprovechamiento del sustrato superior al 90%.

Adicionalmente, la información experimental generada permitirá la definición de una estrategia de escalamiento para la producción de biomasa a nivel piloto o industrial.

Referencias bibliográficas

- Aksu, Z. & Eren, A.T. (2007). Production of Carotenoids by the Isolated Yeast of *Rhodotorula glutinis*. En: *Biochemical Engineering Journal*. 35: 107-113.
- Flórez, J. & Díaz, A. (2002). *Diseño y puesta en marcha de un reactor Airlift para la producción masiva de microorganismos de interés en control biológico*. Ingeniería Química. Fundación Universidad de América. Bogotá, D.C. Colombia.
- Godoy, R. (2002). Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. En: *Manual de métodos analíticos*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. Colombia.
- Tinoi, J.; Rakariyatham, N. & Deming, R.L. (2005). Simplex Optimization of Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* Using Hydrolyzed Mung Bean Waste Flour as Substrate. En: *Process Biochemistry*. 40: 2551-2557.
- Yen H., W. & Zhang, Z. (2011). Enhancement of Cell Growth Rate by Light Irradiation in the Cultivation of *Rhodotorula glutinis*. En: *Bioresource Technology*. 102: 9279-9281.

CAPÍTULO 4.

DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE LA LEVADURA *Rhodotorula glutinis* LVCo7 PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN MORA

Liz Alejandra Uribe Gutiérrez, Carol Andrea Bolaños Almeida, Jimmy Alexander Zapata Narváez, Martha Isabel Gómez Álvarez y Laura Fernanda Villamizar Rivero

Resumen

Rhodotorula glutinis cepa LvCo7 ha demostrado una eficacia superior al 65% en el control de *B. cinerea*, bajo condiciones controladas, razón por la cual el Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, comenzó los estudios de preformulación de un bioplaguicida a base de esta levadura. En el presente trabajo se desarrollaron y evaluaron tres prototipos de formulación codificados como GA (solución de azúcares y sales), GB (solución de sales) y GC (solución de sales y polioles), y cinco sustancias fotoprotectoras codificadas como AB (Vitamina 1), AC (Colorante), AD (Abrillantador óptico), AE (Vitamina 2) y AF (Aceite vegetal). Se seleccionó el prototipo de formulación GC, por presentar la mayor estabilidad cuando se almacenó durante un mes a 25°C, y la sustancia AD, por proteger las células de la levadura frente a la radiación UV-B, durante 15 minutos de exposición. Se elaboraron dos prototipos de formulación de líquidos codificados como Prototipo F (células de levadura suspendida en la solución GC) y Prototipo FA (células de levadura suspendidas en la solución GC con la sustancia fotoprotectora AD), los cuales se almacenaron durante 12 meses a 8°C, 18°C y 28°C, y se seleccionó el prototipo FA por presentar una pérdida de viabilidad inferior al 10%, después de almacenarse durante seis meses a 8°C.

Introducción

El desarrollo de un bioplaguicida implica la realización de diferentes etapas, las cuales aseguren la obtención de un producto eficaz y confiable. El primer paso es el aislamiento y selección del microorganismo, seguido del desarrollo de una tecnología para su producción masiva. Una vez desarrollado el sistema de producción, se realizan los estudios de preformulación y formulación. Durante la preformulación se evalúa la compatibilidad del principio activo con los excipientes, se desarrollan prototipos, se determinan las características fisicoquímicas, biológicas y microbiológicas y se selecciona el o los prototipos adecuados. Posteriormente, en la etapa de formulación se optimiza el prototipo más promisorio para llegar al producto final (Gómez y Villamizar, 2000).

Una vez desarrollado el bioplaguicida es indispensable determinar la estabilidad microbiológica y la actividad biocontroladora del producto durante el almacenamiento, debido a que es uno de los principales obstáculos para la conservación de la calidad y comercialización del mismo (Abadías *et al.*, 2001).

En trabajos previos realizados por el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, se aisló la levadura *R. glutinis*, la cual ha demostrado su potencial para el control de *B. cinerea* con eficacias superiores al 65% en condiciones controladas. Por tal razón, Acosta y colaboradores (2009) iniciaron los estudios de preformulación de un prototipo de bioplaguicida a base de dicha levadura. En estos estudios se evaluaron dos técnicas de secado: directo en estufa y por liofilización, y se empleó como control la levadura suspendida en una solución isotónica. En dicho trabajo se seleccionó la formulación en la solución isotónica, por presentar una mayor estabilidad durante un mes de almacenamiento a 30°C. Sin embargo, fue necesario optimizar esta formulación evaluando diferentes soluciones isotónicas y diferentes sustancias fotoprotectoras de la radiación UV-B sobre la estabilidad de la levadura almacenada. A los prototipos seleccionados a partir de esta etapa se les realizó un estudio de estabilidad. Para tal fin, éstos se almacenaron durante doce meses a 8°C, 18°C y 28°C, con el fin de seleccionar aquel que presentara la mayor estabilidad en almacenamiento, determinando la vida útil del mismo.

Metodología

Para todos los ensayos, la producción de biomasa de la levadura se realizó empleando el medio de crecimiento ML7 previamente estandarizado y optimizado en el Laboratorio de Control Biológico (LCB) de Corpoica.

Caracterización del principio activo a base de R. glutinis

Una vez obtenida la biomasa de la levadura, se realizó la caracterización microbiológica de tres lotes, para establecer los límites de aceptación durante el control de calidad del principio activo. Los parámetros evaluados fueron la concentración de células (células.g⁻¹), la viabilidad (mediante recuento en placa, UFC.g⁻¹), el porcentaje de humedad, el tamaño de las células (µm) y el pH.

Compatibilidad de R. glutinis con medios acuosos isotónicos

Se evaluó la compatibilidad de la levadura *R. glutinis* con tres soluciones isotónicas codificadas como: GA (Solución de azúcares y sales), GB (Solución de sales) y GC (Solución de sales y polioles). En 20 viales de vidrio, estériles, de capacidad de 13 mL, se ubicó una suspensión que contenía 0,5 g de biomasa en 13 mL de cada una de las soluciones isotónicas. Dichos viales se taparon con tapones de caucho, se sellaron con agrafes metálicos y se almacenaron 10 viales a 25°C y otros 10 a 30°C. Antes de iniciar el almacenamiento y cada ocho días, durante un mes, se tomaron dos viales de cada tratamiento (solución/temperatura) y se evaluó la viabilidad, el pH y la actividad de agua (A_w). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado y los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANAVA) y a una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (95%).

Evaluación de fotoprotectores frente a la radiación ultravioleta UV-B

Con el fin de seleccionar un componente fotoprotector para el prototipo de formulación (GC), se evaluaron cinco sustancias codificadas como AB (Vitamina 1), AC (Colorante), AD (Abrillantador), AE (Vitamina 2) y AF (Aceite vegetal). Estas cinco sustancias se evaluaron por separado en mezclas acuosas ajustadas al 0,1%. Por último, el efecto fotoprotector sobre la levadura, a la radiación UV-B se le cuantificó mediante la estimación de la viabilidad expresada como Unidades Formadoras de Colonia (UFC.mL⁻¹), después de la irradiación.

Inicialmente, en cada mezcla acuosa de las sustancias fotoprotectoras se prepararon suspensiones de la levadura, ajustadas a 1×10^3 células.mL⁻¹. Posteriormente, en cajas Petri con agar YM, dividido en tres secciones, se inoculó en cada sección una gota de 10 µL de un tratamiento. Las gotas se dejaron secar y las cajas se expusieron durante 5, 10 y 15 minutos a radiación UV-B, utilizando una lámpara monocromática 3UV-38 Series a

una longitud de onda de 302 nm. El experimento contó con un control de la levadura no expuesta y un control negativo de la levadura sin fotoprotector. Una vez finalizada la exposición a la radiación, las cajas Petri se taparon e incubaron a 28°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó el recuento de UFC.mL⁻¹ originadas en cada gota inoculada. Por último, se calculó el porcentaje de pérdida de viabilidad, comparando el resultado de la viabilidad de la levadura no expuesta a la radiación, con los valores de viabilidad obtenidos cuando ésta fue expuesta en los periodos evaluados. La unidad experimental por tratamiento consistió en una caja de Petri dividida en tres secciones. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado y los datos se sometieron a un análisis de varianza (Anava) y a una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (95%).

Estabilidad de prototipos de formulación a base de R. glutinis

De acuerdo con los resultados obtenidos en las etapas anteriores, se elaboraron dos prototipos de formulación, el primero consistió en la levadura suspendida en la solución GC (prototipo F), y el segundo, en la levadura suspendida en la solución GC con el fotoprotector seleccionado (prototipo AF). Para este ensayo en viales de vidrio, estériles, de capacidad de 13 mL, se dispensó una suspensión que contenía 0,1 g de biomasa en 13 mL de cada vehículo. Dichos viales se taparon con tapones de caucho, se sellaron con agrafes metálicos y se almacenaron durante doce meses a 8°C, 18°C y 28°C. La viabilidad se evaluó cada dos meses mediante el recuento en placa (UFC.g⁻¹). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado y los datos se sometieron a un análisis de varianza (Anava) y a una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (95%).

Resultados

Caracterización del principio activo a base de R. glutinis

La viabilidad y la concentración celular presentaron valores similares, 1x10¹² UFC.g⁻¹ y 2x10¹² células.g⁻¹, respectivamente, lo cual sugiere que el proceso de separación de la biomasa del medio de cultivo no tuvo ningún efecto negativo sobre las células de la levadura (Tabla 9). En cuanto al tamaño de las células de la levadura, estuvo dentro del rango descrito para esta especie, el cual oscila entre 2,3 y 5,0 µm de ancho por 4,0 y 10 µm de largo (Tabla 9) (Kurtzman & Fell, 1999).

Respecto al pH de la biomasa obtenida a partir de la producción masiva de la levadura, fue de 4,4, encontrándose dentro del rango óptimo descrito

en la literatura (Kurtzman y Fell, 1999), en tanto que el porcentaje de humedad de la biomasa fue de 83% (Tabla 10).

Tabla 10. Características del principio activo a base de la levadura

Característica		Valor
Concentración (cél.g ⁻¹)		2x10 ¹²
Viabilidad (UFC.g ⁻¹)		1x10 ¹²
Tamaño (μm)	Ancho	3,9
	Largo	4
Humedad (%)		83
pH		4,4

Tabla 11. Límites de aceptación establecidos para cada característica del principio activo

Concentración (células.g ⁻¹)	Viabilidad (UFC.g ⁻¹)	Humedad (%)	pH
1 x 10 ¹²	1 x 10 ¹²	80 – 85	4 - 4,4

Esta última característica depende principalmente del proceso de centrifugación y lavado, por lo que puede ser variable. Teniendo en cuenta los resultados promedio de las características de *R. glutinis* y sus respectivas desviaciones estándar, se establecieron los rangos y los límites de aceptación para cada uno de los parámetros evaluados. Dichos límites servirán como puntos críticos para aceptar o rechazar los lotes de producción de biomasa en el proceso de manufactura de un bioplaguicida (Tabla 11).

Compatibilidad de R. glutinis con medios acuosos isotónicos

La viabilidad inicial de la levadura antes del almacenamiento fue de 10¹² UFC.g⁻¹. Después de un mes de almacenamiento a 25°C, en las soluciones isotónicas GA y GC no se presentó una disminución significativa de la viabilidad, siendo ésta de 9x10¹¹ UFC.g⁻¹ para las dos soluciones, mientras que con la solución GB si se evidenció una disminución significativa (p<0,05), presentando una viabilidad final de 7x10¹¹ UFC.g⁻¹ (Tabla 12).

Al almacenar la levadura a 30°C en el mismo periodo de tiempo, se presentó una disminución significativa de la viabilidad en las tres soluciones isotónicas, obteniéndose valores finales de 7x10¹¹ UFC.g⁻¹ con las soluciones GA y GB, y de 8x10¹¹ UFC.g⁻¹ con la solución GC (Tabla 12).

Tabla 12. Estabilidad de la levadura almacenada durante un mes a 25°C y 30°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%)

Solución Temperatura	Viabilidad (UFC.g ⁻¹)		pH		A _w	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
GA 25°C	1x10 ¹² a	9x10 ¹¹ ab	3,9a	3,9a	0,967	0,962
GA 30°C		7x10 ¹¹ c		3,8b		0,975
GB 25°C	1x10 ¹² a	7x10 ¹¹ c	4,2a	3,9b	0,961	0,968
GB 30°C		7x10 ¹¹ c		4b		0,966
GC 25°C	1x10 ¹² a	9x10 ¹¹ ab	4,5a	4,4a	0,985	0,98
GC 30°C		8x10 ¹¹ b		4,3b		0,978

En general, la levadura suspendida en las tres soluciones isotónicas almacenadas a las dos temperaturas (25°C y 30°C) presentó una disminución en la viabilidad durante el mes del estudio, lo que sugiere que el tiempo y la temperatura de almacenamiento tuvieron un efecto negativo sobre las células. Sin embargo, cabe destacar que la levadura no presentó una reducción significativa ($p > 0,05$) de la viabilidad, cuando fue suspendida en las soluciones GA y GC, y almacenada a 25°C, lo que sugiere que la levadura fue más tolerante a dicha temperatura de almacenamiento.

Al almacenar la levadura a 30°C se observó una mayor pérdida de viabilidad que a 25°C, lo que sugiere que a mayor temperatura de almacenamiento, mayor inestabilidad. Esto se debe posiblemente a que a mayores temperaturas, el metabolismo celular se mantiene activo y permite que las células tomen los nutrientes asimilables del medio acuoso, acumulando en su interior metabolitos que pueden ser tóxicos y causar la muerte celular. Además, las altas temperaturas conducen a una mayor reactividad de las moléculas, pudiendo generar reacciones químicas o procesos de degradación de los auxiliares de formulación, cuyos productos de reacción podrían ser tóxicos para las células, causando una disminución en la viabilidad (Costa *et al.*, 2002).

En cuanto a la estabilidad del pH, los valores iniciales fueron de 3,97, 4,18 y 4,47 para las soluciones GA, GB y GC, respectivamente. Después de un mes de almacenamientos a 25°C, no se presentó una disminución significativa ($p > 0,05$) del pH en las soluciones GA y GG, con un valor final de 3,9 y 4,4, respectivamente, en tanto que en la solución GB sí se evidenció una reducción significativa del pH ($p < 0,05$) con un valor final de 3,9 (Tabla 12).

Cuando la levadura fue almacenada a 30°C se presentó una disminución significativa del pH en las tres soluciones isotónicas (Tabla 12), indicando

que el pH del sistema no fue estable durante el almacenamiento a dicha temperatura, con ninguno de los tres vehículos evaluados.

En general, se evidenció una acidificación del medio acuoso en la mayoría de los tratamientos, la cual podría deberse a la producción de metabolitos secundarios de carácter ácido por parte de la levadura, a partir de algunos residuos del medio de fermentación que pudieron quedar en la biomasa y por ende en el prototipo final.

Los valores iniciales de A_w para cada una de las soluciones GA, GB y GC fueron de 0,967, 0,961 y 0,985, respectivamente. Después de un mes de almacenamiento a 25°C y 30°C, en ninguna de las soluciones evaluadas se presentaron diferencias significativas entre el valor inicial y final del A_w (Tabla 11). Este resultado sugiere que el A_w se mantuvo estable durante las cuatro semanas de almacenamiento a las dos temperaturas evaluadas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio se seleccionó el prototipo de bioplaguicida GC como el mejor de formulación, al no presentarse diferencias significativas entre los valores iniciales y finales de la viabilidad, pH y A_w después de un mes de almacenamiento a 25°C.

Evaluación de fotoprotectores frente a la radiación ultravioleta UV-B

La levadura LvCo7 sin fotoestabilizador (control) presentó una disminución de la viabilidad del 81%, 99% y 100% después de 5, 10 y 15 minutos de exposición a la radiación UV-B, respectivamente. Al exponer la levadura durante cinco minutos a la radiación UV-B, en presencia de los fotoprotectores, se presentó una disminución de la viabilidad del 85%, 100%, 38%, 90% y 25% para los tratamientos AB, AC, AD, AE y AF, respectivamente, cada uno de los cuales comprende a la mezcla de la biomasa con un posible fotoprotector.

A los 10 minutos de exposición, la pérdida de viabilidad fue del 100% en los tratamientos AB, AC, AD y AE, y del 75% para el tratamiento AF. A los 15 minutos de exposición la pérdida de viabilidad fue del 100% para todos los tratamientos evaluados (Figura 26).

Después de cinco minutos de irradiación, los tratamientos AD y AF ejercieron una mayor protección de las células de la levadura que los tratamientos restantes, presentando una pérdida de la viabilidad significativamente menor, con valores del 37% y del 25%, respectivamente (Figura 26).

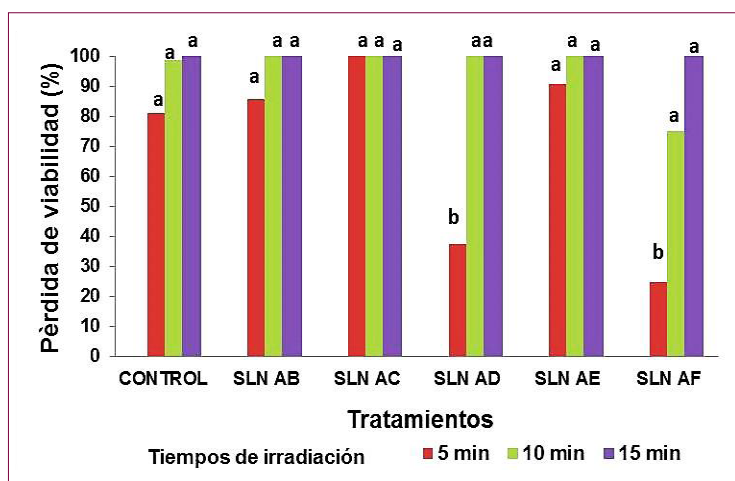


Figura 26. Pérdida de viabilidad de la levadura *R. glutinis* LvCo7 combinada con sustancias fotoestabilizadoras después de la exposición a la radiación ultravioleta UV-B. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con prueba de Tukey (95%).

Ningún fotoprotector mostró un efecto protector para las células de la levadura después de 15 minutos de exposición a la radiación UV-B. Sin embargo, es importante resaltar que las levaduras fueron expuestas a condiciones extremas de irradiación directa, diferentes a las que se presentan en condiciones de campo, donde además las células colonizan las paredes anticlinales de las hojas, principalmente, sobre la lámina, como una estrategia de protección frente a la radiación solar (Andrews, 1992; Jacobs, 2001).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio se seleccionó el fotoprotector AF como la sustancia con potencial protector para ser utilizada en el desarrollo de un prototipo de formulación.

*Estabilidad de prototipos de formulación a base de *R. glutinis**

Cuando los prototipos de formulación (F y FA) fueron almacenados durante 12 meses a 8°C, 18°C y 28°C se evidenció una pérdida significativa de viabilidad ($p < 0,05$) a través del tiempo, siendo mayor a 18°C y 28°C, que a 8°C.

A 8°C el prototipo F presentó pérdidas de viabilidad superiores al 10%, 30% y 50% después de dos, seis y doce meses de almacenamiento, mientras que a esta misma temperatura el prototipo FA presentó pérdidas de viabilidad inferiores al 10% después de dos y seis meses de almacenamiento, y una pérdida de viabilidad del 100% después 12 meses de almacenamiento (Figura 27).

A 18°C el prototipo F presentó pérdidas de viabilidad superiores al 20% y 60% después de dos y seis meses de almacenamiento, y del 100% después de doce meses de almacenamiento, mientras que el prototipo FA, a esta misma temperatura, presentó una pérdida de viabilidad inferior al 10% después de dos meses de almacenamiento, del 50% en el sexto mes de almacenamiento y del 100% después de doce meses de almacenamiento (Figura 28).

Cuando los dos prototipos se almacenaron a 28°C se presentaron las mayores pérdidas de viabilidad a través del tiempo, siendo de alrededor del 50% después de dos meses de almacenamiento y del 100% después de seis y doce meses de almacenamiento (Figura 29).

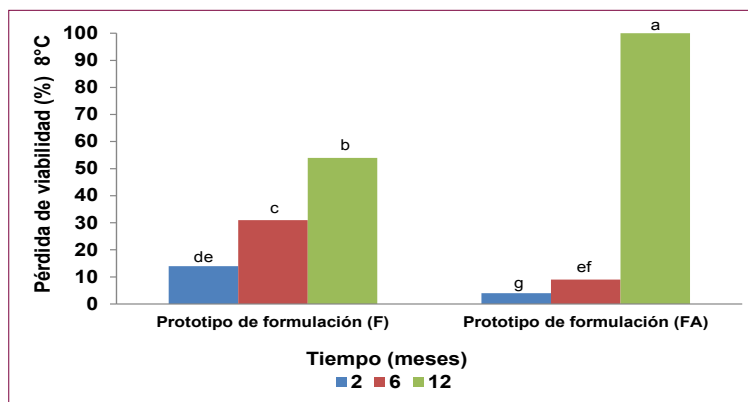


Figura 27. Pérdida de viabilidad de los prototipos evaluados y almacenados a 8°C, después de 12 meses de almacenamiento. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con prueba de Tukey (95%).

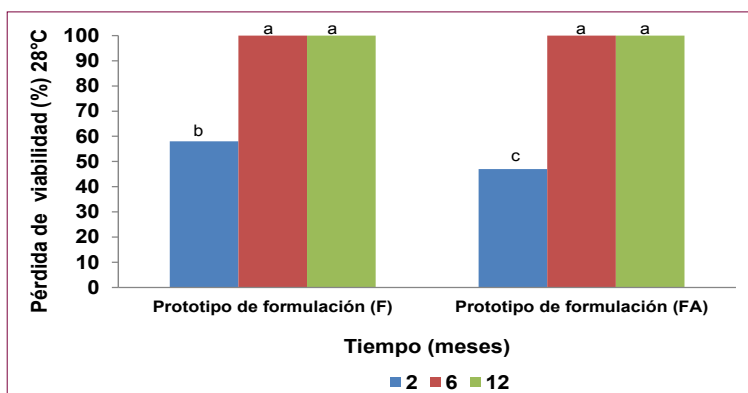


Figura 28. Pérdida de viabilidad de los prototipos evaluados y almacenados a 18°C±0,5°C, después de 12 meses de almacenamiento. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con prueba de Tukey (95%).

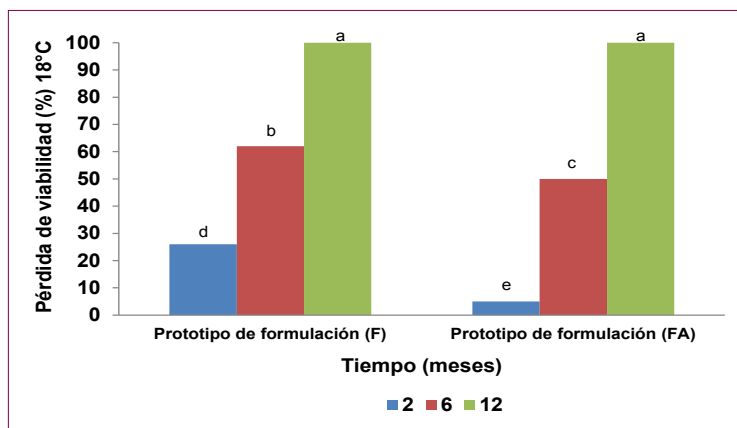


Figura 29. Pérdida de viabilidad de los prototipos evaluados y almacenados a 28°C, después de 12 meses de almacenamiento. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con prueba de Tukey (95%).

En todos los prototipos evaluados, la pérdida de viabilidad de las células de levadura almacenadas durante doce meses a 8°C, 18°C y 28°C, podría ser el resultado de una serie de eventos que ocurren dentro de las células, tal y como lo sugirieron Gabier y colaboradores (2005), que describieron que aun a 4°C se mantiene activo el metabolismo y las células de levadura consumen los carbohidratos que se encuentran disponibles en el medio y tienden a acidificarlo. Posteriormente, al agotarse este sustrato, las levaduras emplean la fuente de nitrógeno disponible y el pH se incrementa. Sin embargo, una vez se han agotado las reservas de azúcares, la viabilidad de las células empieza a decrecer lentamente, debido a que se induce el deterioro del potencial de membrana y el número de células despolarizadas se incrementa. Al despolarizarse la membrana celular, el pH intracelular desciende y las células mueren. Es probable que a medida que aumenta la temperatura suba el consumo de carbohidratos y la pérdida de viabilidad en el tiempo, siendo mayor a 18°C y 28°C, que a 8°C, tal y como se observó en los resultados obtenidos en el presente estudio.

En general, se evidenció que la adición del fotoprotector (Abrillantador óptico) a la solución de formulación (FA), ejerció un efecto positivo sobre la viabilidad de las células de levadura, siendo este prototipo el que presentó una menor pérdida de viabilidad (<10%) después de ser almacenado durante seis meses a 8°C (Figura 27).

Conclusiones

El principio activo a base de *R. glutinis* LvCo7 presentó características físicas, químicas y microbiológicas adecuadas, que permitieron

establecer los límites de aceptación para los parámetros de control de calidad del producto.

Se evidenció un efecto negativo de la temperatura en la estabilidad de las células suspendidas en las soluciones isotónicas, presentándose una superior inestabilidad a mayor temperatura de almacenamiento.

La solución de sales y polioles GC mejoró la estabilidad en almacenamiento de la biomasa de *R. glutinis* LvCo7 y fue seleccionada como vehículo de la formulación.

El abrillantador y el aceite vegetal fueron las sustancias fotoestabilizadoras que ejercieron mayor grado de protección de las células de las levaduras frente a la radiación UV-B.

El prototipo de formulación base de la levadura suspendida en una solución de sales y polioles, adicionada con el fotoestabilizador FA, fue seleccionado por su estabilidad de seis meses bajo condiciones de refrigeración, como el formulado más promisorio para continuar con el desarrollo.

Referencias bibliográficas

- Abadias, M.; Usall, J.; Teixidó, N. & Viñas, I. (2001). Liquid Formulation of the Biocontrol Agent *Candida sake* CPA-1 in Isotonic Solutions. En: *Phytopathology*. 93(4): 436-442.
- Acosta, C. (2009). *Selección de levaduras con potencial para el desarrollo de un bioplaguicida para el control del moho gris (Botrytis cinerea) en cultivos de mora*. Tesis de pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Colombia.
- Andrews, J. (1992). Biological Control in the Phyllosphere. Annu. Rev. En: *Phytopathology*. 30: 603-35.
- Costa, J.; Teixido, U.; Torres, R. & Viñas, I. (2002). Effect of Package and Storage Conditions on Viability and Efficacy of the Freeze-dried Biocontrol Agent *Pantoea agglomerans* Strain CPA-2. En: *Journal of Applied Microbiology*. 92: 873-878.
- Gabier, A.; Gourdon, P.; Reitz, J.; Leveau, J. & Bouix, M. (2005). Intracellular Physiological Events of Yeast *Rhodotorula glutinis* During Storage at +4°C. En: *International Journal of Food Microbiology*. 105: 97-109.
- Gómez, M. & Villamizar, L. (2000). Formulación de bioplaguicidas. En: *Primer curso taller internacional de control biológico*. Corpoica. Bogotá, D.C. Colombia. P. 108-112.
- Jacobs, J. & Sundin, G. (2001). Effect of Solar U.V-B Radiation on a Phyllosphere Bacterial Community. En: *Appl. Envir. Microbiol.* 2001. 67: 5488-5496.
- Kurtzman, C. & Fell, J. (1999). *The Yeast, a Taxonomic Study*. Fourth Edition. Editorial elsevier. Amsterdam. P. 21-24, 77, 112.

CAPÍTULO 5.

EFICACIA DE DOS PROTOTIPOS DE BIOPLAGUICIDA A BASE DE *R. glutinis* CEPA LvCo7 Y UN BIOPLAGUICIDA A BASE DE *T. koningiopsis* CEPA Th003 EN EL CONTROL DE *B. cinerea* EN CULTIVOS DE MORA

Jimmy Alexander Zapata Narváz y Alba Marina Cotes Prado

Resumen

Para evaluar la eficacia en el control de *Botrytis cinerea* en cultivos de mora de dos prototipos de formulación a base de *Rhodotorula glutinis* cepa LvCo7 y de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003, se establecieron dos parcelas experimentales en el municipio de Sylvania (Cundinamarca) sembrando plantas del ecotipo Monterrico, obtenidas a partir de vitroplantas. Después de 77 días de evaluación, los prototipos de formulación a base de la levadura y el bioplaguicida a base del mohó mostraron una mayor eficacia para el control de *B. cinerea*, presentando una reducción de la incidencia entre el 69% y el 55%, comparado con los fungicidas Plocloraz, Difenconazol y Carbendazim, con los cuales se observó una reducción de la incidencia del 58%, 46% y 27%, respectivamente.

Introducción

Debido al peligro que representan los residuos de agroquímicos para la salud humana, los consumidores en el mundo están exigiendo que el uso de productos químicos en la producción agrícola sea reducido significativamente.

En este contexto, la producción de mora bajo los esquemas tradicionales afrontaría el serio riesgo de rezagarse y perder terreno frente a la posibilidad de la apertura de nuevos mercados nacionales e internacionales.

Al ser la mora un cultivo de fructificación continua, las aplicaciones de plaguicidas se realizan sin restricciones de uso y sin contar con periodos de carencia, lo que con seguridad implica la presencia de residuos de plaguicidas en la fruta que se comercializa en los diferentes esquemas de mercado.

De acuerdo con esto, se hace necesario el desarrollo de alternativas para el manejo integrado del moho gris, la enfermedad más limitante del cultivo, integrando a los esquemas de control tradicionales el control biológico de *B. cinerea*, permitiendo una producción más limpia y acorde con la tendencia actual del mercado, con un enfoque hacia una agricultura menos agresiva con el medio ambiente e inocua para el consumidor y para el agricultor.

De acuerdo con lo anterior, Corpoica cuenta con dos prototipos de bioplaguicidas a base de la levadura *R. glutinis* cepa LvCo7 y de *T. koningiopsis* cepa Th003, que bajo condiciones controladas presentaron un control del moho gris superior al 70%; sin embargo, aún no se ha evaluado su eficacia bajo condiciones de campo en el cultivo de la mora, siendo ésta una condición primordial y necesaria para poder suministrar a los agricultores un producto con óptimas condiciones de calidad tecnológica y biológica. Por lo tanto, es necesario realizar bioensayos en campo que permitan desarrollar una estrategia de manejo integrado del moho gris y de esta forma generar las recomendaciones para su futura aplicación en condiciones de producción comercial.

Establecimiento de parcelas experimentales

Para evaluar la eficacia de los prototipos de bioplaguicidas a base de *R. glutinis* y de *T. koningiopsis* en el control de *B. cinerea* en condiciones reales, se establecieron dos cultivos de mora a modo de parcelas experimentales en las veredas Agua Bonita y Monterrico del municipio de Sylvania (Cundinamarca).

En cada parcela se sembraron 300 plantas de mora obtenidas a partir de vitroplantas ecotipo Monterrico, previamente evaluadas en la zona y seleccionadas por los productores por presentar altos rendimientos, así como por sus propiedades nutraceuticas (Espinosa *et al.*, 2009). Este material fue proporcionado por el Laboratorio de Micropropagación Vegetal del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica.

El endurecimiento de las vitroplantas se realizó en bolsas plásticas de 1 kg con sustrato suelo y cascarilla en proporción 3:1, el cual previamente fue inoculado con el bioplaguicida a base del hongo, mediante la aspersión de una suspensión de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ (Beltrán y Cotes, 2009). Cada quince días y durante tres meses se realizaron refuerzos del bioplaguicida a una concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ y aplicaciones de un fertilizante foliar Tottal® (solución de microelementos). Una vez las plantas presentaron un tamaño de entre 15 cm y 25 cm, aproximadamente, tres meses después de la siembra fueron trasladadas a las parcelas experimentales para ser trasplantadas (Figura 30).



Figura 30. Endurecimiento en invernadero de vitroplantas de mora ecotipo Monterrico, utilizadas en el establecimiento de las parcelas experimentales en el municipio de Sylvania (Cundinamarca).

Para el establecimiento de las parcelas se seleccionó un lote de propiedad del productor Enrique Rodríguez, en la vereda Monterrico, y un lote propiedad del productor Juan Carlos Aguirre, en la vereda Agua Bonita (Figura 31).



Figura 31. A y B. Lote del productor Juan Carlos Aguirre, en el que se cultivó mora cinco años antes del montaje del ensayo y se encontraba sin uso. El terreno es pendiente y apropiado para el cultivo de mora, con un suelo franco limoso y franco arcilloso. C y D. Lote del productor Enrique Rodríguez, en el que nunca se había cultivado mora y se utilizaba para el pastoreo de ganado. El terreno es pendiente y apropiado para el cultivo de mora; sin embargo, tiene un suelo arcilloso por lo cual fue necesaria la incorporación de materia orgánica.

El acondicionamiento del suelo antes de la siembra consistió en el plateo, la remoción de malezas, el hoyado en el sitios de siembra con distancias de siembra de 2,5 m entre plantas y de 3 m entre surcos, y el encalado quince días antes de la siembra.

Las plantas fueron llevadas a campo una semana antes del trasplante, con el fin de aclimatarlas. Al momento de la siembra se realizó una mezcla

de fertilizantes orgánicos (gallinaza compostada y lombricompost), la cual se distribuyó en cada uno de los hoyos de siembra. Posteriormente se sembraron las plantas y se aplicó el bioplaguicida a base del *T. koningiopsis* en drench, tanto a la planta como al suelo, a una concentración de 1×10^7 conidios.mL⁻¹. Dos días después de la siembra se aplicó al suelo circundante de cada planta una solución del fertilizante 15-15-15 (N-P-K).

Después del seguimiento de las parcelas durante dos meses, no murieron las plantas, sino que se adaptaron a las condiciones y desarrollaron rebrotes (Figura 32).



Figura 32. Plantas de mora después de un mes de su siembra en las parcelas experimentales A. Agua Bonita. B. Monterrico.

El esquema de fertilización se estableció de acuerdo con las recomendaciones generadas a partir del análisis químico del suelo de cada parcela y consistió en una fertilización posterior al ploteo, agregando 150 g de cal dolomita; 20 días después se aplicó alrededor de cada planta una mezcla de los siguientes fertilizantes: urea, 30 g; KCl, 40 g, y Agrimins®, 30 g. La fertilización foliar consistió en la aplicación del fertilizante Tottal®. Este esquema se repitió cada tres meses.



Figura 33. Seguimiento a la parcela experimental en la vereda Agua Bonita.

Una vez las plantas entraron en periodo de fructificación (entre 10 a 12 meses) se estableció su tutorado, el cual consistió en un sistema de doble poste a cada lado del surco de siembra, a una distancia de 75 cm de la base de la planta, repitiéndose cada cuatro m y cada poste con una longitud de 1,60 m desde la base del suelo. Para colgar las plantas se extendió desde los primeros postes, de uno de los extremos del surco al otro extremo, una guaya de acero a la cual se le colgaron con cuerda las plantas; antes de colgarlas se les realizó una poda, dejando de 6 a 8 ramas desde la corona radical, quitándoles, además, las hojas bajas. Este sistema permite abrir la planta, facilitando las labores de poda sanitaria y de formación, así como la recolección de frutos y la reducción de la humedad en la filósfera (Figura 34).



Figura 34. Tutorado de la parcela experimental de la vereda Agua Bonita, del municipio de Silvania (Cundinamarca).

A. EFICACIA DE DOS PROTOTIPOS DE BIOPLAGUICIDAS A BASE DE *R. glutinis* Y DE *T. koningiopsis* EN EL CONTROL DE *B. cinerea* EN CULTIVOS DE MORA

Metodología

En las parcelas experimentales se evaluó la eficacia en el control de *B. cinerea* en cultivos de mora de dos prototipos de bioplaguicida a base de *R. glutinis*. Un prototipo contenía un abrillantador como protector UV, en tanto que el otro no; igualmente se evaluó el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*, planteando los siguientes tratamientos:

- Prototipo F.
- Prototipo FA.
- Bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* cepa Th003.
- Químico.

- Productor (Carbendazim, en la parcela Monterrico).
- Testigo absoluto.

Los prototipos de bioplaguicida así como el bioplaguicida a base del hongo se aplicaron a una concentración de 1×10^7 conidios/células. mL^{-1} ; en la parcela Agua Bonita se aplicó el fungicida Procloraz como testigo químico, en tanto que en la parcela Monterrico se aplicó el fungicida Difenconazol, a las dosis recomendadas. La aplicación tanto de los bioplaguicidas como de los fungicidas se realizó cada quince días utilizando fumigadoras de espalda.

El bioensayo se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar, con tres repeticiones; la unidad experimental (UE) consistió en dos surcos con cinco plantas cada uno, para un total de 10 plantas por UE, con tres repeticiones, para un total de 30 plantas por tratamiento (Figura 35).



Figura 35. Parcela Agua Bonita. Para facilitar las aplicaciones de los antagonistas, cada tratamiento se marcó con una bandera de color.

La variable evaluada fue la incidencia del moho gris por tratamiento, seleccionando de cada una de las UE tres plantas a las cuales se les contaron los frutos sanos cosechables y los frutos que presentaron signos de moho gris, comprobando que la infección inicial fuese provocada por *B. cinerea* (Figura 36). El registro de los datos se realizó semanalmente. Para cada tratamiento se totalizaron los frutos sanos y enfermos, y se determinó el porcentaje de incidencia utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Frutos con moho gris}}{\text{Frutos totales}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se estudiaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias, usando el test Tukey con α : 0,05.



Figura 36. Característica de los frutos cuantificados para determinar la incidencia de moho gris.

En la parcela Agua Bonita se cuantificó la producción de fruta por tratamiento, dos veces por semana (dos cosechas por semana) y durante cuatro meses, con el fin de determinar la diferencia de la fruta cosechada por tratamiento. Los resultados obtenidos se estudiaron mediante un análisis de varianza y comparación de medias, usando el test Tukey con α : 0,05.

Resultados

La incidencia del moho gris en los testigos absolutos fue en promedio de 8,7% y 15% para las parcelas Agua Bonita y Monterrico, respectivamente; estos valores pueden considerarse bajos, sin embargo, esto repercutió en la cantidad de fruta cosechada, comparada con la cantidad cosechada en los otros tratamientos.

Las aplicaciones de los prototipos de bioplaguicida a base de *R. glutinis* y del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* fueron más eficientes en el control del moho gris, con respecto a los fungicidas utilizados en los tratamientos químicos y productor (Monterrico).

En la parcela Agua Bonita, con las aplicaciones de los prototipos de bioplaguicida se obtuvo una reducción de la incidencia de la enfermedad del 69% con el prototipo F y del 68% con el FA, en tanto que con el bioplaguicida a base del hongo la reducción fue del 65% (Figura 37).

Por otra parte, con las aplicaciones de Procloraz la reducción de la incidencia fue del 58%, y aunque este tratamiento no presentó diferencias

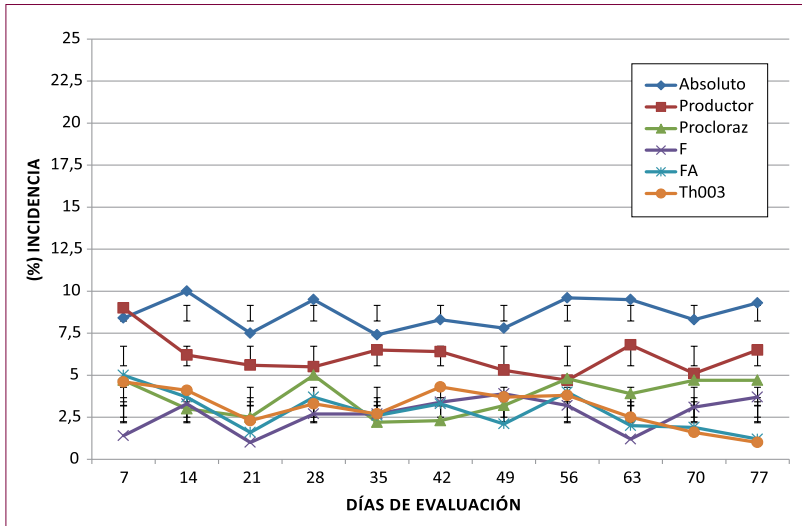


Figura 37. Incidencia de moho gris en cada tratamiento para la parcela Agua Bonita, después de 77 días de evaluación. Las barras representan la desviación estándar. F y FA: prototipos de bioplaguicida a base de *R. glutinis*; Th003: bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*. Las barras representan la desviación estándar.

estadísticamente significativas con respecto a los tratamientos biológicos, las diferencias numéricas fueron del orden del 10%.

En cuanto al tratamiento productor, en esta parcela no se aplicaron fungicidas para el control del moho gris; sin embargo, el productor realizó aplicaciones del fungicida Aliette® (Fosetyl Aluminio) con una frecuencia de 30 días para el control de mildew veloso, obteniendo una reducción del moho gris del 30%.

Respecto a la parcela Monterrico se observó nuevamente que la mayor reducción en la incidencia del moho gris se logró con las aplicaciones de los microorganismos biocontroladores, siendo el prototipo F el que presentó mayor control con una reducción de la enfermedad del 65%, seguido del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* con 60% y el prototipo FA con 55% de reducción del moho gris (Figura 38).

En tanto que con el fungicida Difenoconazol (tratamiento químico) se redujo la incidencia en 46% y con Carbendazim (tratamiento productor), en un 27%. Teniendo en cuenta este resultado, es necesario anotar que Carbendazim es uno de los fungicidas utilizados con mayor frecuencia por los productores de la zona y no inhibió el desarrollo del patógeno en las pruebas *in vitro* e *in planta*.

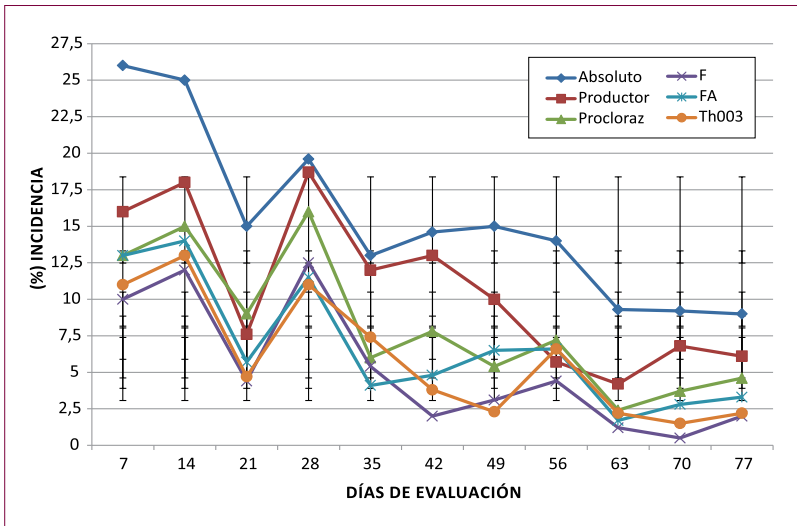


Figura 38. Incidencia de moho gris en cada tratamiento para la parcela Monterrico, después de 77 días de evaluación. F y FA: prototipos de bioplaguicida a base de *R. glutinis*; Th003: bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*. Las barras representan la desviación estándar.

Al analizar los datos promedio obtenidos, en la parcela Agua Bonita se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento productor y los tratamientos químicos, prototipos de bioplaguicida y bioplaguicida, en tanto que en la parcela Monterrico estas diferencias fueron numéricas (Tabla 13).

Tabla 13. Incidencia promedio de moho gris en las parcelas experimentales. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (α : 0,05%)

Tratamiento	% Incidencia promedio	
	Agua Bonita	Monterrico
Absoluto	8,69 a	15 a
Productor	6,15 b	11 ab
Químico	3,73 c	8,2 b
Prototipo F	2,69 c	5,2 b
Prototipo FA	2,83 c	6,7 b
Bioplaguicida	3,08 c	6 b

Son pocos los estudios que se han desarrollado para el control de *B. cinerea* en cultivos bajo condiciones comerciales a campo abierto, mediante el uso de microorganismos; sin embargo, resultados similares a los obtenidos en este

trabajo han sido reportados por Cañamas y colaboradores (2011), que al evaluar entre 2005 y 2006 las aplicaciones de la levadura *Candida sake* CPA-1 sin formular y formulada en una solución isotónica para el control del moho gris en vid, redujeron la incidencia de la enfermedad entre 36% y 40%, sin encontrar diferencias significativas entre *C. sake* y los fungicidas convencionalmente utilizados en vid (Mepanipyrim, Vinclozolin, Procloraz y Carbendazim).

Por otro lado, respecto a la producción de fruta en la parcela Agua Bonita, la mayor cantidad de fruta cosechada por semana correspondió al tratamiento en el que se aplicó el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*, con un promedio de 5.652 g, presentando diferencias significativas con respecto a los tratamientos productor y absoluto; en tanto que con las aplicaciones de los prototipos de bioplaguicida a base de la levadura la cantidad de fruta cosechada fue de 4.000 g con el prototipo F y 4.341 g para el FA, y con las aplicaciones de Procloraz fue de 4.447 g (Tabla 14).

Aunque entre los tratamientos biológicos y el fungicida no se presentaron diferencias significativas, hay diferencias numéricas principalmente entre el bioplaguicida con los prototipos de bioplaguicida y el fungicida. Es importante resaltar que la producción fue relativamente mayor con el fungicida a base del hongo que con los prototipos a base de la levadura, lo cual puede estar relacionado con la alta incidencia de mildew veloso que se presentó en esta parcela, particularmente en las plantas donde estos fueron aplicados y al control que eventualmente Procloraz pudo tener sobre esta enfermedad.

El uso de los antagonistas y los fungicidas redujo la incidencia del moho gris; en la parcela Agua Bonita se observó una mayor producción de fruta en estos tratamientos; sin embargo, es necesario desarrollar un esquema



Figura 39. Cosecha de fruta.

Tabla 14. Promedio de fruta por cosecha en cada uno de los tratamientos evaluados. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (α : 0,05%)

Tratamiento	Producción kg promedio por cosecha
	Agua Bonita
Absoluto	3.4b
Productor	3.6b
Plocloraz	4.4ab
Prototipo F	4.0ab
Prototipo FA	4.3ab
Bioplaguicida	5.7a

de aplicación y rotación de acuerdo con las condiciones climáticas (alta humedad, lluvia y temperatura) e incidencia del patógeno, estableciendo un umbral de daño siguiendo las premisas planteadas en el sistema Botman (Shtienberg y Elad, 1997).

Conclusiones

Los prototipos de bioplaguicidas a base de *R. glutinis* LvCo7 y de *T. koningiopsis* Th003 fueron más eficientes en el control de *B. cinerea* que los fungicidas químicos utilizados tanto en el tratamiento testigo como en las parcelas manejadas por los productores.

Referencias bibliográficas

- Beltrán, C. & Cotes A.M. (2009). Promoción de crecimiento en endurecimiento de plántulas de mora producidas *in vitro* (efecto de la aplicación de *Trichoderma koningiopsis* Th003). En: *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado*. P. 57-63.
- Cañamás, T.; Viñas, I.; Torres, R.; Usall, J.; Solsona, C. & Teixidó, N. (2011). Field Applications of Improved Formulations of *Candida sake* CPA-1 for Control of *Botrytis cinerea* in Grapes. En: *Biological Control* 56 (2011): 150–158.
- Espinosa, N.; Sánchez, D.; García, A.; Ariza, M.; Ariza, C. & Barrero, L. (2009). Evaluación agronómica, nutricional y selección participativa de materiales de mora en Sylvania, Cundinamarca. En: *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado*. P. 34-42.
- Shtienberg, D. & Elad, Y. (1997). Incorporation of Weather Forecasting in Integrated, Biological-chemical Management of *Botrytis cinerea*. En: *Phytopathology* 87: 332-340.

Producción editorial:
Diagramación, impresión y encuadernación



Tel: 893 7710 Bogotá, DC, Colombia
www.produmédios.org