

Alternativas para el manejo de la pudrición blanda del tomate mediante el uso de levaduras¹

Alternatives for the management of tomato soft rot using yeasts

<https://doi.org/10.15332/22563067.7395>

Ambiente

Paulo Germán García Murillo²

Universidad Santo Tomás, Colombia

✉ paulogarcia@usta.edu.co

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4086-0489>

Recibido: 21/11/2021

Aceptado: 03/03/2021

Citar como:

García-Murillo, P. G. (2023). Alternativas para el manejo de la pudrición blanda del tomate mediante el uso de levaduras. *CITAS*, 9(1). <https://doi.org/10.15332/22563067.7395>



¹ Proyecto "Búsqueda de microorganismos con alto potencial antagonista de *Botrytis cinerea*, procedentes de manantiales termales y salinos".

² Docente tiempo completo de la Facultad de Ciencias y Tecnologías/DUAD, programa de Administración Ambiental y de los Recursos Naturales.

Resumen

El estudio que aquí se describe tiene como propósito establecer las condiciones de uso de la levadura *Pichia onychis* cepa Lv027 como alternativa contra *Rhizopus stolonifer*. En un estudio previo, se determinó el alto potencial de control biológico de esta cepa contra *R. stolonifer*, causante de la pudrición blanda en tomate en la poscosecha. De esta manera, mediante tres bioensayos, se estableció la concentración mínima efectiva de la cepa Lv027; se determinó el tiempo óptimo de aplicación de la cepa Lv027, y se evaluó *in vitro* e *in planta* los efectos de la competencia por nutrientes y espacio de esta misma cepa contra *R. stolonifer* con el fin de observar la interacción de la cepa Lv027 en presencia de las esporangiosporas del mencionado fitopatógeno. De acuerdo con los resultados presentados en los bioensayos, la concentración mínima efectiva de la cepa Lv027 es de 1×10^7 células \times ml⁻¹, a 6 °C y 20 °C; además, la aplicación de la cepa Lv027 debe realizarse de forma preventiva con un mínimo tiempo de aplicación de 18 h. A partir de los resultados, también se evidencian fenómenos de competencia por nutrientes (carbohidratos) entre la cepa Lv027 de *P. onychis* frente a *R. stolonifer*, por el reducido desarrollo del micelio y la baja germinación de las esporangiosporas del fitopatógeno en presencia de la cepa Lv027. Finalmente, se sugiere realizar futuros ensayos con esta levadura antagonista en condiciones comerciales de poscosecha de tomate.

Palabras clave: control biológico, *Rhizopus stolonifer*, modo de acción, levaduras.

Abstract

The purpose of this study is to establish the conditions for the use of the yeast *Pichia onychis* Lv027 strain as an alternative against *Rhizopus stolonifer*. A previous study determined the high potential of this strain for biological control against *R. stolonifer*, which causes soft rot in postharvest tomatoes. Three bioassays were conducted to determine the minimum effective concentration of the Lv027 strain, the optimal application time of the Lv027 strain, and evaluate the *in vitro* and *in planta* effects of nutrients and space competition between this strain and *R. stolonifer* in order to observe the interaction of the Lv027 strain with the sporangiospores of this phytopathogen. Based on the results presented in the bioassays, the minimum effective concentration of the Lv027 strain is 1×10^7 cells \times ml⁻¹ at 6 °C and 20 °C. Additionally, the application of the Lv027 strain should be done preventively with a minimum application time of 18 hours. The results also indicate nutrient competition (carbohydrates) between *P. onychis* Lv027 strain and *R. stolonifer*, due to reduced development of mycelium and low germination of the sporangiospores of the phytopathogen in the presence of the Lv027 strain. Finally, it is suggested to conduct future trials with this antagonist yeast under commercial conditions of postharvest tomatoes.

Keywords: biological control, *Rhizopus stolonifer*, mode of action, yeasts.

Introducción

Los daños ocasionados por la mala manipulación del tomate, desde el momento de la cosecha, transporte y almacenamiento, pueden propiciar heridas en la superficie de los frutos, las cuales sirven de entrada a algunos fitopatógenos como *Rhizopus stolonifer*. Tradicionalmente, las enfermedades causadas por *R. stolonifer* y otros fitopatógenos en poscosecha se manejan mediante la utilización de funguicidas de

síntesis química; sin embargo, estas medidas están actualmente revaluadas debido a los problemas de toxicidad provocados en los recursos alimenticios y a los problemas de contaminación (Díaz et ál., 2020).

El control biológico de enfermedades en la poscosecha de frutas y hortalizas es una alternativa promisoriosa al uso de los fungicidas tradicionales, pues es implementado a través del uso de microorganismos habituales en la superficie de los tejidos vegetales, que no representan peligro para la salud humana (Fenta et ál., 2019). En este sentido, las levaduras se ubican como organismos ideales para el control biológico de patógenos en poscosecha, debido a que, principalmente, pueden ser aisladas con facilidad de la superficie de los frutos y hortalizas como microorganismos epifitos habituales y, en otros casos, pueden ser microorganismos endófitos de muchas especies de plantas (Zhang et ál., 2020). Además, existen cepas altamente antagonistas de estos fitopatógenos, ya que pueden establecerse a través de heridas, de modo que protegen frutos y hortalizas (Freimoser et ál., 2019).

Un ejemplo del potencial uso de las levaduras para el control de *Rhizopus* sp. fue un estudio exploratorio, donde se evaluó la capacidad antagónica de la cepa YCSL2 contra este microorganismo patógeno, de lo cual se presentó una reducción de su crecimiento micelial en un ensayo *in vitro*. En un segundo ensayo realizado en frutos de uva, se observó colonización de la cepa YCSL2 en los sitios de herida, cuyo valor máximo inhibitorio registrado fue del 71,11% de *Rhizopus* sp. Consecuentemente, la cepa mencionada puede ser utilizada para el manejo biológico de *Rhizopus* sp. en la poscosecha de la uva (Nandhini et ál., 2019).

Otra investigación estableció el potencial uso del control biológico de *Rhizopus* sp., en un ensayo realizado *in vitro* mediante el uso de hongos endófitos de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En esta se observa que dos asilamientos de levaduras presentan porcentajes de antagonismo de 50,27 y 57,44% respectivamente, con evidente inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno (Obiazikwor et ál., 2021). De otra parte, en general las levaduras están bien adaptadas para colonizar los sitios de herida en frutas, en un amplio rango de temperaturas, especialmente las de refrigeración. Además, estos microorganismos pueden colonizar la superficie de las frutas por largos periodos de tiempo en condiciones de baja humedad, y son más eficientes en el uso de los nutrientes e inhiben la germinación de esporas de los hongos fitopatógenos (Soto et ál., 2018).

Se ha establecido que las levaduras pueden ejercer diferentes modos de acción, expresados como un conjunto complejo de mecanismos que pueden involucrar uno o más de los siguientes procesos: antibiosis, competición por nutrientes, exclusión de sitio, inducción de resistencia en el hospedero e interacción directa entre el antagonista y el fitopatógeno (Freimoser et ál., 2019).

Teniendo en cuenta la importancia de los estudios de los modos de acción ejercidos por las levaduras en su actividad antagónica contra los patógenos en la poscosecha, se propuso como objetivos en este trabajo determinar la concentración mínima efectiva de aplicación de la cepa de levadura Lv027 que inhiba el desarrollo de *R. stolonifer* a 6 °C y 20 °C en frutos de tomate; establecer el tiempo óptimo de inoculación de la cepa Lv027 a 6 °C y 20 °C en frutos de tomate que presente alta protección contra *R. stolonifer*; evaluar la capacidad de competencia por nutrientes de la cepa Lv027 contra *R. stolonifer* en un modelo de evaluación *in vitro*, y describir la interacción de la levadura Lv027 con el hongo fitopatógeno *R. stolonifer* en frutos de tomate.

Materiales y métodos

Para esta investigación, se utilizaron metodologías con enfoque cuantitativo con un estudio de tipo exploratorio.

Microorganismos y material vegetal

En un estudio previo se seleccionó la levadura *P. onychis* cepa Lv027 (aislada del municipio de Cucaita, en el Departamento de Boyacá) por su alta actividad antagonica de *R. stolonifer* en frutos de tomate, la cual fue del 93,3%, a temperatura de 20 °C, y de 97,3 % a 6 °C, cuando esta fue aplicada en una concentración de 1×10^7 células \times ml⁻¹ 24 h antes que el patógeno (García y Cotes, 2001).

Para los ensayos que se mencionan a continuación, se utilizaron frutos de tomate tipo milano (variedad Graciela) en estado de madurez pintón, procedentes del municipio del Valle de Tenza (Departamento de Boyacá). En todos los casos, los tomates fueron previamente desinfectados en hipoclorito de calcio (Ca(ClO)₂) al 1 % durante 20 minutos; posteriormente, fueron enjuagados con abundante agua destilada estéril y puestos a secar en una cámara de flujo laminar por 1 h.

Preparación del inóculo de la levadura antagonista *P. onychis* cepa Lv027

Para la realización de los ensayos, se tomaron cultivos de la levadura desarrollada en cajas de Petri con medio YM (agar extracto malta levadura/(Oxoid) durante 4 días a 25 °C). Esta fue suspendida en agua peptonada (Oxoid) al 0,1 %, ajustándose su concentración a 1×10^7 células \times ml⁻¹ mediante una cámara de Neubauer. La concentración de la cepa Lv027 fue elegida de acuerdo con los resultados encontrados por García y Cotes (2001), con la cual se obtiene porcentajes de protección superiores al 85%, contra *R. stolonifer* en frutos de tomate a temperatura de 20 °C y a 6 °C.

Preparación del inóculo de hongo fitopatógeno *R. stolonifer*

R. stolonifer fue aislado de tomates obtenidos en la plaza de mercado Paloquemao, en la ciudad de Bogotá. Las estructuras morfológicas, tanto macroscópicas (colonia) como microscópicas relacionadas especialmente por los esporangios y esporangiosporas, fueron coincidentes con los informes descritos en Laundon (1977, p. 524).

Para todos los ensayos, se utilizaron cultivos del patógeno incubados a 25 °C por 7 días, en cajas Petri con medio PDA (Oxoid). A partir de estos cultivos, con la ayuda de un asa redonda se retiró el micelio del hongo al cultivo en su parte superficial y se suspendió en 9 ml de polisorbato 80 (Tween 80, Merck) ajustada 0,1 %. La suspensión resultante se filtró utilizando tela algodón estéril para separar la masa micelial de las esporangiosporas y, finalmente, se ajustó su concentración a 1×10^4 esporangiosporas \times ml⁻¹ utilizando también una cámara de Neubauer. La concentración del inóculo del fitopatógeno fue la misma utilizada por García y Cotes en 2001, ya que esta es la concentración mínima capaz de producir síntomas y signos por *R. stolonifer* a 6 °C y a 20 °C en frutos de tomate tipo milano (variedad Graciela) en estado de madurez pintón.

Efecto de la concentración de la cepa Lv027 sobre la actividad antagonista de *R. stolonifer* en frutos de tomate

Con el fin de determinar la concentración mínima efectiva de la cepa Lv027 contra *R. stolonifer* en frutos de tomate, fueron preparadas 5 suspensiones de la cepa Lv027 con concentraciones de 10^5 células \times ml^{-1} , 10^6 células \times ml^{-1} , 10^7 células \times ml^{-1} , 10^8 células \times ml^{-1} , y 10^9 células \times ml^{-1} . De cada una de estas suspensiones del antagonista, se inoculó 25 μl en los sitios de herida en los frutos de tomate, siguiendo la metodología propuesta por García y Cotes en 2001. Una vez inoculados los frutos, fueron puestos a incubar por 24 h en cámaras húmedas a 6 °C y a 20 °C. Posteriormente, estos fueron inoculados con 25 μl de una suspensión con 1×10^4 esporangiosporas \times ml^{-1} del fitopatógeno en los sitios de herida e incubados a las mismas condiciones de temperatura y humedad ya mencionadas.

Se realizó la evaluación del antagonismo conferido por cada concentración de la cepa Lv027 contra *R. stolonifer*, inicialmente a partir de las curvas de los diámetros de lesión generadas por el fitopatógeno en todos los tratamientos, incluyendo el control a 6 °C (hasta los 28 d) y a 20 °C (hasta los 6 d) de las áreas bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) (Campbell y Madden, 1990, p. 193). Con base en las ABCPE, se calcularon los porcentajes de antagonismo de acuerdo con Katoch y Pull (2017), tanto a 6 °C como a 20 °C.

Para este ensayo, se propuso un diseño completamente al azar, donde los tratamientos correspondieron, a las inoculaciones de cada una de las concentraciones de la cepa Lv027 y un control (frutos de tomate inoculados únicamente con el patógeno). Cada tratamiento estuvo constituido por 15 repeticiones, siendo la unidad experimental un fruto de tomate.

Con los valores obtenidos, se realizó un análisis de varianza de los porcentajes de protección obtenidos para cada concentración de la cepa Lv027. Se elaboraron comparaciones de medias de tratamiento por medio de la prueba de rango múltiple de diferencia mínima significativa ($p < 0.05$).

Relación del tiempo de aplicación de la cepa Lv027 con respecto a su actividad antagonista hacia *R. stolonifer*

Con el objeto de determinar la actividad biocontroladora de la levadura Lv027 aplicada en diferentes periodos de tiempo, se hicieron dos heridas de 6mm de diámetro y 3mm de profundidad en la parte de media de frutos de tomate, de acuerdo con la metodología propuesta por García y Cotes (2001). En estos sitios de herida, fue inoculado un primer grupo de tomates con 25 μl de una suspensión con 1×10^7 células \times ml^{-1} de la cepa Lv027 e, inmediatamente después, con 25 μl de 1×10^4 esporangiosporas \times ml^{-1} de *R. stolonifer*. Una vez inoculados con el antagonista y el patógeno, los frutos fueron incubados en cámaras húmedas a temperatura de 6 °C y a 20 °C.

Un segundo grupo de tomates fue inoculado de igual forma, con 1×10^7 células \times ml^{-1} de una suspensión de la cepa Lv027, pero fueron puestos a incubar por 24 h, 18 h, 12 h, y 6 h a temperatura de 6 °C y a 20 °C. Cumplidos estos lapsos de tiempo, los frutos fueron inoculados con 25 μl de una suspensión con 1×10^4 esporangiosporas \times ml^{-1} del patógeno y nuevamente fueron incubados a las mismas condiciones de temperatura y humedad.

Finalmente, un tercer grupo de tomates fue inoculado inicialmente en los sitios de herida, con 25 μl de una suspensión de 1×10^4 esporangiosporas $\times \text{ml}^{-1}$ de *R. stolonifer*. Inmediatamente, estos frutos fueron puestos en cámaras húmedas y almacenados por 24 h, 18 h, 12 h, y 6 h a 6 °C y a 20 °C. Culminados estos periodos de tiempo, los frutos fueron inoculados con una suspensión de la cepa Lv027 en una concentración de 1×10^7 células $\times \text{ml}^{-1}$ e incubados bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura ya mencionadas.

Una vez aparecieron los síntomas de la enfermedad en el control (frutos de tomate inoculados únicamente con *R. stolonifer*) o en cualquiera de los demás tratamientos, se midieron los diámetros de lesión cada 24 h a partir del día 3 hasta el día 6 en los tomates incubados a 20 °C, y cada 48 horas a partir del día 14 hasta el día 28, en aquellos frutos de tomate incubados a 6 °C. A partir de los diámetros de lesión obtenidos, se realizó una evaluación del ABCPE y del porcentaje (%) de antagonismo de la misma forma propuesta en el numeral 2.4.

Para la realización de estos ensayos, se utilizó un diseño completamente al azar. La unidad experimental la constituyó un fruto de tomate. Cada tratamiento lo conformó la inoculación de la cepa Lv027, 6 h, 12 h, 18 h y 24 h antes y después de la inoculación del patógeno, y un tratamiento en el que se inocularon tanto la levadura Lv027 y *R. stolonifer* simultáneamente; además, se incluyó un control, constituido por frutos de tomate inoculados únicamente con el patógeno. Cada tratamiento y el control tuvieron 15 repeticiones, tanto en la prueba realizada a 20 °C como a 6 °C. Para el tratamiento de los resultados de este numeral, se realizó un análisis de varianza de las medias porcentuales de antagonismo obtenidas en todos los tratamientos, incluyendo el control. Posteriormente, se compararon las medias de tratamiento, por medio de la prueba de rango múltiple de diferencia mínima significativa ($p < 0.05$).

Efecto de nutrientes exógenos sobre la actividad antagónica de la cepa *P. onychis* (Lv027) contra *R. stolonifer*

Para observar el desarrollo del micelio de *R. stolonifer* en presencia de la cepa Lv027, se prepararon medios sintéticos (10 g fuente de carbono, 2g L-asparagina, 1 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.7 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de biotina y 100 mg tiamina para 1 litro de H_2O), de acuerdo con la metodología propuesta por Droby et ál. (1989) con diferentes fuentes de carbono, tales como fructosa, glucosa, y sacarosa. Cada medio (20 ml) fue inicialmente inoculado con 25 μl de una suspensión de la cepa Lv027 a una concentración de 1×10^7 células $\times \text{ml}^{-1}$; los medios inoculados con la levadura se mantuvieron en constante agitación a 125 rpm, a 25 °C por 24 h. Posteriormente, cada medio de cultivo fue inoculado con un disco de 6 mm de diámetro de un cultivo del patógeno de 7 d en medio PDA (Oxoid). Nuevamente, cada medio de cultivo fue puesto en las mismas condiciones de agitación y temperatura por 7 d; cumplido este lapso de tiempo, se filtró cada medio de cultivo, utilizando papeles de filtro Watman # 1 (pesados previamente); cada papel de filtro fue puesto a secar a 60 °C por 15 minutos.

Una vez secos, cada papel filtro se pesó; con esto, se obtuvo el peso del micelio del patógeno, al restar peso de los papeles de filtros después de ser secados, menos el peso inicial de los papeles antes de ser usados en la filtración de los medios. Para este ensayo, se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 3 tratamientos que correspondieron a la inoculación de la levadura antagonista cepa Lv027 y *R. stolonifer* en medio sintético con fructosa, glucosa y sacarosa respectivamente, y tres donde solo fue

inoculado *R. stolonifer* en medio sintético con fructosa, glucosa o sacarosa. Cada medio de cultivo correspondió a una unidad experimental, con 15 repeticiones. Para el análisis de los resultados se realizó un análisis de varianza y una posterior comparación de las medias de los tratamientos, mediante la prueba de diferencia mínima significativa ($p < 0.05$).

Interacción de la cepa Lv027 de *P. onychis* con *R. stolonifer* en heridas sobre frutos de tomate

La interacción entre la cepa Lv027 y *R. stolonifer* fue determinada sobre heridas realizadas en la parte media de los frutos de tomate, de la misma forma descrita por García y Cotes (2001). Posteriormente, y de acuerdo con la metodología propuesta por El-Ghaouth et ál. (1997), cada herida fue cubierta con disco de 6 mm de diámetro de una membrana de diálisis, que fue inoculada en cada herida con 20 μl de una suspensión de la cepa Lv027 con una concentración de 1×10^7 células $\times \text{ml}^{-1}$. Los tomates inoculados con cada levadura fueron puestos en cámaras húmedas e incubadas por 24 h a 20 °C. Una vez cumplido este tiempo, las heridas fueron inoculadas con 20 μl de una suspensión de *R. stolonifer* a una concentración de 1×10^4 esporangiosporas $\times \text{ml}^{-1}$ y de nuevo los frutos de tomate fueron mantenidos en cámaras húmedas e incubados durante 6 h, 12 h y 18 h a 20 °C.

Para cada tratamiento, fueron utilizados 8 frutos y, de cada uno, se obtuvieron 2 discos de membrana de diálisis, con el fin de observar la interacción antagonista fitopatógeno en un microscopio compuesto de luz a 400 aumentos. Se tomaron muestras de discos a las 6 h, 12 h y 18 h. Para cada caso, se anotó el porcentaje de emergencia del tubo germinativo y la germinación total de las esporangiosporas de *R. stolonifer*, en presencia y ausencia de células de la levadura cepa Lv027. Adicionalmente, se tomaron fotografías de los discos de diálisis con las esporangiosporas del fitopatógeno y las células de la levadura cepa Lv027 en el microscopio. Para este ensayo se utilizó un diseño completamente al azar. Los tratamientos estuvieron constituidos por un control, en el cual las heridas fueron inoculadas únicamente con una suspensión del fitopatógeno y un tratamiento en el cual se realizó la inoculación en los sitios de herida de cepa Lv027.

Resultados y discusión

Efecto de la concentración de la levadura Lv027 sobre *R. stolonifer*

A 6 °C, con las concentraciones 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ de la cepa Lv027, se observaron valores de antagonismo contra *R. stolonifer* de 91,1 %, 86,2 % y 82,4 %, respectivamente. Dichos valores son mayores con respecto a los porcentajes de antagonismo obtenidos con las concentraciones de 1×10^5 y 1×10^4 células $\times \text{ml}^{-1}$, los cuales arrojaron valores de 43,0 % y de 39,0 %, respectivamente (tabla 1). Por otro lado, únicamente en las concentraciones de 1×10^8 y 1×10^7 células $\times \text{ml}^{-1}$, se presentó ausencia total de síntomas y signos producidos por el patógeno en los sitios de herida, en contraste con la concentración 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$, en donde se observó un leve crecimiento micelial. En cuanto a las concentraciones de 1×10^5 y 1×10^4 células $\times \text{ml}^{-1}$, se observó una pudrición generalizada de los frutos de tomate, lo que demuestra que estas concentraciones no son adecuadas para ser usadas en el control del patógeno a 6 °C.

Al observar los porcentajes de antagonismo contra *R. stolonifer* a 20 °C, con las concentraciones de 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ de la cepa Lv027, se obtuvieron valores del 95,0 %, 85,1 % y 72,0 %

respectivamente (tabla 1), con lo cual se inhibió la presencia de síntomas y signos producidos por el fitopatógeno, a excepción de la concentración 1×10^6 células x ml⁻¹, que presentó una leve manifestación de la pudrición húmeda. Con las concentraciones de la cepa Lv027 de 1×10^5 y 1×10^4 células x ml⁻¹, se obtuvieron porcentajes de antagonismo de 60,0 %, y del 43,0 % respectivamente (tabla 1). Esto retrasó la aparición de síntomas y signos por *R. stolonifer*, pero hacia el día sexto alcanzó abundante crecimiento de micelio y esporulación del patógeno en toda la superficie del fruto. Por tal motivo, estas concentraciones fueron descartadas para el control de la pudrición húmeda a 20 °C.

Con base en los resultados obtenidos tanto a 6 °C como a 20 °C, las concentraciones 1×10^7 y 1×10^8 células x ml⁻¹ de la cepa Lv027 son las únicas efectivas para el control de *R. stolonifer* en frutos de tomate. De esta manera, se pudo establecer que a medida que aumenta la concentración de la levadura antagonista, mayor es la reducción del patógeno en los sitios de herida. Sin embargo, y teniendo en cuenta que las concentraciones 1×10^7 y 1×10^8 células x ml⁻¹ de la cepa Lv027 presentan el mismo nivel de control contra *R. stolonifer*, es más conveniente utilizar la concentración de 1×10^7 células x ml⁻¹, ya que esta, al ser mucho menor que la 1×10^8 células x ml⁻¹, implica menor costo para su aplicación.

Tabla 1. Evaluación de cinco concentraciones de la cepa Lv027 contra *R. stolonifer* en frutos de tomate

Concentración	6 °C		20 °C	
	28 d		6 d	
Células x ml ⁻¹	% de antagonismo			
1×10^8	91,1	a	95,0	a
1×10^7	86,2	a	85,1	ab
1×10^6	82,4	a	72,0	abc
1×10^5	43,0	b	60,0	bc
1×10^4	39,0	b	43,0	c

Fuente: elaboración propia.

Relación del tiempo de aplicación de la cepa Lv027 sobre la actividad biocontroladora de *R. stolonifer*

Al evaluar el efecto del tiempo de aplicación de la cepa Lv027 sobre su actividad antagónica sobre *R. stolonifer* tanto a 6 °C como a 20 °C, únicamente cuando se inoculó 24 h y 18 h antes que el fitopatógeno, se obtuvieron altos porcentajes de antagonismo, los cuales fueron de 94,4 %, y 88,0 % a 6 °C y del 100 % a 20 °C, por lo que se establece que estos tiempos de aplicación deben ser utilizados de forma preventiva (tabla 2). En contraste, al inocular la cepa Lv027 12 h antes que el patógeno, se obtuvo un valor de antagonismo de 73,4 %, de modo que se observó un retraso en el desarrollo de la pudrición húmeda; no obstante, al sexto día alcanzó una intensa manifestación de síntomas y signos de la pudrición húmeda en los tomates tratados, por lo cual no se recomienda aplicar la cepa Lv027 en ese tiempo.

Al inocular la cepa Lv027 6 h antes y simultáneamente con el fitopatógeno, se observaron valores de antagonismo de solo 29,0 % y de 18,4 % respectivamente observándose el desarrollo de síntomas y signos de la pudrición húmeda, por lo que estos tiempos de inoculación se consideran inconvenientes para el control de la pudrición húmeda a temperatura de 6 °C.

Finalmente, cuando se inoculó la levadura 24 h, 18 h, 12 h y 6 h después que el fitopatógeno, se obtuvieron valores muy bajos de antagonismo, los cuales fueron de 0,6 %, 9,0 %, 22,1 % y 10,0 %, respectivamente; de esta manera, se observó el desarrollo de síntomas y signos de *R. stolonifer* en los frutos de tomate a 6 °C (tabla 2). Al observar el efecto del tiempo inoculación sobre la actividad biocontroladora de la cepa Lv027 con respecto a *R. stolonifer* a 20 °C, se observaron porcentajes de antagonismo del 100 % solamente cuando la cepa Lv027 se inoculó 24 h y 18 h antes que el patógeno (tabla 2). Además, se observó una completa inhibición de los síntomas y signos producidos por *R. stolonifer* en los sitios de herida (tabla 2). Al inocular la cepa Lv027, 6 h y 12 h antes que el patógeno a la misma temperatura, se obtuvieron valores de antagonismo de 32,0 % y 49,0 %, respectivamente (tabla 2), donde se observó, como en el caso de los 6 °C, retraso en la aparición de los síntomas y signos de la pudrición húmeda. Cuando se inoculó la cepa Lv027 en simultáneo con el patógeno y 6 h, 12 h, 18 h, y 24 h después del patógeno a 20 °C, se observaron porcentajes de antagonismo muy bajos, con un rango de antagonismo entre 2,0 % y 0,0 %, manifestación temprana en la superficie de los frutos de la pudrición húmeda generalizada, acompañada de abundante crecimiento micelial y esporulación (tabla 2).

De acuerdo con los resultados obtenidos tanto a 6 °C como 20 °C; los únicos tiempos de inoculación de la cepa Lv027 efectivos contra la pudrición húmeda del tomate es a las 24 h y 18 h previos a la inoculación del patógeno, ya que con estos se obtuvieron porcentajes de antagonismo por encima del 85 % contra *R. stolonifer*.

Tabla 2. Efecto del tiempo de aplicación de la cepa Lv027 sobre la actividad antagónica de *R. stolonifer* en frutos de tomate

Periodo de aplicación	6 °C 28 d		20 °C 6 d	
H	% de antagonismo			
24*	94,4	a	100,0	a
18*	88,0	a	100,0	a
12*	73,4	a	49,0	b
6*	29,0	b	32,	c
simultáneamente	18,4	bc	0,0	d
6**	10,0	bc	0,7	d
12**	22,1	bc	0,7	d
18**	9,0	bc	0,7	d
24**	0,6	c	2,0	d

Nota: Los tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de diferencia mínima significativa ($p \leq 0,05$).

*Inoculación de la cepa Lv027 previa a la inoculación de *R. stolonifer*.

**Inoculación de la cepa Lv027 posterior a la inoculación de *R. stolonifer*.

Fuente: elaboración propia.

Efecto de la levadura Lv027 sobre el desarrollo micelial de *R. stolonifer* en presencia de diferentes fuentes de carbono

En este bioensayo, a los 7 d para el control (medios sintéticos solo con la inoculación del fitopatógeno), se observaron valores de peso seco del micelio de 126,0 mg en el medio suplementado con glucosa; 69,0 mg en el medio con sacarosa, y de 51,0 mg en el medio con fructosa (tabla 3). Estos valores fueron menores a los obtenidos cuando se inoculó la cepa Lv027, 24 h antes que el patógeno en los mismos medios de cultivo; así, se obtuvieron valores de 37,0 mg en el medio con fructosa, correspondientes a una reducción del 28,0 % de peso seco; de 26,0 mg en el medio con sacarosa, con una reducción de peso seco de *R. stolonifer* del 62,2 %, y de 22,0 mg en el medio con glucosa, con una reducción 83,0 % (tabla 3).

Tabla 3. Evaluación de la competencia por diferentes tipos azúcares entre la cepa Lv027 y *R. stolonifer* en un medio sintético

Azúcar	<i>R. stolonifer</i> (control)	<i>R. stolonifer</i> con cepa Lv027	Reducción en peso seco de <i>R. stolonifer</i>
Glucosa	126,0 a	22.0 c	83,0 %
Fructosa	51,0 b	37.0 c	28,0 %
Sacarosa	69,0 b	26.0 c	62,2 %

Nota: los tratamientos con letras iguales, no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de rango múltiple de diferencia mínima significativa ($p \leq 0,05$).

Fuente: elaboración propia.

Efecto de cepa Lv027 sobre la germinación de *R. stolonifer*

A las 6 d no se observa evidencia de la aparición del tubo germinativo en las esporangiosporas de *R. stolonifer* con y sin ausencia de la cepa Lv027. A las 12 h, en ausencia de la cepa Lv027, se observa de forma general la aparición del tubo germinativo en las esporangiosporas (figura 1a); en contraste, ninguna esporangiospora presenta tubo germinativo a las 12 h en presencia de la cepa Lv027 y además se observa adhesión de esta en las paredes celulares de las esporas en mención (figura 1c). A las 18 h, en ausencia de la cepa Lv027, se observa germinación masiva las esporangiosporas, en donde la longitud del tubo germinativo alcanzó tres veces la longitud del diámetro de las esporas, con lo que se empezó a conformar una intrincada red de hifas del patógeno (figura 1b). En contraste, cuando se inoculó la cepa Lv027 en el medio sintético con el fitopatógeno, a las 18 h se observa a las esporangiosporas totalmente rodeadas por las células de la levadura cepa Lv027, con adhesión a las paredes de las esporas de patógeno de las células de este microorganismo antagónico. De otra parte, las esporas del fitopatógeno no presentan evidencia de germinación (figura 1d).

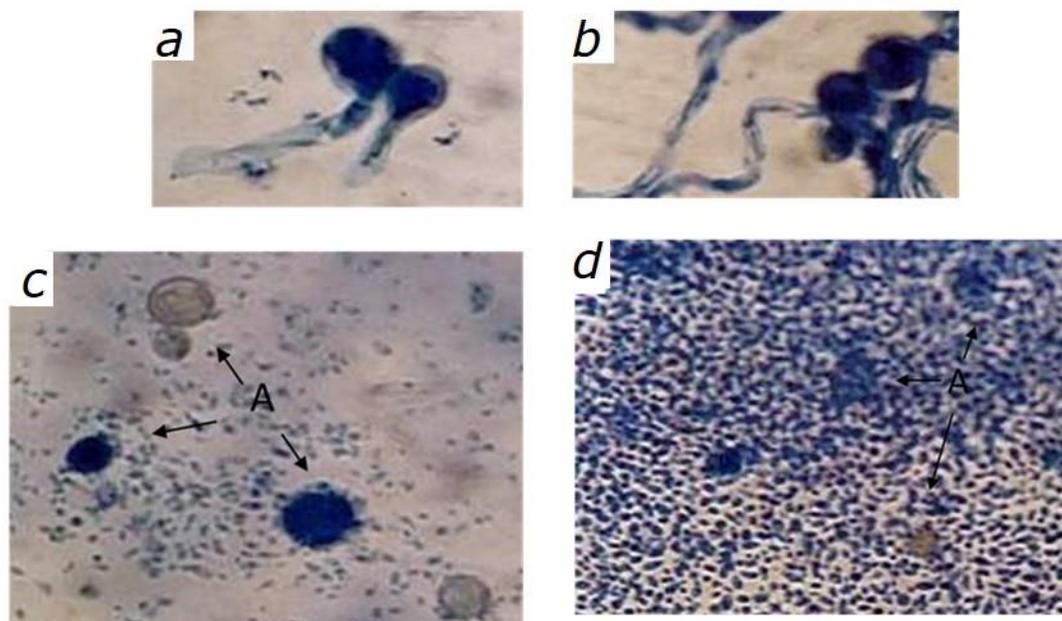


Figura 1. Fotografías de esporangiosporas: a) esporangiosporas (12 h a 400 aumentos); b) esporangiosporas (18 h a 400 aumentos); c) esporangiosporas (A) en presencia de la cepa Lv027 (12 h a 400 aumentos); d) esporangiosporas (A) en presencia de la cepa Lv027 (18 horas a 400 aumentos).

Fuente: elaboración propia.

Cuando fue inoculado *R. stolonifer* en la membrana de diálisis en contacto con la cepa Lv027, a las 12 h se presentó un porcentaje de emergencia del tubo germinativo de las esporangiosporas del 19,0 % (tabla 4). Este valor de germinación es más bajo al obtenido con las esporangiosporas en ausencia de la levadura antagonista, donde la emergencia del tubo germinativo fue del 85,0 %; a las 18 h, las esporangiosporas presentaron un valor de germinación del 15,0 % en presencia de la cepa Lv027, el cual fue inferior al obtenido en ausencia de esta cepa, en el cual las esporangiosporas de *R. stolonifer* alcanzan un valor del 92,0 % (tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la interacción de la cepa Lv027 con *R. stolonifer* en frutos de tomate.

Esporangiosporas	<i>R. stolonifer</i> sin la cepa Lv027	<i>R. stolonifer</i> con la cepa Lv027
% emergencia tubo germinativo	85,0	19,0
% de germinación	92,0	15,0

Fuente: elaboración propia.

Los resultados observados con la aplicación de la levadura *P. onychis* cepa Lv027 a concentraciones 1×10^8 y 1×10^7 células $\times \text{ml}^{-1}$ contra *R. stolonifer* coinciden con los resultados de una evaluación de antagonismo de las cepas K de la levadura *Pichia anomala* y la cepa O de la levadura *Candida oleophila*, contra el complejo parasitario *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, *Fusarium moniliforme* J. Sheld., 1904 y *Cephalosporium* sp., responsable de la pudrición de la corona del banano. En este ensayo, se aplicaron las mencionadas cepas de levaduras a concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 ufc $\times \text{ml}^{-1}$, en donde el nivel de protección más alto (54,4 %) se observó con la cepa O, aplicada a una concentración de 1×10^8 ufc $\times \text{ml}^{-1}$ en coronas de banano previamente inoculadas con el complejo fúngico.

CITAS

Además, el efecto antagonista de estas cepas de levaduras se reforzó fuertemente cuando se aplicó la cepa *O* a una concentración de 1×10^8 ufc x ml⁻¹, pero inoculada 24 h antes de que la inoculación del complejo fúngico alcanzara una protección del 60,0 %, en comparación con su aplicación 15 min antes, con una protección del 24,3 %, o aplicadas 3 h, con una protección de solo el 27,3 % (Lassois et ál., 2008).

De otra parte, los resultados de antagonismo con la cepa Lv027 de la especie *P. onychis* contra *R. stolonifer*, causante de la pudrición húmeda en tomate, son similares a los observados por *Pichia membranefaciens*, pero en frutos de melocotón contra este mismo patógeno. Una explicación de este fenómeno es que con la mencionada levadura se modulan señales para la producción de etileno (ET), ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS), moléculas relacionadas con fenómenos de resistencia hacia el fitopatógeno (Zhang, Wu et ál., 2020).

Otras especies de levaduras epífitas han sido reconocidas por su potencial para el control biológico de fitopatógenos en poscosecha (como es el caso del género *Metschnikowia*). Dentro de ellas, algunas producen la molécula pulquerrimina, asociada al antagonismo de esta levadura hacia hongos fitopatógenos de los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Verticillium* (Pawlikowska et ál., 2019).

En cuanto a los fenómenos de competencia especialmente por fuentes nutricionales observados con la cepa Lv027 en esta investigación, también han sido observados con otros hongos antagonistas, como *Aureobasidium pullulans* contra *Botrytis cinerea*, causante del moho gris. Este tipo de competencia también es asociada al consumo más eficiente de nutrientes y la ocupación de espacio por parte de este hongo antagonista; fue observada con las cepas L1 y L8 de *A. pullulans* contra *Monilinia laxa* en frutos de melocotón (Di Francesco et ál., 2018).

En otro ensayo, también se observó la inhibición de síntomas y signos de *B. cinerea* en tallos de rosa (variedad Vendela), tratados previamente con las cepas DSM 14940 y DSM 14941 de *A. pullulans*. Esta actividad biocontroladora se atribuye a fenómenos de competencia principalmente por nutrientes y espacio (García-Murillo, 2021).

Los resultados de la emergencia de los tubos germinativos y de la germinación de las esporangiosporas de *R. stolonifer* obtenidos al interactuar con las células de la cepa Lv027, se pueden explicar debido a la rápida capacidad de colonización de la levadura antagonista sobre la superficie de las heridas en frutos de tomate. Esto coincide con los resultados obtenidos en diferentes estudios, donde se ha observado que las células de las levaduras rodean las esporas de diferentes hongos fitopatógenos al punto de inhibir su germinación.

Además, se evidencian daños citológicos en sus hifas y esporas, pues se observa degeneración del citoplasma y las paredes celulares de estos microorganismo patógenos. Este fenómeno se ve favorecido por la escasez de las fuentes nutricionales, causadas por una rápida multiplicación de las levaduras en los sitios de aplicación. Otros autores señalan también que los daños citológicos pueden estar relacionados con la producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de los patógenos como la β -1,3 glucanasa (Zhang et ál., 2021).

Otros autores han encontrado cepas altamente antagonistas aisladas de zarzamora como la BSS y BSL, pertenecientes a la especie de la bacteria *Bacillus subtilis*, la cepa BLI de la bacteria *Bacillus licheniformis* y la cepa LAQ de la bacteria *Leifsonia aquatica* contra *R. stolonifer* en frutos de zarzamora. De esta manera,

se evidencia que las mencionadas cepas tienen un potencial alto para el control de la pudrición producida por este fitopatógeno; esta actividad antagónica se relaciona con la producción de sideróforos por parte de las cepas mencionadas, que reducen en un 93 % la germinación de las esporangiosporas de *R. stolonifer* (cepa RSC) después de 48 h (Chavez-Díaz et ál., 2019). Lo anteriormente expuesto coincide con los resultados descritos en este documento, en donde la inhibición de la germinación de las esporangiosporas de *R. stolonifer* también fue observada en presencia de la cepa de Lv027 de *P. onychis*, pero en frutos de tomate.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- Las concentraciones de 1×10^8 y 1×10^7 esporangiosporas x ml⁻¹, respectivamente, presentan alta actividad antagónica contra *R. stolonifer* en frutos de tomate a 6 °C y 20 °C.
- La levadura *P. onychis* cepa Lv027 presenta una alta actividad inhibitoria de *R. stolonifer*, si se aplica mínimo 18 horas antes que *R. stolonifer* por lo que su acción es de tipo preventiva.
- La cepa Lv027 es más eficiente en el aprovechamiento de fuentes nutricionales que *R. stolonifer* en condiciones de crecimiento en un modelo de evaluación *in vitro* e *in planta*.
- La emergencia del tubo germinativo y la germinación de las esporangiosporas de *R. stolonifer* es inhibida por la cepa Lv027 en frutos de tomate.

Referencias

- Campbell, C. L. y Madden, L. V. (Eds.). (1990). *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons.
- Chavez-Díaz, I. F., Mena-Violante, H. G., Hernandez-Lauzardo, A. N., Oyoque-Salcedo, G., Oregel-Zamudio, E. y Angoa-Perez, M. V. (2019). Postharvest control of *Rhizopus stolonifer* on blackberry (*Rubus fruticosus*) by blackberry native crop bacteria. *Rev. FCA UNCUYO*, 51(2), 306-317. <http://www.scielo.org.ar/pdf/refca/v51n2/v51n2a24.pdf>
- Díaz, M. A., Pereyra, M. M., Picón-Montenegro, E., Meinhardt, F. y Dib, J. R. (2020). Killer Yeasts for the Biological Control of Postharvest Fungal Crop Diseases. *Microorganisms*, 8(11), 1680. <https://doi:10.3390/microorganisms8111680>
- Di Francesco, A., Mari, M., Ugolini, L. y Baraldi, E. (2018). Effect of *Aureobasidium pullulans* strains against *Botrytis cinerea* on kiwifruit during storage and on fruit nutritional composition. *Food Microbiology*, 72, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.010>
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L. y Wisniewski, M. (1989). Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(8), 794-800. <https://doi.org/10.1139/m89-132>
- El-Ghaouth, A., Wilson C. L. y Wisniewski, M. (1997). Antifungal Activity of 2-Deoxy-D-Glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*: Ultrastructural and Cytochemical Aspects. *Phytopathology*, 87(7):772-9. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.7.772>
- Fenta, L., Mekonnen, H. y Gashaw, T. (2019). Biocontrol potential of *Trichoderma* and yeast against post harvest fruit fungal diseases: A review. *World News of Natural Sciences* 27 (2019), 153-173. <https://bit.ly/3i0LKt0>
- Freimoser, F.M., Rueda-Mejía, M.P., Tilocca, B. y Quirico, M. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(154), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>

- García, P. G. y Cotes, A. M. (2001). Búsqueda de alternativas de control biológico de *Rhizopus stolonifer* en la post-cosecha de tomate. *Fitopatología colombiana*, 25 (1), 39–47.
- García-Murillo, P. G. (2021). Evaluación de cuatro biofungicidas y dos cepas del género *Trichoderma* contra el moho gris en Rosa. *Rev. Facultad de Agronomía UBA*, 41 (1) 31-38.
<http://agronomiayambiente.agro.uba.ar/index.php/AyA/article/view/162/125>
- Katoch, M. y Pull, S. (2017). Endophytic fungi associated with *Monarda citriodora*, an aromatic and medicinal plant and their biocontrol potential. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 1528 - 1535.
<http://doi.org/10.1080/13880209.2017.1309054>
- Laundon, G. (1977). *C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria (Set 55), Nos. 541-550*. Commonwealth Mycological Institute.
- Lassois, L., Bellaire, L. y Jijakli, M. (2008). Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. *Biological Control*. 45 (2008) 410–418.
<http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.013>
- Nandhini, M., Harish, S., Beulah, A. y Eraivan Arutkani Aiyanathan, K. (2019). Antagonistic activity of epiphytic yeast against grapes mold caused by *Rhizopus* sp. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 2302-2306. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue3/PartAF/8-3-135-404.pdf>
- Obiazikwor, O. H., Ofeimu, O. V. y Onome, F. (2021). Screening of fungal endophytes for their biocontrol potential against *Rhizopus* sp. isolated from diseased cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Biology and Medical Research*, 4(2), 25-37. <https://bit.ly/3Qb4TVO>
- Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H. y Kregiel, D. (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112(10), 1425-1445.
<https://doi.org/10.1007/s10482-019-01272-w>
- Soto, F., Tramón, C., Aqueveque, P., y De Bruijn, J. (2018). Microorganismos antagonistas que inhiben el desarrollo de patógenos en post-cosecha de limones (*Citrus limon* L.). *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 34(2), 173-184. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902018005000406>
- Zhang, X., Wu, F., Gu, N., Yan, X., Wang, K., Dhanasekaran, S., Gu, X., Zhao, L. y Zhang, H. (2020). Postharvest biological control of *Rhizopus* rot and the mechanisms involved in induced disease resistance of peaches by *Pichia membranefaciens*. *Postharvest Biology and Technology*, 163, 111146.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111146>
- Zhang, H., Serwah Boateng, N. A., Ngolong Ngea, G. L., Shi, Y., Lin, H., Yang, Q., Wang, K., Zhao, L. y Droby, S. (2021). Unravelling the fruit microbiome: The key for developing effective biological control strategies for postharvest diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4906-4930.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12783>