

Microflora de naranja adaptada al frío y su actividad antagonica frente a *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc

Visintin, Griselda; García, Blanca; Cáceres, Carina; Ludi Barzante, Luciano; Befani, Romina

Resumen

Sobre las plantas existen poblaciones de microorganismos donde es posible encontrar antagonistas de patógenos. El presente artículo trata sobre la obtención de microorganismos que habitan la superficie de los cítricos y su preselección como potenciales antagonistas de patógenos poscosecha. Considera además, obtenerlos desde heridas en las frutas y su adaptación a condiciones de almacenamiento en frío. Diez aislamientos fueron evaluados como antagonistas potenciales de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc mediante inoculación forzada, registrando su eficacia mediante el porcentaje de heridas que permanecían asintomáticas y calculando el área bajo la curva de progreso de la enfermedad. Las cepas bacterianas S5 y S9 retrasaron 14 días la aparición de síntomas de podredumbres, logrando una eficacia máxima de protección biológica del 47,65%.

Palabras clave: fitopatología, biocontrol, podredumbres poscosecha

Artículo derivado del PID Cód. 2142, Universidad Nacional de Entre Ríos - UNER - (Entre Ríos, Argentina); ingresado en junio 2013; admitido en noviembre 2013.

Autores: Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER (Oro Verde, Entre Ríos, Argentina).

Contacto: gvisintin@fca.uner.edu.ar

Orange microflora adapted to cold and antagonistic activity against *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc

Abstract

The surface of plants is inhabited by populations of microorganisms in which it is possible to find pathogens antagonists. The present paper deals about the collection of microorganisms that inhabit the surface of citrus and their screening as potential postharvest pathogens antagonists. Protocols obtained in the study also considered microorganisms obtained from wounds in fruits and their adaptation to cold storage conditions. Ten isolates were evaluated as potential antagonists of *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc by forced inoculation, recording their effectiveness by the percentage of wounds that remained asymptomatic and calculating the area under the curve of disease progression. Under the conditions of this study, strains S5 and S9 delayed 14 days the onset of symptoms of decay, achieving a maximum wounds biological protection efficiency of 47.65%.

Keywords: plant pathology, biocontrol, postharvest rots

Microflora de laranja adaptada ao frio e sua atividade antagônica contra *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc

Resumo

Sobre a superfície das plantas existem populações de microrganismos nas que pode-se encontrar antagonistas de patógenos. Este artigo trata da obtenção de microrganismos que habitam a superfície dos citros e sua pré-seleção como potenciais antagonistas de patógenos que atuam em pós-colheita. Os protocolos obtidos no trabalho consideram também a obtenção a partir de fermentos nas frutas e sua adaptação a condições de armazenamento refrigerado. Dez isolados foram testados como antagonistas potenciais de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc por inoculação forçada, registrando sua eficácia mediante a porcentagem de feridas que permaneciam assintomáticas e calculando a área sob a curva de progresso da doença. De acordo com as condições deste trabalho, as cepas bacterianas S5 e S9 retardaram 14 dias a aparição de sintomas de podridão, atingindo no máximo uma eficácia de proteção biológica de fermentos de 47,65%.

Palavras chave: fitopatologia, biocontrole, podridões pós-colheita, citros

I. Introducción

Una de las finalidades primordiales de la aplicación de tratamientos de poscosecha es el control efectivo de las podredumbres, que limitan la vida útil de los productos frutihortícolas y reducen considerablemente su potencial de conservación frigorífica [1]. En los cítricos, la mayoría de las pérdidas poscosecha de origen infeccioso, producidas durante la globalidad del proceso de comercialización, son debidas a *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. y *P. italicum* Wehmer, causantes de las podredumbres verde y azul respectivamente [1,2,3,4,5]. El control de estas enfermedades contempla desde normas de cosecha cuidadosa hasta la aplicación de tratamientos antifúngicos, entre los que se encuentran los fungicidas de síntesis tradicionales. Como alternativas, existen sustancias naturales o de síntesis, con efectos residuales sobre el medio ambiente y toxicológicos sobre personas y animales, conocidos y muy bajos. Por esta razón, la mayoría de los candidatos ensayados son sustancias presentes en forma natural en las plantas, microorganismos o aditivos alimentarios [6].

El control biológico de fitoenfermedades considera la utilización controlada de microorganismos que antagonizan con los patógenos, y una estrategia para obtener efectivos agentes biocontroladores es hallarlos en aquellos lugares donde coincidan la planta hospedera, el patógeno y el ambiente favorable al desarrollo de la enfermedad [7,6]. Si bien en Argentina es muy escasa la información sobre los microorganismos que componen la microflora de los cítricos y su forma de interactuar con los patógenos de poscosecha, la cátedra Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Entre Ríos -UNER-, ha realizado investigaciones sobre el tema desde hace diez años [4]. Estos estudios han incluido la extracción de microorganismos presentes sobre frutos y hojas de citrus, y su actividad antagónica sobre *Penicillium* spp., aunque sin considerar su adaptación a las condiciones de almacenamiento de frutas en cámaras frigoríficas.

En la naturaleza, las plantas viven en permanente interacción con poblaciones de microorganismos cuya presencia es constante a pesar de las oscilaciones de temperatura, vientos, exposición a la luz ultravioleta o la disponibilidad limitada e intermitente de agua. En dichas

poblaciones, existe una interacción continua entre los potenciales patógenos capaces de producir enfermedad en las plantas y otros microorganismos cuya acción antagónica evita o disminuye los niveles de enfermedad [1]. La superficie de hojas y frutas cítricas contiene una abundante microflora, compuesta principalmente por bacterias y levaduras, entre las que es posible obtener cepas antagónicas de patógenos poscosecha. Entre éstos, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc penetra e infecta heridas ocasionadas sobre las frutas, las cuales posteriormente serán almacenadas en cámaras frigoríficas. Esto nos llevó a suponer, en primer lugar, que podría obtenerse un biocontrolador de dichas heridas, que es el ambiente al que está destinado a proteger biológicamente, y por otro lado, que se requeriría que el mismo estuviera adaptado a condiciones de almacenamiento en frío [8,2,3,4,5].

Según estas premisas, nuestro objetivo en el trabajo que se expone fue extraer la microflora de heridas y frutoplano de naranjas y evaluar su antagonismo potencial frente a *P. digitatum*.

II. Materiales y métodos

II.1. Extracción de microorganismos

En junio de 2010, se realizó el aislamiento de microorganismos desde naranjas de la variedad Salustiana. En un lote implantado en la Estación Experimental Agropecuaria –EEA– Concordia del Intituto Nacional de Tecnología Agropecuaria –INTA– se realizaron heridas en frutas de distintas plantas en estado de madurez comercial. Las heridas fueron circulares, superficiales, de aproximadamente 1x2 mm, y otras más profundas, de 1x3-4 mm. Las frutas heridas permanecieron en los árboles durante una semana considerando que sobre ellas podrían desarrollarse microorganismos benéficos con posibilidad de ser antagónicos de patógenos poscosecha [7]. Después de 7 días, las frutas fueron cosechadas y se almacenaron en cámaras de la Sección poscosecha de INTA EEA Concordia durante 30 días a 5° y 90-95% de HR.

Además, otro grupo de naranjas del mismo lote, cosechadas en madurez comercial y sin lavar, se almacenaron durante 30 días en las mismas cámaras y bajo iguales condiciones [7].

Previa adaptación a estas condiciones de almacenamiento en cámaras frigoríficas, la extracción se efectuó desde la superficie de las naranjas (frutoplano) y desde heridas provocadas.

II.2. Aislamiento de microorganismos presentes en heridas de frutas, adaptados a incubación en frío

La extracción de la microflora presente en las heridas se realizó en laboratorio con base en el siguiente protocolo, readaptado de [4].

1. En las frutas heridas y asintomáticas, localizar las heridas y extraer una porción de epicarpio y albedo de 0,5 cm de diámetro que las contenga (n=50).

2. Formar muestras compuestas de 10 secciones. Colocar en erlenmeyer con 10 mL de solución tampón fosfato peptona.

3. Agitar en agitador orbital durante 30 min. a 300 rpm.

4. Del agua de lavado, previa agitación en vortex, preparar diluciones decimales.

5. Sembrar alícuotas de 0,1 mL de la suspensión original, D1 y D2, por duplicado en APG 2%.

6. Incubar las cajas en heladera a 5 °C durante 15 días.

7. Repicar colonias bacterianas y levaduriformes, y mantener en heladera a 5°C.

II.3. Aislamiento de microorganismos presentes en el frutoplano de naranjas, adaptados a incubación en frío

La extracción de la microflora presente sobre su superficie se realizó lavando las frutas enteras en bolsas de cierre hermético con 100 ml de solución *tampón* fosfato peptona, según el siguiente protocolo readaptado de [4]:

1. Seleccionar frutas sin heridas visibles y asintomáticas.

2. Colocarlas individualmente en bolsa de cierre hermético, con 100 mL de solución tampón fosfato peptona.

3. Agitar 45 min. a 1200 rpm.

4. Del agua de lavado, preparar diluciones decimales.

5. Sembrar alícuotas de 0,1 mL de la suspensión original, D1 y D2, por duplicado en APG 2%.

6. Incubar las cajas en heladera a 5 °C durante 15 días.

7. Repicar colonias bacterianas y levaduriformes, y mantener en heladera a 5°C.

La incubación en heladera de las cajas de petri sembradas con las suspensiones procedentes de frutas y heridas permitió el crecimiento de distintas colonias diferenciables a simple vista por su morfología y color. Desde las cajas con las distintas diluciones, se seleccionaron algunas colonias para mantenerlas en tubos pico de flauta conteniendo APG 2%, a 5°C en heladera. Cada aislamiento codificado se observó microscópicamente, lo que permitió clasificarlo en bacterias o levaduras.

Las estrategias de aislamiento de los microorganismos consideraron entonces la facultad de colonizar las frutas como epífitos, de crecer en el sitio de acción (las heridas de las frutas) como biocontroladores y la capacidad de proliferar en condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas [7].

II.4. Evaluación de antagonismo mediante inoculación forzada de heridas

Después del aislamiento de los microorganismos, y con el objetivo de preseleccionar algunos de ellos por su capacidad para inhibir las podredumbres causadas por *P. digitatum*, se realizaron inoculaciones forzadas de la mezcla de cada microorganismo y el patógeno. Para ello, se cosecharon frutas de naranja Valencia Late en lotes de la EEA Concordia de INTA, y se utilizó la cepa patógena de *P. digitatum* P160, resistente al fungicida Imazalil y a la mezcla Imazalil+Tiabendazol. Los microorganismos evaluados por inoculación de heridas fueron seis bacterias y cuatro levaduras (**Tabla 1**).

TABLA 1. Código, tipo y procedencia de microorganismos Destinados a inoculación forzada de heridas

MICROORGANISMOS			
BACTERIAS		LEVADURAS	
Código	Origen	Código	Origen
S 1	Heridas	S 4	Heridas
S 3	Heridas	S 5	Heridas
S 7	Heridas	S 14	Frutoplano
S 9	Heridas	S 15	Frutoplano
S 10	Heridas		
S 16	Frutoplano		

Proponiendo una metodología fácil y rápida, se produjeron siete heridas en la zona ecuatorial de las frutas, considerándose cada una como una repetición [9]. En seis de ellas, se inoculó cada microorganismo junto al patógeno, mientras que en la herida control sólo se inoculó el patógeno. El protocolo de inoculación desarrollado previamente por nuestro equipo en esta misma línea de investigación [4] fue el siguiente:

1. Lavar las frutas con agua corriente y desinfectarlas por inmersión en hipoclorito de sodio 5% y alcohol 70°.
2. Dejar secar las frutas.
3. Marcar 7 círculos (6 tratados y un testigo) en la zona ecuatorial de cada fruta.
4. Destacar uno para herida testigo con una marca especial.
5. En el centro de cada círculo producir una herida de 2x2mm.
6. Preparar 6mL de suspensión mezcla de patógeno y microorganismo: *P. digitatum* (2 ml (3×10^5 con/mL) + 4 mL de suspensión del microorganismo al 10%T.
7. Testigo: Preparar 6mL de suspensión del patógeno (2 mL (3×10^5 con/mL) + 4 mL de solución tampon)
8. Inocular las heridas con 10 μ L de la suspensión mezcla del microorganismo+ *Penicillium*.
9. En la herida testigo inocular 10 μ L de suspensión de *Penicillium* solo (8×10^4 con/mL)

10. Realizar cuatro repeticiones.

11. Una vez secas las heridas, embolsar individualmente las frutas en bolsas de cierre hermético creando una cámara húmeda.

12. Incubar en heladera durante 28 días, a 5°C.

Semanalmente se registró el porcentaje de heridas tratadas con cada microorganismo que permanecieron asintomáticas, sanas, protegidas frente a la acción del patógeno, y la incidencia de heridas sintomáticas como porcentaje de heridas con hidrosis y podredumbre húmeda. A los 28 días desde la inoculación, este porcentaje fue expresado como eficacia de protección biológica (en %) relativa al testigo según la fórmula:

$$\left[\frac{\text{Incidencia enfermas en Testigo} - \text{Incidencia enfermas tratamiento biológico}}{\text{Incidencia enfermas testigo}} \right] * 100.$$

Estos registros permitieron detectar los microorganismos de mejor comportamiento como protectores de heridas y construir curvas de progreso de la enfermedad (CPE), de los aislamientos considerados promisorios como antagonistas y de las podredumbres en heridas testigo, en función del tiempo.

Los valores de incidencia de heridas sintomáticas, expresados en proporción, fueron transformados a $\ln(y/(1-y))$. Mediante un análisis de regresión lineal simple (Programa InfoStat) [10] entre los valores transformados como variable dependiente y el tiempo como variable independiente, se obtuvieron las ecuaciones de ajuste al modelo Logístico y las tasas de progreso de la enfermedad (r_t). El programa Derive™6 trial edition, version 6.0, Texas Instruments, Inc., permitió calcular las áreas bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) como integrales definidas entre los 7 y los 28 días de tratamiento.

Se realizó un análisis de los tratamientos biológicos de mayor eficacia respecto al testigo *Penicillium* considerando: la exploración gráfica de las CPE, las incidencias finales de enfermedad, las eficacias de protección biológica, los días libres de enfermedad, las tasas de progreso y las ABCPE.

III. Resultados y discusión

III.1. Microorganismos aislados desde heridas

De un total de 50 heridas, se obtuvieron 12 aislamientos, de los cuales 10 (83,33%) correspondieron a bacterias y dos (16,66%) a levaduras.

III.2. Microorganismos aislados desde el frutoplano de naranjas

Del procesamiento de 26 naranjas Salustiana, se obtuvieron 33 aislamientos, de los cuales 20 (60,6%) correspondieron a bacterias y 13 (39,4%) a levaduras. Al igual que los microorganismos obtenidos desde heridas de frutas, se almacenaron a 5°C. En ambos casos, el crecimiento y supervivencia de colonias a 5°C permite suponer su adaptación al ambiente de las cámaras de almacenamiento de frutas una vez cosechadas. Este es uno de los factores considerados centrales dentro de las investigaciones realizadas con biocontroladores, debido a que su adaptación a las bajas temperaturas garantizaría mantener su bioactividad y, por ende, su eficacia antagónica en aplicaciones bajo condiciones de comercialización externa [7,1,4].

Los ensayos permitieron constatar que la microflora que se adapta más fácilmente al ambiente de las heridas está constituida por bacterias, y a la vez fue la que predominó en el frutoplano de naranjas Salustiana. Sin embargo, en otros estudios se ha podido constatar que es posible obtener composiciones microbianas diferentes al utilizar otras especies cítricas, con madurez en distintas épocas del año, y condiciones ambientales diferentes que pueden influir sobre la constitución y dinámica poblacional de los microorganismos presentes [2,4].

En principio, esto permitiría considerar a las bacterias como las principales antagonistas potenciales de patógenos de poscosecha presentes en heridas, en naranjas cosechadas en Entre Ríos.

III.3. Evaluación de microorganismos por su capacidad para inhibir las podredumbres causadas por *Penicillium digitatum*

III.3.1. Progreso de heridas asintomáticas en función del tiempo

A los 21 días desde la inoculación forzada, el 80% de los microorganismos evaluados resultó ineficaz como protector biológico, con valores que variaron entre 0 y 37,5% de heridas protegidas. Pero se logró detectar un notable comportamiento diferencial de los tratamientos S5 y S9 como microorganismos protectores. Considerando las heridas testigo, inoculadas sólo con el patógeno, solamente el 25% se mantuvo como asintomáticas. En ese momento, la levadura S5 protegía biológicamente el 66,70% de las heridas, mientras que la bacteria S9 mantuvo 79,17% de las heridas asintomáticas (**Tabla 2, Figura1**).

A los 28 días desde la inoculación, el porcentaje de heridas asintomáticas disminuyó a 37,50% en el tratamiento con S5, a 54,20% con S9, y a 12,50% en el testigo.

TABLA 2. Porcentaje de heridas asintomáticas protegidas con S5 y S9 respecto al testigo *Penicillium*, y eficacia de protección a los 28 días desde la inoculación

TRATAMIENTO	INCIDENCIA (%) DE HERIDAS ASINTOMÁTICAS				EFICACIA DE PROTECCIÓN BIOLÓGICA (%)
	7 días	14 días	21 días	28 días	28 días
S5 + Penic.	100	100	66,70	37,50	28,57
S9 + Penic.	100	100	79,17	54,20	47,65
Testigo	87,50	62,5	25	12,50	-

La eficacia final de protección biológica de cada tratamiento relativa al tratamiento testigo fue de 28,57% aplicando la levadura S5 y de 47,65% aplicando la bacteria S9 (**Tabla 2**).

La exploración gráfica de las CPE de los tratamientos S5 y S9 respecto al testigo y en función del tiempo (**Fig. 1**) muestra, en primer lugar, el progreso de los síntomas de hidrosis y podredumbres en heridas testigo sin la protección biológica de antagonistas. Por otro lado, revela un proceso diferente de la enfermedad al tratar las heridas con S5 y S9 interactuando con el patógeno. Gráficamente, en este proceso se

observa un evidente retraso en el inicio de la incidencia de heridas sintomáticas, protegiendo las heridas durante los primeros 14 días de almacenamiento en frío. Esto significaría disponer de 14 días libres de enfermedad para comercializar las frutas en el mercado. La exploración muestra, además, que los tratamientos biológicos disminuyen la incidencia final respecto al testigo, lo que implica, a su vez, la disminución de las ABCPE.

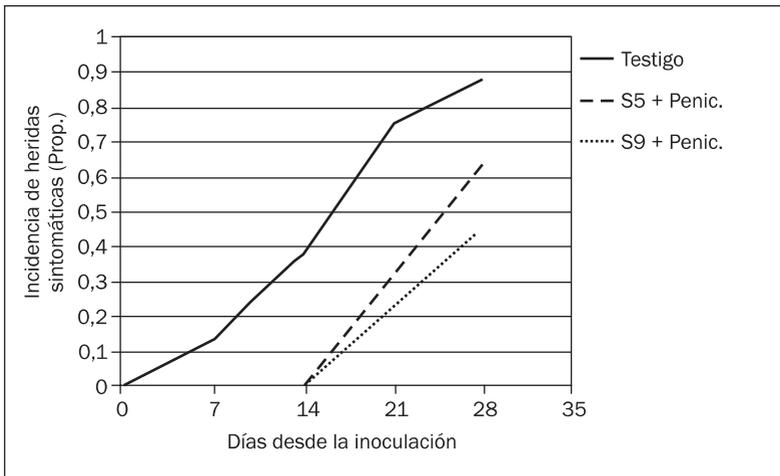


FIGURA 1. CPE causadas por *P.digitatum* en heridas de naranjas tratadas biológicamente con S5 y S9. Diferencias respecto a heridas testigo

El tratamiento estadístico y matemático de los datos permitió obtener las ecuaciones de ajuste al modelo logístico para cada tratamiento, las tasas r_L , los coeficientes R^2 y las funciones (y) resueltas, para la incidencia de heridas sintomáticas (**Tabla 2**).

TABLA 2. Ajuste de las CPE de los tratamientos Testigo, S5 y S9 al Modelo Logístico, Coeficientes R², tasas r_L y funciones obtenidas

Trat.	Ecuación de ajuste Modelo Logístico	R ²	Tasa r _L	Función de y para cada tratamiento
Testigo	$\ln(y/(0,9-y)) = 0,26 \cdot t - 3,77$	1,00	0,26	$y = 4,8 \cdot 10^5 \cdot e^{0,26t} / 5,4 \cdot 10^5 \cdot e^{0,26t} + 2,3 \cdot 10^7$
S5 + Penic.	$\ln(y/(0,7-y)) = 0,46 \cdot t - 10,88$	0,88	0,46	$y = 1709,4 \cdot e^{0,46t} / 2442 \cdot e^{0,46t} + 1,29 \cdot 10^8$
S9 + Penic.	$\ln(y/(0,5-y)) = 0,45 \cdot t - 10,52$	0,89	0,45	$y = 3940 \cdot e^{0,45t} / 7880 \cdot e^{0,45t} + 2,91 \cdot 10^8$

Referencias:

y: Incidencia de heridas sintomáticas; función matemática obtenida

(1-y): deriva de logit: $\ln(y/(1-y))$

t: tiempo

R²: Coeficiente de ajuste al modelo logístico

r_L: tasa de infección según el modelo logístico

El ajuste al modelo logístico permitió obtener las tasas de progreso de la enfermedad (r_L) desde los 7 a los 28 días. Los resultados muestran que, en las heridas tratadas biológicamente, las velocidades de progreso de las podredumbres (0,46 para S5 y 0,45 para S9) en promedio, fueron 1,75 veces mayores que en las heridas testigo (0,26), donde el patógeno ejercía su patogenicidad sin interactuar con otros microorganismos. Cabe destacar que S9 y S5 fueron totalmente eficaces protegiendo las heridas durante los primeros 14 días de tratamiento en los que interactuaban con la población del patógeno. Durante esos 14 días, las tasas de progreso fueron nulas, y recién desde allí prácticamente se duplicaron respecto a las del testigo.

La técnica de inoculación realizada implicó provocar heridas y, de este modo, la liberación de aceites esenciales y ácidos, sustancias favorables para la germinación y colonización del patógeno en ellas. Por otro lado, considero la penetración de una elevada concentración de propágulos del patógeno (3×10^4 con/mL) y el mantenimiento de un ambiente húmedo. Estas características nos permiten considerarla como una técnica de inoculación agresiva, ante la cual se rescata la importancia de poder contar con dos semanas para comercializar frutas sanas [11].

La aplicación de integrales definidas entre los 7 y 28 días para cada una de las funciones y obtenidas permitió calcular las ABCPE para S5 y S9 y sus diferencias porcentuales respecto al tratamiento testigo (**Tabla 3**).

TABLA 3. Áreas bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) aplicando dos antagonistas protectores de heridas y su diferencia porcentual respecto al testigo

Tratamiento	ABCPE	% respecto al testigo
Testigo	11,79	
S5 + Penic.	3,24	27,48
S9 + Penic.	2,44	20,69

El cálculo de las ABCPE permitió constatar que ambos tratamientos biológicos disminuyeron la incidencia acumulada de la enfermedad en el tiempo respecto al testigo *Penicillium*. Aplicando la levadura S5, el ABCPE representó 27,48% del área del testigo, mientras que la obtenida con S9 fue del 20,69% respecto al testigo (**Tabla 3, Figura 2**).

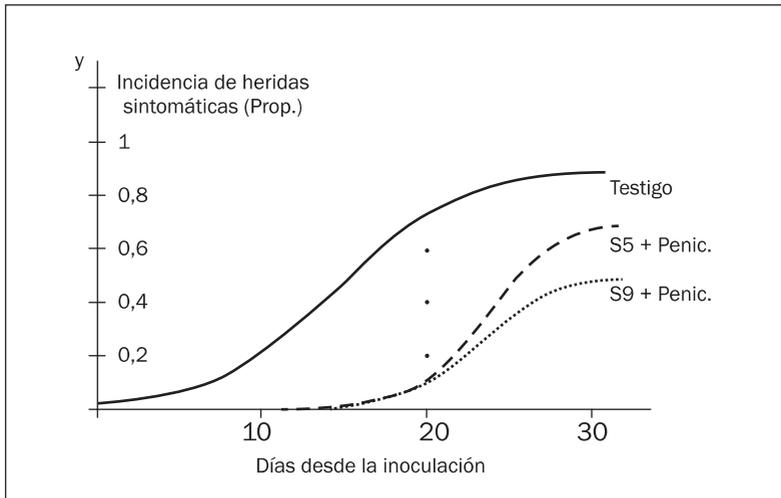


FIGURA 2. Áreas bajo la curva de progreso de la enfermedad de dos antagonistas protectores de heridas (S5 y S9) respecto al área testigo *P. digitatum*

El efecto protector de los tratamientos biológicos se constató, además, a través de la disminución de la incidencia final de heridas sintomáticas a los 28 días. No obstante, considerando que una cepa eficaz debería proteger el 85-90% de las heridas en aplicaciones comerciales, las eficacias logradas incorporando S5 (28,57%) y S9 (47,65%) están muy alejadas de esos valores [8,2,5].

La verificación del retraso en el inicio de las infecciones justifica la elección de esta táctica de manejo como una estrategia para disminuir o retrasar la actividad del inóculo primario de esta enfermedad y la duración total de la epifitía [11]. Considerando, entonces, los días libres de enfermedad, la disminución porcentual del ABCPE respecto al testigo, y de las incidencias finales de heridas con podredumbre, ambos microorganismos podrían ser considerados como antagonistas promisorios para ser utilizados en mezclas entre ellos y/o con otros microorganismos, estimando la posibilidad de lograr una bioactividad sinérgica o complementaria en el control de *Penicillium digitatum*.

En función de considerar las incidencias de enfermedad acumuladas en función del tiempo, bajo las condiciones de este ensayo, S9 fue el microorganismo de mayor eficacia protectora logrando reducir un 79,31% el ABCPE del testigo (**Tabla 3**).

IV. Conclusiones

La superficie de las frutas cítricas contiene una abundante microflora, compuesta principalmente por bacterias y levaduras entre las que es posible obtener cepas de antagonismo variable frente a patógenos de poscosecha. Bajo las condiciones de este trabajo, las cepas S5 y S9 retrasaron 14 días la aparición de síntomas de podredumbres, logrando como máximo una eficacia de protección biológica de heridas del 47,65%.

Referencias bibliográficas

1. MONDINO, P. Control Biológico. En: MONDINO P., VERO S., editores. *Control biológico de patógenos de plantas*. Uruguay: Depto. Public. Fac. Agronomía, Univ.de la República; 2006. p. 21-26.
2. VISINTIN G., GARCÍA B., CÁCERES C., BARREDO, G. Potencial antagonístico de la microflora cítrica adaptada a heridas y a bajas temperaturas frente a *Penicillium digitatum*. En: LOBOS E.A., et al., editores. *Resúmenes de las XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas: fitosanidad responsable, base de la calidad de vida*. Santiago del Estero: UNSE. 2009.
3. VISINTIN G., GARCÍA B., CÁCERES C., BARREDO G. El frutoplano de los cítricos como fuente de microflora potencialmente antagonística de patógenos poscosecha. En: *Actas de V Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología de Postcosecha*. INTA San Pedro, Argentina, 27 y 28 octubre. 2009. p. 70.
4. VISINTIN G., FÁLICO L., GARCÍA B. Manejo de mohos poscosecha de cítricos mediante antagonistas microbianos. *Ciencia, docencia y Tecnología*. 2010; XXI (40):187-214.
5. VISINTIN G., GARCÍA B., CÁCERES C., LUDI BARZANTE L. Microflora de naranja Salustiana adaptada al frío y su actividad antagonística frente a *Penicillium digitatum*. En: *Resúmenes del 2º Congreso Argentino de Fitopatología*. Mar del Plata, Argentina, 1-3 junio. 2011 p. 350.
6. PALOU, L. Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha de cítricos de producción integrada. *Horticultura global*. 2007 [citado 11-10-2011]; 200:82-93. Disponible en: <http://www.horticom.com/revistas>.
7. MONDINO P. Aislamiento y selección de Agentes de control biológico. En: MONDINO P., VERO S., editores. *Control biológico de patógenos de plantas*. Uruguay: Depto. Public. Fac. Agronomía, Univ. de la República; 2006. p. 79- 90.
8. GARMENDIA G., VERO S. Control Biológico de enfermedades de poscosecha. En: MONDINO P., VERO S., editores. *Control biológico de patógenos de plantas*. Uruguay: Depto. Public. Fac. Agronomía, Univ. de la República; 2006. p. 97-113.
9. LUDI BARZANTE L. Extracción de la microflora de manzana para selección de biocontroladores de patógenos poscosecha. En: *Resúmenes de las XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM)*; 2011, 25- 27 octubre; Ciudad del Este, Paraguay. p. 550.
10. DI RIENZO J., CASANOVE F., BALZARINI M., GONZALEZ, L., TABLADA M., ROBLEDO, C. *InfoStat versión 2011*. Grupo InfoStat, FCA. Córdoba: Univ.Nac. Córdoba.
11. MARCH G., ODDINO C., MARINELLI A. Epidemiología y manejo de enfermedades. En: MARCH G., ODDINO C., MARINELLI A. *Manejo de enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos*. Córdoba, Argentina: Biglia Impresores. 2010. p.1-14.