

PID 2142

Actividad Antagónica de la Microflora Epífita de Citrus y Manzanas frente a Patógenos Poscosecha

Visintin, Griselda; García, Blanca; Cáceres, Carina Mabel; Musante, Carina Lía; Ludi Barzante, Luciano Efraín; Niz, Matías

AUTORES: Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. (Oro Verde, Entre Ríos, Argentina).

CONTACTO: gvisintin@fca.uner.edu.ar

Resumen

El control biológico es el resultado de la actividad de la microflora epífita, que habita la superficie de las plantas autorregulando poblaciones de patógenos. La hipótesis general de este trabajo planteó reducir la incidencia de podredumbres causadas por *Penicillium* spp. en cítricos y manzanas, si los frutos son previamente tratados con antagonistas obtenidos de la superficie de los tejidos del hospedero. El objetivo general fue evaluar la capacidad antagónica de la microflora epífita de cítricos y manzanas frente a *Penicillium* spp. La propuesta y desarrollo de protocolos para su extracción, permitió obtener una abundante y diversa microflora desde los hospederos. Numerosas cepas fueron preseleccionadas *in vitro* por su capacidad para inhibir el crecimiento de *Penicillium* spp. Mediante protocolos basados en inoculación forzada de microorganismos potencialmente antagónicos y propágulos del patógeno, se seleccionaron las cepas más prometedoras como antagonistas. En todos los procesos se consideraron temperaturas de almacenamiento en frío. Simulando comercialización externa, cultivos líquidos de antagonistas fueron aplicados por inmersión y aspersion sobre frutas cítricas. Las mayores eficacias de protección biológica fueron obtenidas con la bacteria NP11: 60 % mediante inmersión y 31 % por aspersion en línea de empaque experimental. En manzanas, la aplicación de la levadura Mz105 por inmersión solo logró mantener las frutas asintomáticas por siete días.

Palabras clave: biocontrol, podredumbres poscosecha, microflora epífita, cítricos, manzanas

Objetivo General

Evaluar la capacidad bioactiva de la microflora epífita de cítricos y manzanas frente a patógenos poscosecha.

Objetivos específicos

Obtener material vegetal para extracción de microorganismos epífitos.

Aislar microorganismos desde *Citrus* sp. adaptados a incubación en frío.

Aislar microorganismos desde Manzana (*Malus* sp.) adaptados a incubación en frío.

Preseleccionar microorganismos como antagonistas potenciales de *P. digitatum* y de *P. expansum*.

Seleccionar y aplicar sobre citrus y manzanas antagonistas potenciales de *P. digitatum* y de *P. expansum*.

Marco teórico y metodológico

La hipótesis general de este trabajo planteó reducir la incidencia de podredumbres causadas por *Penicillium* spp. en cítricos y manzanas, si los frutos son previamente tratados con antagonistas obtenidos de la superficie de los tejidos del hospedero. El material vegetal necesario para extraer los microorganismos que habitan sobre citrus y manzanas fue obtenido mediante convenios con INTA, EEA Concordia y aportes de productores particulares de Entre Ríos. Se obtuvieron principalmente de plantas con un manejo integral de enfermedades y buenas condiciones sanitarias [1].

El material de citrus incluyó hojas y frutas de distintas especies, con madurez en distintas épocas del año y condiciones ambientales diferentes, a fin de obtener diversidad en la composición de las poblaciones microbianas. El material de manzana comprendió hojas, flores y frutas de distintos cultivares, previo almacenamiento en heladera durante 30 días a 5 °C y en cámaras húmedas [1, 2].

Desde ambos hospederos, los protocolos de aislamiento de los microorganismos, desarrollados en el Laboratorio de Fitopatología de la FCA UNER, consideraron incubar las cajas de petri en heladera a 5 °C durante 15 días, con el objetivo de prever su adaptación al frío, condición similar a la de las cámaras frigoríficas almacenadoras de frutas, donde los microorganismos seleccionados debían manifestar su antagonismo frente a *Penicillium* spp. Se aplicaron tres variantes de extracción: desde heridas provocadas en frutas, desde hojas y desde frutas enteras (frutoplano) [3, 4, 5, 6].

Preselección de microorganismos extraídos

Los microorganismos obtenidos desde el hospedero Citrus fueron preseleccionados por su capacidad antagónica frente a *P. digitatum*, mientras que los obtenidos desde manzana por su antagonismo frente a *P. expansum*.

Como patógeno de poscosecha de *Citrus* spp. se contó con numerosos aislamientos de *Penicillium digitatum* (P141, P138, P ch, P100 y P160) procedentes del mercado local de citrus, de cámaras frigoríficas de productores citrícolas y de la Sección Fitopatología de INTA EEA Concordia.

Como patógeno de poscosecha de Manzana, se utilizó una cepa obtenida de frutas del mercado local, codificada como *P. expansum* (Pe).

En ambos casos, la preselección se basó en dos técnicas:

1. Técnica de Preselección *in vitro* por medio de cultivos múltiples [7].
2. Técnica de Inoculación forzada de heridas sobre frutas [5, 7, 8, 9].

Las interacciones *in vitro* entre cada microorganismo potencialmente antagónico y el patógeno *Penicillium*, se evaluaron mediante las siguientes distancias: D1: Entre la línea de siembra del microorganism-

mo en evaluación y el borde de crecimiento de la colonia de *Penicillium*; D2: entre la línea de siembra del microorganismo y su propio borde de crecimiento hacia *Penicillium*; D3: entre ambos bordes de crecimiento de colonias.

La preselección de microorganismos mediante inoculación forzada de heridas sobre las frutas, en general permitió detectar las cepas más promisorias como antagonistas de *Penicillium* sp. Para ello, los objetivos planteados fueron:

1. Preseleccionar microorganismos capaces de inhibir las podredumbres causadas por *Penicillium* sp.
2. Comprobar la no patogenicidad de los microorganismos que resulten promisorios como antagonistas potenciales.

Todos los ensayos recrearon las condiciones de almacenamiento a 5 °C y alta humedad. Se registró la incidencia de heridas sintomáticas (%) con hidrosis y podredumbres en función del tiempo; y a los 27 días la eficacia final de protección biológica de heridas (%) respecto a las heridas testigo.

Algunos de estos ensayos consideraron además, evaluar el efecto de inóculos que contuvieran mezclas de microorganismos antagónicos como protectores biológicos de heridas.

Tratando independientemente los dos hospederos (citrus y manzana). Los ensayos finales de selección de antagonistas se planificaron considerando las siguientes premisas de partida en Control Biológico de poscosecha [1]:

1. LA ESTRATEGIA ES PREVENTIVA
2. NO HAY PROTECCIÓN SI EL PATÓGENO LLEGA ANTES A LA HERIDA

Por otro lado, las metodologías de aplicación de los tratamientos biológicos [1, 8, 10, 11, 12, 13] consideraron:

- La presencia de heridas producidas durante el proceso de cosecha normal de un productor, como nicho de la acción patógena y por ende, la posibilidad de acceso del patógeno antes de aplicar el tratamiento biológico.
- El encerado de las frutas como cierre del proceso normal para mercado.

Para ello se realizaron dos formas de aplicación de microorganismos antagónicos, ambas simulando la comercialización de frutas para mercado externo:

- Aplicación de antagonistas potenciales en citrus por inmersión

Sobre 150 naranjas Valencia Late en madurez comercial y sin tratamientos químicos de poscosecha, se evaluó la eficacia de protección biológica ejercida por las bacterias preseleccionadas: NP7, NP11, NC16 y NC21 frente a *P. digitatum*. La aplicación por *Inmersión en caldo nutritivo* (CN), con una concentración de 10⁷ ufc de antagonista/ml, suponía generar presión del caldo durante 1 minuto sobre las heridas de las frutas, para facilitar el ingreso del antagonista en las mismas. Se consideró además el encerado de las frutas con cera de origen vegetal (Carnauba, de pH: 6,5), el secado bajo flujo de aire caliente y la incubación según condiciones de comercialización externa (29 días a +/- 5 °C y humedad y posteriormente 7 días a 22 °C y humedad) [7, 12].

- Aplicación de antagonistas potenciales en citrus por aspersión en línea de empaque experimental

Se evaluó la eficacia de protección biológica ejercida por la bacteria NP11 frente a *P. digitatum* sobre 510 naranjas Valencia Seedless por aspersión en línea de empaque experimental, y condiciones de almacenamiento en cámaras de frío simulando las temperaturas de comercialización externa. Al igual que en el ensayo por inmersión, se partió de premisas que consideraron la presencia de heridas producidas durante la cosecha normal de un productor, como nicho de la acción patógena y la posibilidad de acceso del patógeno antes de aplicar el tratamiento biológico.

La metodología de aplicación por aspersión del tratamiento biológico fue la seguida habitualmente por el personal capacitado de INTA EEA Concordia en la línea de empaque experimental. El caldo (CN+NP11)

aplicado mediante pulverizadores manuales a presión (reemplazando en la línea, el pulverizado de fungicidas de síntesis) contuvo una concentración bacteriana de $2,95 \times 10^8$ ufc/ml de caldo. Después del encerado, la incubación en cámaras de refrigeración fue a $5\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ y 98 % de humedad relativa durante 28 días y posteriormente 7 días a $20\text{ }^\circ\text{C}$ [7, 13].

Evaluación en ambas formas de aplicación

Cada 7 días, cada fruta se evaluó como positiva (con podredumbre) o negativa (sin podredumbre). Se expresó como Incidencia de frutas podridas en porcentaje. Este registro permitió calcular la eficacia de protección biológica de frutas respecto al testigo, construir curvas de progreso de la enfermedad (CPE) y comparar tratamientos epidemiológicamente.

Además, se monitoreó la población adherida de antagonista y patógeno en frutas extras, al momento de la aplicación y cada 7 días [7].

Aplicación de antagonistas potenciales en manzanas heridas por inmersión

Se evaluó la eficacia de protección biológica de la levadura MZ105 sobre manzanas heridas, mediante inmersión en Caldo nutritivo dextrosa para levaduras (NYDB) conteniendo la levadura antagonista y el patógeno *P. expansum* (Pe).

Se utilizaron manzanas Red Delicious disponibles en el *mercado local*. Después de realizar 5 heridas de $2\text{mm} \times 3\text{mm}$ en la zona ecuatorial de cada fruta, se trataron por inmersión en la mezcla: Caldo NYDB+Mz105+Pe y se incubaron durante 30 días a $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ y en cámara húmeda.

Luego del periodo de incubación, cada fruta se evaluó como positiva (con podredumbre) o negativa (sin podredumbre) y se registró como *Incidencia de frutas podridas* en porcentaje.

Con las incidencias de podredumbre en función del tiempo se construyeron curvas de progreso de la enfermedad y se calcularon *áreas bajo la curva* de progreso de la enfermedad (ABCPE).

Síntesis de resultados y conclusiones

• Aislamientos obtenidos desde *Citrus* sp. adaptados a incubación en frío [5, 14].

Aislamiento de microorganismos de la microflora presente en heridas realizadas sobre frutas cítricas: Desde un total de 80 heridas de distintas formas y tamaños, provocadas sobre las frutas y conservadas en cámara frigorífica a 5° y 90-95 % de HR durante 30 días, se obtuvieron 21 aislamientos: 3 levaduras y 18 bacterias.

Aislamiento de microorganismos de la microflora presente en hojas de cítricos: A partir de muestras de hojas de naranja, se obtuvieron 46 aislamientos: 32 bacterias y 14 levaduras.

Aislamiento de microorganismos de la microflora presente en el frutoplano de distintas especies de cítricos: Mediante lavados de naranjas enteras en solución tampón fosfato peptona, y protocolos de extracción similares a los aplicados en heridas y hojas, se logró obtener además una colección de microorganismos: de 66 levaduras y 39 bacterias.

El total de los aislamientos fue obtenido por sus aptitudes de crecimiento en medios nutritivos e incubados a bajas temperaturas. Lamentablemente el hecho de haberlos aislado en esas condiciones no aseguró que permanecieran con esas aptitudes de crecimiento, reproducción e incremento de inóculo suficiente y en poco tiempo. Es posible que esta inestabilidad, sea la responsable además de generar variaciones en su futuro accionar como biocontrolador.

Los microorganismos así obtenidos fueron destinados a ensayos de preselección por su capacidad antagónica frente a *Penicillium*.

• Aislamientos desde Manzana (*Malus sp.*) adaptados a incubación en frío

El total de microorganismos obtenidos desde el hospedero manzana ascendió a 123, de los cuales 44 (35,8%) se obtuvieron desde hojas, 67 (54,5%) desde frutas y 12 (9,7%) desde flores. Dentro de esta población, la mayoría de los aislamientos fueron bacterianos (62%).

Preselección de microorganismos como antagonistas potenciales de *P. digitatum*

1. Preselección de microorganismos por Cultivos múltiples *in vitro* [7].

Estos bioensayos tuvieron como objetivo: Preseleccionar de manera rápida y sencilla, microorganismos epífitos aislados, por su capacidad antagónica *in vitro* frente al patógeno *Penicillium*.

Se constató una gran diversidad en las formas de interacción *in vitro* entre los microorganismos evaluados y *P. digitatum* (P100).

Las interacciones que demostraron el mayor antagonismo *in vitro* se caracterizaron por la elevada capacidad del microorganismo evaluado para multiplicarse, crecer y colonizar el medio de cultivo, limitando en consecuencia la capacidad de crecimiento del patógeno P100.

Estas últimas interacciones permitieron preseleccionar trece microorganismos como los de mayor actividad bioactiva *in vitro* frente a P100.

2. Preselección de microorganismos por Inoculación forzada de heridas sobre naranjas

La preselección de microorganismos mediante inoculación forzada de heridas [5, 15] en general permitió detectar las cepas más promisorias como antagonistas de *P. digitatum*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos generales:

1. Preseleccionar microorganismos capaces de inhibir las podredumbres causadas por *Penicillium digitatum*
2. Comprobar la *no patogenicidad* de los microorganismos que resulten promisorios como antagonistas potenciales.

En los ensayos de *preselección* realizados entre 2010 y 2012, se evaluaron 66 microorganismos (22 bacterias y 44 levaduras). Se realizaron además ensayos utilizando la mezcla de dos aislamientos diferentes de bacterias. El bajo número de microorganismos ensayados se debió a la escasa capacidad de almacenamiento en frío de las frutas tratadas, a la disponibilidad de frutas de calidad para ser ensayadas, y fundamentalmente a la pérdida de biodiversidad dentro de la colección obtenida tanto en cantidad como en sus cualidades fisiológicas. Un gran porcentaje de los microorganismos extraídos de la microflora epífita perdió su capacidad para mantener e incrementar su inóculo en medios nutritivos artificiales y bajo condiciones de almacenamiento en frío, a pesar de considerar alternativas como: diferentes medios de cultivo, incubaciones a distintas temperaturas o agregado de extractos de citrus a los medios o caldos de cultivo. Mediante estos ensayos, no se logró detectar cepas de comportamiento promisorio o destacado como antagonista y/o fisiológicamente estable en función del tiempo. Esta estabilidad fisiológica pretendida en los microorganismos consideraba el mantenimiento en el tiempo de: su capacidad de reproducción en medios nutritivos artificiales, de un porcentaje relativamente alto de protección biológica de heridas y/ o del retraso en el inicio de podredumbres en heridas tratadas biológicamente.

En los ensayos de *preselección* realizados en 2013, los aislamientos a evaluar quedaron definidos mediante las pruebas previas de *preselección in vitro*. Doce aislamientos bacterianos con resultados promisorios de antagonismo *in vitro*, se preseleccionaron por inoculación forzada de heridas. Todos los aislamientos habían sido obtenidos de la microflora que habita sobre hojas y frutas de naranja, provenientes de zonas productoras de citrus en Entre Ríos, como Concordia (ocho aislamientos) y Chajarí (cuatro aislamientos).

Inoculando las heridas con los tratamientos bacterianos, codificados como: NC16, NC21, NP7 y NP11 se registraron las mayores eficacias relativas de protección biológica (42,5%), valor que se encuentra muy por debajo de las eficacias planteadas como objetivo a lograr dentro del proyecto original (85-90%).

En función de cumplir con el segundo objetivo general, se constató la *NO PATOGENICIDAD* de dichos aislamientos mediante inoculaciones forzadas de heridas, sin la presencia de inóculo patógeno. En todos los casos, las heridas permanecieron asintomáticas de podredumbres poscosecha (sin síntomas de hidrosis o podredumbres y ausencia del signo del patógeno) y sin evidenciar cambios en la calidad comercial de las frutas durante 39 días de incubación en frío.

Selección Final de Antagonistas Potenciales de *Penicillium digitatum*

1. Aplicación por inmersión

Como objetivo se planteó evaluar la eficacia de protección biológica ejercida por las bacterias NP7, NP11, NC16 y NC21 frente a *P. digitatum*, sobre naranjas Valencia Late sin tratamientos químicos de poscosecha, mediante la aplicación por inmersión.

El monitoreo de la carga bacteriana adherida a la superficie de las naranjas permitió registrar valores máximos de 7×10^3 ufc/cm² de fruta (NP7) a partir de la aplicación por inmersión, y su descenso después del encerado de las frutas y a los 7 días de almacenamiento. Resistiendo el efecto del encerado, la población de NP11 adherida registró un leve aumento de (de $7,54 \times 10^1$ a $1,52 \times 10^2$ ufc/cm² de fruta), nivel que se mantuvo a los 7 días desde la inmersión en el caldo.

Después de 29 días de incubación en frío, el 100% de las frutas de los tratamientos, incluyendo al testigo, se mantuvo sin infecciones visibles, asintomáticas.

Después de este periodo, el cambio en las condiciones de incubación a 22 °C y humedad provista por cámara húmeda, favorecieron la acción patógena del inóculo de *Penicillium digitatum* presente en heridas, permitiendo el progreso de infecciones latentes.

A los 40 días desde la aplicación de tratamientos biológicos por inmersión, el testigo (inmerso solo en caldo CN) presentó un 40% de incidencia de frutas podridas, evidenciando la carga de inóculo presente en las frutas aún después del lavado y encerado.

Los aislamientos bacterianos codificados como NC16 y NC21 lograron muy bajos valores de protección biológica de las heridas al sumergir las frutas en el caldo biológico, solo 30% de protección relativa al testigo. En cambio NP7 y NP11 protegieron el 60% de las frutas relativas al tratamiento testigo.

El ajuste de los valores de incidencia (%) de frutas con podredumbre al modelo Gompertz, permitió obtener las tasas de infección (r_G) de los tratamientos, entre las cuales no se encontraron diferencias significativas.

Al calcular las áreas bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) para cada tratamiento se constató que aplicando la bacteria NP11 se obtuvo la menor área (0,494), que resultó un 47,68% menor a la obtenida aplicando NP7 (1,036).

Las diferencias entre las ABCPE de todos los tratamientos señalaron al tratamiento biológico NP11 como el más prometedor para proteger frutas cítricas en poscosecha, bajo condiciones de almacenamiento para mercado externo.

2. Aplicación por aspersión en línea de empaque experimental

Se planteó como objetivo evaluar la eficacia de protección biológica ejercida por NP11 frente a *P. digitatum* sobre naranjas Valencia Seedless por aspersión en línea de empaque experimental, y condiciones de almacenamiento en cámaras de frío simulando las temperaturas de comercialización externa.

Después de la bacterización y secado de las frutas y antes de encerar, se constató la eficacia de aplicación por aspersión rescatando $8,8 \times 10^3$ ufc de NP11/cm² de fruta, superando los valores de bacterización logrados mediante la aplicación por inmersión ($7,54 \times 10^1$ ufc/cm²). Luego del encerado y secado de las frutas, se rescataron $6,28 \times 10^2$ ufc de NP11/cm² de fruta, valor similar al establecido sobre la superficie de las frutas mediante la aplicación por inmersión ($1,52 \times 10^2$ ufc/cm²).

Durante el período de 28 días de incubación a 5 °C no se registraron naranjas con síntomas de podredumbre causadas por *P. digitatum*, incluyendo el tratamiento testigo.

Los síntomas de podredumbre por *P. digitatum* se evidenciaron al cambiar las condiciones de incubación, a 20 °C durante 7 días. Los datos de incidencia finales (%), de frutas con podredumbre a los 35 días desde la aplicación por aspersión fueron en promedio de 1,6 % para el tratamiento con NP11 y 2,3 % para el tratamiento testigo, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos ($p > 0,05$).

Aplicando NP11 por aspersión, la *eficacia* de protección biológica de heridas, con respecto al tratamiento Testigo fue de 31 %, al finalizar la simulación de condiciones de comercialización externa.

Esto significaría que después de tratar las frutas con NP11 en zona de producción de origen y viajar refrigeradas en barco, al llegar a un mercado de destino, con temperaturas de comercialización de aproximadamente 20 °C, se evidenciarían pérdidas poscosecha por *P. digitatum* que serían sólo 31 % menores a las registradas en lotes sin tratamientos poscosecha.

Apoyándonos en eficacias citadas por la bibliografía existente (Garmendia y Vero, 2006), que son acordes a los objetivos planteados originalmente para nuestras investigaciones, el porcentaje de 31 % difiere mucho del deseado para el control con antagonistas biológicos de patógenos de poscosecha, ya que consideramos inicialmente el logro de eficacias que reduzcan al menos el 85 % de las podredumbres respecto al testigo.

A partir del periodo de incubación en frío, y durante los 7 días siguientes de incubación a 20°C, el progreso de las podredumbres fue lineal. En este periodo se encontraron diferencias entre las tasas de infección (r_i) de ambos tratamientos ($r_i = 0,035$ para el tratamiento biológico y $r_i = 0,060$ para el testigo), lo que permitiría rescatar el efecto de retraso en la velocidad de las infecciones de *P. digitatum* una vez finalizado el almacenamiento en frío, tal como ocurrió en la aplicación por inmersión de NP11.

Preselección de microorganismos como antagonistas potenciales de *P. expansum*

1. Preselección de microorganismos por su capacidad antagónica “in vitro” frente a *P. expansum*

Se observó y documentó la evolución de las interacciones *in vitro* de los microorganismos frente a *P. expansum* a las 24 hs., 5 y 7 días desde la iniciación del ensayo. Las distancias D1, D2 y D3 se registraron a los 7 días de interacción.

Según las mayores distancias D1 y considerando al menos 1 cm. entre la línea de siembra y el borde de *Penicillium expansum* se preseleccionó a la levadura Mz 88 para destinar a ensayos de inoculación forzada en frutas.

2. Preselección de microorganismos antagónicos de *P. expansum* mediante inoculación forzada en manzanas

Según los primeros ensayos de preselección realizados, el 85 % de los tratamientos resultó ineficaz en la protección biológica de heridas. Las levaduras Mz 105 y Mz 123 fueron las de mejor comportamiento en inoculaciones forzadas frente a *P. expansum*, aunque ambas registraron muy bajos valores de eficacia de protección biológica [9, 16].

Aplicando la cepa Mz123 se registraron 6 días libres de enfermedad, una eficacia del 53 % de protección biológica de heridas a los 19 días desde el tratamiento, y un ABCPE= 4,355.

Inoculando la cepa Mz105, se alcanzó a proteger solo el 25 % de las heridas, pero se resaltan los valores registrados de ABCPE (1,254) y los días libres de podredumbre. MZ 105 protegió las heridas tratadas durante 12 días, impidiendo las podredumbres, lo que podría considerarse beneficioso a nivel de comercialización interna de manzanas.

Ninguna de las mezclas de microorganismos ensayadas resultó eficaz en la protección de heridas, registrándose podredumbres en las heridas, desde los 6 días desde la inoculación.

Los ensayos finales de selección por inoculación forzada ratificaron la posibilidad de utilización de la levadura Mz 105 como protectora de heridas en manzanas. Mediante su aplicación, a los 14 días de la inoculación solo se registró un 10 % de heridas con síntomas de podredumbre, mientras que en el tratamiento Testigo *P. expansum* el 87,5 % de las heridas ya presentaba síntomas. A los 35 días desde la aplicación, el 40 % de las heridas se mantenían sanas, protegidas biológicamente por MZ 105.

Selección Final de Antagonistas Potenciales de *Penicillium expansum*

Eficacia de protección biológica de MZ105 sobre manzanas heridas, mediante inmersión en caldo NYDB conteniendo la levadura antagonista y el patógeno *P. expansum*

A los 7 días desde la inmersión en el caldo conteniendo a MZ105 + *P. expansum*, se registró el menor porcentaje de Incidencia: 25 % de frutas sintomáticas. Sin embargo, a partir de allí las incidencias registradas alcanzaron valores muy alejados de los pretendidos originalmente en nuestras investigaciones (Garmendia, G. y Vero, S. 2006) llegando a afectar el 82,50 % de las frutas a los 28 días de incubación en frío. Estos valores descartan la posibilidad de considerar a Mz 105 como un antagonista potencial y promisorio de *P. expansum* en poscosecha.

Bajo las condiciones del ensayo, la aplicación de la levadura MZ105 resultó ineficaz para proteger biológicamente las frutas del mercado local frente a *P. expansum* durante la poscosecha.

Análisis de los resultados obtenidos

El análisis de resultados permitió concluir sobre los objetivos planteados originalmente que desde distintos órganos vegetales de manzanas y citrus se obtuvo una abundante y diversa microflora epífita, constituida principalmente por bacterias y levaduras. Su extracción fue factible mediante lavados en solución tampón fosfato peptona, para lograr suspensiones microbianas. Su aislamiento e incubación en frío consideró la posibilidad de su futura actividad antagónica en cámaras frigoríficas. Se observaron inconvenientes en el mantenimiento de cepas bajo estas condiciones, indicadores de la variabilidad fisiológica según el ambiente donde se encuentran y la consecuente pérdida de biodiversidad.

Para cada hospedero (citrus o manzana) y según la interacción correspondiente entre patógeno y microorganismo obtenido, la *técnica de cultivos múltiples* permitió preseleccionar aislamientos promisorios por su actividad *in vitro* frente a *Penicillium* spp. Su utilización permitió escoger algunas cepas potenciales, cuya capacidad antagónica fue evaluada mediante protocolos *in vivo*, basados en inoculación forzada de microorganismos y propágulos del patógeno. Esto permitió constatar que la bioactividad de un microorganismo evaluada *in vitro*, no siempre se correlaciona con la lograda en el ambiente de las heridas, donde está condicionada por la población del antagonista establecida en las mismas, el efecto de las ceras utilizadas, los jugos liberados y las temperaturas de almacenamiento.

Mediante las dos pruebas previas, se logró reducir el número de cepas, que fueron destinadas para evaluar su eficacia de protección biológica frente a *Penicillium* spp. sobre un número mayor de frutas.

Sobre naranjas, mediante la aplicación por *Inmersión en caldo nutritivo* conteniendo una concentración de 10^7 ufc de antagonista/ml, las bacterias NP7 y NP11 protegieron el 60% de las frutas, relativas al testigo. Las diferencias entre las ABCPE de los tratamientos señalaron a NP11 como el más prometedor para proteger frutas cítricas en poscosecha, bajo condiciones de almacenamiento

para mercado externo. Mediante la aplicación por *Aspersión en línea de empaque experimental*, la bacteria NP11 logró una *eficacia* de protección biológica de heridas de 31%, con respecto al tratamiento Testigo, al finalizar la simulación de condiciones de comercialización externa. El porcentaje logrado difiere mucho del deseado para el control con antagonistas biológicos de patógenos de poscosecha, ya que se consideró inicialmente el logro de eficacias que reduzcan al menos el 85 % de las podredumbres respecto al testigo.

Sobre manzanas, mediante *Inmersión en caldo NYDB conteniendo la levadura y el patógeno P. expansum*, Mz105 resultó ineficaz para proteger biológicamente las frutas del mercado local frente a *P. expansum* durante la poscosecha.

Indicadores de producción

Como indicadores de producción el proyecto logró: una publicación con referato, una presentación en una Reunión Científica Internacional y diez presentaciones en Reuniones Científicas Nacionales. La presentación del Becario de Iniciación a la Investigación Luciano Ludi Barzante en Paraguay, fue seleccionada para Presentación Oral, por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Entre Ríos, dentro de los trabajos presentados por aspirantes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Como actividades de difusión, se participó con 4 trabajos en las Jornadas INEXA: Difusión de Proyectos de Investigación, Extensión y Actividades Académicas de la UNER.

Como Relaciones Interinstitucionales: Se firmaron dos Convenios sucesivos entre la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNER) y el INTA EEA Concordia, en 2010 y 2013, los cuales permitieron Coordinar y ejecutar actividades del Proyecto con investigadores externos a la UNER, obtener material biológico y utilizar equipamiento específico de poscosecha.

Como formación de Recursos Humanos se dirigieron: Dos Becarios de Iniciación a la Investigación (UNER); una Tesista de grado (UADER); dos pasantes (UADER, UNSE) y dos Docentes Auxiliares Alumnos (FCA-UNER).

Bibliografía

1. GARMENDIA G., VERO S. Control Biológico de enfermedades de poscosecha. En: Mondino P., Vero S., editores. *Control biológico de patógenos de plantas*. Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República; 2006: 97-113.
2. MONDINO, P. Control Biológico. En: Mondino P., Vero S., editores. *Control biológico de patógenos de plantas*. Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República; 2006: 21-26.
3. MONDINO P. Aislamiento y selección de Agentes de control biológico. En: Mondino P., Vero S., editores. *Control biológico de patógenos de plantas*. Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República; 2006: 79-90.
4. LUDI BARZANTE L. Extracción de la microflora de manzana para selección de biocontroladores de patógenos poscosecha. En: Libro de Resúmenes de las *XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM)*; 2011, 25 al 27 de octubre; Ciudad del Este, Alto Paraná, Paraguay: 550.
5. VISINTIN G., GARCÍA B., CÁCERES C., BARREDO, G. Potencial antagónico de la microflora cítrica adaptada a heridas y a bajas temperaturas frente a *Penicillium digitatum*. En: Lobos E.A., *et al.*, editores. Libro de Resúmenes de las *XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas: fitosanidad responsable, base de la calidad de vida*; 2009, 30 de setiembre, 1 y 2 de octubre; Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero. PVg6.

6. VISINTIN G., GARCÍA B., CÁCERES C., BARREDO G. El frutoplano de los cítricos como fuente de microflora potencialmente antagónica de patógenos poscosecha. En: Libro de Actas de *V Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología de Postcosecha*; 2009, 27 y 28 de octubre; San Pedro, Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO); EEA San Pedro – Centro Regional Buenos Aires norte, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p. 70.
7. VISINTIN G., FÁLICO L., GARCÍA B. Manejo de mohos poscosecha de cítricos mediante antagonistas microbianos. *Ciencia, docencia y Tecnología*. (2010) 21(40):187-214.
8. FRANCHESI, V.; CÁCERES, C.; VISINTIN, G.; GARCÍA, B. Microflora epífita de manzano como antagonista potencial de *Penicillium expansum*. *INEXA 2013. 5tas Jornadas de Difusión de Proyectos de Investigación, Extensión y Actividades Académicas de la UNER*. 2013, 4 de noviembre, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.
9. NIZ, M.; VISINTIN, G. Antagonistas del desarrollo de *Penicillium expansum* en poscosecha de manzanas. En: libro de Resúmenes *XXI Jornadas Jóvenes Investigadores AUGM*. 2013, 14 al 16 de octubre. Corrientes, Argentina. (1): 345-346.
10. VISINTIN, G., GARCÍA, B., FÁLICO, L. y GARRÁN, S. Población natural de *Penicillium digitatum* sobre diferentes especies cítricas. En: Publicación electrónica de Resúmenes *11 Congreso Nacional SUHF. 3er. Congreso Panamericano Promoción del Consumo de Frutas y Hortalizas*. 2007a, 21, 22 y 23 de mayo, Montevideo, Uruguay. LATU. Publicación electrónica: 79.
11. VISINTIN, G., GARCÍA, B., FÁLICO, L. y RONCONI, A. Establecimiento y persistencia de una bacteria antagonista de *Penicillium digitatum* en frutas cítricas tratadas con ceras. En: Libro de Resúmenes *IV Jornadas de Biología y Tecnología de Postcosecha y I Jornadas de Postcosecha del Cono Sur*. 2007b, 5 y 6 de julio, Buenos Aires, Argentina. Resumen n.º 46: 88.
12. VISINTIN, G. GARCÍA, B.; FÁLICO L., ALCARAZ FÁLICO M.E. y BARREDO G. Aplicación Experimental de una Bacteria Antagónica de *Penicillium* por Inmersión de Cítricos. En: Libro de Resúmenes del *Primer Congreso Argentino de Fitopatología*. 2008 a, 28 al 30 de mayo, Córdoba, Argentina: 222.
13. VISINTIN, G. GARCÍA, B. FÁLICO, L. ALCARAZ FÁLICO, M.E. y G. BARREDO. Eficacia de Aspersión de un Microorganismo Bioactivo en una Línea de Empaque Experimental. En: Libro de Resúmenes del *Primer Congreso Argentino de Fitopatología*. 2008 b, 28 al 30 de mayo, Córdoba, Argentina: 221
14. VISINTIN G., GARCÍA B., CÁCERES C., LUDI BARZANTE L. Microflora de naranja Salustiana adaptada al frío y su actividad antagónica frente a *Penicillium digitatum*. En: Libro de Resúmenes del *2º Congreso Argentino de Fitopatología*; 2011, 1, 2 y 3 de junio; Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Fitopatólogos, Gráfica Tucumán, Mar del Plata. p. 350.
15. VISINTIN, G.; GARCÍA, B.; CÁCERES, C., LUDI BARZANTE, L. y BEFANI, R. Microflora de naranja adaptada al frío y su actividad antagónica frente a *Penicillium digitatum*. *Ciencia, Docencia y Tecnología*. (2013) 24 (47): 249-263. Edición online (ISSN 1851-1716) en www.revistacdyt.uner.edu.ar
16. GARCÍA, B.; VISINTIN, G.; CÁCERES, C.; MUSANTE, C.; LUDI BARZANTE, L. Biocontrol con levaduras epífitas de manzanas frente a *Penicillium expansum*. *INEXA 2013. 5tas Jornadas de Difusión de Proyectos de Investigación, Extensión y Actividades Académicas de la UNER*. 2013, 4 de noviembre, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Entre Ríos que por medio de la Secretaría de Investigaciones Científicas, Tecnológicas y de Formación de Recursos Humanos instrumenta y fomenta la investigación, contribuye a la formación de recursos humanos, permite el logro de nuevos conocimientos, su transferencia al medio y la integración con profesionales, investigadores y productores.