



Diversidad de levaduras y hongos patógenos en fruta fina de Patagonia

Sofía López^{1,2*}, Marcela Sangorrín^{1,3} y María Belén Pildain^{1,2,4}

1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

2) Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP).

3) Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, CONICET-UNCo).

4) Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

* slopez@ciefap.org.ar

Resumen: Con el fin de identificar los organismos benéficos y patógenos asociados a la fruta fina, se aislaron levaduras y hongos patógenos a partir de cerezas, frambuesas y zarzamoras de tres zonas productoras de fruta fina en Patagonia Sur. Se obtuvieron 308 aislamientos de levaduras y 50 de hongos patógenos. La identificación molecular evidenció la presencia de levaduras ya reportadas como organismos benéficos y de hongos patógenos de poscosecha de diferentes frutas, similares a los de frutas finas de otros países.

Palabras clave: cerezas, frambuesas, zarzamoras, organismos benéficos, patógenos poscosecha

Introducción

En Argentina la producción de frutas finas se concentra principalmente en Entre Ríos, Tucumán, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz. En Patagonia Sur (sur de Río Negro, Chubut y Santa Cruz), existen aproximadamente 325 ha implantadas con cerezos, 170 ha con frambuesas y 21 ha con zarzamoras (Caminiti 2005, Raffo et al. 2006).

Las frutas finas presentan un limitado tiempo de almacenamiento en poscosecha, de 45 a 60 días en el caso de las cerezas y 7 para las frambuesas y zarzamoras, debido al aumento de su metabolismo luego de la cosecha lo que conlleva un cambio organoléptico y de apariencia acompañado con un aumento en la susceptibilidad a ser atacadas por hongos causantes de pudriciones (Candan 2006). En Argentina se han identificado diversos mohos asociados a estos frutos, como *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Nome et al. 2012), y no existe ningún fungicida registrado para su control en poscosecha. Una de las estrategias de control se basa en el uso del hydrocooling con agua clorada previo a conservarlas en cámaras a 0 °C.

Actualmente, la re-evaluación del uso de fungicidas químicos en la agricultura ha derivado en que sean pocos los permitidos en el país debido a sus efectos nocivos sobre la salud humana y el medio ambiente, y ha promovido

el inicio de estudios sobre levaduras antagonistas como agentes de control biológico (ACB) de hongos: en almacenamiento de granos (Olstorpe et al. 2010), en partes aéreas de plantas (Mildemberg & Flores 2008), en poscosecha de frutas (Visintin et al. 2006, Robiglio et al. 2011, Lutz et al. 2012). Las levaduras son organismos muy prometedores como ACB y en fruta fina, se han evaluado diferentes especies con capacidades biocontroladoras, como *Rhodotorula colostri* en moras de Colombia (Medina et al. 2009), *Aureobasidium pullulans* en cerezas de Italia (Scheda et al. 2003), *Kloeckera apiculata* en cerezas de Turquía y *Metschnikowia fructicola*, en cerezas de Turquía y en frambuesas de Italia (Karabulut et al. 2005; Prodorutti et al. 2006). En Argentina también se han evaluado levaduras como ACB, por ejemplo *Kluyveromyces thermotolerans* (Ponsone et al. 2011) aislada de uvas en Mendoza, *A. pullulans*, *R. mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus*, *Pichia membranifaciens* y *Cryptococcus victoriae* aisladas de peras de Neuquén y Río Negro (Robiglio et al. 2011, Lutz et al. 2013) pero aún no existen antecedentes sobre diversidad de levaduras, patógenos, ni ACB para fruta fina.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad de hongos patógenos y levaduras indígenas asociados a la poscosecha de cerezas, frambuesas y zarzamoras de Patagonia

Sur, como punto inicial para detectar agentes de biocontrol de las principales podredumbres de poscosecha en fruta fina.

Materiales y métodos

Sitios de muestreo

Las cerezas se obtuvieron de establecimientos comerciales de la Comarca del Paralelo 42°, Trevelin y Gaiman, mientras que las frambuesas y las zarzamoras de establecimientos de la Comarca del Paralelo 42°. Las frutas fueron cosechadas a madurez comercial y conservadas a 0° en cámaras adecuadas hasta su utilización.

Aislamiento de levaduras

Para cerezas, frambuesas y zarzamoras se realizaron aislamientos de levaduras epifíticas a diferentes tiempos de conservación, según Venturini et al. (2002) (Figura 1A).

Para cerezas se adaptó la metodología de Venturini et al. (2002) con el fin de obtener levaduras endofíticas del tejido interno de las frutas (Figura 1B), y la de Lutz et al. (2012) para obtener aislamientos a partir de frutas sanas, sin síntomas de enfermedad, heridas artificialmente (Figura 1C). Las muestras de frutas se agitaron en agua destilada estéril y se sembraron 100 µl de las aguas de lavado en medio específico para levaduras. Luego de 14 días a 4 °C se seleccionaron las colonias por frecuencia de aparición y morfología.

Aislamiento de hongos

Se realizaron aislamientos a partir de frutas que presentaron síntomas de enfermedad en condiciones de poscosecha. Se colocaron porciones de tejido medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron en cámara de crecimiento durante 10 días (Figura 1D, E y F).

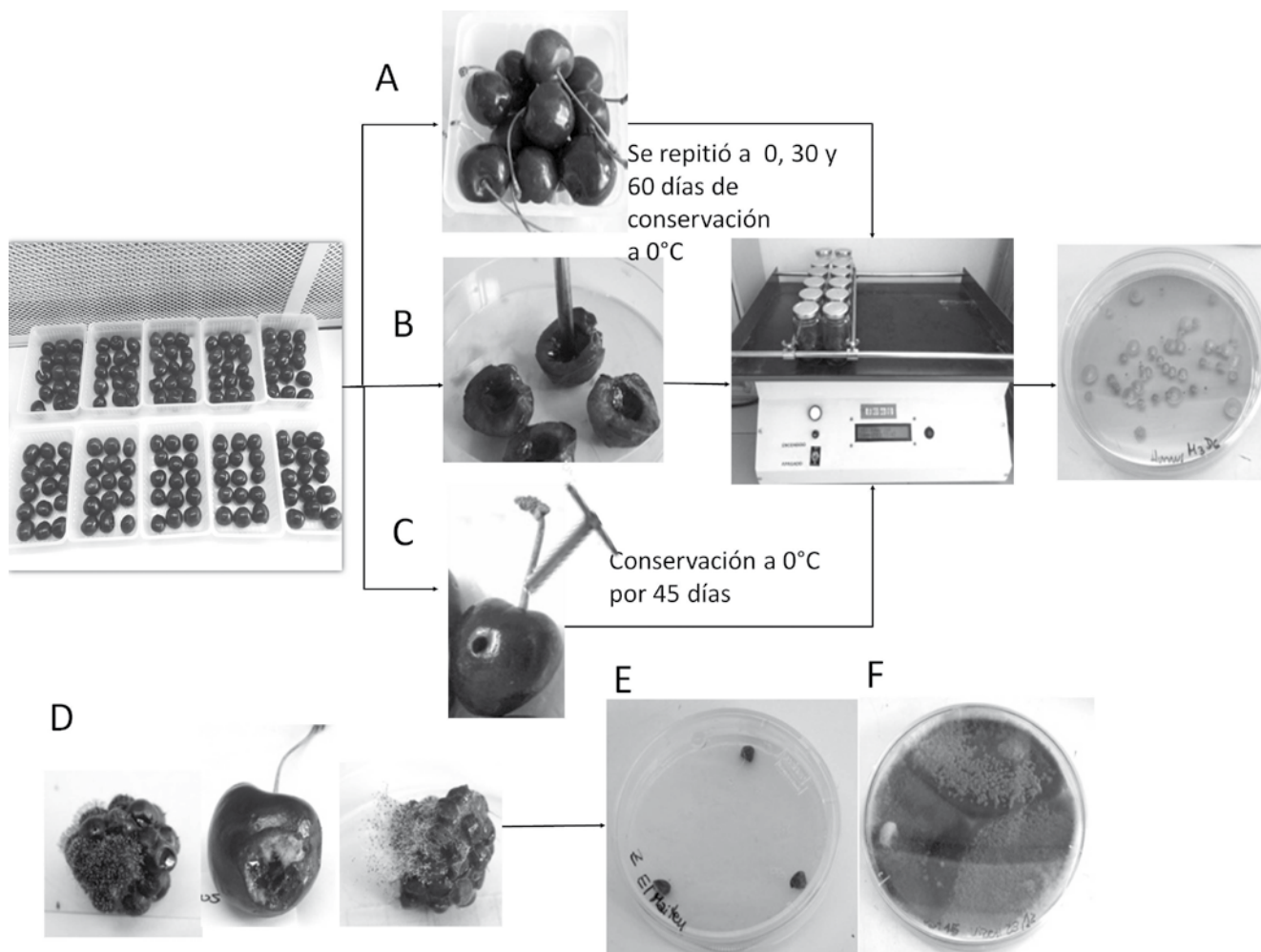


Figura 1. Esquema de las estrategias empleadas para el aislamiento de: A) levaduras epifíticas, B) levaduras endofíticas, C) levaduras obtenidas a partir de fruta sana herida (aislamiento selectivo), D) frutas enfermas, E) aislamiento e F) incubación de hongos.

Evaluación del crecimiento de levaduras en condiciones de almacenamiento productivo

Se realizó una evaluación preliminar de la capacidad de crecimiento a 0 °C (temperatura de conservación de las cerezas) de los 308 aislamientos en cajas de Petri y se seleccionaron los de crecimiento más rápido para identificarlos molecularmente (Figura 2).

Identificación

Las levaduras se identificaron por secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S, utilizando los primers NL1 y NL4 siguiendo la metodología de Valente et al. (1999). Los hongos se identificaron morfológicamente según sus características macro y microscópicas (Pitt & Hocking 2009) y molecularmente por secuenciación de

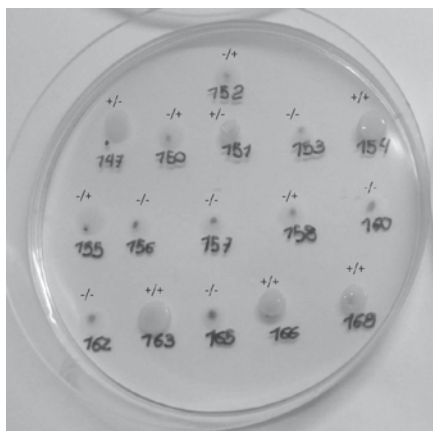


Figura 2. Crecimiento de diferentes aislamientos de levaduras a 0 °C. Escala: +/+ rápido, +/- lento, -/+ muy lento, - nulo.

regiones ITS y beta-tubulina del ADN nuclear, con los primers ITS 1 y 4 y Bt2A y Bt2B siguiendo las metodologías de White et al. (1990) y Kim et al. (2007), respectivamente.

Las secuencias de levaduras y hongos patógenos se identificaron consultando la base de datos GenBank utilizando la opción de búsqueda BLASTn (Altschul et al. 1997). Las similitudes superiores al 98 % fueron tratadas a nivel de especie, mientras que para consensos entre 90 y 98 % la identificación fue a nivel de género.

Resultados

Aislamiento e identificación de las levaduras

Se obtuvieron 308 aislamientos de levaduras provenientes de frambuesas, zarzamoras y cerezas. La frecuencia de aislamientos obtenidos por sitio de muestreo y las especies identificadas hasta el momento se detallan en la Tabla 1.

Aislamiento e identificación de hongos

Se obtuvieron 50 aislamientos de hongos de las frutas con síntomas de enfermedad, 13 a partir de frutas de Gaiman, 22 del Paralelo 42 y 15 de Trevelin. *Alternaria*, *Mucor* y *Penicillium* fueron los géneros que presentaron mayor diversidad de especies. Las especies identificadas por sitio de muestreo y las frecuencias de aparición se detallan en la Tabla 1.

Discusión

A partir de los tres tipos de frutas analizadas en este trabajo, se obtuvieron 308 aislamientos de levaduras, distribuidos en 7 géneros y 13 especies y 50 aislamientos de mohos potencialmente patógenos distribuidos en 12 géneros y 19 especies.

La determinación taxonómica de levaduras mostró que *Cystofilobasidium macerans* y *A. pullulans* fueron las únicas especies identificadas comunes a los tres sitios de muestreo. Además, *A. pullulans* fue la única especie identificada común a los tres tipos de fruta, todas ellas provenientes del Paralelo 42°. Este sitio fue el que mostró la mayor diversidad de especies, esto puede deberse a que las cerezas y frambuesas obtenidas en los establecimientos de la zona son producidas de forma orgánica y las zarzamoras se producen naturalmente de forma asilvestrada. Asimismo, *A. pullulans* fue la única especie aislada tanto con técnicas de aislamiento para levaduras como con la asociada a frutas enfermas, para obtener los hongos patógenos. Esto concuerda con su distribución cosmopolita y con los diferentes roles que puede adoptar, entre ellos, como saprobio en alimentos en descomposición (Pitt & Hocking 2009).

Algunas de las especies identificadas en el presente trabajo ya fueron identificadas en aislamientos de la superficie de frutas en otros países, destacándose *A. pullulans* y *Rhodotorula colostri* por haber sido aisladas y probadas como ACB sobre patógenos poscosecha que afectan a frutas finas en Italia y Colombia, respectivamente (Scheda et al. 2003, Medina et al. 2009). Por otro lado *A. pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Cryptococcus wieringae* y *C. victoriae* fueron caracterizadas como ACB en peras en condiciones de poscosecha en Patagonia (Robiglio et al. 2011, Lutz et al. 2012). Además, algunas especies identificadas en este trabajo, fueron asociadas a frutos de raulí (*Nothofagus nervosa*) donde podrían actuar como agentes promotores del crecimiento y/o ACB contra patógenos que afectan a esta especie forestal (Fernández et al. 2012). Se identificaron también especies de levaduras psicrófilas, como *Guehomyces pullulans*, *Cryptococcus albidosimilis*, *C. friedmannii*, *Cystofilobasidium capitatum*, *C. infirmominiatum*, *C. macerans*, y *Mrakiella cr*

Tabla 1. Especies de levaduras y hongos aislados de diferentes sitios de muestreo y hospedantes.

* indica especies de levaduras y mohos que también se identificaron para cerezas del Paralelo 42°. # indica que la especie también fue identificada para cerezas y zarzamoras del Paralelo 42°.

Sitio	Hospedante	Número de levaduras	Especies de levaduras	Número de hongos	Especies de hongos
Gaiman	Cerezas	97	<i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> <i>Filobasidium capsuligenum</i> <i>Guehomyces pullulans</i>	13	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria arborescens</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium</i> sp <i>Penicillium crustosum</i> <i>Ulocladium</i> sp
	Cerezas		<i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Cystofilobasidium capitatum</i>		<i>Alternaria rosae</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Chaetomium funicola</i> <i>Cladosporium macrocarpum</i> <i>Fusarium</i> sp <i>Mucor circinelloides</i>
Paralelo 42°		367		22	
	Frambuesas		<i>Aureobasidium pullulans</i> # <i>Cryptococcus victoriae</i> *		<i>Mucor piriformis</i> * <i>Penicillium crustosum</i> * <i>Penicillium simplicissimum</i>
	Zarzamoras		<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> * <i>Cryptococcus albidosimilis</i> <i>Cryptococcus friedmannii</i> <i>Cryptococcus wieringae</i> <i>Rhodotorula fujisanensis</i> <i>Rhodotorula colostri</i>		<i>Botrytis cinerea</i> * <i>Mucor fragilis</i>
Trevelin	Cerezas	217	<i>Cystofilobasidium capitatum</i> <i>Cystofilobasidium macerans</i> <i>Guehomyces pullulans</i> <i>Mrakiella cryoconiti</i>	15	<i>Alternaria arborescens</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Chaetomium funicola</i> <i>Cladosporium macrocarpum</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Fusarium avenaceum</i> <i>Penicillium commune</i> <i>Penicillium crustosum</i> <i>Mucor piriformis</i> <i>Trichoderma citrinoviride</i> <i>Ulocladium consortiale</i>

yoconiti previamente aisladas de ambientes extremos, como lagos patagónicos y aguas antárticas y glaciares (Bhadra et al. 2008, Libkind et al. 2009, Song et al. 2009, Thomas-Hall et al. 2010). Esto concuerda con su capacidad para crecer a bajas temperaturas y destaca la importancia de aislar y seleccionar los antagonistas en condiciones de bajas temperaturas para obtener individuos adaptados a esos ambientes (Sangorrín et al. 2014).

Los géneros de hongos identificados han sido reportados en Argentina como patógenos de cítricos, frutos de pepita, trigo, lúpulo y fruta fina (Nome et al. 2012). Los patógenos que afectan la fruta dependerían de las condiciones ambientales propias de cada sitio. Las especies de los géneros *Mucor* y *Penicillium* fueron aisladas mayormente en la comarca del Paralelo 42° donde existe un “microclima” cálido y húmedo que favorece el desarrollo de estos mohos. En Gaiman, donde el clima es seco, los géneros *Alternaria* y *Ulocladium* fueron más frecuentes; esto concuerda con la estructura morfológica que tienen estos taxones que les confiere mayor tolerancia a climas más calurosos y secos.

Si bien se supone que los mohos aislados a partir de tejido enfermo son los responsables de generar la pudrición, esto se confirma solamente con estudios de virulencia. Dichos estudios, para los patógenos aislados en este trabajo, fueron realizados por nuestro grupo donde se demostró que las especies *Mucor piriformis*, *Penicillium crustosum* y *P. simplicissimum* son altamente patógenas para las frutas finas almacenadas hasta su comercialización (López et al. 2013). Además de la obtención de hongos patógenos, se aislaron cepas de *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Trichoderma* y *Ulocladium*, géneros con especies reconocidas por su capacidad biocontradora; este resultado presenta otros organismos a ser evaluados como ACB para fruta fina en la región.

Este primer estudio realizado para identificar la microbiota asociada a la fruta fina de Patagonia Sur, proporciona la base sobre la cual se realizarán pruebas de confrontación entre las levaduras y los hongos patógenos de poscosecha en busca de agentes de biocontrol en estos tipos de frutos.

La obtención de levaduras con capacidad antagonica contra hongos patógenos de fruta fina permitirá obtener

un método económico y saludable con el medio ambiente, como también posibilitará el desarrollo de una formulación comercial natural basada en microorganismos biocontroladores de enfermedades de poscosecha.

Agradecimientos

A los establecimientos Humus (El Bolsón, Río Negro), Valle del Medio (Lago Puelo, Chubut), Salinas (Gaiman, Chubut) y Hishashi (Trevelin, Chubut) por proveernos las frutas para realizar el trabajo.

Bibliografía

- Altschul, S., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25, 3389–3402.
- Bhadra, B., Rao, R.S., Singh, P.K., Sarkar, P.K., Shivaji, S., 2008. Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. *Current Microbiology*. 56, 489–494.
- Caminiti, A., 2005. Berries una alternativa para la región. *Fruticultura & Diversificación*. 46, 22–29.
- Candán, A. P., 2006. Cosecha y poscosecha de cerezas. *Fruticultura & Diversificación*. 50: 404 32–38.
- Fernandez, N.V., Mestre, M.C., Marchelli, P., Fontenla, S.B., 2012. Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*. 80, 179–192.
- Karabulut, O.A., Arslan, U., Ilhan, K., Kuruoglu, G., 2005. Integrated control of postharvest diseases of sweet cherry with yeast antagonists and sodium bicarbonate applications within a hydrocooler. *Postharvest Biology and Technology*. 37, 135–141.
- Kim, W.K., Sang, H.K., Woo, S.K., Park, M.S., Paul, N.C., Yu, S.H., 2007. Six species of *Penicillium* associated with blue mold of grape. *Mycobiology*. 35, 180–185.
- Libkind, D., Gadanho, M., van Broock, M., Sampaio, J.P., 2009. *Cystofilobasidium lacus-mascardii* sp. nov., a new basidiomycetous yeast species isolated from aquatic environments of the Patagonian Andes and *Cystofilobasidium macerans* sp. nov., the sexual stage of *Cryptococcus macerans*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 59, 622–630.
- López, S.N., Sangorrín, M.P., Pildain, M.B., 2013. Patogenicidad y resistencia a fungicidas de patógenos de poscosecha en fruta fina de Patagonia. En: libro de resúmenes XIII del Congreso Argentino de Microbiología. Bs. As. pp 231–232.
- Lutz, M.C., Sosa, M.C., Lopes, C.A., Sangorrín, M.P., 2012. A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science & Technology*. 22, 1465–1483.
- Lutz, M.C., Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., Sosa, M.C., Sangorrín, M.P., 2013. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology*. 164, 166–172.
- Medina, C.M., Cristancho, D., Uribe, D., 2009. Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filamentosos de levaduras obtenidos en cultivos de mora (*Rubus glaucus*). *Acta Biológica Colombiana*. 14, 179–196.
- Mildenberg JC, Flores D. 2008. Control biológico de *Botrytis* sp. en plantas de arándano (*Vaccinium* sp.) mediante el empleo de *Trichoderma* y levaduras. Resúmenes XXXI Congreso Argentino de Horticultura. Pp. 224.
- Nome, S.F., Docampo, D.M., Conci L.R. (Eds), 2012. *Atlas fitopatológico argentino*. Vol. 4, n° 4. ISSN 1851-8974. Córdoba, Argentina. URL: <http://www.fitopatoatlas.org.ar>
- Olstorp M, Borling J, Schnu"rer J, Passoth V (2010) The biocontrol yeast *Pichia anomala* improves feed hygiene during storage of moist crimped cereal grain under Swedish farm conditions. *Animal Feed Science and Technology* 156:47–56
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and food spoilage*, 3rd edition. Springer, New York.
- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 151, 70–77.
- Prodorutti, D.; Ferrari, A.; Pertot, I., 2006. Efficacy of *Shemer (Metschnikowia fructicola)* against postharvest rot of small fruits en Brunelli, A.; Canova, A.; Collina, M. (Eds), *Giornate Fitopatologiche 2006*, Riccione (RN), 27–29 marzo 2006. Atti, volume secondo 2006. pp. 423–428.
- Raffo, D., Villarreal, P., Ballivián, T., Barria, J., 2005. Cerezas en Norpatagonia. *Fruticultura & Diversificación*. 50, 16–20.
- Robiglio, A., Sosa, M.C., Lutz, M.C., Lopes, C.A., Sangorrín, M.P., 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature, *International Journal of Food Microbiology*. 147, 211–216.
- Sangorrín, M.P., Lopes, A., Vero, S., Wisniewski, M., 2014. Cold-Adapted Yeasts as Biocontrol Agents: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biocontrol Potential en Buzzini, P., Margesin, R. (Eds), *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*. Springer. Pp. 441–464.
- Song, C., Chi, Z., Li, J., Wang, X., 2010. Beta-galactosidase production by the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 33, 1025–31.
- Thomas Hall, S.R., Turchetti, B., Buzzini, P., Branda, E., Boekhout, T., Theelen, B., Watson, K., 2010. Cold-adapted yeasts from Antarctica and Italian Alps-description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles*. 14, 47–59.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., Ippolito, A., 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*. 30, 209–220.
- Venturini, M.E., Oria, R., Blanco, D., 2002. Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Sweetheart. *Food Microbiology*. 19, 15–21.
- Valente, P., Ramos, J., Leoncini, O., 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Canadian Journal of Microbiology*. 45, 949–958.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics. En Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds), *PCR protocols: A guide to the Methods and Applications*, New York. pp. 315–322.