

Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos

Ana Niurka Hernández-Lauzardo, Silvia Bautista-Baños, Miguel Gerardo Velázquez-del Valle, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Apdo. Postal 24, km 8.5 Carr. Yautepec-Jojutla San Isidro, Yautepec, Morelos, México CP 62731; y **Annia Hernández-Rodríguez**, Universidad de la Habana, Departamento de Microbiología, Calle 25 esquina J, Ciudad Habana, Cuba CP 10347. Correspondencia: aniuurka10@hotmail.com

(Recibido: Junio 26, 2006 Aceptado: Septiembre 26, 2006)

Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G. y Hernández-Rodríguez, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:66-74.

Resumen. Los microorganismos antagonistas se han utilizado como agentes de biocontrol para diversas enfermedades postcosecha en fruta fresca. Éstos pueden ser aislados de la superficie de los frutos o las hojas. Para el uso adecuado de este tipo de microorganismo es importante comprender los mecanismos de acción involucrados en la actividad de biocontrol, para un desarrollo más seguro de los procesos de aplicación y una base para seleccionar cepas nuevas y eficientes. Se deben abordar estudios básicos a nivel bioquímico y molecular que contribuyan a dilucidar efectos tales como la antibiosis, la competencia por los nutrientes y la inducción de resistencia. En la mayoría de los estudios de biocontrol es aplicado un solo agente biocontrolador. Sin embargo, se ha señalado que se requiere evaluar el efecto de varios antagonistas combinados para asegurar un control adecuado de la enfermedad, disminuyendo dosis y minimizando el empleo de productos sintéticos, considerando además que el uso de aditivos mejora el efecto de los microorganismos antagonistas.

Palabras clave adicionales: Pudriciones postcosecha, agentes de biocontrol, antibiosis, enzimas líticas.

Abstract. Antagonistic microorganisms have been used as biological control agents for several postharvest diseases of fresh fruits. These microorganisms can be isolated from the surface of fruits or leaves. In order to properly use this type of microorganism, it is important to understand the action mechanisms involved in biocontrol activities which would allow a more secure development of the application processes and a base to select new and efficient strains. Basic biochemistry and molecular studies are required in order to elucidate the effect of antibiosis, nutrient competition, and the induction of resistance. In almost all biocontrol systems,

a single biocontrol agent is applied. However it has been suggested the need to evaluate the effect of several combination of antagonists to assure an adequate disease control, reducing rates and minimizing the use of synthetic products, considering that the use of additives improve the effect of antagonist microorganisms.

Additional keywords: Postharvest rots, biocontrol agents, antibiosis, lytic enzymes.

Microorganismos antagonistas: Definición, características y mecanismos de acción. Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales (De Costa y Erabadupitiya, 2005; Wisniewski y Wilson, 1992). En los últimos años, el control biológico ha sido objeto de estudio y ha demostrado ser efectivo en el control de enfermedades postcosecha; la superficie del fruto o fructoplano es el mejor lugar para el aislamiento de microorganismos antagonistas, los cuales pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad en el fruto (Janisiewicz y Korsten, 2002). También se ha reportado que la superficie de las hojas (filoplano) constituye otra fuente para el aislamiento de antagonistas (Zhou *et al.*, 1999). Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar las siguientes características generales: a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos y de persistir en ellas de manera efectiva, b) mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes, y c) capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales (Wisniewski y Wilson, 1992). Por otra parte, se deben considerar otras características específicas del microorganismo antagonista, siendo las más importantes: su estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente, efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de frutos y hortalizas, capacidad

de reproducirse en medios de crecimiento económicos, que se mantenga en una formulación durante un largo periodo de vida, que sea fácil de aplicar sin producción de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistente a los fungicidas y compatible con los procedimientos comerciales y no patógeno sobre el hospedero (Wilson y Wisniewski, 1989). Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso de los mismos, y para la selección de nuevos antagonistas efectivos. Hasta ahora, los conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia. Cabe destacar que en general más de un mecanismo puede estar implicado en el efecto de biocontrol (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Microorganismos antagonistas en la fase de postcosecha. El uso de microorganismos antagonistas para controlar las enfermedades postcosecha se plantea mediante dos enfoques importantes, que consisten en la estimulación y el manejo de los antagonistas presentes sobre la superficie del fruto, y en la introducción artificial de antagonistas contra los patógenos. Éste último, se favorece bajo las condiciones actuales de almacenamiento controlado de los productos (Wisniewski y Wilson, 1992). Son diversos los efectos benéficos de los microorganismos que durante años han sido utilizados, en esta área de estudio se abren potencialmente las perspectivas del empleo de los microorganismos antagonistas para controlar las enfermedades postcosecha. Las levaduras son más utilizadas que las bacterias para controlar las enfermedades postcosecha y en menor grado los hongos. En el Cuadro 1 se resumen algunos estudios realizados utilizando microorganismos antagonistas para el control de las enfermedades postcosecha. Las levaduras empleadas como antagonistas han mostrado efecto antifúngico sobre diferentes patógenos postcosecha; los mecanismos de acción no han sido del todo establecidos, aunque se sugiere que existe la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia (El Ghaouth y Wilson, 1995). El control biológico constituye una tecnología emergente para controlar las enfermedades postcosecha; es importante considerar la resistencia a este tipo de enfermedades porque ésta podría ser diferente a la resistencia en campo hacia hongos; se ha observado que pocos antagonistas son efectivos cuando se trasladan del laboratorio al campo (Wilson y Wisniewski, 1989). McLaughlin *et al.* (1990) establecieron criterios para diferenciar taxonómicamente las levaduras que pueden ser utilizadas potencialmente. Por otra parte, Guerrero-Prieto *et al.* (2004) identificaron levaduras epifitas de manzana [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] que pueden ser utilizadas para biocontrol en postcosecha.

Estudios *in vitro* en la fase postcosecha. En investigaciones desarrolladas por Wilson y Chalutz (1989), se evaluó el efecto de más de 100 aislamientos de microorganismos antagonistas

(bacterias y levaduras) contra *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. y *Penicillium italicum* Wehmer, agentes causales de la pudrición de los cítricos, y se encontró que las levaduras *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder y Kreger-van Rij y *Aureobasidium pullulans* de Bary y las bacterias *Pseudomonas cepacia* Van Hall y *Pseudomonas syringae* Van Hall resultaron más efectivos. En general, *P. cepacia* mostró mejor efecto de biocontrol sobre ambos patógenos, evidenciándose mediante la producción de antibióticos. Las levaduras *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrison (aislado LS-11) y *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner (aislamiento LS-28), mostraron diferentes niveles de actividad antagonista contra diversos patógenos postcosecha; su posible mecanismo de acción, al parecer se relaciona con la competencia por los nutrientes, teniendo este factor un papel importante en la actividad de ambas cepas de levaduras, sobre todo en el caso del primer aislamiento. El segundo aislamiento fue capaz de producir *in vitro* altos niveles extracelulares de β -1,3-glucanasa cuando creció en presencia de las hifas de los patógenos *Penicillium expansum* Link. y *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. como única fuente de carbono (Castoria *et al.*, 1997). Experimentos realizados en pequeña escala demostraron que *A. pullulans* (aislado LS-30) posee una significativa actividad antagonista contra *B. cinerea*, *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Aspergillus niger* Van Tieghem en uvas (*Vitis vinifera* L.) y contra *B. cinerea* y *P. expansum* en frutos de manzana. La competencia por los nutrientes resultó ser el principal mecanismo al que se le atribuyó este efecto. Adicionalmente, también se encontró que la actividad extracelular de la exoquitinasa y β -1,3-glucanasa se detectaron en los principales sitios de penetración de los hongos patógenos, sugiriéndose que estas enzimas podrían estar involucradas en la actividad antagonista de este microorganismo (Castoria *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha observado que la adición de bicarbonato de sodio (2%) a las levaduras antagonistas *C. laurentii* y *Trichosporon pullulans* (Linder) Diddens y Lodder inhibió de manera significativa la germinación de las esporas y la elongación del tubo germinativo de *P. expansum* y *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissler f. sp. *lycopersici* cultivados en caldo papa-dextrosa (Yao *et al.*, 2004), aunque aún no se conoce la función que desempeña. De acuerdo a los estudios realizados para tratar de esclarecer los mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas, se ha encontrado que resaltan la producción de antibióticos y la competencia por los nutrientes; sin embargo, es importante continuar abordando aspectos básicos de la interacción antagonista-patógeno en condiciones *in vitro*. Con base en los estudios realizados por Vero y Mondino (1999), es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista, dado el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico y a su vez, este mecanismo de acción es el más estudiado y se refiere a la producción por parte del antagonista de sustancias tóxicas (antibióticos) para otros microorganismos, un ejemplo típico es el cultivo dual de

Cuadro 1. Principales estudios realizados aplicando microorganismos antagonistas en el control de hongos postcosecha *in vitro* e *in situ*.

Microorganismo antagonista	Hongo fitopatógeno	Enfermedad	Efectos obtenidos	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis en mango	Control de la antracnosis y de las pudriciones pediculares en mango (<i>in situ</i>)	Govender <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Penicillium expansum</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	Pudriciones en naranjas	Resultados variables dependiendo del tiempo de almacenamiento (<i>in situ</i>)	Huang <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde en limón	Inhibición del crecimiento del patógeno y control de la enfermedad en un 80% (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Smilanick y Denis-Arrue, 1992
<i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Debaromyces hansenii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium digitatum</i> y <i>Penicillium italicum</i>	Pudrición de los cítricos	<i>P. cepacia</i> mostró mejor efecto de biocontrol evidenciándose mediante la producción de antibióticos (<i>in vitro</i>)	Wilson y Chalutz, 1989
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Aspergillus niger</i>	Pudriciones y mohos en uvas y manzanas	Actividad extracelular de exoquitinasa y β -1,3-glucanasa (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Castoria <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhodoturla glutinis</i> y <i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Penicillium expansum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	Mohos azul y gris de diferentes frutos	Altos niveles de β -1,3-glucanasa (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Castoria <i>et al.</i> , 1997
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris en pera	Efecto variable, en función del momento de aplicación del inóculo (<i>in situ</i>)	Zhang <i>et al.</i> , 2005
<i>Cryptococcus albidus</i> y <i>Pichia membranefaciens</i>	<i>Monilia fructicola</i> , <i>Penicillium expansum</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	Pudriciones en manzanas	Altos niveles de β -1,3-glucanasa (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Zhulong y Tian, 2005
<i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Candida cifferri</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul en manzanas	Reducción de la incidencia de la enfermedad (80%) (<i>in situ</i>)	Vero <i>et al.</i> , 2002
<i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Cryptococcus infirmo-miniatus</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul en manzanas	Reducción significativa de la incidencia y severidad del moho cuando se aplicó simultáneamente el antagonista y el patógeno (<i>in situ</i>)	Chand-Goyal y Spotts, 1996
<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	Pudriciones de manzanas, naranjas y limones	La combinación de la aplicación del antagonista con 0.2% de 2-deoxy-D-glucosa fue efectiva en controlar las pudriciones (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	El Ghaouth <i>et al.</i> , 2000

Cuadro 1. Continuación...

Microorganismo antagonista	Hongo fitopatógeno	Enfermedad	Efectos obtenidos	Referencia
<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris en manzanas	Los sitios del hospedero colonizados por el antagonista no presentaron degradación en la pared celular (<i>in situ</i>)	El Ghaouth <i>et al.</i> , 1998
<i>Candida oleophila</i>	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i>	Pudriciones en duraznos	El antagonista tuvo efecto sólo al combinarse con atmósfera modificada (<i>in situ</i>)	Karabulut y Baykal, 2004
<i>Candida famata</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Pudriciones en naranja	Producción de fitoalexinas y control de la pudrición en un 90% (<i>in situ</i>)	Arras, 1996
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Alternaria</i> spp. y <i>Monilinia</i> spp.	Pudriciones en manzanas	Efecto de acuerdo al patógeno estudiado (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Spadaro <i>et al.</i> , 2002
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	Pudriciones en peras	Reducción de la enfermedad causada por <i>B. cinerea</i> (80%) (<i>in situ</i>)	Nunes <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) Harrison	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis en mango	Reducción considerable de la severidad de la antracnosis (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Patiño-Vera <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhodotorula minuta</i> y <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis en mango	Aplicaciones precosecha de los antagonistas reducen la severidad en postcosecha (<i>in situ</i>)	Carrillo-Fasio <i>et al.</i> , 2005
<i>Verticillium lecanii</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde de los cítricos	Inducción de reacciones de defensa en el patógeno y antibiosis (<i>in vitro</i>)	Benhamou y Brodeur, 2000
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	<i>Botrytis cinerea</i>	Pudrición en uvas	Control parcial de la enfermedad (<i>in situ</i>)	Latorre <i>et al.</i> , 1997
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris en manzanas	Protección durante más de dos meses de la enfermedad (<i>in situ</i>)	Batta, 2004a
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul en manzanas	Protección durante más de dos meses de la enfermedad (<i>in situ</i>)	Batta, 2004b

Epicoccum nigrum Link y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.

Estudios *in situ* en la fase postcosecha. No siempre se ha observado consistencia al extrapolar los resultados del laboratorio a condiciones *in situ*. Se demostró que dos aislamientos de *Bacillus firmus* Bredemann y Werner redujeron el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en 75.3 y 69.1% en un lapso de 96 h *in vitro*, mientras que en los frutos de papaya no se encontró ningún efecto de control del hongo (Baños-Guevara *et al.*, 2004). Se han obtenido respuestas contradictorias cuando se trata de relacionar el daño celular en el fruto con el compuesto producido por el antagonista, por ejemplo, la aplicación de *P. cepacia* redujo el moho verde (*P. digitatum*) en más del 80%

en comparación al testigo en frutos de limón [*Citrus limon* (L.) N.L. Burm.]. La bacteria creció rápidamente en la herida y causó daños en el fruto, la pudrición se logró controlar cuando el antagonista se aplicó 12 h previas a la inoculación; se atribuyó este efecto a la producción de antibióticos (pyrrolnitrin) (*in vitro*). También se observó que la aplicación del mismo en el medio de cultivo inhibió la germinación de las esporas. Sin embargo, estudios realizados con cepas mutantes resistentes a este antibiótico, también mostraron este efecto en la germinación de sus esporas, por lo que los autores no atribuyen el efecto de la pudrición a la producción de este compuesto (Smilanick y Denis-Arrue, 1992). Otros autores también han encontrado que la eficiencia en el efecto de control depende del momento en que se aplique el inóculo,

tal es el caso de la levadura *C. laurentii* evaluada contra el moho gris en peras (*Pyrus communis* L.); su efecto varió de acuerdo al momento de aplicación del inóculo, si las aplicaciones del antagonista se realizaban previamente o al mismo tiempo que el patógeno sobre el fruto, los resultados del control eran positivos; sin embargo, este efecto no se mantuvo cuando *B. cinerea* se inoculó antes que la levadura (Zhang *et al.*, 2005). Resultados similares fueron encontrados por Chand-Goyal y Spotts (1996), quienes aislaron seis cepas de levaduras de la superficie de frutos de pera y evaluaron su capacidad para controlar el moho azul en manzanas; todas las cepas redujeron significativamente la incidencia y severidad de esta pudrición cuando se aplicó simultáneamente el antagonista con el patógeno. Dentro de los aspectos a considerar para conocer con más certeza el mecanismo por el que ocurre este proceso de control biológico, se encuentran los cambios ultraestructurales y citoquímicos que provocan los microorganismos empleados en el hospedero. En este sentido, el control biológico de *B. cinerea* por *Candida saitoana* Nakase y Suzuki en frutos de manzana, se estudió y se observó que cuando se cultivaron juntos, la levadura atacó las hifas del hongo. En el fruto, la levadura restringió la proliferación del patógeno y suprimió la enfermedad, denotándose severos daños citológicos en la pared celular de las hifas del fitopatógeno (ensanchamiento de la pared celular y degradación del protoplasma). La colonización del hongo causó una extensa degradación de la pared celular del hospedero, mientras que la levadura no causó algún daño al tejido vegetal. Los autores atribuyen el efecto de control biológico a la capacidad de la levadura de prevenir el crecimiento necrotrófico del hongo y al estímulo de la respuesta estructural de defensa en el fruto (El Ghaouth *et al.*, 1998). De manera similar al ejemplo anterior, también se ha estudiado la interacción entre dos levaduras antagonistas (*Pichia membranefaciens* Hansen y *Cryptococcus albidus* (Sato) C.E. Skinner) y tres hongos fitopatógenos [*Monilinia fruticola* (Winter) Honey, *P. expansum* y *R. stolonifer*] en heridas de manzanas. Las observaciones al microscopio de luz y al microscopio electrónico de barrido, indicaron que *P. membranefaciens* tiene mayor capacidad para atacar a las hifas del hongo que *C. albidus* (Zhulong y Tian, 2005). Resultados similares fueron reportados por Arras (1996), quienes mediante estudios de microscopía electrónica demostraron que *Candida famata* (Harrison) Meyer y Yarrow presentó actividad fagocítica y lítica contra las hifas de *P. digitatum*. Para el caso de hongos empleados como antagonistas, se señala el efecto que causó *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas contra *P. digitatum*; mediante observaciones histológicas se observó que las hifas del patógeno presentaron una pronunciada desorganización celular y se restringieron a colonizar la superficie del fruto (Benhamou, 2004). Otros estudios evidenciaron que *P. membranefaciens* produjo una alta cantidad de la enzima β -1,3-glucanasa, lo que podría indicar que la excreción de enzimas líticas tiene un papel importante en el efecto de

biocontrol (Zhulong y Tian, 2005); por lo que otro argumento que se ha utilizado para sustentar la actuación de los microorganismos antagonistas, ha sido la producción de enzimas relacionadas con la inducción de resistencia en los frutos. Asimismo, se ha encontrado que cuando la levadura *Candida famata* se inocula dentro de la herida, se estimula la producción de fitoalexinas en frutos de naranja (*Citrus aurantium* L.) y se controla en un 90% las pudriciones causadas por *P. digitatum* en los mismos (Arras, 1996). En otras investigaciones, se evaluaron cuatro aislamientos de la levadura *Metschnikowia pulcherrima* Pitt y Miller contra *B. cinerea*, *P. expansum*, *Alternaria* spp. y *Monilinia* spp., donde se encontró que la aplicación del antagonista en la superficie de las manzanas redujo el crecimiento de *B. cinerea* y *P. expansum* y causó una completa supresión de *Monilinia* spp. después del almacenamiento a 23°C. Sin embargo, los resultados contra *Alternaria* spp. fueron variables. Estos autores sustentan la hipótesis de que las células vivas son necesarias para lograr el efecto de biocontrol, debido a que en las pruebas que realizaron con células muertas y filtrados de cultivo, resultaron inefectivos (Spadaro *et al.*, 2002). Esto aplica para el mecanismo de acción de competencia, parasitismo e inducción de resistencia, ya que se requiere que el antagonista permanezca vivo, no así para el mecanismo de producción de antibiótico debido a que el antibiótico pudo haberse producido por el antagonista en el medio y al esterilizar la suspensión, el antibiótico permanece activo. En otros estudios que podrían sustentar la hipótesis anterior, se evaluó la actividad de *C. laurentii* en la reducción del moho gris (*B. cinerea*) en peras; las suspensiones sin células controlaron mejor que cuando estaba presente la levadura en el cultivo. Al aplicar a la herida células de levadura previamente tratadas en autoclave o filtrados libres de células, no se observó efecto de control (Zhang *et al.*, 2005). La competencia por los nutrientes también ha sido valorada en estudios *in situ*. Dos levaduras antagonistas *C. laurentii* (aislado 317) y *Candida ciferrii* Kreger-van Rij (aislado 283) obtenidas de la superficie de manzanas sanas, controlaron el moho azul causado por *P. expansum*. Ambos antagonistas redujeron la incidencia de esta enfermedad en un 80% a 25°C, y a 5°C el segundo aislamiento mantuvo su eficiencia de control y el otro sólo redujo la incidencia de la enfermedad en un 50% (Vero *et al.*, 2002). Estudios previos realizados por Vero y Mondino (1999) demostraron que estas cepas no producen antibióticos, y que compiten por los nutrientes en las heridas de los frutos impidiendo la colonización de las mismas por parte del patógeno. Microorganismos epífitos aislados de la superficie de frutos y hojas de manzanas y peras, se evaluaron para conocer su actividad antagonista contra *P. expansum* en peras. Se seleccionó la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters y De Ley (CPA-2), la cual fue efectiva contra *B. cinerea*, *P. expansum* y *R. stolonifer*, obteniéndose un 80% de reducción de la pudrición causada por *B. cinerea* (Nunes *et al.*, 2001). A pesar de que se han obtenido resultados prometedores,

similares a los logrados con fungicidas sintéticos, todavía no se consigue superar algunos detalles con el manejo de los microorganismos antagonistas; por ejemplo, el empleo de bacterias como *P. cepacia* ha mostrado un buen efecto de biocontrol contra el moho verde y azul de las naranjas, siendo similar al de los fungicidas sintéticos durante las primeras cinco semanas de almacenamiento; sin embargo, a las diez semanas se observó que el control era mejor con los fungicidas sintéticos, lo que denota que la persistencia de los productos biológicos debe ser objeto de estudio para garantizar un efecto más duradero (Huang *et al.*, 1993). Existen diferentes alternativas (extractos vegetales, quitosano, antagonistas) para controlar las enfermedades postcosecha causadas por hongos fitopatógenos en frutas; sin embargo, se conoce que ninguna de ellas por sí sola, logra suplir los efectos que se obtienen cuando se aplican fungicidas sintéticos (El Ghaouth y Wilson, 1995). Se han comenzado a desarrollar técnicas complementarias capaces de mejorar la efectividad de métodos alternativos; es importante considerar las prácticas de manejo de frutos para evitar los daños físicos y mecánicos y garantizar óptimas condiciones de almacenamiento (Mari y Guizzardi, 1998). Por otra parte, es elemental considerar el efecto de las prácticas de postcosecha en la actividad biológica de los antagonistas, y la seguridad de la aplicación de los mismos sobre la salud humana (El Ghaouth y Wilson, 1995).

Tendencias actuales para el empleo de microorganismos antagonistas en el control de las enfermedades postcosecha.

El empleo de microorganismos antagonistas se ha sustentado en la combinación con otras alternativas o con los fungicidas sintéticos, además de que se considera importante que se integre el uso de los mismos dentro de las prácticas de manejo de la tecnología postcosecha. En este sentido, se han desarrollado diversos estudios para conocer la eficiencia biológica de los antagonistas; por ejemplo, al analizar el comportamiento de cuatro levaduras antagonistas (*T. pullulans*, *C. laurentii*, *R. glutinis* y *P. membranefaciens*), se encontró que fueron efectivas contra importantes patógenos postcosecha (*A. alternata*, *P. expansum*, *B. cinerea* y *R. stolonifer*) en cerezas (*Rubus idaeus* L.) almacenadas a 25° C; sin embargo, a bajas temperaturas y en condiciones de atmósfera controlada se suprimió el crecimiento de *T. pullulans* y *P. membranefaciens* (Qin *et al.*, 2004). También se ha encontrado el efecto inverso, estudios realizados en duraznos [*Prunus persica* (L.) Batsch] para controlar la enfermedad causada por *B. cinerea* y *P. expansum* con el antagonista *Candida oleophila* Montrocher, evidenciaron que esta levadura por sí sola no fue capaz de ejercer efecto de biocontrol, pero cuando se combinó con la atmósfera modificada durante el empaque se redujo la pudrición (Karabulut y Baykal, 2004). Los dos ejemplos mencionados anteriormente indican que se debe profundizar en el estudio de los diferentes microorganismos propuestos como antagonistas, no se puede generalizar el comportamiento de los mismos, aún estando clasificados dentro de las

levaduras, ellos pueden diferir en su forma de respuesta cuando se integran a las prácticas postcosecha. Por otra parte, se ha experimentado la posibilidad de utilizar el microorganismo antagonista con otros compuestos que le ayuden a controlar al patógeno, como es el empleo de sideróforos que tienen un papel fundamental en la supresión de hierro y limitan la disponibilidad de este compuesto a los patógenos, el cual es esencial para diferentes funciones vitales. En experimentos de biocontrol en manzanas heridas, el moho gris fue controlado de modo más efectivo cuando se combinó la aplicación de la levadura (*R. glutinis*) con el sideróforo (ácido rodotorúlico) que cuando se utilizó sola; en el primer caso se redujo en un 72% la severidad de la enfermedad y en el segundo, se observó una reducción del 54% (Sansone *et al.*, 2005). Una formulación a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y levaduras antagonistas, adicionadas o no con quitina, fue evaluada contra la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). La incidencia de la antracnosis en pre y postcosecha se redujo significativamente cuando se aplicó *Pseudomonas fluorescens* Migula (FP7) y quitina, desde la precosecha (Vivekananthan *et al.*, 2004). La actividad de biocontrol de *C. laurentii* y *T. pullulans* contra las pudriciones postcosecha causadas por *P. expansum* y *A. alternata* en frutos de pera se incrementó cuando las levaduras se combinaron con bicarbonato de sodio (2%), siendo mayor el efecto que cuando se aplicaron los tratamientos de forma independiente. Se destacó la cepa de *C. laurentii* por ejercer mejor biocontrol sobre los patógenos estudiados, en comparación a *T. pullulans* (Yao *et al.*, 2004). El uso de este tipo de aditivos ha comenzado a desarrollarse con éxito en la mayoría de las investigaciones realizadas. Otro aspecto importante, es la posible integración de la aplicación de microorganismos antagonistas (*M. pulcherrima*) con los químicos acibenzolar-S-methyl, etanol ó bicarbonato de sodio y tratamientos de calor, para controlar los mohos azul y verde en frutos de manzanas. Sin embargo, el elemento que resultó clave para el control de las pudriciones fue la levadura, evidenciándose mejor después del almacenamiento en frío, con una reducción de 56.6 y 97.2% del diámetro de la lesión de los mohos azul y verde, respectivamente. Estos autores proponen las combinaciones de los químicos y la levadura como una alternativa viable para controlar las pudriciones postcosecha en frutos de manzana (Spadaro *et al.*, 2004). De igual forma, otros autores plantean la aplicación conjunta de cepas de *P. syringae* con fungicidas (ciprodinil) para controlar el moho azul en manzanas resistentes a los tratamientos con tiabendazol (Errampalli y Brubacher, 2006). También se encontró que es factible incorporar al antagonista *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester combinado con fungicidas para controlar la antracnosis y las pudriciones pediculares en mango, en condiciones semicontroladas (Govender *et al.*, 2005). Asimismo, se ha estudiado el efecto del uso de aditivos (propionato de calcio, bicarbonato de sodio y ácido etilendiaminotetracético) combinados con el producto Aspire,

en el control de patógenos postcosecha. Al combinarse este producto con bicarbonato de sodio al 2%, se obtuvieron resultados consistentes en la capacidad de biocontrol (efecto curativo y protector) contra *B. cinerea* y *P. expansum* en las pudriciones de manzanas y duraznos (*Rhizopus* spp. y *Monilinia* spp.) (Droby *et al.*, 2003). Al respecto, otras investigaciones necesitan desarrollarse y contribuir a potenciar el empleo de estos productos.

Perspectivas. Los antagonistas microbianos tienen gran potencial de empleo, se ha comprobado que el uso de los mismos ha sido eficiente en el control de patógenos que afectan diferentes frutos (manzanas, cítricos, *etc.*); sin embargo, con relación a sus mecanismos de acción se deben abordar otros estudios básicos a nivel bioquímico y molecular, que contribuyan a dilucidar efectos tales como la antibiosis y la competencia por los nutrientes, con el objeto de mejorar la efectividad de los mismos. De forma adicional a los estudios e investigaciones básicas que deben continuar desarrollándose de forma individual con las alternativas propuestas, se debe analizar el efecto que causa la combinación de las mismas entre sí y a su vez con diversos químicos sintéticos. Se conoce que por sí sola ninguna de estas alternativas logra superar la efectividad del empleo de los productos sintéticos; sin embargo, sería interesante combinarlas con ellos y disminuir las dosis de empleo de los mismos, con lo cual estamos contribuyendo a minimizar el uso de los químicos sintéticos y su efecto nocivo y residual. Reflexionamos al respecto con relación al uso de químicos sintéticos que han causado efectos nocivos a lo largo de varios años, con el afán de controlar patógenos de interés agrícola. Es necesario continuar desarrollando estudios con alternativas de origen natural que puedan emplearse para controlar las enfermedades sin riesgos para el entorno. Es importante que los estudios a desarrollar comprendan un enfoque multidisciplinario, diferentes especialistas deben unir sus esfuerzos y aportar al conocimiento de los procesos de competencia de su área de estudio; es crucial, la unión de microbiólogos, químicos y agrónomos, para abordar desde aspectos básicos que pueden ocurrir en condiciones de laboratorio con los microorganismos estudiados, la interacción química con los compuestos empleados y finalmente, el trabajo fundamental que desempeñan los agrónomos en aplicar los productos a los frutos, y esclarecer la efectividad de los productos evaluados en controlar la severidad de las enfermedades postcosecha. De forma integral se debe considerar la protección de los productos frutícolas sin dañar al ambiente y a la salud humana, aspectos fundamentales en el desarrollo sustentable de los países que afrontan esta problemática.

CONCLUSIONES

El empleo de microorganismos antagonistas para controlar las enfermedades postcosecha se ha demostrado mediante diversos estudios. Algunos consideran el efecto directo que tienen los antagonistas sobre los hongos fitopatógenos

estudiados, dentro de ellos destacan los pertenecientes al género *Penicillium* que afectan fundamentalmente cítricos y manzanas. En la búsqueda por el control de los mismos, se ha evaluado el empleo de bacterias (*Pseudomonas* spp.) y levaduras (*Cryptococcus* spp.), las cuales se han caracterizado por la producción de antibióticos y la competencia por los nutrientes. En este caso se ha argumentado el efecto directo que causan sobre los patógenos. Por otra parte, también se ha demostrado que el empleo de antagonistas ha inducido resistencia en los frutos estudiados; se ha caracterizado por provocar el incremento de enzimas líticas como la β -1,3-glucanasa, que causan rompimiento celular en los fitopatógenos, y de igual forma, se ha encontrado incremento en la producción de fitoalexinas que contribuyen a incentivar los mecanismos de defensa de los frutos que son objeto de estudio. Los resultados obtenidos han sido variables y dependen del antagonista empleado, del hospedero, del patógeno analizado y así como las condiciones climáticas y otras (pH, dosis de gases en atmósferas controladas, *etc.*). En general, se puede señalar que ambos efectos, o sea, antifúngico y de inducción de resistencia, han sido observados cuando se emplean microorganismos antagonistas que actúan mediante los mecanismos de acción referidos en la literatura: La antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia.

Agradecimientos. A la Biblioteca Nacional de Ciencia y Tecnología del Instituto Politécnico Nacional.

LITERATURACITADA

- Arras, G. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology* 8:191-198.
- Baños-Guevara, P.E., Zavaleta-Mejía, E., Colinas-León, M.T., Luna-Romero, I. y Gutiérrez-Alonso, J.G. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en papaya Maradol Roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:198-205.
- Batta, Y.A. 2004a. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection* 23:19-26.
- Batta, Y.A. 2004b. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *International Journal of Food Microbiology* 96:281-288.
- Benhamou, N. 2004. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the casual agent of green mold: A Comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* 94:693-705.
- Benhamou, N., and Brodeur, J. 2000. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*,

- the casual agent of green mold. *Phytopathology* 90:932-943.
- Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Muy-Rangel, M.D., Sañudo-Barajas, A., Márquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., De la Garza-Ruiz, Z., Patiño-Vera, M. y Galindo-Fentanes, E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:24-32.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., and De Cicco, V. 1997. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 12:293-300.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Pacifico, S., and De Cicco, V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: Study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology* 22:7-17.
- Chand-Goyal, T., and Spotts, R. 1996. Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control* 6:253-259.
- De Costa, D.M., and Erabadupitiya, H.R.U.T. 2005. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology* 36:31-39.
- Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., and Wilson, C.L. 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol. *Postharvest Biology and Technology* 27:127-135.
- El Ghaouth, A., and Wilson, C. 1995. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. *Postharvest News and Information* 6:5-11.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wisniewski, M., and Wilson, C.L. 2000. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Disease* 84:249-253.
- El Ghaouth, A., Wilson, C.L., and Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88:282-291.
- Errampalli, D., and Brubacher, N.R. 2006. Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. *Biological Control* 36:49-56.
- Govender, V., Korsten, L., and Sivakumar, D. 2005. Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology* 38:57-65.
- Guerrero-Prieto, V.M., Trevizo-Enriquez, M.G., Gardea-Béjar, A.A., Figueroa-Valenzuela, C., Romo-Chacón, A., Blanco-Pérez, A.C. y Curry, E. 2004. Identificación de levaduras epifitas obtenidas de manzana [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] para control biológico poscosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:223-230.
- Huang, Y., Deverall, B.J., Morris, S.C., and Wild, B.L. 1993. Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. *Postharvest Biology and Technology* 3:293-304.
- Janisiewicz, W.J., and Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40:411-441.
- Karabulut, O., A., and Baykal, N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection* 23:431-435.
- Latorre, B.A., Agosin, E., San Martín, R., and Vásquez, G.S. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against Botrytis bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection* 16:209-214.
- Mclaughlin, R.J., Wilson, C.L., Chalutz, E., Kurtzman, C.P., Fett, W.F., and Osman, S.F. 1990. Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 56:3583-3586.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., and Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* 70:53-61.
- Patiño-Vera, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., and Galindo, E. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potencial biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology* 99:540-550.
- Qin, G., Shiping, T., and Xu, Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 31:51-58.
- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D., and Sanz de Tosetti, M.I. 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology* 35:245-251.
- Smilanick, J.L., and Denis-Arrue, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas species*. *Plant Disease* 76:481-485.
- Spadaro, D., Garibaldi, A., and Gullino, M.L. 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology* 33:141-151.
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., and Gullino, M.L. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology* 24:123-134.
- Vero, S. y Mondino, P. 1999. Control biológico poscosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional* 7:1-10.

- Vero, S., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M., and Wisniewski, M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology* 26:91-98.
- Vivekananthan, R., Saravanakumar, D., Kumar, N., Prakasam, V., and Samiyappan, R. 2004. Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection* 23:1061-1067.
- Wilson, C.L., and Chalutz, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeast and bacteria. *Scientia Horticulturae* 40:105-112.
- Wilson, C.L., and Wisniewski, M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27:425-441.
- Wisniewski, M.E., and Wilson, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. *HortScience* 27:94-98.
- Yao, H., Tian, S., and Wang, Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology* 93:297-304.
- Zhang, H., Zheng, X., Fu, C., and Xi, Y. 2005. Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*. *Postharvest Biology and Technology* 35:79-86.
- Zhou, T., Northover, J., and Schneider, K.E., 1999. Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 21:375-381.
- Zhulong, C., and Tian, S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology* 36:215-223.