

UCH-FC
Biotecnología
V 722
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO

“Evaluación del potencial de levaduras antárticas como fuente para el desarrollo de productos Biocontroladores de fitopatógenos”.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

PABLO VILLARREAL DIAZ



Director del Seminario de Título:
Dr. Marcelo Baeza C.

Junio de 2014
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Pablo Villarreal Díaz**

“Evaluación del potencial de levaduras antárticas como fuente para el desarrollo de productos Biocontroladores de fitopatógenos”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Marcelo Baeza C.
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. Baeza", written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación:

Dra. Claudia Stange K.
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "C. Stange", written over a horizontal line.

Dra. Lorena Norambuena M.
Evaludador

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "L. Norambuena", written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Mayo de 2014



Nací el Martes 7 de Junio de 1988 en la Ciudad de Santiago, hijo de Christian Villarreal Barahona y Rosa Días Elguet. Realicé la enseñanza básica y media en el Colegio San Ignacio El Bosque, donde jugué Basquetbol por la selección del colegio desde que estaba en 5 básico. Ya en la enseñanza media tuve la oportunidad de ingresar a la U. de Chile a jugar de manera federada y logre integrar la selección Chilena en 2º Medio y la selección de la Región Metropolitana 2 años consecutivos, 3º y 4º Medio. El año 2007 opté por entrar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, siguiendo mi gusto por la ciencia. Luego de 3 años ingrese al Laboratorio de Genética donde realicé variadas actividades hasta que el año 2011 comencé mi seminario de titulo, en el área del Biocontrol utilizando levaduras antárticas. Me llevo mas de lo esperado pero finalmente lo logre. Actualmente me encuentro realizando el Doctorado en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias, comenzando una nueva línea de investigación.

A mi hijo Martín...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres por apoyarme siempre en todas las decisiones de mi vida. A mi hijo Martín, por ser mi gran motivación en mi vida. A 4 abuelos que todavía están conmigo y mis tíos, sobre todos a mi tía Paty, por estar siempre conmigo durante los años más difíciles de la Universidad.

Al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, que me abrió la puertas. Al Dr. Marcelo Baeza, que me dio la oportunidad de ingresar a su grupo de trabajo y ayudarme siempre respondiendo dudas y dando consejos para ser mejor científico. Al Dr. Víctor Cifuentes por permitirme realizar mi seminario de título en su laboratorio. A la Dony y Jenny por ayudarme a desenvolverme mejor en el laboratorio y responder siempre mis dudas. Al Salva por ayudarme siempre y estar dispuesto a resolver cualquier problema o duda en cualquier momento incluso dejando de lado su trabajo. A todos mis compañeros del Lab por hacer los días de trabajo menos monótonos y en especial a mi grupo de trabajo Ori, Mario y Juan Manuel.

Por último a mis amigos Mono, Slapi y Pajaro por estar siempre acompañándome en las buenas y malas, por los buenos carretes y salidas juntos.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Metodologías de control actual.....	3
1.2 Fitopatógenos.....	4
1.2.1 <i>Clavibacter michiganensis subsp michiganensis</i>	4
1.2.2 <i>Penicillium expansum</i>	5
1.2.3 <i>Botrotis cinerea</i>	6
1.2.4 <i>Fusarium oxysporum</i>	6
1.2.5 <i>Phytophthora infestans</i>	7
1.3 Biocontroladores.....	7
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo General.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Materiales.....	17
4.1.1 Microorganismos.....	17
4.1.2 Reactivos químicos.....	17

4.2 Métodos.....	21
4.2.1 Optimización de condiciones de cultivo de los patógenos a analizar..	21
4.2.2 Ensayo de confrontación en placa.....	21
4.2.3 Extracción de proteínas extracelulares totales.....	22
4.2.4 Análisis de actividad antimicrobiana de los extractos proteicos.....	22
4.2.5 Sensibilidad de levaduras frente a pesticidas de uso común.....	23
5.RESULTADOS.....	24
5.1 Determinación de las condiciones adecuadas de cultivo para los ensayos de confrontación.....	25
5.2 Análisis de actividad antimicrobiana <i>in vivo</i>.....	25
5.3 Extracción y análisis de proteínas extracelulares totales.....	31
5.4 Sensibilidad de las levaduras frente a pesticidas de uso común.....	38
6. DISCUSION.....	47
6.1 Optimización de las condiciones de cultivo.....	48
6.2 Análisis de actividad antimicrobiana.....	48
6.3 Sensibilidad de las levaduras frente a pesticidas de uso común.....	49
7. CONCLUSION.....	51
8. PROYECCIONES.....	53
9. BIBLIOGRAFIA.....	55
10. ANEXOS.....	59
10.1 Anexo 1.....	60
10.2 Anexo 2.....	61
10.3 Anexo 3.....	62

10.4 Anexo 4.....63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ensayo <i>in vivo</i> de aislados antárticos contra el fitopatógeno de tomate <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	27
Figura 2: Ensayo <i>in vivo</i> de aislados antárticos contra el fitopatógeno de cítricos <i>Penicillium expansum</i>	29
Figura 3: Ensayo <i>in vivo</i> de aislados antárticos contra el fitopatógeno de vid <i>Botrytis cinerea</i>	30
Figura 4: Ensayo <i>in vitro</i> de extractos proteicos seleccionados a 22°C	32
Figura 5: Ensayo <i>in vitro</i> de extractos proteicos de aislados antárticos contra el fitopatógeno de bananero <i>F. oxysporum</i>	37
Figura 6: Compatibilidad de <i>C. sake</i> frente a diferentes pesticidas de uso común.....	40
Figura 7: Compatibilidad de <i>M. psychrophilia</i> frente a diferentes pesticidas de uso común.....	42
Figura 8: Compatibilidad de <i>Cr. gilvescens</i> frente a diferentes pesticidas de uso común...44	
Figura 9: Compatibilidad de <i>W. anomalus</i> frente a diferentes pesticidas de uso común.....	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Levaduras antárticas.....	18
Tabla 2: Fitopatógenos.....	19
Tabla 3: Pesticidas.....	20
Tabla 4: Resumen de actividad <i>in vivo</i> de aislados antárticos.....	28
Tabla 5: Rango de temperatura de crecimiento y pH de <i>Clavibacter michiganensis subsp michiganensis</i>	33
Tabla 6: Ensayo de actividad <i>in vitro</i> de los extractos proteicos seleccionados a diferentes T° y pH.....	35
Tabla 7: Ensayo de actividad antifúngica de los extractos proteicos realizados a 22 y 30°C, contra los fitopatógenos <i>P. expansum</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>P. infestans</i>	36
Tabla 8: Compatibilidad de <i>C. sake</i> frente a diferentes pesticidas de uso común.....	39
Tabla 9: Compatibilidad de <i>M. psychrophilia</i> frente a diferentes pesticidas de uso común.....	41
Tabla 10: Compatibilidad de <i>Cr. gilvescens</i> frente a diferentes pesticidas de uso común.....	43
Tabla 11: Compatibilidad de <i>W. anomalus</i> frente a diferentes pesticidas de uso común.....	45

RESUMEN

Históricamente la agricultura ha pasado por alto la sustentabilidad de la producción agrícola. El uso de químicos (agroquímicos) ha permitido obtener grandes mejoras en la producción, sin embargo, una serie de efectos adversos están impactando de manera significativa la sustentabilidad de la agricultura. La contaminación generada por el uso indiscriminado de estos compuestos ha reducido la biodiversidad de los “agroecosistemas”, causando su inestabilidad, la cual se manifiesta en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos. Esto y los problemas inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de nuevas alternativas de manejo de plagas y enfermedades. Por lo cual surge el interés por el control ecológico, el cual se define como: “Cualquier forma de control que reduce la incidencia o severidad de la enfermedad, o incrementa la producción del cultivo, aun cuando no haya aparentemente un efecto significativo en la reducción de la enfermedad o inoculo, y su impacto nocivo en el ambiente sea mínimo o nulo”. Siendo el control biológico, mediante la aplicación de organismos antagonistas o sus derivados (biocontrol), el que ha adquirido mayor fuerza en el mundo, generándose una amplia variedad de productos nuevos basados en levaduras y otros organismos los cuales han salido al mercado para combatir principalmente hongos fitopatógenos, ya sea en la fruta post-cosecha o en el campo.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de levaduras antárticas como fuentes para el desarrollo de Biocontroladores contra fitopatógenos de importancia en la agricultura chilena. Para esto, una colección de 28 levaduras aisladas e identificadas desde el continente antártico por nuestro grupo de trabajo fueron evaluadas como antagonistas mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, contra 5 fitopatógenos de importancia nacional, la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm) y los hongos filamentosos *Penicillium expansum*(Pe), *Botrytis cinerea* (Bc), *Fusarium oxysporum* (Fo) y

Phytophthora infestans(*Phi*). En ellas podemos encontrar atractivas características para poder usarse en productos biocontroladores en campo y post-cosecha, ya que presentan resistencias a bajas temperaturas, resistencia a escasos de nutrientes y tolerancia a una elevada radiación UV. Del total de levaduras, 16 presentaron actividad antagónica contra *Cmm* siendo *W. anomalus*, *C. sake*, *Cr. gilvescens* y *M. psychrophilia* las especies con mayor actividad. Las levaduras *Le. Creatinivora*, *Sp. salmonicolor*, *G. antarctica* y *M. blollopis* presentaron actividad contra el fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. En todos los casos la actividad antagónica fue observada en extractos proteicos extracelulares, indicativo de que la actividad se debe a factores que son exportados al medio. Se evaluó la actividad a distintos pH y temperaturas y extractos proteicos extracelulares. Para el caso de *Cmm* los extractos ensayados presentaron mayor actividad a pH 5,6, y a temperaturas en el rango de 15 a 30 °C. Pensando en su uso en conjunto con pesticidas de uso común, estrategia conocida como control integral, en donde se disminuye la cantidad de químicos replazándolos por microorganismo o productos biológicos generados por estos, se realizó un estudio de compatibilidad con 14 pesticidas de uso común. Se encontró que las levaduras *W. anomalus* y *C. sake* son sensibles a la mayoría de los compuestos utilizados hoy en la agricultura, mientras que *M. psychrophilia* presentó mayor resistencia.

ABSTRACT

Historically the agriculture has overlooked the sustainability in the agricultural production. The use of chemicals (agro-chemicals) improved the production, but with many adverse effects that impact significantly its sustainability. The pollution originated by the indiscriminate use of agro-chemicals has reduced the biodiversity of "ecosystems", causing instability and increase of pests and diseases in crops. Furthermore, there are hazards in the production and in the applications of agro-chemicals. For these reasons, the researches and establishments of new alternatives for pest and disease management have raised in last years. Due to mentioned above, appears the interest for an ecological control, which is defined as: "any control procedure that reduces the incidence or severity of the disease, or increases the crop production, even when apparently there is no a significant effect in reducing the disease or the inoculum, and there is no or there is minimal harmful impact on the environment". The biological control, which is the application of antagonistic organisms or derivate (biocontrol), has acquired high worldwide force and a wide variety of new products based on yeasts and other organisms appeared in the market, to combat mainly fungal pathogens, either fruit post-harvest or in the field.

The objective of the present study was to evaluate the potential of Antarctic yeasts as a source for the development of biocontrol against pathogens of importance in Chilean agriculture. For this, a collection of 28 yeasts isolated and identified from the Antarctic continent were evaluated as antagonists by *in vivo* and *in vitro* assays against 5 pathogens: the bacterium *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (*Cmm*) and filamentous fungi *Penicillium expansum* (*Pe*), *Botrytis cinerea* (*Bc*), *Fusarium oxysporum* (*Fo*) and *Phytophthora infestans* (*Phi*). In them we find attractive features to be used in biocontrol products in the field and post-harvest, they having low temperature resistance, strength to nutrient shortage and high tolerance to UV radiation. Sixteen yeasts showed antagonistic

effect against *Cmm*, being *W. anomalus*, *C. sake*, *Cr. gilvescens* and *M. psychrophilia* those with major activity. The yeasts *Le. Creatinivora*, *Sp. salmonicolor*, *G. Antarctica* and *M. blollopis* showed activity against *Fusarium oxysporum*. In all cases the antagonist activity was observed in extracellular protein extracts, indicative that the activity is due to exported factors. In the assays with protein extracts performed at different pH and temperatures against *Cmm*, it was observed greater activity at pH 5,6 in the temperatures range from 15 to 30 °C. In the strategy known as integrated control, the biological control is used together pesticides that allow the decrease in the amount of chemical used. Having this in mind, we analyzed the compatibility of yeast with 14 pesticides commonly used. The yeasts *W. anomalus* and *C. sake* were sensitive to most compounds assayed, while *M. psychrophilia* showed high resistance.

1. INTRODUCCION

Factores tales como el crecimiento de la población mundial y campañas que incentivan al consumo de alimentos orgánicos en diversos países han llevado a que la demanda de productos agrícolas presente un crecimiento que supera a su producción. Debido a estos factores, se han generado otro tipo de necesidades respecto a la sustentabilidad de producción, así como también en los aspectos de calidad e inocuidad de los alimentos. En el último tiempo gracias a diferentes trabajos y estudios sobre el manejo agrícola, la calidad y productividad de los cultivos han logrado una gran mejora. Sin embargo uno de los principales obstáculos para alcanzar los objetivos de producción a los cuales se deben enfrentar los agricultores, está representado por los microorganismos fitopatógenos, los cuales son capaces de provocar enormes pérdidas en la agricultura e industria agrícola. Chile ocupa un papel importante a nivel mundial en de la industria frutícola siendo uno de los países con mayor producción y exportación, razón por la cual la rigurosidad del control de enfermedades es un factor muy importante para los agricultores. Los fitopatógenos principalmente corresponden a hongos filamentosos y bacterias, los cuales generan grandes pérdidas en etapas de producción de pre y post-cosecha. A nivel mundial se estima que los patógenos de post-cosecha son los que causan la mayor cantidad de pérdidas, que van de un 1 a un 20% de las pérdidas totales. En Chile se estiman perdidas de un 5%, lo que significa 128.969 toneladas de fruta que se pierden, generando pérdidas por 184.114 US FOB (“Free on Board”). Dependiendo del destino de las exportaciones, los productos deben ser mantenidos en condiciones de refrigeración prolongada, periodo durante el cual son susceptibles a ser atacados por patógenos. La gravedad de la infección dependerá de qué tipo de patógeno sea y en que estadio (pre o post-cosecha) haya atacado, siendo factible que la fruta se vea afectada parcial o incluso totalmente. Dentro de los patógenos más importantes a nivel mundial podemos encontrar a

Magnaporthe oryzae; *Botrytis cinerea*; *Puccinia spp*; *Fusarium graminearum*; *Fusarium oxysporum*; *Mycosphaerella graminicola*; *Colletotrichum spp*; *Ustilago maydis*; *Melampsra lini*, de los cuales 2 son de suma importancia nacional (*Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*) (Dean y cols, 2012).

Para poder hacer frente a todos los problemas mencionados se han utilizado muchos enfoques diferentes para la prevención o control de las enfermedades que afectan a plantas y frutas. Uno de los métodos más utilizados por los agricultores e industrias frutícolas es el control mediante antimicrobianos químicos (Agroquímicos) (Errampalli 2004). El uso y abuso de este tipo de compuestos en la agricultura ha generado efectos nocivos tales como la contaminación ambiental, la reducción de la biodiversidad de los ecosistemas y el desarrollo de cepas fitopatógenas resistentes, razones que han fundado una percepción negativa en la sociedad respecto a su aplicación (Esterio y cols 2011) (Cid. y cols. 2011). Por ello el mercado mundial de frutas y hortalizas cada vez es más riguroso y exige el menor uso de agroquímicos o que estos sean más seguros para la salud humana y medio ambiente. Además existe el problema inherente a los procesos de fabricación, manipulación y aplicación de los plaguicidas químicos, que poseen efectos dañinos para el hombre, por lo cual actualmente existe una estricta regulación sobre su uso y presiones para eliminar los productos químicos más peligrosos del mercado, lo cual ha generado la necesidad de encontrar algún método alternativo para el control de las diferentes enfermedades que afectan a los cultivos hoy en día (Tripathi y Dubey , 2004).

1.1 Metodologías de control actual.

Actualmente tanto en el mercado nacional como internacional la utilización de agroquímicos para el control de enfermedades en los cultivos sigue superando ampliamente

a cualquier tipo de metodología alternativa y amigable con el medio ambiente. Productos químicos basados en cobre y azufre son los más utilizados y los que más daño generan en los ecosistemas, por lo que se han generado grandes esfuerzos para encontrar metodologías de control que no impliquen el manejo de pesticidas químicos. Alternativas usadas actualmente en algunos países y que han dado buenos resultados desde el punto de vista práctico y económico son la utilización de variedades vegetales resistentes, control de las fechas de siembra, la solarización y el acolchado o arropamiento del suelo mediante plásticos degradables, la rotación y asociación de cultivos, la utilización en el suelo de materia orgánica que favorece la actividad antagónica de la biota habitante del suelo, la aplicación de cubiertas epidermales (antitranspirantes) para proteger a los cultivos de algunas enfermedades foliares, y la fitomineraloterapia, (Zavaleta-Mejia 2000). Sin embargo una metodología muy eficiente y la cual se está implementando con grandes resultados es el **biocontrol**, mediante la incorporación a los cultivos de microorganismos que presentan actividad antagónica contra los diferentes fitopatógenos.

1.2 Principales Fitopatógenos.

En Chile la mayor cantidad de enfermedades asociadas a cultivos vegetales están relacionadas con hongos filamentosos fitopatógenos, siendo *B. cinerea* y *P. expansum* los principales, los cuales atacan a diversas variedades de vegetales. Por otro lado enfermedades producidas por bacterias fitopatógenas han sido muy poco estudiadas y las metodologías de control contra ellas son escasas.

1.2.1 *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm): es una bacteria Gram-positiva que reside principalmente en el sistema vascular de las plantas y es considerado uno de los patógenos bacterianos más importantes, ya que sus diferentes

subespecies presentan un amplio rango de hospederos. Entre los cultivos afectados se encuentran la alfalfa, el maíz, la papa y el tomate, siendo este último el de mayor importancia a nivel económico (Bruce y cols 2004). La subespecie michiganensis (*Cmm*), causante del cancro o pudrición del tomate se encuentra bajo las normas internacionales de cuarentena regidas por la legislación de la European Union Plant Health debido a su gran impacto en los cultivos (Holger y cols 1999). La infección por *Cmm* usualmente comienza por una herida en la planta que permite el ingreso del patógeno, luego se establece, se propaga hacia el xilema y en estados llevando finalmente a la marchitez de la planta (Plant Health Directive, European Union 1995). El actual control de la enfermedad está basado en productos antibióticos químicos y compuestos basados en cobre los cuales no han sido muy eficientes y además han generado graves problemas ambientales. Otra alternativa que se ha manejado en la generación de cultivos resistentes de plantas, pero no se ha tenido éxito hasta ahora, por lo cual, hoy en día uno de los métodos más efectivos es la prevención, la cual es posible mediante el uso de semillas certificadas o trasplantes que han sido evaluados seguros de *Cmm* (Wallis 1997; Chang y cols 1991; Mansfeld-Giese 1997).

1.2.2 *Penicillium expansum*: es una de las especies de hongos más comunes en podredumbres post-cosecha en manzanas. Aunque económicamente representa mayores pérdidas en esta fruta, este patógeno se puede aislar desde una amplia gama de hospederos, incluyendo peras, frutillas, tomates, maíz, arroz y cítricos. Este hongo produce patulina que es un metabolito carcinogénico representando un gran problema de salud ya que mucho de los consumidores de manzanas son niños pequeños por lo cual su rápida detección en las cosechas es de gran importancia (Morales 2007).

1.2.3 *Botrytis cinérea*: conocido como mohó gris, es un hongo ascomycete que infecta una gran variedad de plantas, es un necrótrofo típico considerado el más destructivo de tejido maduro (Janisiewicz, 2012). Es capaz de infectar en diversas etapas los cultivos, pre y post-cosecha, ya que se puede mantener inactivo durante un tiempo considerable, antes de la descomposición de los tejidos, cuando la fisiología del hospedero cambia y el ambiente es favorable (van Baarlen y cols. 2007). Los costos de los daños asociados a *Botrytis* son muy difíciles de estimar debido a la amplia gama de hospederos que presenta. A pesar de los intentos de utilizar controladores biológicos en los diferentes cultivos, los fungicidas químicos siguen siendo la manera más común de atacar a *Botrytis* (Williamson y cols. 2007). En el mercado de los agroquímicos el 10% de los productos en el mundo están dirigidos contra este hongo y de ese porcentaje el 50% se utiliza en la industria vitivinícola (Moser y cols. 2008).

1.2.4 *Fusarium oxysporum*: es un hongo que es posible de encontrar ubicuamente en el suelo. Fue descubierto en plátanos pero hoy en día se sabe que es capaz de infectar a más de 100 tipos diferentes de plantas. Las más importantes y en las que causa mayores pérdidas económicas son el tomate, melón, algodón y el ya mencionado plátano (Michiels y Rep 2009). Este hongo entra al hospedero mediante heridas, logrando colonizar los conductos xilemáticos de la planta generando el marchitamiento de hojas y eventualmente a la muerte total de la planta (Agrios 2005). Actualmente para el control de este patógeno se han propuesto métodos de lucha biológica con microorganismos antagonistas o el uso de suelos supervisados, sin embargo lo que más se usa es la selección de variedades resistentes o tolerantes y la desinfección del suelo con bromuro de metilo en altas dosis. (Arvieva 1987) Otra técnica que ha surgido es la solarización, con la cual se ha visto mejores en

rendimientos y resistencia de los cultivos (Katan y cols. 1976). Sin embargo a pesar de todo esto continua la búsqueda de una metodología de control rápida y segura.

1.2.5 *Phytophthora infestans*: es un hongo patógeno de plantas perteneciente a la clase Oomicetes, conocido por producir la enfermedad conocida como tizón tardío o podredumbre de papa. Además de la papa es capaz de infectar al tomate y otras solanáceas, causando grandes pérdidas en los cultivos, de hecho fue el responsable de la gran hambruna de Irlanda entre 1845 a 1849. Las esporas de este patógeno son capaces de hibernar en los tubérculos infectados, especialmente en los que quedan en los suelos de cosechas anteriores y se propagan rápidamente en condiciones cálidas y húmedas lo cual genera pérdidas de cultivos enteros (Koepsell y Pscheidt. 1994). Los síntomas incluyen la aparición de manchas oscuras en las hojas y tallos de plantas, aparecieron de un polvo blanco debajo de las hojas en condiciones de humedad. Los tubérculos infectados desarrollan manchas de color gris o negro, rápidamente se pudren por una infección bacteriana secundaria y producen muy mal olor. Los tratamientos contra este Oomicete no son muchos y el principal es la prevención mediante la utilización de semillas certificadas, cuidados del suelo mediante limpiezas exhaustivas para asegurar la calidad de este y como último paso el uso de fungicidas pero de uso preventivo (Monteiro y cols. 2005).

1.3 Biocontroladores.

Los controladores biológicos o biocontroladores se han convertido en el último tiempo una real alternativa al uso de agroquímicos (Yu y cols. 2012). El uso durante los diferentes procesos productivos de variados microorganismos o compuestos biológicos que poseen actividad antagónica contra los microorganismos fitopatógenos tiene la gran ventaja

de ser inocuo tanto para la persona que lo administra como para el consumo humano, además de ser compatible para el medio ambiente, por lo cual actualmente existe un interés creciente en la búsqueda y desarrollo de nuevos y más eficientes biocontroladores. Un tipo de microorganismo que presenta propiedades atractivas para ser utilizado como un controlador biológico son las levaduras. Estos hongos unicelulares han sido utilizados por el hombre por mucho tiempo, siendo hoy en día uno de los microorganismos más utilizados a nivel industrial. Las levaduras juegan un rol preponderante en la producción de metabolitos abarcando diferentes sectores como la alimentación y bebidas alcohólicas, químico y farmacéutico, producción de enzimas industriales, la agricultura y también en el tratamiento y remediación del medio ambiente. Una de las grandes ventajas de las levaduras es que varias especies han sido denominadas como “General Regarded As Safe” (GRAS) lo que promueve aún más su utilización a gran escala, además que muchas metodologías para su producción a nivel industrial están bien establecidas y optimizadas (Gerrero y Berlanga 2013).

Actualmente se han reportado estudios que demuestran gran actividad antagónica de algunas especies de levaduras contra hongos fitopatógenos, además del potencial que presentan para poder ser aplicadas como microorganismos controladores, ya sea en cultivos post-cosecha o en campo (Cook y cols. 1999). Esto último debido a la capacidad de las levaduras para colonizar la superficie de los frutos y heridas en ellos, logrando persistir a niveles efectivos que les permiten competir con el patógeno por espacio y nutrientes. Otra característica favorable para su utilización como antagonista es la tolerancia que poseen frente a fungicidas usados en post-cosecha, lo cual ha permitido su uso en forma integrada en el biocontrol de algunos patógenos, donde se bajan las dosis del producto químicos y se aplica en combinación con las levaduras (Pimenta y cols. 2009). En el mercado

internacional existen varios productos basados en microorganismos, incluyendo a varias especies de levaduras para su utilización como antagonistas en el control de enfermedades (Vargas y cols. 2012). A pesar de esto la mayoría de los productos que se han desarrollado para combatir enfermedades están relacionados con hongos filamentosos, siendo muy poco estudiado el biocontrol de enfermedades bacterianas que afectan a cultivos en el campo. La aplicación de los antagonistas puede ser realizado antes o después de la cosecha, pero las aplicaciones de levaduras y otros microorganismos post-cosecha han demostrado ser más eficientes. Por otra parte si bien una levadura puede ejercer un efecto antagónico contra un fitopatógeno, se ha observado que la aplicación de una combinación de tratamientos tiene mayor efecto. La aplicación de cultivos mixtos de cepas y la combinación con pequeñas dosis de pesticidas químicos, aditivos salinos o tratamientos físicos, poseen un mejor control de enfermedades post-cosecha, que cada tipo de tratamiento por separado (control integrado). Un ejemplo de esto es la utilización de quitinosa en combinación con *Cryptococcus laurentii* resulta en un control más efectivo de *Penicillium expansum* en peras, que cada uno por separado (Janisiewicz y Conway S.2010). En el caso de kiwis almacenados, el uso de levaduras para el control microbiológico y la inducción de la resistencia del huésped por incubación a 10°C con alta humedad, mostraron un efecto aditivo en la reducción de la pudrición (El-Tarabily y Sivasthamparam 2006). Es por todo lo mencionado anteriormente que existe consenso en que en el futuro los tratamientos para control de enfermedades se basarán en la combinación de varios tratamientos de control biológico.

Las levaduras pueden ejercer su actividad antagónica gracias a variados mecanismos, como la secreción de toxinas proteicas letales llamadas “toxinas killer” (micotoxinas), la producción de sideroforos que limitan la utilización de hierro por otros microorganismos,

mediante antibiosis, secreción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de hongos y/o de compuesto volátiles tóxicos (Walker y cols. 1995 Masih y cols. 2001; (MacKenzie 1981; Carrasco y cols. 2012). Sin embargo, el mecanismo más común es el desplazamiento de otros microorganismos mediante la competencia por alimento y espacio, ya que las levaduras pueden desarrollarse rápidamente en la superficie de hojas, frutos y flores, y en especial en medios que presenten una variada composición de azúcares, llegando de esta forma a dominar estos hábitats.

Un grupo de levaduras que presentan atractivas características para ser usadas como biocontroladores son las Levaduras Antárticas. Además de las ya mencionadas características que presentan las levaduras en general para ejercer un efecto antagónico frente a los fitopatógenos, las levaduras aisladas desde climas tan inhóspitos como la región sub-antártica presentan una serie de adaptaciones diferentes a las encontradas en climas mesófilos. Ellas tienen la particularidad de desarrollarse en variadas condiciones ambientales como escases de nutrientes, temperatura, elevada radiación UV por lo cual su acción biocontroladora podría usarse tanto en productos para el campo como en los de post-cosecha.

En el presente trabajo se analizó el potencial de las levaduras antárticas para inhibir el crecimiento de algunos fitopatógenos importantes de interés nacional y/o internacional. La colección de levaduras fue aislada desde la Isla Rey Jorge en la región sub-antártica, todas ellas han sido identificadas molecularmente (18 especies distintas pertenecientes a 13 géneros, más otras aun no clasificadas) y caracterizadas en relación a la producción de antimicrobianos, temperaturas de crecimiento, utilización de diversas fuentes de carbono y actividades enzimáticas extracelulares. Resultados previos han mostrado actividad antagónica de estas levaduras sobre otras levaduras y bacterias gram positivas y negativas,

lo que hace a este grupo de levaduras muy atractivas para otro tipo de ensayos de antagonismo (Baeza y cols. 2010).

En el presente trabajo se realizó la búsqueda de una nueva alternativa de control contra la bacteria fitopatógena del tomate *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* además de los 4 hongos filamentosos fitopatógenos como *P. expansum*, *B. cinerea*, además de *F. oxysporum* y *Ph. infestans* dos patógenos, los cuales en el último tiempo han causado grandes problemas a la agricultura del país.

2. HIPOTESIS



“Una o varias especies de levaduras antárticas de nuestra colección poseerán un efecto antagónico contra fitopatógenos bacterianos y/o fúngicos importantes del sector agrícola nacional”.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Encontrar levaduras antárticas de nuestra colección que posean actividad antagónica contra fitopatógenos y evaluar su potencial uso como biocontrolador.

3.2 Objetivos Específicos.

1. Optimización de condiciones de cultivo de los diferentes patógenos a analizar.
2. Determinar el efecto antagónico de levaduras antárticas contra fitopatógenos mediante ensayos de confrontación en placa.
3. Extracción de las proteínas extracelulares totales desde cultivos de cepas de levaduras antárticas antagónicas y evaluación de su actividad antifúngica.
4. Determinación del pH y temperatura óptima de acción antagónica de los extractos proteicos.
5. Evaluación de la sensibilidad de las levaduras antárticas con actividad antagónica frente a diferentes productos y dosis de pesticidas.

4. MATERIALES Y METODO

4.1 MATERIALES

4.1.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.

Las levaduras a ensayar (Tabla 1) fueron aisladas y caracterizadas de muestras obtenidas de la Isla Rey Jorge del territorio Antártico Chileno, por nuestro grupo de trabajo (Baeza, M. y cols. 2010) en el Laboratorio de Genética de la Universidad de Chile. Estas fueron crecidas en medio YM (0,3% de Extracto de levadura, 0.3 % de Extracto de Malta, 0,5% de Peptona), suplementado con 2% de glucosa.

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis fue crecida en medio LB (1 % de Triptona, 0,5 % de Extracto de levadura y 0,5 % de NaCl). Para los medios semisólidos se agregó Agar al 1,5 % p/v. *Penicillium expansum* fue crecido en medio Agar Malta Glucosa (1% Extracto de Malta y 1% de Glucosa), *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* fueron crecidas en medio PDA (Papa dextrosa agar) y *Phytophthora infestans* fue crecida en medio Agar Malta (1% de Extracto de Malta) . Además cada uno de los patógenos fue crecido en medio YM (Yeast Medium) y PDA (Papa dextrosa agar, Difco) (Tabla 2).

4.1.2 Reactivos químicos.

Los diferentes reactivos para la preparación de los medios de cultivo y obtención de los extractos proteicos fueron obtenidos en Merck y Difco Laboratorios. Los diferentes pesticidas para los ensayos de compatibilidad fueron facilitados por la empresa Biopacific Ltda. y Los pesticidas fueron preparados a las concentraciones indicadas en la Tabla 3.

Tabla 1. Levaduras antárticas.

Levaduras antárticas	
Temperatura óptima de crecimiento	Cepa
30°C	<i>W. anomalus</i>
	<i>R. musilaginosa</i>
	<i>C. parapsilosis</i>
22°C	<i>Le. cratinivora</i>
	<i>C. sake</i>
	<i>D. fristingensis</i>
	<i>Le. fragaria</i>
	<i>G. antarctica</i>
	<i>C. davisiana</i>
	<i>Sp. salmonicolor</i>
	<i>Rh. laryngis</i>
	<i>Cr. victoriae</i>
	<i>Cr. Gilvescens</i>
	<i>H. waticus</i>
15°C	<i>Criptococus Sp.</i>
	<i>Diosegia sp.</i>
	<i>Rh. Glacialis (T8Rg)</i>
	<i>C. davisiana</i>
	<i>M. robertii</i>
	<i>Rh. Glacialis (T11Rs)</i>
	<i>Mrakia sp1.</i>
<i>M. gelida</i>	
10°C	<i>M. blollopis</i>
	<i>M. bicuspidata</i>
	<i>M. psychrophilia</i>
	<i>Rhodotorula sp.</i>
	<i>Rhodotorula sp 2.</i>
	<i>Levadura sp</i>

En la tabla se ordenan las 28 levaduras utilizadas para realizar los ensayos de confrontación en placa contra los diferentes fitopatógenos seleccionados. Cada una de las levaduras está agrupada por su temperatura óptima de crecimiento, determinada previamente por nuestro grupo de trabajo.

Tabla 2. Fitopatógenos.

Fitopatógenos		
Cepa	Tipo	Hospedero
<i>Claviacter michiganensis subsp michiganensis.</i>	Bacteria	Tomate
<i>Penicillum expansum</i>	Hongo filamentoso	Cítricos
<i>Botritis cinerea</i>	Hongo filamentoso	Vid
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hongo filamentoso	Bananeros
<i>Phytophthora infestans</i>	Hongo filamentoso	Papa

La bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm) fue obtenida por la empresa Biopacific Ltda. desde tomates infectados. Los hongos filamentosos *Penicillum expansum* (P.e), *Botritis cinérea* (B.c), *Fusarium oxysporum* (F.o) y *Phytophthora infestans* (P.i) fueron adquiridas de la colección CBS (Central bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands).

Tabla 3. Pesticidas.

Fungicida	Dosis de Campo (g o cc/100L)	Laboratorio (ul)		
		Mínima	Recomendada	Máxima
Polyben	240	24	50	100
Dodine	80	24	50	100
Oxi cup	500	10	50	100
Rodomil gold	250	20	50	100
Phaltan 75	320	12	32	50
Metalaxil Cu	300	20	30	100
Azufre mojable	40	20	50	100
Pomarsol forte	250	20	25	50
Captan	400	20	40	100
Fungi cup	500	20	50	100
Bumper 25%	45	10	50	100
Mancozeb	240	18	24	50
Rubigan	35	25	50	100
Previcur	300	25	50	100

En la tabla se muestran las diferentes concentraciones a las cuales los pesticidas son preparados y agregados en el campo. Además se informa las tres concentraciones a las cuales se trabajo con los pesticidas en los ensayos, concentraciones de laboratorio Mínima, Máxima y Recomendada en campo.

4.2 METODOS

4.2.1 Optimización de condiciones de cultivo de los patógenos a analizar.

Previo a la realización de los ensayos de actividad antagónica en placa se optimizaron los medios y condiciones de cultivo de cada patógeno a analizar, para hacerlos compatibles con las levaduras antárticas de modo de permitir un crecimiento conjunto en la placa. Para el caso de la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* se determinó su crecimiento a diferentes concentraciones de glucosa (0,1 a 2%). Para el caso de los hongos filamentosos fitopatógenos se comprobó su viabilidad de crecimiento en medios YM (Yeast médium) y PDA (Papa dextrosa Agar). Se determinó el crecimiento a diferentes temperaturas (10 a 30 °C), en medios semisólidos.

4.2.2 Ensayos de confrontación en placa.

Los ensayos de actividad antibacteriana se realizaron según la metodología descrita por Baeza y cols. (2010). Se confeccionó un césped del microorganismo patógeno “blanco”, mezclando 25 ml de medio YM 0,5 % de glucosa, azul de metileno al 0,3 % (colorante vital) y 2,5 ml de cultivo celular. Una vez gelificado, las diferentes levaduras antárticas se sembraron sobre el césped y se incubaron a diferentes temperaturas. Para el caso de hongos filamentosos, el ensayo se realizó según la metodología descrita por Sirioinvisal (2010), esta consiste en sembrar en una misma placa el hongo blanco y la levadura a ensayar, posteriormente se incubó a 15, 22 y 30°C después de lo cual la actividad positiva se ve observando la inhibición de crecimiento del hongo en la placa. Cada uno de los ensayos descritos se realizó por lo menos tres veces para comprobar la legitimidad de los resultados obtenidos.

4.2.3 Extracción de proteínas extracelulares totales.

Se realizó la extracción de proteínas extracelulares totales según una metodología adaptada desde Baeza y cols. (2010). Cultivos de 500 ml de levaduras antárticas en medio YM se centrifugaron a 7.000 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se filtró con filtros de 0,45 mm de diámetro de poro (Millipore), se adicionó etanol hasta alcanzar una concentración final de 75 % y se incubó por 2 horas a 4°C. Se centrifugó a 8.000 g por 10 minutos, se eliminó el exceso de etanol y el pellet se suspendió en 1 ml de agua destilada.

4.2.4 Análisis de actividad antimicrobiana de extractos proteicos.

Se confeccionaron céspedes como se describe en la sección 4.2.2, se cortaron pocillos en ellos, se adicionó 100 a 150 ul de los diferentes extractos proteicos obtenidos según la metodología descrita en la sección 4.2.3 y se incubó por 24 horas a 10, 15, 22 y 30°C. Para los hongos filamentosos se sembró cada patógeno sobre la superficie de un medio semisólido YM y se cortaron los pocillos sobre este, posteriormente se agregó 100 ul del extracto proteico obtenidos según como se describe en la sección 4.2.3. Los ensayos se realizaron a diferentes pH (5,6 a 6,6) y temperaturas las que variaron de 15 a 30°C. Las placas con diferente pH fueron preparadas con solución tampón fosfato según Sambrook y Russell (2001). Cada uno de los ensayos se realizó tres veces para legitimar el resultado obtenido.



4.2.5 Sensibilidad de las levaduras antárticas con actividad antagónica frente a pesticidas de uso común.

Se confeccionaron césped de las diferentes levaduras antárticas que presentaron actividad positiva frente al fitopatógeno del tomate *Clavibacter michiganensis sub. michiganensis* y se realizaron pocillos en el como se mencionó anteriormente en la sección 4.2.2. Se preparó una solución inicial de pesticidas con las concentraciones señaladas en la Tabla 3. Las dosis fueron: dosis recomendada en campo, dosis mínima recomendada en campo y dosis máxima recomendada en campo. Se agregaron 100 a 150 ul de los diferentes pesticidas en los pocillos y se incubaron a la temperatura óptima de la levadura antártica ensayada. Cada ensayo fue realizado tres veces para legitimar el resultado obtenido.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de las condiciones de cultivo adecuadas para los ensayos de confrontación.

Debido a que las diferentes condiciones de crecimiento de las levaduras antárticas, las que son psicófilas y psicotolerantes, y de los fitopatógenos que fueron aislados desde ambiente templados (mesófilos), fue necesario determinar las condiciones en que ambos crecieran bien. Para la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* se varió el porcentaje de glucosa del medio YM, encontrando un buen crecimiento a 0,5% de glucosa, y en un amplio rango de temperatura (10, 15, 22 y 30°C).

En el caso de los hongos filamentosos la determinación de la viabilidad en medios semisólidos YM y PDA fue positiva, los cuatro hongos crecieron en ambos medios a temperaturas de 10, 15, y 22°C.

5.2 Análisis de actividad antimicrobiana *in vivo*.

Se realizó el análisis de actividad antibacteriana contra *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm), según lo explicado en la metodología descrita en la sección 4.2.2. Se ensayaron 28 cepas de levadura antárticas a cuatro temperaturas diferentes (10,15,22 y 30°C), (Figura 1, Tabla 4 y Anexo 1). El resultado positivo de actividad antagónica es posible observarlo gracias a la utilización del azul de metileno (colorante vital), el cual ingresa a las células cuando estas se encuentran permeables (muertas). Una vez dentro el compuesto precipita y se torna de un color azul oscuro (cambio de ph), generando en el ensayo halos de color azul al rededor de la colonia sembrada si es que el efecto es de muerte o halos transparentes si es de inhibición de crecimiento. En el ensayo observaron cepas con actividad antagónica en las cuatro temperaturas ensayadas, con diferentes diámetros de halo de muerte. Las cepas positivas fueron: *W. anomalus*, *R.*

mucilaginosa y *C. parapsilosis* para las levaduras ensayadas con temperatura óptima de crecimiento a 30°C. *Le. Creatinivira*, *C. sake*, *D. frisingensis*, *Le. fragaria*, *G. antartica* para las levaduras ensayadas con temperatura optima de crecimiento a 22°C. *Diosegia sp.*, *C. davisiana*, *M.robertii* para las levaduras con temperatura óptima de crecimiento a 15°C. *M. psychrophilia*, *Rhodotorula sp.*, *Rhodotorula sp2.*, *Levadura sp.* para las levaduras con temperatura optima de crecimiento a 10°C. Cada ensayo de actividad antibacteriana fue realizado 3 veces para legitimar el resultado positivo. En el caso de los hongos filamentosos donde la actividad antimicrobiana se ve producto de la formación de una medialuna en la paca generada por el hongo, solo la levadura *Rhodotorula sp.* presentó actividad positiva contra *P. expansum* y *B. cinerea* (Figura 2 y Figura 3, Tabla 4), no encontrando ninguna cepa antártica positiva para los otros dos hongos filamentosos ensayados, *F. oxysporum* y *P. infestans*. Anexo 4 y 5. En este caso cada ensayo fue realizado 2 veces variando los tiempos de incubación y el orden al sembrar las cepas ensayadas, así descartamos un efecto negativo producto del rápido crecimiento de los hongos filamentosos.

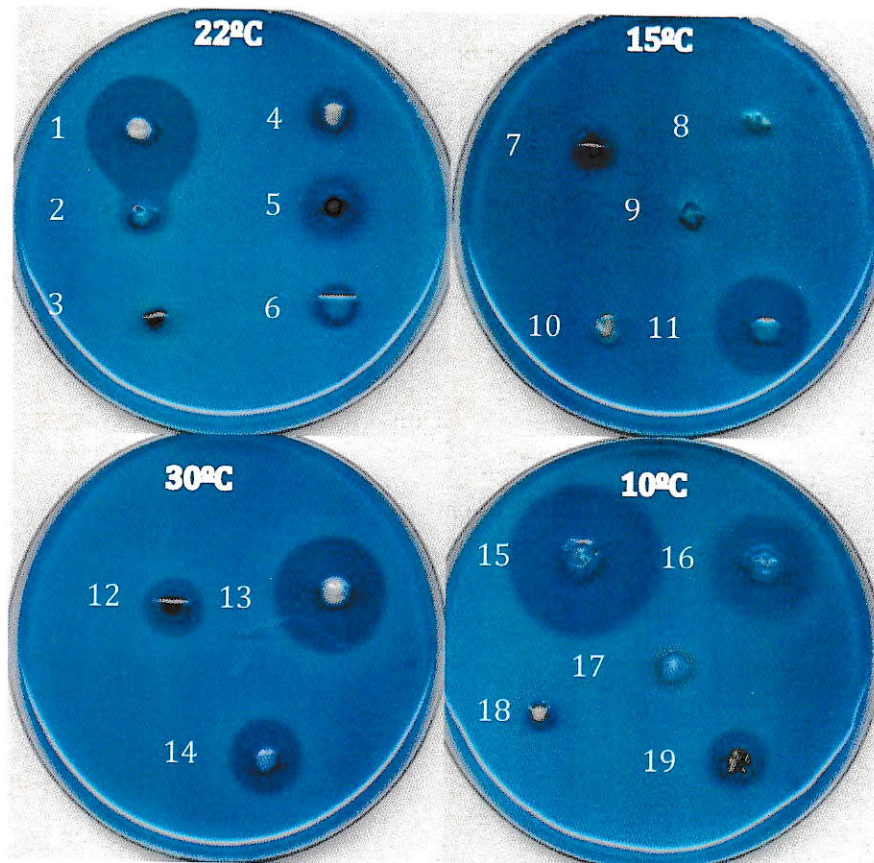


Figura 1: Ensayos *in vivo* de aislados antárticos contra el fitopatógeno de tomate *Clavivacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. 1: *C. sake*; 2: *G. antarctica*; 3: *Rh. laryngis*; 4: *Le. creatinovora*; 5: *D. fristingensis*; 6: *Le. fragaria*; 7: *Sp. salmonicolor*; 8: *C. davisiana*; 9: *Cr. victoriae*; 10: *H. waticus*; 11: *Cr. gilvescens*; 12: *Rh. Musilaginosa*; 13: *W. anomalus*; 14: *C. parapilopsis*; 15: *M. psychrophilia*; 16: *Levadura sp.*; 17: *M. bicuspidata*; 18: *Rhodothorula sp.*; 19: *Rhodothorula sp2*. El ensayo fue realizado a 4 temperaturas diferentes, 10,15,22 y 30°C según la temperatura óptima de crecimiento de las levaduras antárticas, como lo indica la sección 4.2.2. Este, fue repetido tres veces para legitimar los resultados positivos y se midió con una regla el radio del halo de muerte desde el borde de la colonia al termino del halo, en la tabla 4 se reporto el máximo halo encontrado. En la figura se pueden observar las cuatro cepas seleccionadas con mayor actividad antagonica frente el fitopatógeno (1,11, 13 y 15).

Tabla 4. Resumen actividad *in vivo* de aislados antárticos.

T°	Cepa	Actividad sobre (mm de halo)			
		10°C	15°C	22°C	30°C
30°C	<i>W. anomalus</i>	Cmm (6,6±0,5)	Cmm (7,3±0,5)	Cmm (8±0)	Cmm (8±1)
	<i>R. musilaginosa</i>	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (3,3±0,5)	Cmm (4,3±0,5)	Cmm (3±0)
	<i>C. parapsilosis</i>	Cmm (3,6±0,5)	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (4±0)	Cmm (4±1)
22°C	<i>Le. cratinivora</i>	Cmm (2±1)	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (4±1)
	<i>C. sake</i>	Cmm (8±0)	Cmm (7,3±0,5)	Cmm (9,3±0,5)	Cmm (8±1)
	<i>D. fristingensis</i>	Cmm (2,6±0,5)	Cmm (2,6±0,5)	Cmm (2±0)	Cmm (1,6±0,5)
	<i>Le. fragaria</i>	Cmm (1±0)	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (2,6±0,5)
	<i>G. antarica</i>	Cmm (1±1)	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (2±0)	Cmm (2,6±0,5)
	<i>C. davisiana</i>	-	-	-	-
	<i>Sp. salmonicolor</i>	-	-	-	-
	<i>Rh. laryngis</i>	-	-	-	-
	<i>Cr. victoriae</i>	-	-	-	-
	<i>Cr. Gilvescens</i>	Cmm (6±0)	Cmm (5,6±0,5)	Cmm (6±1)	Cmm (7,3±0,5)
15°C	<i>H. waticus</i>	-	-	-	-
	<i>Criptococcus Sp.</i>	-	-	-	-
	<i>Diosegia sp.</i>	Cmm (3,6±0,5)	Cmm (3±1)	Cmm (3±0)	Cmm (1,6±0,5)
	<i>Rh. Glacialis (T8Rg)</i>	-	-	-	-
	<i>C. davisiana</i>	Cmm (2,6±0,5)	Cmm (2,6±0,5)	Cmm (3,6±0,5)	Cmm (2,6±0,5)
	<i>M. robertii</i>	Cmm (2,6±0,5)	Cmm (4±0)	Cmm (4±0)	Cmm (2,6±0,5)
	<i>Rh. Glacialis (T11Rs)</i>	-	-	-	-
	<i>Mrakia sp1.</i>	-	-	-	-
	<i>M. gelida</i>	-	-	-	-
	<i>M. blollopis</i>	-	-	-	-
10°C	<i>M. bicuspidata</i>	-	-	-	-
	<i>M. psychrophilia</i>	Cmm (19,6±0,5)	Cmm (9,6±0,5)	Cmm (10±0)	Cmm (12,6±0,5)
	<i>Rhodotorula sp.</i>	Cmm (2,6±0,5); B.c	Cmm (1,6±0,5); P.e; B.c	Cmm (2±0); P.e; B.c	Cmm (1,6±0,5)
	<i>Rhodotorula sp 2.</i>	Cmm (1,6±0,5)	Cmm (1±0)	Cmm (2,6±0,5)	Cmm (3,6±0,5)
	<i>Levadura sp</i>	Cmm (5,6±0,5)	Cmm (3,6±0,5)	Cmm (4,6±0,5)	Cmm (4,6±0,5)

Tabla resumen con las actividades *in vivo* de todas las levaduras antárticas de la colección contra los cinco fitopatógenos ensayados. Cmm: *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*; P.e: *Penicillium expansum*; B.c: *Botritis cinérea*. En paréntesis se indican los promedios en milímetros y la desviación estandar de los halo de muerte generados por cada levadura.

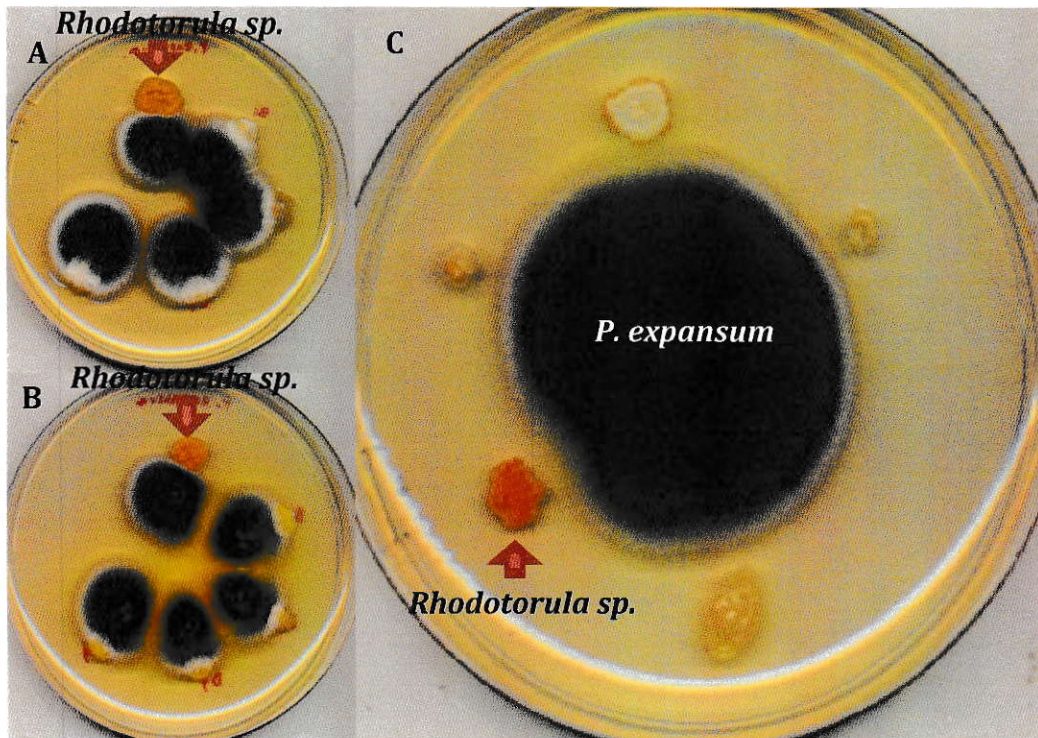


Figura 2: Ensayo *in vivo* de aislados antárticos contra el patógeno de cítricos *P. expansum*. En la figura se logra observar una leve actividad de la levadura *Rhodotorula sp.* sobre el hongo filamentoso fitopatógeno de los cítricos *P. Expansum*, donde la levadura no permite el crecimiento del hongo sobre ella como en los otros casos y se forma una pequeña medialuna al borde del hongo. Cada ensayo fue realizado 2 veces, variando el tiempo de incubación y el orden al sembrar las cepas a ensayar, a cuatro temperaturas diferentes 10,15,22 y 30°C. **A:** Ensayo realizados 15°C. **B y C:** Ensayo realizado a 22°C.

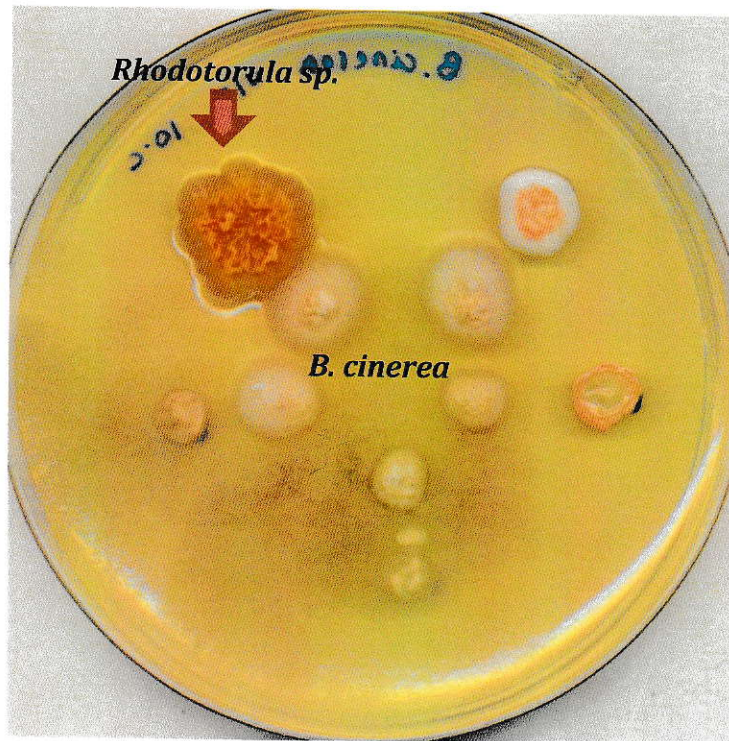


Figura 3: Ensayo in vivo de aislados antárticos contra el patógeno de vid *B. cinerea*. En la figura se observa el ensayo de confrontación en placa del hongo fitopatógeno de la vid *B. Cinérea* realizado a 10°C. Se logró observar que solo la levadura señalada con una flecha roja, *Rhodotorula sp.*, presenta una leve actividad contra el hongo ya que no permite el crecimiento de este sobre la colonia.

5.3 Extracción y análisis de proteínas extracelulares totales.

De las 16 cepas positivas encontradas en el ensayo en placa contra la bacteria fitopatógena del tomate *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*, se eligieron las que presentaron el mayor halo de muerte para realizar los siguientes experimentos. Las cepas seleccionadas y sus temperaturas óptimas de crecimiento fueron: *W. anómalus* (30°C), *C. sake* (22°C), *Cr. gilvescens* (22°) y *M. psychrophilia* (10°C). Desde cultivos líquidos de las 4 levaduras mencionadas anteriormente se realizó la extracción de las proteínas extracelulares totales según la metodología descrita en la sección 4.2.3 y se determinó su actividad antagónica en placa según la metodología descrita en la sección 4.2.4. Se obtuvieron resultados acordes con los obtenidos *in vivo*, ya que todos los extractos proteicos obtenidos de las cepas positivas en placa presentaron actividad antagónica contra el fitopatógeno. En algunos casos la actividad fue mucho mayor en el extracto proteico en comparación con el ensayo *in vivo* (Figura 4). La actividad fue medida a diferentes temperaturas (15,22 y 30°C) y pH (5,6-6,6 compatibles con el crecimiento del fitopatógeno Tabla 5). Los diferentes extractos presentan mayor actividad a pH 5,6 en los cuatro casos, mientras que no se observaron grandes diferencias en los halos de muerte a las diferentes temperaturas ensayadas (Tabla 6).

Como se mencionó, la mayoría de las levaduras no presentaron actividad contra hongos filamentosos, no obstante esto se podría deber a que estos últimos poseen un crecimiento más rápido lo cual podría influenciar los resultados. Por ello se ensayó la actividad de extractos extracelulares de una levadura antártica por genero de nuestra

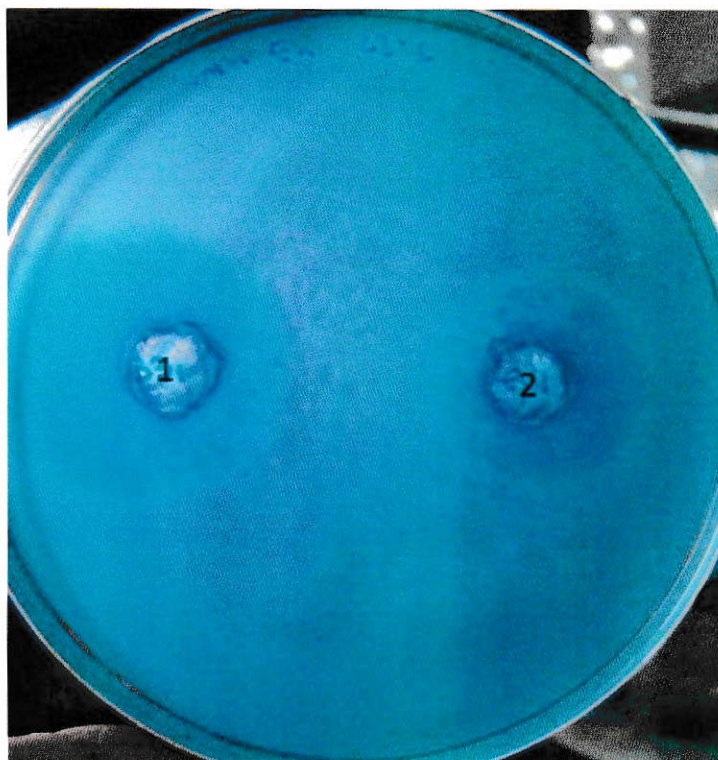


Figura 4: Ensayo in vitro de extractos proteicos seleccionados a 22°C. 1: *C. sake*; 2: *Cr. Gilvescens*. En la foto se observa los halos generados por las levaduras *C. Sake* y *Cr. gilvescens* sobre el fitopatógeno de tomate *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*. Este ensayo fue realizado según la metodología descrita en la sección 4.2.2 a 22°C, la temperatura óptima de las dos levadura antárticas mencionadas. Los diferentes extractos proteicos totales fueron obtenidos desde cultivos líquidos de las levaduras antárticas según al metodología descrita en la sección 4.2.3.

Tabla 5. Rango de pH y temperatura de crecimiento de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*.

<i>Clavibacter michiganensis subsp michiganensis</i>		
pH	22°C	30°C
4,4	-	-
5	-	-
5,6	++	++
6	+	++
6,6	+	+
7	-	-

Con un signo + se indica el crecimiento de la bacteria en los diferentes medios ensayados.

Tabla 6. Ensayo de actividad *in vitro* de los extractos proteicos seleccionados a diferentes T° y pH.

Halo de muerte (mm) sobre <i>Clavibacter michiganensis subsp michiganensis</i>												
	Extracto proteico <i>C. sake</i>			Extracto proteico <i>W. anomalus</i>			Extracto proteico <i>Cr. Gilvescens</i>			Extracto proteico <i>M. psychrophilia</i>		
Temperatura	15°C	22°C	30°C	15°C	22°C	30°C	15°C	22°C	30°C	15°C	22°C	30°C
pH												
5,6	8±0	9,6±0,5	9±0	6,6±0,5	9±1	12,6±0,5	5,6±0,5	8±0	7±0	10±0	7,6±0,5	8±0
6	6,6±0,5	8,6±0,5	7,6±0,5	7±0	7±0	7,6±0,5	5,6±0,5	7±0	7±0	8,6±0,5	7±0	7±0
6,6	5,6±0,5	6,6±0,5	6,6±0,5	6,6±0,5	6,6±0,5	7±0	4,6±0,5	5,6±0,5	6±0	9±0	7,6±0,5	7±0

En la tabla se muestra el promedio y la desviación estándar en milímetro de los halos generados por los extractos proteicos de las levaduras antárticas seleccionadas.



colección (Tabla 7). Los ensayos se realizaron a 22 y 30° C, donde ninguna de las levaduras presentó actividad contra los hongos *P. expansum*, *B. cinerea* y *P. infetans*. En el caso del hongo *F. oxysporum* las levaduras que presentaron actividad fueron, *Le. Creatinivora B4*, *Le. Creatinivora B31*, *Sp. salmonicolor*, *G. antartica* y *M. blollopis* (Tabla 7, Figura 5), los ensayos para cada una de las levaduras antárticas seleccionadas se repitió tres veces para legitimar los resultados obtenidos.

Tabla 7. Ensayo de actividad antifúngica de los extractos proteicos realizados a 22 y 30°C, contra los fitopatógenos *P. expansum*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *P. infestans*.

Cepas	Actividad antifúngica extrato							
	<i>P. expansum</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>F. oxysporum</i>		<i>P. infestans</i>	
	22°C	30°C	22°C	30°C	22°C	30°C	22°C	30°C
<i>D. fristingensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mrakia sp1.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rh. musilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Le. Creatnivora B4.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Le. Creatnivora B31</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>W. anomalus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sp. Salmonicolor</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>H. wuatticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sake</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. antarctica</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Cr. gastricos</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. blollopis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-

Con un signo + se indica el resultado positivo de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos proteicos de las levaduras seleccionadas. Cada uno de los ensayos fue realizado 2 veces para legitimar los resultados.

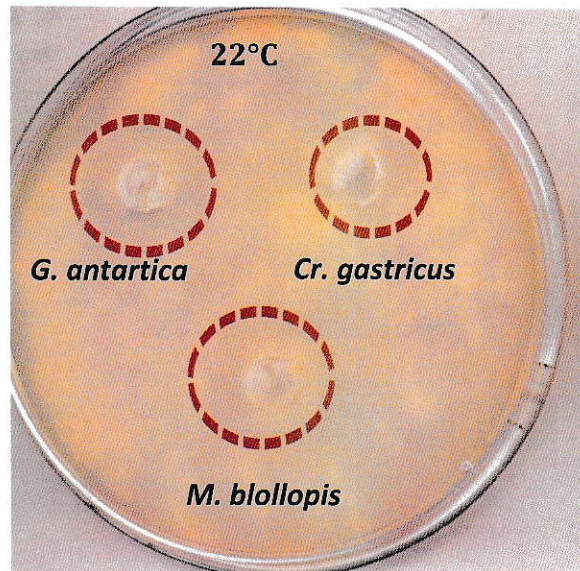


Figura 5: Ensayo *in vitro* de extractos proteicos de aislados antárticos contra el fitopatógeno de bananero *F. oxysporum*. En la foto se observan los resultados positivos del ensayo *in vitro* donde se puede observar marcados con una línea punteada roja los halos generados por los extractos proteicos de las levaduras *G. Antartica*, *Cr. gastricus* y *M. blollopis* sobre el fitopatógeno de bananero *F. oxysporum*

5.4. Sensibilidad de levaduras frente a pesticidas de uso común.

En la agricultura la utilización del control integrado para combatir patógenos es una gran ventaja frente a los métodos tradicionales donde el uso de químicos es el que predomina. Este tipo de control hace referencia a la utilización de combinaciones de microorganismos con químicos u otro tipo de compuestos que disminuyan la dosis de los pesticidas utilizados normalmente. Pensando en este tipo de estrategia, se evaluó la sensibilidad de las levaduras frente a pesticidas basados en cobre y azufre usualmente utilizados en el campo. Para los ensayos se confeccionaron céspedes de las levaduras utilizando la misma metodología descrita en la sección 4.2.2, en ellos se realizaron pocillos, en los cuales se adicionó 100 μ l de los diferentes pesticidas a variadas concentraciones. Posteriormente se incubó a la temperatura óptima de crecimiento de la levadura antártica ensayada hasta observar el crecimiento del césped. Para *W. Anomalus* (30°C) y *C. sake* (22°C) la mayoría de los químicos agregados presentaron un efecto negativo a todas las concentraciones administradas. En el caso de las *Cr. Gilvences* (22°C) y *M. psychrophilia* (10°C) se vio mayor resistencia a las diferentes concentraciones ensayadas siendo la levadura *M. psychrophilia* la con mayor resistencia, ya que solo los pesticidas Mancozeb y Azufre mojable tenían efecto negativo sobre ella, por lo cual de las 4 levaduras ensayadas es la mejor candidata para generar un producto biocontrolador de post-cosecha mediante la combinación con algún pesticida de uso común (Figuras 6, 7, 8 y 9; Tablas 8, 9, 10 y 11).

Tabla 8. Sensibilidad de *C. sake* frente a diferentes pesticidas de uso común.

Fungicida	Dosis de Campo (g o cc/100L)	Laboratorio (ul)			<i>C. sake</i>		
		Mi	R	Ma	Mi	R	Ma
Polyben	240	24	50	100	M	M	M
Dodine	80	24	50	100	M	M	M
Oxi cup	500	10	50	100	M	M	M
Rodomil gold	250	20	50	100	M	M	M
Phaltan 75	320	12	32	50	M	M	M
Metalaxil Cu	300	20	30	100	M	M	M
Azufre mojable	40	20	50	100	NE	NE	NE
Pomarsol forte	250	20	25	50	M	M	M
Captan	400	20	40	100	M	M	M
Fungi cup	500	20	50	100	M	M	M
Bumper 25%	45	10	50	100	M	M	M
Mancozeb	240	18	24	50	NE	NE	NE
Rubigan	35	25	50	100	M	M	M
Previcur	300	25	50	100	M	M	M

Mi: mínima, Ma: máxima, R: recomendada. M: muerte, NE: no efecto



Figura 6: Compatibilidad de *C. sake* frente a diferentes pesticidas de uso común. . Concentraciones utilizadas en el ensayo de laboratorio están indicadas en la Tabla 8. 1: Mínima, 2: Recomendada, 3: Máxima. Cada ensayo fue realizado a la temperatura optima de la levadura antártica ensayada, en este caso, 22°C. Como control se utilizó la levadura *C. sake* sin ningún pesticida, en la foto se logra observar el crecimiento del césped celular sin ningún halo u otro color en la placa control. En las demás placas se agregaron dos pesticidas y el efecto de muerte o incompatibilidad se logra observar por la formación un halo color azul oscuro alrededor del pocillo donde se agregó el pesticida.

Tabla 9. Compatibilidad de *M. psychrophilia* frente a diferentes pesticidas de uso común.

Fungicida	Dosis de Campo (g o cc/100L)	Laboratorio (ul)			<i>M. psychrophilia</i>		
		Mi	R	Ma	Mi	R	Ma
Polyben	240	24	50	100	NE	NE	NE
Dodine	80	24	50	100	NE	NE	NE
Oxi cup	500	10	50	100	M	M	M
Rodomil gold	250	20	50	100	NE	NE	NE
Phaltan 75	320	12	32	50	M	M	M
Metalaxil Cu	300	20	30	100	M	M	M
Azufre mojable	40	20	50	100	M	M	M
Pomarsol forte	250	20	25	50	NE	NE	NE
Captan	400	20	40	100	M	M	M
Fungi cup	500	20	50	100	M	M	M
Bumper 25%	45	10	50	100	NE	NE	NE
Mancozeb	240	18	24	50	NE	NE	NE
Rubigan	35	25	50	100	NE	NE	NE
Previcur	300	25	50	100	NE	NE	NE

Mi: mínima, R: recomendada, Ma: máxima. M: muerte, NE: no efecto



Figura 7: Compatibilidad de *M. psychrophilia* frente a diferentes pesticidas de uso común. Concentraciones utilizadas en el ensayo de laboratorio están indicadas en la Tabla 9. 1: Mínima, 2: Recomendada, 3: Máxima. Cada ensayo fue realizado a la temperatura óptima de la levadura antártica ensayada, en este caso, 10°C. Como control se utilizó la levadura *M. Psychriphilia* sin ningún pesticida, en la foto se logra observar el crecimiento del césped celular sin ningún halo u otro color en la placa control. En las demás placas se agregaron dos pesticidas y el efecto de muerte o incompatibilidad se logra observar por la formación un halo color azul oscuro alrededor del pocillo de donde se agregó el pesticida.

Tabla 10. Compatibilidad de *Cr. gilvscens* frente a diferentes pesticidas de uso común.

Fungicida	Dosis de Campo (g o cc/100L)	Laboratorio (ul)			<i>Cr. Gilvscens</i>		
		Mi	R	Ma	Mi	R	Ma
Polyben	240	24	50	100	NE	NE	NE
Dodine	80	24	50	100	M	M	M
Oxi cup	500	10	50	100	M	M	M
Rodomil gold	250	20	50	100	NE	NE	NE
Phaltan 75	320	12	32	50	M	M	M
Metalaxil Cu	300	20	30	100	NE	NE	NE
Azufre mojable	40	20	50	100	NE	NE	NE
Pomarsol forte	250	20	25	50	M	M	M
Captan	400	20	40	100	M	M	M
Fungi cup	500	20	50	100	M	M	M
Bumper 25%	45	10	50	100	M	M	M
Mancozeb	240	18	24	50	NE	NE	NE
Rubigan	35	25	50	100	NE	NE	NE
Previcur	300	25	50	100	NE	NE	NE

Mi: mínima, R: recomendada, Ma: máxima. M: muerte, NE: no efecto



Figura 8: Compatibilidad de *Cr. gilvscens* frente a diferentes pesticidas de uso común. Concentraciones utilizadas en el ensayo de laboratorio están indicadas en la Tabla 10. 1: Mínima, 2: Recomendada, 3: Máxima. Cada ensayo fue realizado a la temperatura óptima de la levadura antártica ensayada, en este caso, 22°C. Como control se utilizó la levadura *Cr. gilvscens* sin ningún pesticida, en la foto se logra observar el crecimiento del césped celular sin ningún halo u otro color en la placa control. En las demás placas se agregaron dos pesticidas y el efecto de muerte o incompatibilidad se logra observar por la formación un halo color azul oscuro alrededor del pocillo donde se agregó el pesticida.

Tabla 11. Compatibilidad de *W. anomalus* frente a diferentes pesticidas de uso común.

Fungicida	Dosis de Campo (g o cc/100L)	Laboratorio (ul)			<i>W. anómalus</i>		
		Mi	R	Ma	Mi	R	Ma
Polyben	240	24	50	100	NE	M	M
Dodine	80	24	50	100	NE	M	M
Oxi cup	500	10	50	100	NE	M	M
Rodomil gold	250	20	50	100	NE	M	M
Phaltan 75	320	12	32	50	M	M	M
Metalaxil Cu	300	20	30	100	M	M	M
Azufre mojable	40	20	50	100	NE	NE	NE
Pomarsol forte	250	20	25	50	M	M	M
Captan	400	20	40	100	M	M	M
Fungi cup	500	20	50	100	M	M	M
Bumper 25%	45	10	50	100	NE	M	M
Mancozeb	240	18	24	50	NE	NE	NE
Rubigan	35	25	50	100	NE	NE	NE
Previcur	300	25	50	100	NE	NE	NE

Mi: mínima, R: recomendada, Ma: máxima. M: muerte, NE: no efecto

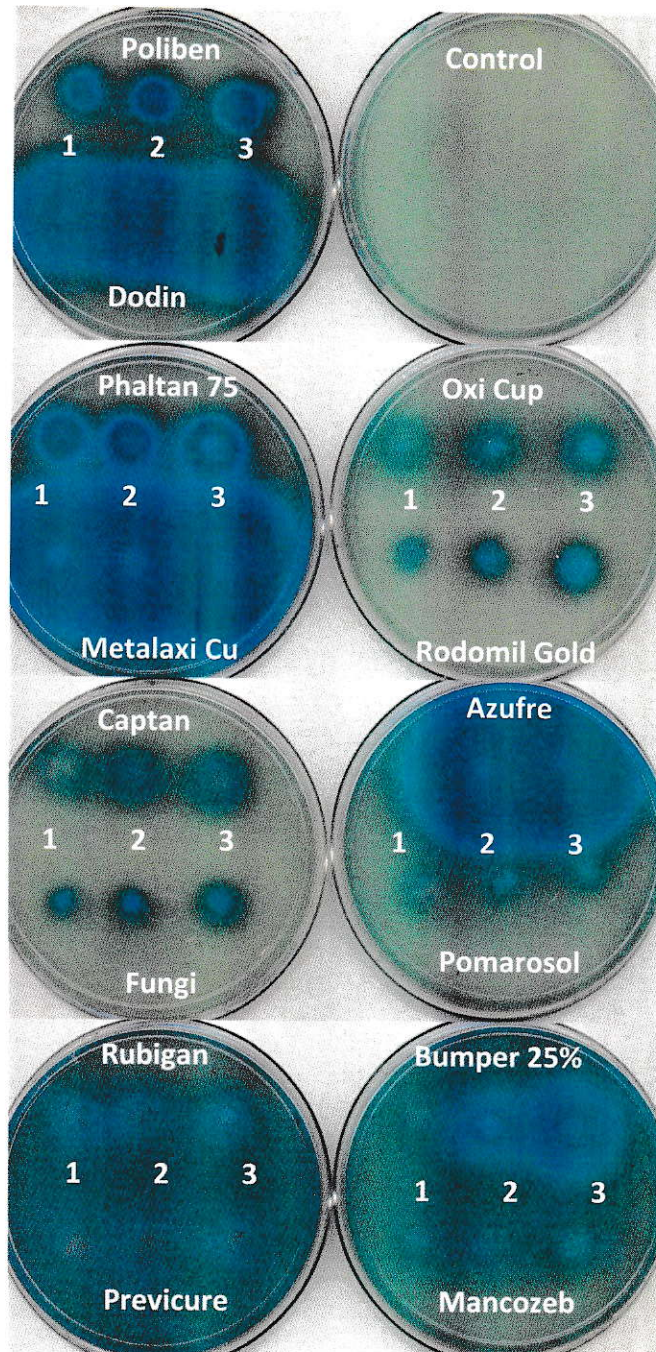


Figura 9: Compatibilidad de *W. anomalus* frente a diferentes pesticidas de uso común. Concentraciones utilizadas en el ensayo de laboratorio están indicadas en la Tabla 11. 1: Mínima, 2: Recomendada, 3: Máxima. Cada ensayo fue realizado a la temperatura óptima de la levadura antártica ensayada, en este caso, 30°C. Como control se utilizó la levadura *W. anomalus* sin ningún pesticida. En la foto se logra observar el crecimiento del césped celular sin ningún halo u otro color en la placa control. En las demás placas se agregaron dos pesticidas y el efecto de muerte o incompatibilidad se logra observar por la formación un halo color azul oscuro alrededor del pocillo donde se agregó el pesticida.

6. DISCUSIÓN

6.1 Optimización de condiciones de cultivo.

Las condiciones de cultivo que requieren bacterias y organismos del reino fungi, en relación a fuente de carbono y temperatura óptima de crecimiento son muy variados. Es por esto que el primer objetivo del trabajo antes de realizar los ensayos de antagonismo fue, determinar las condiciones de cultivo de *Cmm* y los cuatro hongos filamentosos fitopatógenos. Cada uno de los ensayos de actividad antimicrobiana en placa tiene que ser realizados en medios donde crezcan las levaduras con actividad antagónica. En ensayos realizados por Gerrero y Berlanga (2013), donde se mide actividad antifúngica de levaduras contra dos patógenos fúngicos, no se reporta una optimización de condiciones de cultivo entre el blanco celular y las levaduras, esto debido a que ambos microorganismos son aislados desde el mismo hábitat, por lo tanto no se requiere adaptar las condiciones para que ambos puedan crecer en un ensayo de confrontación. No es el caso de este estudio ya que los ambientes desde donde se aislaron los diferentes microorganismos a estudiar son muy diferentes, por ende las adaptaciones y condiciones de crecimiento son muy variadas. En nuestro caso se usó como base el medio YM, siendo básicamente necesario disminuir la cantidad de glucosa adicionada en el ensayo de actividad antagónica contra la bacteria *Cmm* y los tiempos de incubación en el caso de los hongos, sembrando de uno a dos días antes las levaduras para poder ver el efecto deseado y no observar efectos negativos por el rápido crecimiento de los hongos filamentosos en comparación a las levaduras antárticas.

6.2 Análisis de actividad antimicrobiana.

Reportes de actividades antagónicas contra fitopatógenos son muy variados, Gerrero y Berlanga (2013) demuestran la capacidad antagónica de levaduras contra dos hongos filamentosos fitopatógenos mediante ensayos de confrontación. Sirioinvisal (2010)

también demuestra la capacidad biocontroladora de hongos pero mediante la utilización de la bacteria *B. subtilis*. Este trabajo representa el primer reporte de actividad antimicrobiana de levaduras antárticas contra bacterias y hongos filamentosos fitopatógenos. Es el primer reporte de una actividad positiva y capacidad de control generado por levaduras del genero *Candida*, *Wickerhamomyces*, *Criptococus* y *Mrakia* contra la bacteria *Clavibacter michiganensis subs michiganensis*. El ensayo de confrontación en placa para determinar la capacidad antagonica de una levadura o bacteria contra un hongo filamentosos ha sido probado y optimizado por Sirioinvisal (2010), siendo incluso reportado la actividad antagonica de levaduras contra *P. expansum* y *B. cinerea*. En el presente trabajo no fue posible encontrar ninguna levadura con actividad positiva significativa contra ninguno de los hongos filamentosos ensayados a pesar de que se trabajó con *R. mucilaginoso*, de la que ha reportado una actividad contra *B. cinerea* (Gerrero y Berlanga 2013). Es sabido, que aislados de levaduras de una misma especie pueden diferir ampliamente en sus características fenotípicas y fisiológicas. Las levaduras antárticas utilizadas presentan una serie de adaptaciones y diferencias con otras levaduras mesófilas, como diferencias en la tasa de expresión de genes y modificaciones en el metabolismo, el cual se encuentra adaptado para poder realizar todas las funciones a baja temperatura.

6.3 Sensibilidad de las levaduras frente a pesticidas de uso común.

Una de las técnicas que hoy en día se ha implementado mucho en la agricultura es la utilización del control biológico integrado. Este se refiere a la utilización de una combinación de microorganismos junto con químicos u otros compuestos en bajas dosis para mejorar el efecto controlador de algún patógeno (Vargas 2012). En el presente trabajo

se realizó un estudio de sensibilidad para poder determinar si alguna de las levaduras con actividad antagónica contra el patógeno *Cmm* podía resistir a diferentes pesticidas de uso común. Como se vio anteriormente, de acuerdo a los resultados la posible utilización de alguna levadura con efecto antagónico contra la bacteria *Cmm* sería útil para generar un producto mezclando con diferentes dosis de pesticidas para aumentar el efecto bactericida del biocontrolador. Además de esto como se reportó por Pimenta y cols. (2009), la utilización y combinación de microorganismos con enzimas que pueden degradar la pared de hongos y bacterias podría incluso aumentar más la efectividad del posible biocontrolador a generar. En el presente trabajo se logró determinar que la levadura *M. psychrophilia* fue la levadura que presentó mayor resistencia a los diferentes pesticidas de uso común ensayados. Esta levadura es una gran candidata para poder seguir con ensayos de campo y determinar cual sería el mejor biocontrolador contra la bacteria *Cmm*, ya que presenta temperatura óptima de crecimiento a 10°C y resiste a la mayoría de los pesticidas utilizados hoy en día, siendo ideal su uso en cámaras refrigeradas durante las post-cosecha.

7. CONCLUSIONES

1. Se encontraron levaduras antárticas con actividad antibacteriana contra el fitopatógeno *Cmm*. Dicha actividad se debería a un factor proteico que es exportado.
2. No se encontró levaduras con actividad significativa contra hongos filamentosos fitopatógenos, en ensayos de confrontación. En el análisis de los extractos proteicos extracelulares se observó una leve actividad antagónica contra el hongo *Fusarium oxysporum*
3. La levaduras *M. psychrophilia* que presenta actividad antagónica contra *Cmm*, posee alta resistencia a pesticidas de uso común, por lo cual es una buena candidata para la generación de un producto y control integrado con químicos.

8. PROYECCIONES

Reportes de actividad antagónica contra bacterias fitopatógenas en el mundo son muy escasos. El presente trabajo representa el primer estudio de actividad antimicrobiana de levaduras aisladas del territorio antártico contra diferentes fitopatógenos bacterianos y fungos. Los resultados mostrados tienen gran potencial para la formulación de un producto biocontrolador contra la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, patógeno del tomate.

Además es posible que complementando este trabajo con otros tipos de ensayos determinar la capacidad biocontroladora de las levaduras en post-cosecha y contenedores refrigerados para un mejor biocontrol y prevención de enfermedades bacterianas como la del cancro producido por *Cmm*.

9. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5ª ed. St. Louis, MO: Academic Press.
- Arvieu J.C. 1987. Comportement du bromure de methyle dans le sol. Consequences sur l'activité pesticide et la formation de residus bromés. *Fruticultura Profesional* 12, 90-95
- Baeza, M., Flores, O., Carrasco, M., Rozas, J.M., Oviedo, V., Barahona, S. y Cifuentes, V., 2010. The Inter-generic Fungicidal Activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *The Journal of Microbiology*.48,822-828.
- Bruce, A., Verrall, S., Hackett, C., Wheatley, R., 2004. The impact of bacterial diet on the migration and navigation of *Caenorhabditis elegans*. *Holzforschung* 58, 193.
- Carrasco M., Rozas JM., Barahona S., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M. 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic región. *BMC Microbiology*. 12:251-272
- Chang, R.J., Ries, S.M., and Pataky, J.K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practises used to produce tomato plants. *Phytopathology* 81, 1276–1281.
- Cid, P., Auger, J., Ramos, C. y Esterio, M. 2011. Frecuencia de resistencia multidroga (mdr) de *Botrytis cinerea* en las principales zonas productoras de uva de mesa en Chile. Resúmenes XX Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Santiago, Chile 29 noviembre al 1 de diciembre de 2011. p. 50.
- Cook, D. W. M., Long, G. P., Ganesh, S. 1999. The combined effect of delayed application of yeast biocontrol agents and fruit curing for the inhibition of the postharvest pathogen *Botrytis cinérea* in kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* 16, 233-243.
- Dean R., Van Kan, J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathology*. 13, 414-430
- El-Tarabily K.A.y Sivasithamparam, K. 2006.Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47, 25-35.
- Errampalli, D. 2004. Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in Apple cvs. Empirew Gala. *Crop Protection* 23, 811-817.
- Esterio, M., Ramos, C., Araneda, M.J. y Auger, J. 2011. Situación actual de sensibilidad a botryticidas en las principales zonas productoras de uva de mesa en Chile. Resúmenes XX Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Santiago, Chile 29 noviembre al 1 de diciembre de 2011. p. 49.

European Union.1995. Commission directive 95/4/EC amendment of 21 Feb 1995 to the European Community Plant Health Directive (77/93/EEC). Official Journal of the European Communities L44, 56–60.

Guerrero, V. M., Berlanga, D. I., Ojeda, D. L. 2013. Biocontrol with yeasts of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in Golden Delicious apples. *Tecnociencia chihuahua*. 7, 75-79.

Holger, J., Rainer, B., Annette, B., Jutta, A and Rudolf, E.1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology* 1, 113-118.

Janisiewicz, W. 2012. "Blue Mold". USDA Appalachian fruit research.

Janisiewicz, W. J y Conway, W. S. 2010. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest *Stewart Postharvest Review, Postharvest Pathology*, 1,137-152.

Katan J., Greenberger, A. Alon,H. Greenstein A. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. *Phytopathology* 66,683-688.

MacKenzie, D.R. 1981. Scheduling fungicide applications for potato late blight with Blitecast.. *Plant Disease*. 65,394-399.

Mansfeld-Giese, K. 1997. Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. *Potato Research*. 40, 229–235.

Masih, E.I.S., Slezack-Deschaumes, I., Marmaras, E., Ait Barka, G., Vernet, C., Charpentier, A. Y Adholeya, B. 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters* 202,227-232.

Michielse, C. B. y Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol*. 10, 311–324.

Monteiro, L., Mariano, R. L. R. y Souto-Maior, A. M. 2005. Antagonism of *Bacillus spp.* Against *Xanthomonas campestris pv. Campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48,23-29.

Morales H, Marín S, Rovira A, Ramos A.J., Sanchis V. 2007. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. *Lett Appl Microbiol*. 44, 30–35.

Moser, R., Pertot, I., Elad, Y. and Raffaelli, R. 2008. Farmers attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries. *Biol. Control*. 47, 125–132.

- Tripathi, P., Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as alternative strategy to control post-harvest fungal rotting of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*.32, 235-245
- Paul A. Koepsell and Jay W. Pscheidt. 1994 *Pacific Northwest Plant Disease Control Handbook*, Oregon State University Press.165.
- Pimenta, R. S., Morais, P. B., Rosa, C. A., Corrêa, A. 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. 199.-212
- Sambrook, J y Russell D. W. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sirioinvisal., S. 2010. Biocontrol Efficacy of *Bacillus simtilis* BCB3-19 agains Tomato Gray Mold. *KMITL .Science and Techology Journal*. 10, 37-44.
- van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M. y van Kan,J. A. L. 2007. Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species:an important role for cell death control. *Molecular. Plant Pathology*. 8,41–54.
- Vargas, M., Garrido, F., Zapata, N. y Tapia, M. 2012. Isolation and selection of epiphytic yeast for biocontrol of *Botrytis cinerea* pers. on table grapes", *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(3), 332-337 (2012).
- Walker, G. M., McLeod, A. H., Hodgson, V. J.1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Letters* 127, 213-222.
- Wallis, F.M. 1977. Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiogy Plant Patholgy* 11, 333–342.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. 8, 561–580.
- Yu, T., Yu, C., Chen, F., Sheng, K., Zhou, T. 2012. Integrated control of blue mold in pear fruit by combined application of chitosan, a biocontrol yeast and calcium chloride *Postharvest Biology and Technology*. 69, 49-53.
- Zavaleta-Mejía, E. 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra*. 17, 201-207.
- Zwankhuizen, M. J., Govers, F., Zadoks, J. C. 1988. Development of potato late blight epidemics: Disease foci, disease gradients, and infection sources. *Phytopathology*. 88, 753-763.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1. Análisis de actividad antimicrobiana de aislados antárticos contra *P. expansum*, fitopatógeno de Cítricos.

Temperatura	Cepa	Ensayo actividad in vivo		
		10°C	15°C	22°C
30°C	<i>W. anomalus</i>	-	-	-
	<i>R. musilaginosa</i>	-	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
22°C	<i>Le. cratinivora</i>	-	-	-
	<i>C. sake</i>	-	-	-
	<i>D. fristingensis</i>	-	-	-
	<i>Le. fragaria</i>	-	-	-
	<i>G. antarctica</i>	-	-	-
	<i>C. davisiana</i>	-	-	-
	<i>Sp. salmonicolor</i>	-	-	-
	<i>Rh. laryngis</i>	-	-	-
	<i>Cr. victoriae</i>	-	-	-
	<i>Cr. Giiilvescens</i>	-	-	-
	<i>H. waticus</i>	-	-	-
15°C	<i>Criptococus Sp.</i>	-	-	-
	<i>Diosegia sp.</i>	-	-	-
	<i>Rh. Glacialis (T8Rg)</i>	-	-	-
	<i>C. davisiana</i>	-	-	-
	<i>M. robertii</i>	-	-	-
	<i>Rh. Glacialis (T11Rs)</i>	-	-	-
	<i>Mrakia sp1.</i>	-	-	-
	<i>M. gelida</i>	-	-	-
10°C	<i>M. blollopis</i>	-	-	-
	<i>M. bicuspidata</i>	-	-	-
	<i>M. psychrophilia</i>	-	-	-
	<i>Rhodotorula sp.</i>	-	+	+
	<i>Rhodotorula sp 2.</i>	-	-	-
	<i>Levadura sp</i>	-	-	-

Con un signo + se denota el resultado positivo y con un signo – el resultado negativo de la actividad antimicrobiana de las diferentes levadura antárticas contra el hongo filamentoso *P. expansum*.

10.2 ANEXO 2. Análisis de actividad antimicrobiana de aislados antárticos contra *B. cinerea*, fitopatógeno de Vid.

Temperatura	Cepa	Ensayo actividad in vivo		
		10°C	15°C	22°C
30°C	<i>W. anomalus</i>	-	-	-
	<i>R. musilaginosa</i>	-	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
22°C	<i>Le. cratinivora</i>	-	-	-
	<i>C. sake</i>	-	-	-
	<i>D. fristingensis</i>	-	-	-
	<i>Le. fragaria</i>	-	-	-
	<i>G. antarctica</i>	-	-	-
	<i>C. davisiana</i>	-	-	-
	<i>Sp. salmonicolor</i>	-	-	-
	<i>Rh. laryngis</i>	-	-	-
	<i>Cr. victoriae</i>	-	-	-
	<i>Cr. Giiilvescens</i>	-	-	-
	<i>H. watticus</i>	-	-	-
15°C	<i>Criptococus Sp.</i>	-	-	-
	<i>Diosegia sp.</i>	-	-	-
	<i>Rh. Glacialis</i> (T8Rg)	-	-	-
	<i>C. davisiana</i>	-	-	-
	<i>M. robertii</i>	-	-	-
	<i>Rh. Glacialis</i> (T11Rs)	-	-	-
	<i>Mrakia sp1.</i>	-	-	-
	<i>M. gelida</i>	-	-	-
	<i>M. blollopis</i>	-	-	-
10°C	<i>M. bicuspidata</i>	-	-	-
	<i>M. psychrophilia</i>	-	-	-
	<i>Rhodotorula sp.</i>	+	+	+
	<i>Rhodotorula sp 2.</i>	-	-	-
	<i>Levadura sp</i>	-	-	-

Con un signo + se denota el resultado positivo y con un signo – el resultado negativo de la actividad antimicrobiana de las diferentes levadura antárticas contra el hongo filamentoso *B. cinérea*.

10.3 ANEXO 3. Análisis de actividad antimicrobiana de aislados antárticos contra *P. infestance*, fitopatógeno de la Papa.

Temperatura	Cepa	Ensayo actividad <i>in vivo</i>		
		10°C	15°C	22°C
30°C	W. anomalus	-	-	-
	R. musilaginosa	-	-	-
	C. parapsilosis	-	-	-
22°C	Le. cratinivora	-	-	-
	C. sake	-	-	-
	D. fristingensis	-	-	-
	Le. fragaria	-	-	-
	G. antarctica	-	-	-
	C. davisiana	-	-	-
	Sp. salmonicolor	-	-	-
	Rh. laryngis	-	-	-
	Cr. victoriae	-	-	-
	Cr. Gilvescens	-	-	-
	H. watticus	-	-	-
15°C	Criptomocococ Sp.	-	-	-
	Diosegia sp.	-	-	-
	Rh. Glacialis (T8Rg)	-	-	-
	C. davisiana	-	-	-
	M. robertii	-	-	-
	Rh. Glacialis (T11Rs)	-	-	-
	Mrakia sp1.	-	-	-
	Mrakia gelida	-	-	-
10°C	M. blollopis	-	-	-
	M. bicuspidata	-	-	-
	M. psychrophilia	-	-	-
	Rhodotorula sp.	-	-	-
	Rhodotorula sp 2.	-	-	-
	Levadura sp	-	-	-

Con un signo – se denota el resultado negativo de los ensayos de las diferentes levadura antárticas contra el hongo filamentoso *P. Infestance*.

10.4 ANEXO 4. Análisis de actividad antimicrobiana de aislados antárticos contra *F. oxysporum*, fiopatógeno de Bananeros.

Temperatura	Cepa	Ensayo actividad <i>in vivo</i>		
		10°C	15°C	22°C
30°C	W. anomalus	-	-	-
	R. musilaginosa	-	-	-
	C. parapsilosis	-	-	-
22°C	Le. cratinivora	-	-	-
	C. sake	-	-	-
	D. fristingensis	-	-	-
	Le. fragaria	-	-	-
	G. antartica	-	-	-
	C. davisiana	-	-	-
	Sp. salmonicolor	-	-	-
	Rh. laryngis	-	-	-
	Cr. victoriae	-	-	-
	Cr. Giilvescens	-	-	-
15°C	H. watticus	-	-	-
	Criptococus Sp.	-	-	-
	Diosegia sp.	-	-	-
	Rh. Glacialis (T8Rg)	-	-	-
	C. davisiana	-	-	-
	M. robertii	-	-	-
	Rh. Glacialis (T11Rs)	-	-	-
	Mrakia sp1.	-	-	-
Mrakia gelida	-	-	-	
10°C	M. blollopis	-	-	-
	M. bicuspidata	-	-	-
	M. psychrophilia	-	-	-
	Rhodotorula sp.	-	-	-
	Rhodotorula sp 2.	-	-	-
	Levadura sp	-	-	-

Con un signo – se denota el resultado negativo de los ensayos de las diferentes levadura antárticas contra el hongo filamentoso *F. oxysporum*.