

CONTROL BIOLÒGIC DE LES PRINCIPALS MALALTIES DE POST-COLLITA DE FRUITA DOLÇA MITJANÇANT L'APLICACIÓ DE LA SOCA CPA-1 DE *CANDIDA SAKE*

USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; FONS, E.; OCHOA DE ERIBE, J.* i VIÑAS, I.

Unitat de Postcollita-CeRTA

Centre R+D UdL-IRTA

Av. Rovira Roure, 177. 25198 Lleida

*SIPCAM INAGRA, S.A.

RESUM

El control biològic, basat en l'ús de microorganismes antagonistes, s'ha considerat com una alternativa prometedora a l'ús de productes químics de síntesi. A partir d'un extens programa experimental, es va trobar que una soca del llevat *Candida sake* (CPA-1) era particularment efectiva en controlar tres dels principals patògens de postcollita de fruita de llavor a l'àrea mediterrània: *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* i *Rhizopus nigricans*. En experiments de laboratori *C.sake* va controlar completament *B.cinerea* i *R.stolonifer* en pomes i peres i va controlar *P.expansum* en més del 80%. En emmagatzematge en atmosfera controlada la podridura causada per *P.expansum* va reduir-se en un 97%, i es va trobar més efectivitat al 3% que a l'1 o el 21% d'oxigen. En proves semicomercials i comercials amb la varietat de poma Golden Delicious es va aconseguir un control efectiu de les malalties de postcollita en diverses condicions d'emmagatzematge.

INTRODUCCIÓ

Les pèrdues de fruita en postcollita degudes a podridures fúngiques poden ser importants, i poden reduir-se amb l'ús de fungicides de síntesi. El desenvolupament de resistències als fungicides pels principals agents causants de podridures (Bertrand i Saulie-Carter, 1978; Dekker i Georgopoulos, 1982; Viñas et al, 1991), i la preocupació dels consumidors per la salut i el medi ambient han impulsat l'interès per trobar alternatives als mètodes químics.

El control biològic, utilitzant microorganismes antagonistes, s'ha considerat una alternativa prometedora als productes químics de síntesi. Els principals patògens en fruites de pinyol (Pussey i Wilson, 1984), pomes (Janisiewicz, 1987), cítrics (Wilson i Chalutz, 1989), i altres fruits (Janisiewicz, 1990) han pogut ser controlats en alguna mesura mitjançant aquesta tècnica. Els llevats són considerats bons candidats com a agents de biocontrol perquè colonitzen ràpidament la superfície de la fruita, suporten el stress ambiental i utilitzen els nutrients més ràpidament que els patògens.

El 1989 es va iniciar un programa de mostratge per aïllar i identificar bacteris i llevats que, trobant-se de forma natural a les plantes (fruits i fulles de pomeres i pereres), mostressin un potencial com a antagonistes de les podridures principals en aquestes espècies a l'àrea mediterrània: *Penicillium expansum* Link, *Botrytis cinerea* Pers. i *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Lind. Una soca de *Candida sake* (CPA-1) va mostrar ser particularment efectiva en aquest control.

MATERIALS I MÈTODES

Patògens. *P.expansum*, *B.cinerea* i *R.stolonifer*, aïllats de pomes podrides després d'alguns mesos en emmagatzematge, van seleccionar-se per ser els que causaven majors podridures en inocular-los en pomes. Es mantenien en medi Patata Dextrosa Agar, i eren transferits periòdicament a pomes. S'inoculaven suspensions aquoses de 10^3 , 10^4 o 10^5 conidis per mililitre, preparades de cultius de *P.expansum*, *B.cinerea* i *R.stolonifer* de 10, 14 i 7 dies respectivament.

Fruits. Es van emprar pomes Golden Delicious i peres Blanquilla, de camps situats a l'àrea de Lleida, just després de la collita o després d'un emmagatzematge curt (màxim de 3 mesos) en atmosfera normal a 1 °C.

Antagonista. Es van preparar suspensions a partir de cultius crescuts en medi NYDB en agitació a 150 rpm, 24-48 h a 25±1 °C. El medi era centrifugat a 7520 g durant 10 min; es feia una nova suspensió de les cèl·lules en 50 ml d'aigua, a partir de la qual s'ajustava la concentració mitjançant mesures espectrofotomètriques contrastant amb una corba estàndard.

Tests de laboratori. Es va determinar l'efectivitat dels antagonistes potencials seleccionats contra *P.expansum*, *B.cinerea* i *R.stolonifer*. Es va experimentar sobre fruits prèviament emmagatzemats a 1 °C per determinar la concentració mínima requerida d'antagonista per produir control efectiu. Després d'esterilitzar la superfície dels fruits, es van provocar dos damys en cadascun d'ells de 3x3x5 mm³. Cada tractament es va repetir 3 vegades i la unitat de mostra va ser de 3 fruits. A cada forat s'hi van injectar 25 µl de la concentració corresponent de la suspensió de *C. sake*. A continuació es van injectar 20 µl d'una suspensió aquosa d'espores del patogen corresponent (1x10³, 1x10⁴ i 1x10⁵ espores per ml). La concentració de les suspensions de conidis es va determinar amb un hematocitòmetre. Després d'incubar durant 5, 7 i 10 dies les fruites inoculades amb *R.stolonifer*, *P.expansum* i *B.cinerea*, respectivament, a 20±1 °C i humitat relativa del 75±5% en safates de plàstic, es va mesurar el diàmetre de la lesió. Per separar les mitjanes es va emprar el test de Duncan de rang múltiple, amb p=0.05.

Proves a escala pilot en condicions comercials. Amb pomes Golden Delicious tractades com s'ha descrit anteriorment va avaluar l'efectivitat de l'antagonista per controlar *P.expansum* en condicions d'emmagatzematge comercial. Cada lot experimental estava constituït per 20 pomes i es repetia 3 vegades. Després de 60 dies a 1 °C i 21% O₂, 3% O₂, 3% CO₂ o 1% O₂, 1% CO₂ es va realitzar la lectura dels resultats mesurant el diàmetre de la lesió i el nombre de forats amb podridura. Per separar les mitjanes es va emprar el test de Duncan de rang múltiple, amb p=0.05.

Proves semicomercials en frigoconservació. Es van submergir pomes Golden Delicious acabades de collir durant 30 s en una suspensió aquosa de *C. sake* amb 1,6x10⁴ o 1,6x10⁶ unitats formadores de colònia (ufc)/ml. Una hora més tard se submergien els mateixos fruits durant 30 s en una suspensió de 10⁴ conidis/ml de *P.expansum*. Cada lot experimental constava de 60 fruits i es repetia 3 vegades. Després de 8 mesos a 1 °C i 21% O₂ es controlava el número de fruits amb podridura. Per separar les mitjanes es va emprar el test de Duncan de rang múltiple, amb p=0.05.

Proves en atmosferes controlades comercials. Es van seleccionar a l'atzar pomes Golden Delicious acabades de collir i es van emmagatzemar en palox d'uns 1800 fruits de capacitat, on es van tractar en *drencher* amb una solució d'imazalil a dosis comercials, amb *C. sake* a 6,5x10⁴ i amb *C. sake* a 3x10⁵ ufc/ml, respectivament, més un grup de palox no tractats com a control, i cada tractament es va repetir quatre vegades. Tot es va realitzar segons els mètodes estàndard d'una central hortofructícola. Els fruits tractats es van emmagatzemar 9 mesos en AC a 1 °C, 3% O₂ i 3% CO₂ en una cambra comercial, acabada d'omplir amb pomes similars que havien rebut els tractaments normals. Després del període d'emmagatzematge es va comptar el número de fruits amb podridura a cada mostra.

RESULTATS

Identificació de l'antagonista. El llevat aïllat amb millor potencial, CPA-1, es va enviar al Centraalbureau voor Schimmelcultures (Delft, Holanda) per la seva identificació. Va ser identificat com a *Candida sake* (Saito & Ota) Van Uden & Buckley i dipositat a la Colección Española de Cultivos Tipo (València).

Activitat de l'antagonista *C.sake* en pomes i peres a 25 °C. El llevat antagonista va produir una forta inhibició del desenvolupament en pomes i peres dels tres patògens testats. En pomes tractades amb les tres concentracions de l'antagonista (7,5x10⁵, 1,6x10⁶ i 2,6x10⁶ ufc/ml) i 10³ o 10⁴ conidis/ml de *B.cinerea* no es van desenvolupar lesions. A 10⁵ conidis/ml de *B.cinerea* i a les dues concentracions més elevades de l'antagonista, el control va ser absolut.

En peres, *C. sake* només va controlar *B. cinerea* a 10³ conidis/ml, mentre que a dosis de 10⁴ i 10⁵ conidis/ml no es va produir un control efectiu (menys del 50% de reducció de la podridura).

En pomes i peres inoculades amb *P.expansum*, *C.sake* va reduir o controlar totalment el desenvolupament de la podridura. Amb concentracions creixents de l'antagonista es reduïa el diàmetre i el percentatge de ferides infectades per *P.expansum*.

En pomes protegides amb *C.sake* a $1,6 \times 10^6$ i $2,6 \times 10^6$ ufc/ml inoculades amb 10^5 conidis/ml de *P.expansum* i *R.stolonifer* no es van produir lesions. A les dues concentracions més elevades de l'antagonista assajades, només es van observar petites lesions o control total en fruits inoculats amb 10^4 o 10^5 conidis/ml de *R.stolonifer*.

Proves a escala pilot amb *C. sake* en condicions comercials.

En emmagatzematge en atmosfera controlada, la dosi de $2,4 \times 10^6$ ufc/ml de *C. sake* va produir un control efectiu a totes les atmosferes provades. Al 3% O_2 el control va ser el més efectiu, arribant al 97% de reducció de podridura respecte al control (Taula 1).

Taula 1. Efecte de l'antagonista en el diàmetre de podridura (cm) causat per *P. expansum* en pomes Golden Delicious foradades.

Nivells de gasos	Concentració de <i>C.sake</i> (CPA-1)	
	0 ufc/ml	$2,4 \times 10^6$ ufc/ml
21% O_2	3.9 a	1.1 b
3% O_2 - 3% CO_2	4.1 a	0.1 b
1% O_2 - 1% CO_2	2.9 a	0.6 b

*Els fruits van ser perforats i inoculats amb l'antagonista a les dosis referides, i *P. expansum* a 10^4 conidis/ml, i emmagatzemats durant 60 dies a $1^\circ C$ i les atmosferes indicades. Els números amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons un test de rang múltiple de Duncan ($p=0.05$)

Proves semicomercials en frigoconservació.

A la concentració més alta assajada, *C. sake* va reduir significativament el percentatge de fruits podrits (reducció del 74%) respecte al control.

Taula 2. Efecte de l'antagonista en el percentatge de podridures per *P. expansum* en pomes Golden Delicious.

Concentració de <i>C. sake</i>	% de fruits podrits
0 ufc/ml	8,4 a
$1,6 \cdot 10^4$ ufc/ml	4,2 ab
$1,6 \cdot 10^6$ ufc/ml	2,2 b

*Fruits comercials, sense ferides, es van submergir en una suspensió aquosa de *C. sake* a les dosis referides i de *P. expansum* a 10^4 conidis/ml, i emmagatzemats durant 8 mesos a $1^\circ C$. Els números amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons un test de rang múltiple de Duncan ($p=0.05$).

Efectivitat de *C. sake* en una prova comercial en atmosfera controlada.

A la concentració de $3,0 \times 10^5$ ufc/ml *Candida sake* va controlar la podridura de forma similar al fungicida químic més efectiu autoritzat al mercat per postcollita de fruits de llavor. La reducció de la podridura va ser significativa respecte al control. (Taula 3)

Taula 3. Efectivitat de diversos tractaments contra agents de podridura en pomes Golden Delicious.

Tractament	% de fruits amb podridura
0	1.30 a
6.5x10 ⁴ ufc/ml de <i>C. sake</i>	0.89 ab
3.0x10 ⁵ ufc/ml de <i>C. sake</i>	0.70 b
Imazalil (dosi comercial)	0.74 b

*Fruits comercials, sense ferides, es van tractar en *drencher* en condicions normals amb una suspensió aquosa de *C. sake* o una solució d'Imazalil tal com s'ha indicat, i van ser emmagatzemats durant 9 mesos a 1 °C, 3% CO₂ i 3% O₂. Els números amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons un test de rang múltiple de Duncan (p=0.05).

DISCUSSIÓ

Candida sake, la soca que va mostrar millor potencial com a antagonista contra malalties fúngiques entre les assajades, és un organisme adequat per control de malalties en postcollita, ja que no s'ha associat mai amb animals de sang calenta (Hurley et al, 1987), i és ubicu a la natura i un component principal de la flora epifítica dels fruits madurs (Beech i Davenport, 1970).

Es pot esperar que els llevats aïllats de la superfície de fruits, com *C. sake*, seran més efectius com agents de biocontrol perquè estan adaptats fenotípicament a aquest nínxol i poden, per tant, ser més efectius en colonitzar i competir pels nutrients i l'espai a la superfície del fruit. L'especialització en l'hàbitat és comú en les espècies conegudes com *Candida* (Kreger van Rij, 1984).

La concentració d'antagonista requerida per obtenir control va ser suficientment baixa com per considerar-ne la comercialització. La capacitat de control va ser satisfactòria a les temperatures habituals en frigoconservació, i a les atmosferes controlades comercials.

Les instal·lacions utilitzades comunament a les centrals per aquests tractaments són també adequades per utilitzar-les amb *C. sake* tal com s'ha assajat, fet que, per no requerir inversions addicionals per part dels operadors comercials, fa d'aquest organisme una alternativa prometedora als fungicides químics de síntesi.

AGRAÏMENTS

Aquesta recerca va ser finançada per la Comissió Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), i a comptar amb el suport financer de SIPCAM INAGRA S.A.

REFERÈNCIES

- BEECH, F.W. i DAVENPORT, R. R. (1970) The role of yeasts in cider-making. In: *The yeasts*. Vol. 3. A.H. Rose i J.S. Harrison (eds). Academic Press. Londres. pp 73-146.
- BERTRAND, P.F. i SAULIE-CARTER, J.L. (1978) The occurrence of benomyl-tolerant strains of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in the mid-Columbia region of Oregon and Washington. *Plant Dis. Rep.* **62**:305-320.
- DEKKER, J. i GEORGOPOULOS, S.G. (1982) Fungicide resistance in crop protection. Center for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. 265 pp.
- JANISIEWICZ, W.J. (1987) Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology*, **77**:481-485.
- JANISIEWICZ, W.J. (1990) Biological control of postharvest fruit diseases. In: *Handbook of Applied Mycology. Vol 1. Soils and Plants*. D.K. Arora (ed) Marcel Decker. New York. pp 301-326.
- KREGER VAN RIJ, N.J.W. (1984) The yeasts. A taxonomic study. 3d ed. Elsevier. Amsterdam. 1082 pp.
- PUSSEY, P.L. i WILSON, C.L. (1984) Postharvest biological control of stone fruits brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant. Dis.* **68**:753-756.
- VIÑAS, I, USALL, J, i SANCHIS, V. (1991) Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest fungicide treatment in apple packinghouses in Lleida (Spain). *Mycopathology*. **113**:15-18.
- WILSON, C.L. i CHALUTZ, E. (1989) Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. Hortic.* Amsterdam. **40**:105-112.