

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA  
ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR  
LEVADURAS RESPONSABLES DE LA INHIBICIÓN DE MOHOS ALTERANTES DE  
FRUTAS.

TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DEL MÁSTER  
UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD  
EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

POR

Almudena Rodríguez Utrero

TUTELADO POR

Alejandro Hernández León

Alberto Martín González

BADAJOS, JULIO DE 2018

## ÍNDICE

Glosario.....	2
Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción.....	7
1.1. Enfermedades fúngicas postcosecha en fruta.....	10
1.2. <i>Botrytis cinérea</i> .....	11
1.3. Métodos de control de <i>Botrytis cinérea</i> en postcosecha.....	14
1.3.1. Tratamientos térmicos.....	15
1.3.2. Extractos naturales.....	16
1.3.3. Biocontrol por microorganismos antagonistas.....	17
2. Objetivos.....	20
3. Material y métodos.....	21
3.1. Material.....	21
3.1.1. Reactivos.....	21
3.1.2. Medios de cultivos.....	21
3.1.3. Instrumentación.....	21
3.1.4. Material biológico.....	22
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Manejo y conservación de microorganismos.....	22
3.2.2. Identificación de levaduras a nivel de especie.....	23
3.2.3. Enfrentamiento levaduras- <i>Botrytis cinérea</i> in vitro.....	26
3.2.4. Determinación de los compuestos volátiles.....	29
3.2.5. Análisis de los resultados y tratamiento estadístico.....	31
4. Resultados.....	32
4.1. Identificación de levaduras a nivel de especie.....	32
4.2. Enfrentamiento levaduras- <i>Botrytis cinerea</i> .....	36
4.3. Determinación de los compuestos volátiles.....	42
5. Conclusiones.....	52
6. Bibliografía.....	53

# **GLOSARIO**

## GLOSARIO

### A

**Actividad translaminar:** Propiedad del producto que penetra por el haz foliar y llega al envés (atraviesa la lámina de la hoja desde la parte superior a la inferior).

**Antifúngico o antimicótico:** se denomina a toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

### B

**Biofilms:** es una estructura colectiva de microorganismos que se adhiere a superficies vivas o inertes y está revestida por una capa protectora segregada por los propios microorganismos.

### C

**Cámara Neubauer:** instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido, que puede ser; un cultivo celular, sangre,...

**Cromatografía de gases:** es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de un mechero de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

### E

**Esclerosis:** es un endurecimiento del órgano o tejido debido a un incremento de los tejidos conjuntivos. La esclerosis es, por lo tanto, una enfermedad que deriva de otra, no es una enfermedad autónoma. La enfermedad suele producirse debido a un daño del tejido como resultado de inflamaciones, problemas de perfusión o también procesos de envejecimiento.

**Espectrometría de masas:** es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. El espectrómetro de masas es un dispositivo que permite analizar con gran precisión la composición de

diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga ( $m/z$ ).

**Espectrometría de masas:** es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. El espectrómetro de masas es un dispositivo que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga ( $m/z$ ).

## F

**Fenotipo:** Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

**Fungicidas:** son sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento o eliminar los hongos y mohos perjudiciales para las plantas, los animales o el hombre. Todo fungicida, por más eficaz que sea, si se utiliza en exceso puede causar daños fisiológicos a la planta.

## I

**Índice de Kovats:** método de cuantificación de los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos en cromatografía de gases, de forma que ayuda a identificar positivamente los componentes de una mezcla.

## L

**Levadura:** La levadura es todo aquel organismo de tipo eucariota y son clasificados como hongos de vida microscópica conformados por un solo tipo de células (unicelulares), estos son importantes en el proceso de descomposición de toda materia orgánica bajo el uso del proceso conocido como fermentación.

**Lipofílicos:** comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por los lípidos. En una disolución o coloide, las partículas lipófilas tienden a acercarse y mantener contacto con los lípidos.

## M

**Micelio:** conjunto de hifas que forman la parte vegetativa de un hongo.

**P**

**Perecedero:** alimento que tiene duración limitada, está destinado a perecer, perder su utilidad o validez, o estropearse en un determinado plazo de tiempo.

**S**

**Saprófito:** Organismo que obtiene su alimento a partir de la materia orgánica de otros organismos, muertos o en descomposición.

**T**

**Termociclador:** aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

# **RESUMEN**

## RESUMEN

Uno de los grandes problemas que presenta hoy en día la producción y comercialización de frutas y hortalizas es el efecto que tienen los patógenos fúngicos, que se consideran la principal causa de pérdidas de frutas y verduras frescas tanto en pre como en postcosecha. En la actualidad, los consumidores exigen reducir el uso de fungicidas sintéticos y para ello se está empezando a emplear nuevas alternativas como puede ser el control biológico utilizando microorganismos antagonistas. En este trabajo se utilizan 32 levaduras epifitas aisladas de distintas variedades de higos y brevas (*Ficus carica* L.) y una cepa del moho patógeno *Botrytis cinerea*. En primer lugar se identifican las especies de levaduras con las que se trabaja. Para evaluar la capacidad antagonista de las levaduras sobre el moho se investiga la capacidad de generar compuestos orgánicos volátiles antifúngicos en un sistema de doble placa. Tras la incubación se mide el crecimiento radial del *Botrytis cinerea* y se determinan parámetros como reducción en la tasa de crecimiento, aumento del periodo de latencia y reducción del diámetro radial de *Botrytis cinerea*. Además, se realiza el análisis de compuestos volátiles presentes en el espacio del sistema de doble placa mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas.

La identificación molecular de los aislamientos permite determinar 5 especies de levaduras siendo la mayoritaria *Aureobasidium pullulans*. Además se encuentran aislamientos de *Vishniacozyma carnescens*, *Candida carpophila*, *Filobasidium oeirense* y *Hanseniaspora uvarum*. En cuanto al efecto antagonista, el 46,87% de los aislamientos empleados tienen un efecto significativo en la reducción del crecimiento micelial, y también se observa que a medida que aumentaba el periodo de latencia, aumenta el porcentaje de reducción radial. La cepa 793 es la más eficaz ya que reduce la tasa de crecimiento en 7,59 mm/día, y retrasa el periodo de latencia en 0,51 días. Se identifican un total de 75 compuestos volátiles que se agrupan en 12 familias; de los cuales 38 compuestos volátiles son producidos por las levaduras. Los compuestos correlacionados con la reducción son 7 compuestos químicos. Como resultado, la cepa 793 (*Hanseniaspora uvarum*) es la más adecuada ya que produce una menor velocidad de crecimiento en *Botrytis cinerea*, un mayor periodo de latencia y un aumento en el porcentaje de reducción. Esto se debe a la producción de ciertos compuestos orgánicos volátiles que hacen que sea un buen agente de control biológico respecto a *Botrytis cinerea*.

# **ABSTRACT**

## ABSTRACT

One of the great problems that the production and commercialization of fruit and vegetables presents today is the effect of fungal pathogens, which is considered the main cause of fresh fruits and vegetables in pre as well as in postharvest. Currently, consumers demand to reduce the use of synthetic fungicides and for this is starting to use new alternatives such as biological control using microorganism antagonists. In this work, 32 epiphytic yeasts isolated from different varieties of figs and figs (*Ficus carica L.*) and one strain of the pathogenic mold *Botrytis cinerea* are used. First, identify the yeast species with which you work. To evaluate the antagonistic capacity of yeasts on mold, the ability to generate volatile antifungal organic compounds in a double plate system is investigated. After the incubation the radial growth of *Botrytis cinerea* is measured and parameters such as the reduction in the growth rate, the increase of the latency period and the reduction of the radial diameter of *Botrytis cinerea* are determined. In addition, the analysis of volatile compounds in the headspace of the double plate system is carried out by means of a gas chromatograph coupled to a mass detector.

The molecular identification of the isolates allows to determine 5 species of yeasts that are the majority of *Aureobasidium pullulans*. Isolates of *Vishniacozyma carnescens*, *Candida carpophila*, *Philobasidium oeirense* and *Hanseniaspora uvarum* are also found. Regarding the antagonist effect, 46.87% of the employees of this type have a significant effect in the reduction of mycelial growth, and it is also observed that the latency period can be increased, the percentage of the radial reduction increases. Strain 793 is the most effective that reduces the growth rate by 7.59 mm / day, and does not delay the latency period by 0.51 days. A total of 75 volatile compounds are identified that are grouped into 12 families; of which 38 volatile compounds are produced by the yeasts. The compounds correlated with the reduction are 7 chemical compounds. As a result, Strain 793 (*Hanseniaspora uvarum*) is the most suitable that produces a lower growth rate in *Botrytis cinerea*, a longer latency period and an increase in the percentage of reduction. This is due to the production of organic compounds that make a good biological control agent against *Botrytis cinerea*.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el sector hortofrutícola es considerado como el de mayor relevancia económica en la agricultura debido al volumen de negocio, además de poseer una gran importancia debido a que son alimentos básicos en la dieta humana, y se asocian con el creciente conocimiento por los consumidores de la relación entre la alimentación y la salud. Por ello, este sector se enfrenta a un escenario comercial marcado por la globalización y la competencia, pero tienen el inconveniente de ser perecederos, por lo que se dispone de ellos durante períodos cortos de tiempo.

El sector hortofrutícola se encuentra presente de forma significativa en la mayoría de la Comunidades Autónomas destacando Andalucía, Aragón, Cataluña, Castilla-La Mancha, Comunidad Valenciana, Extremadura y la Región de Murcia; si bien ocupa una parte relativamente pequeña de la superficie agraria (9%), contribuyendo a la conservación del entorno medioambiental ya que evita la roturación de grandes superficies (FEPEX,2018).

Los datos recogidos por el MAPAMA de la campaña correspondiente al 2016 muestran que en el caso de los frutales no cítricos, la gran parte de las producciones va con destino a ventas para consumo en fresco (2.483.889 t), mientras que en el caso de los frutales cítricos el mayor destino de las producciones es para exportación (3.017.486 t) seguido de consumo interior en fresco (2.219.788 t).

Además, hay que señalar que España presenta un gran número de productos con modelos de producción muy diversos, desde la producción intensiva de hortalizas de invernadero hasta el secano extensivo.

La superficie total dedicada al sector hortofrutícola en general es aproximadamente de 1.500.000 hectáreas. Más de la mitad del total, alrededor de unas 900.000 ha, están dedicadas a la producción de hortalizas (38%), cítricos (34%) y frutales no cítricos (28%). La evolución general tiende a mantenerse estable en el caso de los productos frutícolas. La producción de frutas en España está por encima de los 8 millones de toneladas. En la siguiente tabla (Tabla 1.1) se muestra la distribución de superficie dedicada a frutas en España en 2012.

TABLA 1.1. Superficies dedicada a frutas en 2012 (MAPAMA).

Especies	Superficie(ha)	
	Total	% respecto a total frutales
Manzano	32.441	6,4%
Peral	24.064	4,7%
Melocotonero	79.617	15,6%
Albaricoquero	21.172	4,2%
Cerezo	32.419	6,4%
Ciruelo	15.097	3,0%
<b>Total Frutales no Cítricos</b>	<b>204.810</b>	<b>40,2%</b>
Naranja	157.592	31,0%
Mandarino	109.386	21,5%
Limonero	37.068	7,3%
<b>Total Frutales Cítricos</b>	<b>304.046</b>	<b>59,8%</b>
<b>Total Frutales</b>	<b>508.856</b>	<b>100,0%</b>

Las frutas y hortalizas frescas constituyen el primer sector de la agricultura española representando el 59% de la Producción Vegetal Agraria. La mayor parte se dedica a la exportación y el resto a consumo interno. En 2017 este porcentaje se ha elevado al 63%, según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, procesados por FEPEX (Informe económico del sector de frutas y hortalizas en España, 2018).

España es el principal productor de frutas y hortalizas de la UE, con el 31% del total del comercio intracomunitario de frutas y hortalizas. Le sigue Italia y Francia. Según los últimos datos de la FAO correspondientes a 2014, la producción española ascendió a 32,1 millones de toneladas (datos que incluyen especies con una gran vocación industrial como el tomate para industria).

Dentro de la región de Extremadura, el sector hortofrutícola tiene una gran importancia debido al paso del río Guadiana y su cuenca, una zona fértil con un clima mediterráneo subtropical según la clasificación de Papadakis (MAPAMA, 1996) y con unos suelos sin problemas de salinidad pero de una gran variedad debido a la amplitud de la zona, donde se localizan las Vegas Altas y Bajas, con unas infraestructuras preparadas para la agricultura de regadío, y donde el subsector más importante en cuanto a volumen de facturación es el de hortalizas transformadas (145 millones de euros), seguido de los

subsectores de frutas (83,2 millones de euros) y, en último lugar, de las hortalizas frescas (25,7 millones de euros ) según el estudio DAFO realizado por Coletto y col. (2008).

Extremadura posee una gran cantidad de cooperativas hortofrutícolas (Figura 1.1) con respecto a España, aunque no ocupa las primeras posiciones en producción nacional, siendo estas las regiones del Levante y Andalucía, sin embargo supone para Extremadura un motor económico muy importante además de crear numerosos puestos de trabajos durante las campañas.

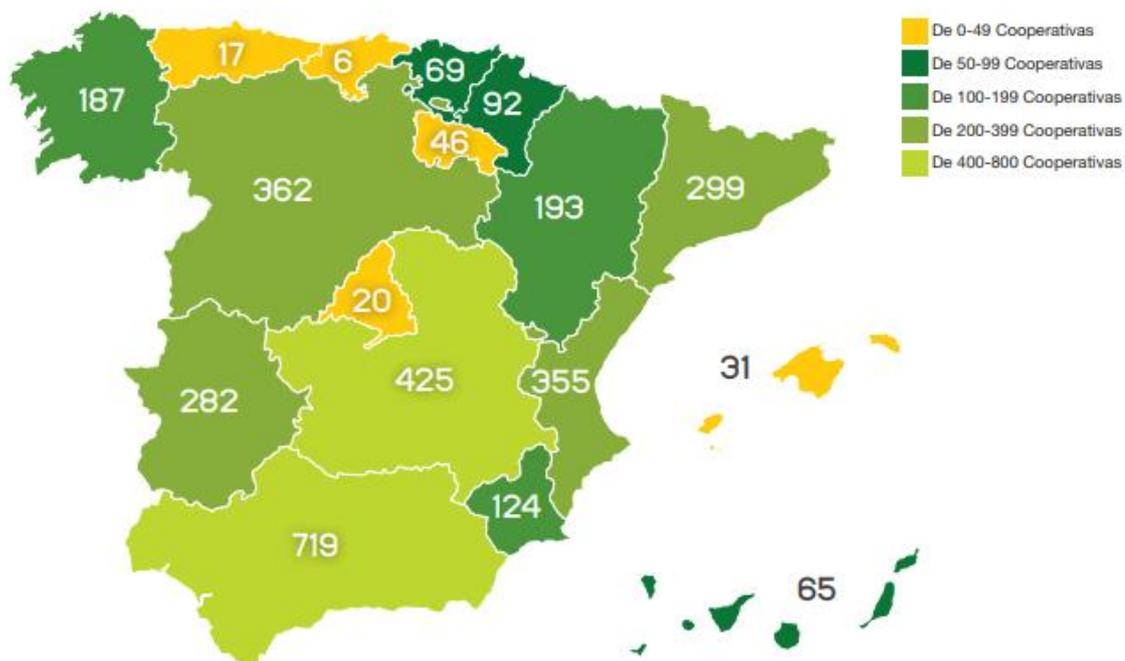


FIGURA 1.1. Macromagnitudes del cooperativismo agroalimentario Español (OSCAE, 2015).

Como podemos observar por los datos mostrados, el sector presenta una gran importancia socioeconómica en toda España y más aún en nuestra región. Pero además los consumidores cada vez están más concienciados de los beneficios que aportan las frutas y hortalizas en su dieta y salud (vitaminas, minerales y compuestos antioxidantes) y por ello son más exigentes queriendo que la fruta proporcione más seguridad y calidad.

Uno de los grandes problemas que presenta hoy en día la producción y comercialización de frutas y hortalizas es el efecto que tienen los patógenos fúngicos, que se consideran la principal causa de pérdidas de frutas y verduras frescas tanto en pre como en postcosecha (Spadaro y Gullino, 2004). A medida que la fruta madura, la susceptibilidad a los

microorganismos de deterioro aumenta, por una parte debido a que la producción de componentes antifúngicos de la fruta disminuye, y por otra parte debido a la degradación de las paredes celulares. El deterioro también se favorece en condiciones de alta temperatura y alta humedad después de la cosecha.

Por ello, en los últimos años se están buscando nuevas alternativas al uso de productos químicos sintéticos como por ejemplo agentes de control biológico. El esfuerzo se ha basado en la necesidad de reducir el uso de fungicidas sintéticos para controlar los patógenos presentes en productos agrícolas cosechados, además de favorecer al medio ambiente y la salud del consumidor (Droby y col., 2016).

### 1.1. ENFERMEDADES FÚNGICAS POSTCOSECHA EN FRUTA

La fruta es un producto perecedero que se consume mayoritariamente en fresco, por ello precisa de una tecnología adecuada para su conservación, que le permita preservar en el tiempo sus características organolépticas, así como su apariencia. Para poder conseguir estos objetivos hay que hacer frente a varios problemas, entre ellos, la pérdida de peso, las alteraciones fisiológicas y las podredumbres, siendo los mohos los principales causantes (Usall, 2008).

Un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2011) indicó que la pérdida por enfermedades fúngicas (Figura 1.2) promedio en Europa, Norte América y Oceanía son aproximadamente 29%, en comparación con un promedio de alrededor de 38% en Asia industrializada, sudeste asiático, África y América Latina (Spadaro y col., 2016).

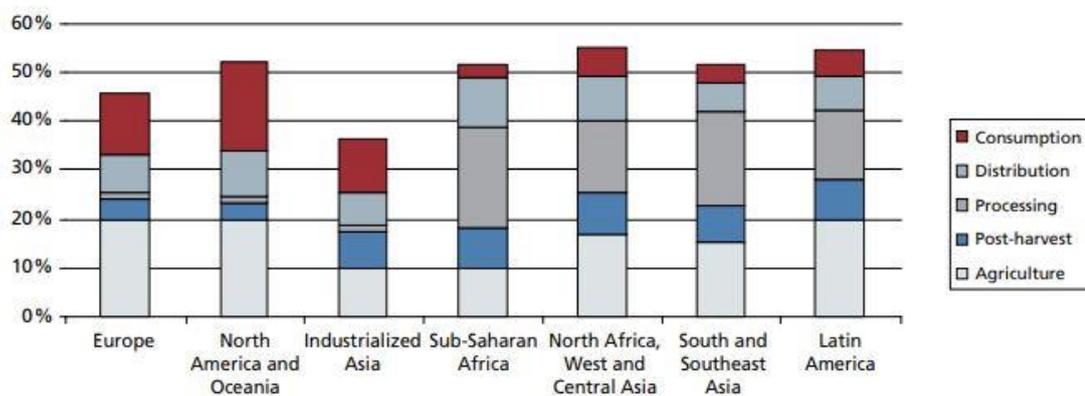


FIGURA 1.2. Pérdida de frutas y hortalizas en las diferentes etapas de la producción y comercialización (FAO, 2011)

La colonización fúngica precosecha determina usualmente el deterioro postcosecha. Algunos hongos son capaces de penetrar la cutícula intacta de las hojas, tallos y frutos. Otros organismos de deterioro entran en la fruta a través de heridas mecánicas producidas durante la cosecha, la manipulación y el envasado, o a través de aberturas naturales de la cutícula, atacando los tejidos internos. Durante la postcosecha, las frutas y verduras son susceptibles de verse afectadas por distintos microorganismos como hongos y bacterias que empeoran su rendimiento y calidad. Cuanto mayor tiempo estén los frutos almacenados, mayor será la posibilidad de que contraigan alguna de estas enfermedades, ya que la capacidad de síntesis de las sustancias naturales que los protegen frente a estas enfermedades disminuye. Algunas de las enfermedades en postcosecha más comunes son las siguientes: *Penicillium digitatum* (moho verde) y *Penicillium italicum* (moho azul), *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum*, *Phytophthora citrophthora*, *Phomopsis* spp., *Diplodia* spp., *Rhizopus nigricans* entre otros.

En las últimas décadas, las pérdidas causadas por alteraciones se han controlado mediante el uso de productos químicos de síntesis, debido a su bajo coste y comodidad de aplicación. La utilización masiva de estos pesticidas ha generado una preocupación debido al incremento de residuos en los frutos y a la aparición de cepas fúngicas resistentes.

Una de las especies más preocupantes, objeto del presente estudio, es el conocido como moho gris perteneciente a la especie *B. cinerea* ya que causa grandes pérdidas postcosecha en una amplia gama de cultivos. Algunas infecciones que ocurren en el campo permanecen inactivas durante la temporada de crecimiento y se desarrollan después de la cosecha. Las pérdidas por *B. cinerea* pueden ser muy graves, alcanzando hasta el 25% en la cosecha principal y un 89% en la fase de postcosecha (Ugoloni y col., 2014).

## **1.2. BOTRYTIS CINÉREA**

*B. cinerea* (Tabla 1.2) es un hongo fitopatógeno importante que infecta una amplia variedad de plantas y que puede hacer uso de diferentes mecanismos de infección (Benito y col., 2000).

TABLA 1.2. Taxonomía de *B. cinerea*.

<b><i>Botrytis cinerea</i></b>	
<b>División</b>	<u>Mycota</u>
<b>Clase</b>	<u>Hiphomycetos</u>
<b>Orden</b>	<u>Moniliales</u>
<b>Familia</b>	<u>Botrytidiaceae</u>
<b>Género</b>	<u>Botytis</u>
<b>Especie</b>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>

Es también conocido como podredumbre gris, debido a que produce una gran cantidad de micelio gris de apariencia polvosa. El hongo produce esclerocios (Figura 1.3) que son estructuras de resistencia, planos, duros y de color negro, que permiten que el organismo se mantenga latente en el suelo, desarrollándose sobre restos de plantas en proceso de descomposición.

FIGURA 1.3. Esclerocios de *B. cinerea*.

El desarrollo del moho gris suele comenzar en restos de plantas de otras cosechas previamente infectadas que han quedado en el área de cultivo. Puede propagarse en las

semillas infectadas con esclerocios y germina en climas húmedos a temperaturas entre los 18°C y 23°C, produciendo la infección, aunque puede crecer a bajas temperaturas de almacenamiento. Este patógeno afecta a más de 235 especies de plantas ornamentales, frutales y hortalizas. Puede atacar desde la semilla, bulbos, tallos, hojas, flores, raíces y frutos postcosecha. Se estima que alrededor del 20% de la cosecha mundial puede verse afectada por *B. cinerea* ocasionando una inversión de billones de euros anuales para su control (Plascencia y col., 2012).

*B. cinerea* se disemina por el aire, se comporta como saprófito mientras encuentra las condiciones favorables para infectar el hospedador y convertirse en patógeno (Poveda, 2006). Esta habilidad de desarrollarse como saprófito es esencial pues le permite incrementar su inóculo sin recursos de sostenimiento derivados de la patogénesis de las células huésped. La infección tiene lugar a través de heridas, de tejido muerto o en decaimiento y por penetración directa.

Este hongo es el principal alterante en frutas como uvas y fresas (Figuras 1.4 y 1.5). La fresa es altamente perecedera y susceptible a hongos y a ataques bacterianos durante el almacenamiento a temperatura ambiente. La descomposición del moho causada por *B. cinerea* es una de las principales enfermedades postcosecha que limita la vida de almacenamiento de la fresa (Parafat y col., 2015).



FIGURA 1.4. Fresas infectadas con *B. cinerea*.



FIGURA 1.5. Uvas infectadas con *B. cinerea*.

Respecto al sector vitivinícola, se ha demostrado que la infección fúngica de uvas con el hongo patógeno de plantas *B. cinerea* causa una degradación de proteínas en el vino resultante. Además, influye en las propiedades espumosas del vino (Kupfer y col., 2017).

### 1.3. MÉTODOS DE CONTROL DE *BOTRYTIS CINEREA* EN POSTCOSECHA

Como hemos mencionado anteriormente, los fitosanitarios, concretamente en este estudio fungicidas, presentan un papel importante en la producción primaria para el control de este moho. Sin embargo estos compuestos no están permitidos en la etapa postcosecha, y con ello se producen grandes pérdidas de fruta en postcosecha por enfermedades fúngicas. En la siguiente tabla (Tabla 1.3) se recogen los diez fungicidas más utilizados en la actualidad para combatir la enfermedad producida por *B. cinerea* antes de la cosecha.

TABLA 1.3. Fungicidas más utilizados para combatir *B. cinerea* (AGROTERRA, 2016)

FUNGICIDAS	FUNCIÓN
<b>FOLICUR 25 WG</b>	Fungicida sistémico de Bayer, con acción preventiva y curativa contra infecciones incipientes.
<b>CHORUS</b>	Fungicida sistémico de Syngenta con acción preventiva y curativa, resistente al lavado para el control de varias enfermedades en frutales de hueso y de pepita.
<b>SWITCH</b>	Fungicida de Syngenta de alta eficacia contra podredumbres en cultivos hortícolas, vid y frutales. Ataca al hongo en 4 momentos diferentes de su desarrollo biológico: inhibe la germinación de las esporas, el crecimiento del tubo germinativo, la penetración dentro de la planta y el crecimiento interno.
<b>CROTENE</b>	Fungicida preventivo de Cheminova de amplio espectro, de aplicación en numerosos cultivos.
<b>SCALA</b>	Fungicida sistémico de Basf diseñado especialmente para el control de la <i>Botrytis</i> . Scala posee actividad por contacto, actividad translaminar y efecto vapor. Scala inhibe la secreción de enzimas necesaria para el proceso de infección, bloqueando la absorción de elementos nutritivos por el hongo y evitando el desarrollo del tubo germinativo.
<b>SIGNUM</b>	Fungicida de Basf, eficaz para combatir un gran número de hongos en las hortalizas. Gracias a su formulación aumenta la calidad de producción, la eficiencia agronómica y la tolerancia al estrés.
<b>ERASMUS 25 EW</b>	Fungicida de Masso, capaz de controlar <i>Botrytis</i> entre otras enfermedades hace que este producto sea idóneo para la eliminación de enfermedades fúngicas.
<b>TOPSIN 70 WG</b>	Fungicida sistémico de amplio espectro de Bayer, diseñado para el control de <i>B. cinerea</i> en vid de vinificación, tomate, berenjena y arbustos ornamentales.
<b>SERENADE MAX</b>	Producto de origen natural de Bayer a base de <i>Bacillus subtilis</i> . Indicado para el control <i>Botrytis cinerea</i> .
<b>TELDOR</b>	Fungicida de Bayer, actividad contra <i>Botrytis</i> mediante la inhibición del crecimiento del tubo germinativo del hongo en la superficie de la planta y en los primeros estadios de colonización de la hoja.

Para reducir la aparición de moho gris hasta el momento se realiza principalmente mediante la aplicación de fungicidas. Sin embargo, la preocupación de los consumidores y las autoridades reguladoras sobre los riesgos asociados con los residuos químicos en los alimentos imponen unas regulaciones estrictas y la prohibición de la mayoría de los grupos químicos en la etapa postcosecha. Por ello, se ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas efectivas que reduzcan la aplicación de fungicidas convencionales. A continuación se van a explicar algunas de las más utilizadas:

### 1.3.1. Tratamientos térmicos

El curado es un tratamiento térmico en el cual el producto es sometido a temperaturas y humedades relativas altas durante varios días. La aplicación de este tratamiento ayuda a disminuir la aparición de algunas enfermedades. Por ejemplo, un estudio demostró que un curado de 48 horas a 35°C y 96% de humedad relativa son suficientes para controlar el desarrollo de *Penicillium digitatum* en heridas de naranjas Valencia (Zhang y col., 2005). Estos investigadores sugieren que los mecanismos por los cuales se controla el desarrollo del moho verde por curado podrían ser los siguientes: a) inhibición de la germinación de las esporas fúngicas debido al tratamiento b) producción de lignina en las heridas y curado de las mismas c) producción de fitoalexinas en las heridas.

Las enfermedades postcosechas limitan el periodo de almacenamiento y comercialización en el caso de los melocotones causado por podredumbre del moho azul (*Penicillium expansum*) y podredumbre de rizopus (*Rhizopus stolonifer*). Por ello un estudio buscó una alternativa a la aplicación de fitosanitarios y se basó en la combinación de un tratamiento térmico de 37°C durante dos días y la levadura *Cryptococcus laurentii* (Zang y col., 2007). Se observó que el porcentaje de heridas infectadas en los melocotones tratados era significativamente más bajo que la fruta control, por lo tanto se concluyó que el tratamiento térmico puede controlar la descomposición por el moho azul en postcosecha, la descomposición por *Rhizopus* y limitar la germinación de esporas de dichos patógenos.

Además del curado, la inmersión en agua caliente, es un método físico utilizado para lograr una sanitización superficial en vegetales. En general se trata de procesos cortos en los que los productos son tratados con agua caliente a temperaturas entre 50-70°C, dependiendo del producto a tratar (Garmendia y Vero, 2006). Hong y col. (2014), para combatir

*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Geotrichum citri-aurantii*, realizaron la inmersión en agua caliente de mandarinas para combatir estos agentes fúngicos.

Un punto importante a tener en cuenta es la calidad del agua utilizada. Si bien el gradiente de temperaturas entre el agua de tratamiento y el producto a tratar es tal que no se produce infiltración de contaminantes presentes en el agua de lavado dentro del producto, es importante que el tratamiento se realice con agua que cumpla con los requisitos de potabilidad.

### **1.3.2. Extractos naturales**

La aplicación de extractos de origen vegetal para combatir enfermedades producidas en la etapa de postcosecha presentan una serie de ventajas como por ejemplo que es un material biodegradable y por lo tanto son herramientas eficientes y seguras para reducir o eliminar mohos que presenten resistencia a algunos pesticidas. Presentan una amplia gama de modos de acción contra patógenos. Estos extractos ayudan a retrasar la alteración y con ello mejorar la producción sostenible de los alimentos

Dentro del abanico de posibilidades entre los extractos de plantas, uno de los más estudiados en el control de enfermedades de plantas es el Ecolife-40, que es el extracto de biomasa cítrica, compuesto de bioflavonoides cítricos, fitoalexinas cítricas y ácido ascórbico, que actúa por inducción de resistencia y por acción directa contra los fitopatógenos. Se ha recomendado contra bacteriosis en los cultivos de pimiento y fresa, *Botrytis* en uva, entre otras (Stadnik y Talamini, 2004). El producto está registrado como fitopatógeno en el Ministerio de la Agricultura, y posee un sello de certificación orgánica (IBD).

Otros estudios aplican extractos de ajo y aceite de clavo (Tabla 1.4) directamente o mediante exposición volátil para inhibir la descomposición causada por los patógenos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Neofabraea alba* en manzanas (Daniel y col., 2015).

En países como Nigeria se están utilizando extractos de plantas como por ejemplo ajo (*Allium sativum*) para luchar contra las podredumbres en alimentos postcosechas como cebollas y patatas para así reducir el deterioro que supone (Enyiukwu y col., 2014). Esta práctica refleja que es un método de detención de enfermedades fito-fúngicas con un bajo coste.

Como se ha comentado anteriormente con ejemplos, una manera de combatir enfermedades fúngicas es mediante extractos naturales y así evitar la utilización de productos químicos sintéticos. En la siguiente tabla 1.4 se recogen datos de distintas maneras de combatir en concreto a *B. cinerea* mediante compuestos naturales.

TABLA 1.4. Compuestos naturales para combatir *Botrytis cinerea*.

Compuesto	Efecto	Cultivo	Patógeno controlado	Referencias
Acetaldehído	Contra microorganismos de descomposición	Fresa	<i>B. cinerea</i>	Prasad y Stadelbacher .,1973
Vapor hexanal	Inhibición en el crecimiento de hifas	Manzana	<i>B. cinerea</i>	Song y col.,1996
Ácido acético	Control de producción de conidios	Manzana	<i>B. cinerea</i>	Sholberg and Gaunce., 1995
Ácido jasmónico	Inhibición de la pudrición	Fresa	<i>B. cinerea</i>	Moline y col., 1997
Fusapirona y desoxifusapirona	Actividad antimicótico	Uva	<i>B. cinerea</i>	Altomare y col., 2000
Aceites esenciales	Inhibición de la pudrición	Cereza	<i>B. cinerea</i>	Chu y col., 1999
Extractos de ajo y aceite de clavo	Inhibición de la descomposición	Manzana	<i>B. cinerea</i>	Daniel y col; 2015

### 1.3.3. Biocontrol por microorganismos antagonistas

En la actualidad, los consumidores exigen reducir el uso de pesticidas en la fruta y mejorar la protección del medio ambiente y la salud humana; por ello, ha aumentado la necesidad de desarrollar métodos de control alternativos.

Por ejemplo en Italia para combatir *B. cinerea* no se autorizan fungicidas comerciales para el control de la descomposición de las uvas de mesa después de la postcosecha; el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) es permitido como adyuvante y es efectivo para reducir el moho gris desarrollado durante el almacenamiento (Parafati y col., 2015). Sin embargo, es necesario buscar nuevas alternativas al SO<sub>2</sub> ya que puede ser un peligro para la salud humana.

El control biológico es una técnica muy utilizada en los últimos, practicada principalmente para combatir microorganismos contra levaduras, mohos y bacterias. Los posibles mecanismos de control biológico efectivos contra el deterioro de la fruta en poscosecha son competencia (por nutrientes y espacio), producción de sustancias antimicrobianas (antibióticos), parasitismo, inducción de resistencia en el tejido del huésped y

por último y en el que nos vamos a centrar en este trabajo, generación de sustancias volátiles antifúngicos (Jamalizadeh y col., 2011)

Varios estudios científicos demostraron eficacia de los agentes de control biológico (BCA) contra muchos hongos fitopatógenos postcosecha como *Penicillium*, *Botrytis* y *Monilia*, entre otros; aunque el papel funcional de la mayoría de los agentes de control biológico aún no han sido completamente explorados.

El proceso de control biológico por levaduras involucra varios mecanismos bioquímicos, incluida la capacidad de levadura para adherirse a sitios específicos de las células huésped y patógeno, para secretar enzimas específicas y sustancias antimicrobianas, para inducir resistencia al huésped y la capacidad de formar biofilms en las heridas de la superficie o para competir por nutrientes, producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos (VOCs) (Lutz y col., 2013).

Parafati y col. (2015) realizaron ensayos para inhibir a *B. cinerea* con 15 cepas pertenecientes a cuatro especies (*Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Aureobasidium pullulans*) de levaduras aisladas de vegetales mínimamente procesados y fermentados para su control biológico contra *B. cinerea*. Los ensayos *in vitro* demostraron que los aislamientos de la levadura frente al moho gris eran capaz de suprimir su acción. Las levaduras seleccionadas tenían acción de control biológico, como la competencia de hierro, producción de compuestos orgánicos volátiles, producción de enzimas degradantes de la pared celular y formación de biopelículas.

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) típicamente constituyen una mezcla compleja de compuestos lipofílicos de bajo peso molecular. Son componentes importantes de la planta fenotipo químico; hojas, flores y frutas los liberan en la atmósfera, y las raíces, en el suelo y también pueden ser producidos por microorganismos. Una de sus funciones y en la que nos centramos en este trabajo es la liberación de COV que puede actuar como sellador de heridas en frutas o inhibición en el crecimiento fúngico. En la siguiente tabla 1.5 se muestra algunos ejemplos de compuestos orgánicos utilizados en diferentes estudios.

TABLA 1.5. Compuestos orgánicos volátiles utilizados para combatir enfermedades fúngicas en postcosecha.

Espece	Efecto	Cultivo	Patógeno controlado	Referencia
Extractos fenólicos de plantas silvestres	Fungicida químicos sintéticos	Cereza dulce	<i>Monilinia</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Gatto y col.,2016
<i>Muscodor albus</i>	Producción de COV para inhibición fúngica	Manzana, melocotón y uva	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium culmorum</i> y <i>F. graminearum</i>	Mercier y col., 2005
<i>Candida intermedia</i>	Inhibición del crecimiento	Fresas	<i>Botrytis cinerea</i>	Huang y col., 2011
<i>Streptomyces spp.</i>	Inhibición del crecimiento	Cítricos, tomate y fresas	<i>Penicillium italicum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	Li y col.,2010

En base a los antecedentes mostrados, en el presente trabajo se pretende iniciar la búsqueda de métodos alternativos para el control de *B. cinerea* mediante el uso de levaduras antagonistas productoras de compuestos orgánicos volátiles.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

En el presente trabajo de investigación se pretendió identificar los compuestos responsables del antagonismo entre levaduras y mohos alterantes de frutas. Para ello se plantearon una serie de objetivos específicos:

1. Identificar a nivel de especie alrededor de 40 aislamientos de levaduras potencialmente antagonistas.
2. Analizar e identificar mediante CG-MS los principales compuestos volátiles producidos por las levaduras en medio sintético.
3. Identificar los compuestos volátiles responsables de la inhibición de mohos alterantes de frutas.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Reactivos

Los productos químicos empleados en el presente trabajo han sido de calidad reactiva y suministrada por las casas comerciales SCHARLAB, SIGMA, ACROS, PANREAC, PROLABO y MACHEREY-NAGEL.

##### 3.1.2. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para las distintas pruebas microbiológicas fue:

-Agar Dextrosa Patata (PDA): para su preparación se necesita 39 g de polvo en un litro de agua purificada y llevar a ebullición. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. No sobrecalentar. Una vez terminada la esterilización en autoclave, se le añade ácido tartárico al 10% (VWR PROLABO). Por último, lo dejamos enfriar y lo repartimos en las placas aproximadamente 20-25 mL por placa.

##### 3.1.3. Instrumentación

- Los medios de cultivo y otras pesadas rutinarias se realizaron en una balanza METTLER TOLEDO mod.B2002-S de precisión  $\pm 0,01$  g y en una balanza METTLER TOLEDO mod. AB54-S de precisión  $\pm 0,0001$  g.
- Los medios de cultivo se prepararon en agitadores magnéticos SELECTA con calefacción, mod. AGIMATIC-E.
- La esterilización de los medios de cultivo, soluciones y material de laboratorio se realizó en un autoclave SELECTA mod. PRESOCLAVE 75.
- Las siembras de microorganismos se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar TELSTAR mod. AH-100.
- Los microorganismos y reactivos se conservaron en cámaras frigoríficas a 4°C, frigoríficos ZANUSSI mod. TROPIC SYSTEM y WHIRPOOL y un congelador vertical ELCOLD mod. Lab -85.

- Para la realización de las diluciones se usaron micropipetas BIOHIT de 5-20  $\mu\text{L}$ , 50-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$  y micropipetas PLURIPET KARTELL de 0,5-2  $\mu\text{L}$  y de 2-20  $\mu\text{L}$ .
- Para el recuento de microorganismo se usó un microscopio óptico OLYMPUS mod. CX40 y complementado con una cámara Neubauer.
- Para precipitar microorganismos y componentes celulares se empleó una centrifuga refrigerada EPPENDORF Centrifuge 5810 R.
- Las incubaciones necesarias para la extracción del ADN se realizaron en un bloque térmico SELECTA y para la realización de la PCR se utilizó un termociclador MYCYCLER, marca BIORAD.
- Para fotografiar las imágenes y los geles de agarosa se utilizó un transiluminador marca SYNGENE mod. GeneGenius.
- Además, se utilizó diverso material de uso general de laboratorio, como matraces, probetas, asa de siembra, tubos Falcon, placas de Petri, etc.

#### **3.1.4. Material biológico**

Los aislamientos de levaduras utilizadas en este estudio provinieron del estudio de Villalobos y col. (2014). Estos microorganismos epifitos fueron aislados de distintas variedades de higos y brevas (*Ficus carica* L.) almacenadas en distintas atmosferas modificadas y a distintos tiempos de almacenamiento. Se utilizaron un total de 32 aislamientos. Todos los aislamientos estaban conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  criogenizados en 50% de glicerol.

La cepa de *B. cinerea* utilizada en el presente estudio proviene de la colección de cultivos del grupo de investigación Calidad y Microbiología de los Alimentos (CAMIALI) de la Escuela de Ingenierías Agrarias. Del mismo modo que las levaduras, la cepa de *B. cinerea* estaba criogenizado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2. MÉTODOS**

#### **3.2.1. Manejo y conservación de microorganismos**

Todas las cepas de levaduras fueron sembradas por duplicado en PDA para el trabajo diario y conservadas a temperatura ambiente. En cada placa se sembraron entre 1 o 2 aislamientos de levaduras debidamente identificadas para poder simplificar el

trabajo al manipular el gran número de levaduras. Las placas se incubaron a 20°C durante 48 horas. Cada semana se llevaba a cabo un mantenimiento de las cepas y eran resembradas en nuevos medios (Figura 3.1).

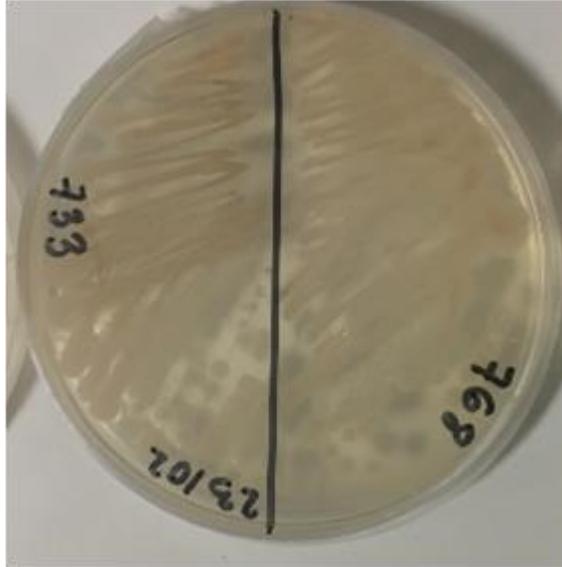


FIGURA 3.1. Siembra y manejo de los aislamientos de levaduras en placas de PDA.

En el caso del moho utilizado, *B. cinerea*, la siembra se realizó a 20°C en placas de PDA hasta que el micelio presentó síntomas claros de esporulación.

Todas las placas eran selladas con parafilm a efectos de evitar contaminaciones y las distintas manipulaciones se ejercían en la mayor esterilidad posible junto a mecheros bunsen.

### 3.2.2. Identificación de levaduras a nivel de especie

#### - Extracción de ADN de levaduras

Para la identificación de las cepas de levaduras se utilizó el método de lisis de una colonia descrito por Hamby y col. (2012) para la extracción del ADN. Se sembraron inicialmente todas las levaduras y pasados unos 4 días aproximadamente, se llevó a cabo la extracción del ADN que constó de los siguientes pasos:

- Resuspender una colonia aislada de la levadura ayudados de un mango de inoculación en 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O desionizada y estéril en un microtubo.
- Calentar en termobloque durante 10 min a 100°C.

- Enfriar inmediatamente en hielo durante 2-3 min.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 2 min.

Una vez terminado los pasos anteriores se obtiene el ADN libre en el sobrenadante.

#### - PCR y secuenciación

Una vez obtenidos el ADN de los distintos aislamientos de las levaduras, se llevó a cabo una PCR para amplificar la región ITS1-5,8S ARNr-ITS2 con los cebadores ITS1 e ITS4 (White y col., 1990). Las secuencias de los dos cebadores utilizados se detallan en la siguiente tabla 3.1.

TABLA 3.1. Secuencia de los cebadores usados para las distintas PCRs.

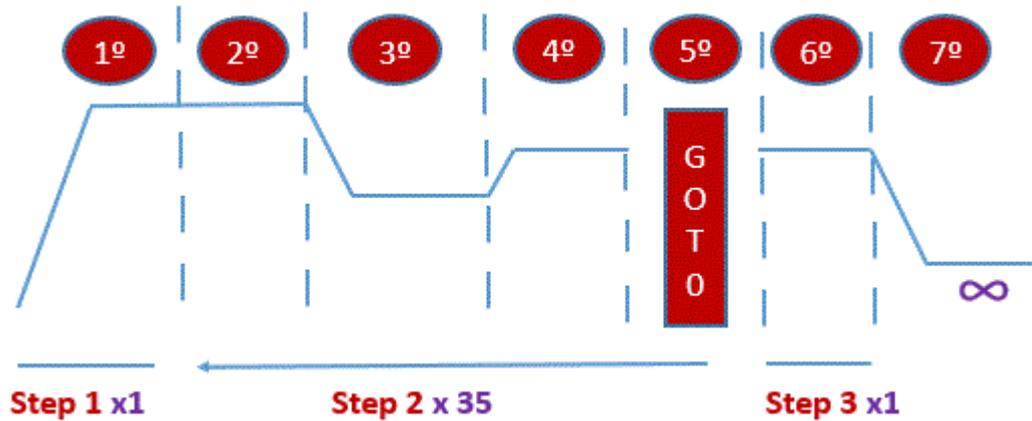
CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	REFERENCIA	REGION AMPLIFICADA
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White y col., 1990	ITS1-5,8S ARNr-ITS2
ITS4	5'-TCCTCCGCTATTAGATATGC-3'	White y col., 1990	ITS1-5,8S ARNr-ITS2

Para la reacción del PCR con los cebadores ITS1 e ITS4 los reactivos y volúmenes fueron los siguientes (Tabla 3.2):

TABLA 3.2. Cantidades por reacción para la preparación de la PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen 1x
ADN	10-100 ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L
ADN pol	5U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L
dNTPs	10 mM	1 $\mu$ L
Buffer de reacción	10x	5 $\mu$ L
ITS1	10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
ITS4	10 $\mu$ M	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	Calidad PCR	40 $\mu$ L
<b>TOTAL</b>		<b>50<math>\mu</math>L</b>

Después se llevó a cabo la reacción PCR en un termociclador MYCYCLER, marca BIORAD con el siguiente programa (Figura 3.2):



1º. 95°C, 3:00 (desnaturalización inicial)
2º. 95°C, 1:00 (desnaturalización)
3º. 55°C, 1:00 (iniciación)
4º. 72°C, 1:30 (hibridación)
5º. 35x GOTO
6º. 72°C, 10:00 min
7º. 12°C, ∞
<b>Tiempo de duración: 2:55:00</b>

FIGURA 3.2. Programa PCR utilizado para amplificar el fragmento ITS1-5,8S ARNr-ITS4.

Una vez realizadas las PCRs se procedió a su visualización; para ello se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó tampón de carga 1x suplementado con bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{l/ml}$  (p/v) para la visualización del ADN (Maniatis y col., 1982).

Se procedió a cargar en cada pocillo 10  $\mu\text{L}$  del producto de las PCR y 3  $\mu\text{L}$  de tampón de carga con azul de bromofenol y se empleó una corriente constante de 90 V durante 1,5 horas (Figura 3.3). El gel fue visualizado en el transiluminador SYNGENE



FIGURA 3.3. Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez visualizados, estos fueron mandados a secuenciar a la Unidad de Secuenciación de ADN, de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron editadas con el programa informático Chromas Pro versión 1.49 Beta. Posteriormente, las secuencias fueron cotejadas con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information utilizando el algoritmo BLAST. Las identificaciones de especie se consideraron correctas cuando se obtuvo más de un 98% de similitud.

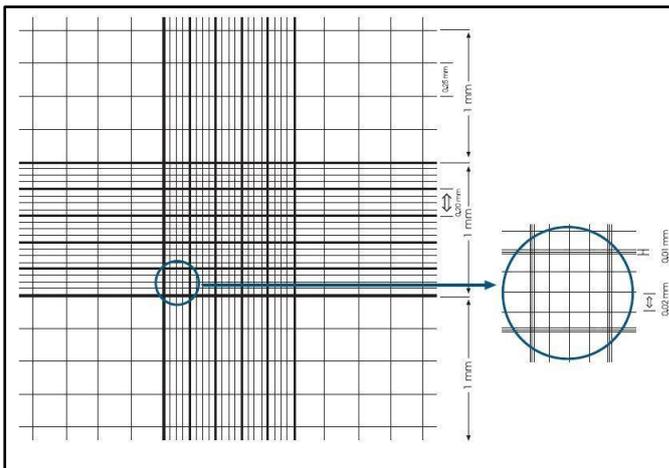
### 3.2.3. Enfrentamiento levaduras-*Botrytis cinerea* in vitro

Todas las operaciones se realizaron en esterilidad en la campana de flujo laminar debidamente desinfectada. Se irradiaba la zona de trabajo con luz ultravioleta durante varias horas y posteriormente se limpiaba con etanol al 70%.

#### - Preparación de los inóculos de mohos

El cultivo del moho (*B. cinerea*) una vez crecido en el medio de PDA y con síntomas evidentes de total esporulación, se vertió el contenido completo de la placa (medio de cultivo + moho) en una bolsa de Stomacher con filtro y se añadió 100 mL de agua estéril con Tween 80 (Scharlab) (agente tensoactivo, para facilitar que se disuelvan las esporas) al 0,05% (v/v), después se masajeó el agar para favorecer el paso de las esporas al líquido, y por último se vertió el líquido de las esporas a un tubo de Falcon y se conservó en el frigorífico hasta su utilización.

Una vez obtenido la solución con las esporas, se realizó el conteo de las mismas con el objetivo de determinar la concentración de esporas de nuestro moho en cuestión, pudiendo así normalizar posteriormente la siembra del moho a la concentración deseada. La concentración se determina en el microscopio con una cámara de Neubauer (Figura 4.4), que es un portaobjetos modificado cuya superficie presenta grabadas unas líneas a modo de cuadrícula que permiten el conteo de microorganismos con el objetivo de hacer una estimación de la cantidad que hay de los mismos.



Se realiza el conteo de las esporas que hay en tres cuadrados, como el que se observa en la figura 3.4 y se determina su concentración mediante la siguiente fórmula:

FIGURA 3.4. Ilustración de la composición de una cámara Neubauer.

$$N^{\circ} \text{ esporas/ml} = \frac{N^{\circ} \text{ celulas}}{0,04\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} \times 0,001\text{ml/mm}^3} \quad (\text{Ec.3.1})$$

Después se procedía a realizar una disolución con una concentración de  $10^6$  esporas/mL para los distintos ensayos del trabajo.

#### - Preparación de los inóculos de levaduras

La preparación de la muestra de los inóculos de las levaduras se llevó a cabo con un método distinto. Se cogió una muestra de levadura crecida a temperatura ambiente en agar PDA con el asa de siembra y se resuspendió en un microtubo que contenía 500  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril hasta conseguir un grado de turbidez de  $\text{DO}_{600} \approx 1,5$ .

A continuación se explica el procedimiento de los enfrentamientos.

#### - Ensayo *in vitro* para la detección de levaduras antagonistas productoras de VOCs antifúngicos.

Los enfrentamientos se realizaron en sistemas de doble placa de medio PDA. Inicialmente se marcaban las distintas placas y se rotulaban para poder diferenciar los distintos enfrentamientos. Para realizar los enfrentamientos se partía de los inóculos de esporas de *B. cinerea* y levaduras explicados anteriormente.

1°. En el centro de una placa de PDA se procedía a inocular con la ayuda de una micropipeta una alícuota de 10  $\mu$ L de la solución de esporas preparada previamente a una concentración de  $10^6$  esporas/mL (Figura 3.5).

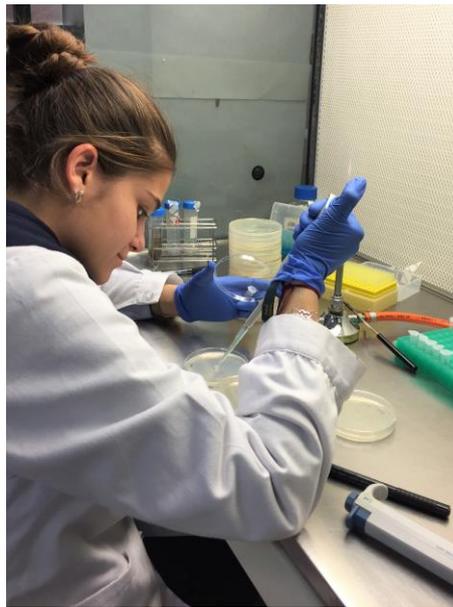


FIGURA 3.5. Inoculación de esporas

2°. Se inoculaban 100  $\mu$ L de la solución de levaduras previamente preparada ( $DO_{600} \approx 1,5$ ) y se extendía por la placa para conseguir un crecimiento a modo de césped con un asa de siembra digralsky.

3°. Por último se enfrentaban las dos placas de PDA (desechando las cubiertas de las placas de Petri), una de ellas con la levadura y otra con el moho (Figura 2.6), poniendo siempre la placa de PDA con el moho en la parte inferior del enfrentamiento para evitar su desplazamiento de la alícuota y así poder observar con más exactitud el crecimiento que tiene el moho frente a la levadura, este proceso se realizó por triplicado. Todo ello, se sellaba con parafilm y se realizaban cuatro perforaciones en el ecuador de las dos placas con la ayuda del asa de siembra incandescente para crear un entorno aerobio en el interior y así descartar que la falta de oxígeno o exceso de  $CO_2$  sea la

causa de la inhibición o reducción en el crecimiento de *B. cinerea*. Este proceso se realizó por triplicado.

Como controles se prepararon sistemas de doble placa de PDA sólo con el moho (*B. cinerea*) para poder evaluar el efecto de los volátiles producidos por la levadura sobre el moho.

Todos los enfrentamientos en sistemas de doble placa fueron incubados a 20°C hasta que el diámetro del micelio de *B. cinerea* cubría completamente la placa (85 mm de diámetro). Se realizó un seguimiento de todos los enfrentamientos periódicamente (Figura 3.6) consistente en medir el diámetro del desarrollo del moho con la ayuda de una regla.

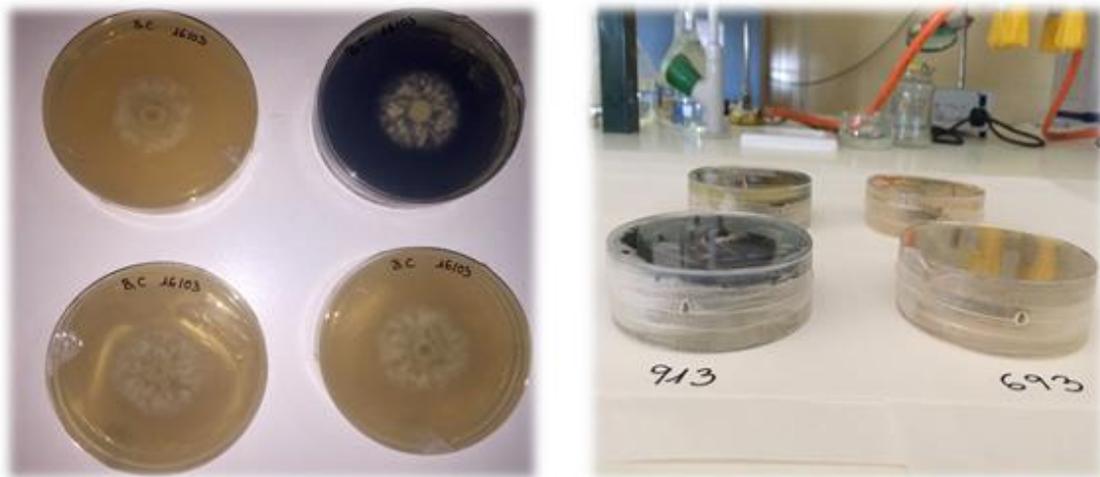


FIGURA 3.6. Enfrentamientos en sistemas de doble placa levadura/*Botrytis cinerea* y con perforaciones en los lados.

#### 3.2.4. Determinación de los compuestos volátiles

**Extracción de compuestos volátiles.** Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó una fibra de microextracción en fase sólida de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro de carboxen-polidimetilxilosano (Ruiz y col., 1998).

**Análisis de los compuestos volátiles mediante CG-MS.** Tras la extracción de los volátiles la fibra fue inmediatamente llevada al inyector del cromatógrafo de gases para el análisis de los volátiles captados. Las condiciones cromatográficas empleadas

para la separación de los compuestos volátiles se exponen a en la siguiente tabla (Tabla 3.3).

TABLA 3.3. Condiciones cromatografías empleadas para la separación de compuestos volátiles.

<b>Temperatura inicial del horno</b>	<b>Rampa de temperatura</b>	<b>Temperatura de la interfase</b>
	4°C/min hasta 150°C	
35°C / 5 min	20°C/min hasta 250°C	280°C
	250°C - 5 min	

Para la obtención del espectro de los distintos compuestos volátiles las condiciones del detector selectivo de masas fueron las siguientes (Tabla 3.4):

TABLA 3.4. Condiciones del detector de masas empleadas.

<b>Impacto electrónico (eV)</b>	<b>Electrón multiplicador voltio (emv)</b>	<b>Recogida de datos (scan/seg)</b>	<b>Rango de iones</b>
70 eV	1756 V	1 scan/seg	30-300

La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante su espectro de masas así como por su índice de Kovats calculado a partir del tiempo de retención del pico con respecto al de los patrones de alcanos.

### 3.2.5 Análisis de los resultados y tratamiento estadístico

Una vez realizados los enfrentamientos por triplicado levaduras/*B. cinerea* las placas fueron incubadas a 20°C, para comenzar con las mediciones del moho y registrar el crecimiento que iba teniendo frente a la levadura, siempre teniendo como referencia el control. Las mediciones se realizaron con la ayuda de una regla (mm) y los datos se iban introduciendo en una tabla de Excel para representarlos gráficamente y determinar la tasa de crecimiento. Por cada enfrentamiento y día se realizaron dos mediciones de diámetro del moho.

Con los valores obtenidos de las medidas de diámetro del moho a lo largo de los días de incubación se realizó un gráfico de dispersión (valores resultantes de los dos experimentos por triplicado) con al menos tres días de mediciones. La tasa de crecimiento de *B. cinerea* en cada enfrentamiento se calculó tras obtener la ecuación de la representación mediante los gráficos de dispersión del crecimiento radial a lo largo de los días. En todos los casos la ecuación correspondía a un modelo lineal  $R^2 \geq 0,90$ . La pendiente de estas ecuaciones representa la tasa de crecimiento expresada en mm de crecimiento por día (mm/día). Finalmente los resultados se mostraron y discutieron como variación de las tasas de crecimiento respecto al control, calculadas de la resta de la tasa de crecimiento del control menos la tasa de crecimiento del enfrentamiento. Valores positivo indican un mayor tasa de crecimiento de *B. cinerea* mientras que valores negativos indican una disminución en la velocidad del crecimiento del moho.

Con las ecuaciones obtenidas también se calculó el periodo de latencia (expresado en días), como el periodo necesario para que el moho comience su crecimiento lineal. Para ello, la variable “y” (crecimiento del moho en mm) se igualó a 0. Con ello calculamos los días necesarios para el comienzo del crecimiento. Finalmente los resultados se mostraron y discutieron como variación del periodo de latencia respecto al control. El cálculo se realizó: periodo de latencia de *B. cinerea* en cada enfrentamiento menos el periodo de latencia del moho control. Valores positivos indican un retraso en el inicio del crecimiento de *B. cinerea* mientras que los valores negativos indican que *B. cinerea* comenzó a crecer antes.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistic 21. El porcentaje de reducción de crecimiento se evaluó mediante un análisis de varianzas (ANOVA) de una y dos vías.; la comparación de las medias se llevó a cabo mediante el Test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

La relación entre variables fue evaluada mediante el análisis de componentes principales, mientras que la correlación entre variables fue estimada con el test de Pearson con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Para el manejo y ordenación de los datos se usó el programa EXCEL versión 2007.

# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS A NIVEL DE ESPECIE

En el presente trabajo se han utilizado un total de 32 aislamientos de levaduras procedentes de higos y brevas. Estos aislamientos fueron identificados mediante la secuenciación y comparación en la base de datos GenBank del fragmento de ADN ITS1-5,8S ADNr-ITS4. En la siguiente tabla (Tabla 4.1) se muestra el código del aislamiento, el nombre de la especie identificada, el número de acceso con el que se ha comparado en la base de datos GenBank y el porcentaje de coincidencia con el número de acceso. Como se puede observar, las identificaciones resultaron en diferentes tipos de especies; en concreto 5, denominadas *Aureobasidium pullulans*, *Vishniacozyma carnescens*, *Candida carpophila*, *Filobasidium oeirense* y *Hanseniaspora uvarum*. La especie más abundante entre los aislamientos identificados fue *Aureobasidium pullulans* con un 78,13%, seguido de *Vishniacozyma carnescens* (6,25%), *Filobasidium oeirense* (6,25%), y por último *Hanseniaspora uvarum* (3,13%) y *Candida carpophila* (3,13%).

TABLA 4.1. Identificación de los aislamientos de levaduras utilizados.

Código cepa	Especie	Número de acceso	% identificación
153	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JF439462.1	100%
156	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
191	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869959.1	100%
209	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869959.1	100%
283	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KY294714.1	100%
298	<i>Filobasidium oeirense</i>	KX067801.1	99%
327	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
352	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
366	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
390	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JX462673.1	100%
398	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
408	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX664386.1	100%
475	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JX188099.1	99%
497	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JX462671.1	100%
619	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KY294714.1	100%
632	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
665	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
677	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
693	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
714	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
733	<i>Aureobasidium pullulans</i>	JX188093.1	99%
768	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KY294714.1	100%
781	<i>Filobasidium oeirense</i>	NR077106.1	99%
793	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	KY103573.1	99%
803	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
818	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	LC203729.1	99%
840	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
861	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KY294714.1	100%
874	<i>Candida carpophila</i>	KP131681.1	99%
913	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KX869960.1	100%
928	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	KY105817.1	100%
973	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KY294714.1	100%

En los últimos años se han realizado diferentes estudios para caracterizar la población de levaduras en fruta. Algunas de las especies identificadas en nuestro trabajo coinciden con las previamente identificadas en frutas. En el estudio de Hamby y col. (2012) identificaron *Hanseniaspora uvarum* como especie de levadura predominante en cerezas y otras frutas. En el estudio realizado por Seradilla y col. (2013) la especie *Aureobasidium pullulans* se encontraba mayoritariamente en la superficie de la fruta.

Como hemos dicho anteriormente, la identificación se obtuvo mediante la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information utilizando el algoritmo BLAST. Todas las cepas tienen asignado un número de acceso que es un registro que contiene la secuencia y anotaciones. El número de acceso es un identificador único. La mayoría de las identificaciones presentaron un 100% de coincidencia con los números de acceso presentes en la base de datos. Sin embargo, algunos aislamientos presentaron pequeñas diferencias en las secuencias del fragmento ITS1-5,8S ADN<sub>r</sub>-ITS4. Estos aislamientos fueron los que presentaron los códigos 298, 475, 733, 781, 793, 818 y 874; todos ellos se identificaron con una coincidencia del 99%. Estos aislamientos que no obtuvieron un 100% de homología fue debido a alguna diferencia en la secuencia de nucleótidos respecto al número de acceso al cual las hemos asociado. Estas diferencias las podemos observar en la siguiente tabla (Tabla 4.2).

TABLA 4.2. Diferencia en la secuencia genómica entre los aislamientos y el número de acceso.

Cepa	Posición	Descripción
<b>298</b>	527	Sustitución de una adenina por guanina
<b>475</b>	461	Sustitución de una adenina por guanina
<b>733</b>	462,463	Delección de un nucleótido
<b>781</b>	19	Inserción de una timina
<b>793</b>	170	Delección de una timina
<b>818</b>	49	Inserción de una adenina
	56	Sustitución timina por citosina
	82	Sustitución timina por adenina
	367	Sustitución citosina por timina
	385,386	Sustitución guanina y timina por adenina y citosina
	430	Sustitución adenina por guanina
<b>874</b>	155	Delección de 7 nucleótidos

Estas diferencias en la secuencia genómica de las levaduras pueden suponer una ventaja a la hora de identificar estas cepas, y en el caso de tener capacidad antagonista, ser utilizadas como marcador molecular que permita su identificación cuando sean utilizadas.

En la siguiente figura (Figura 5.1) se observan los diferentes tipos de levaduras empleadas en este trabajo tras su crecimiento en medio PDA, donde también se puede observar que cada especie tiene una morfología diferente. La imagen A: es un

aislamiento de *Vishniacozyma carnescens*, imagen B es una *Candida carpophila*, C: es una *Filobasidium oeirense*, D: *Hanseniaspora uvarum*, y por último la imagen E: es una *Aureobasidium pullulans*.

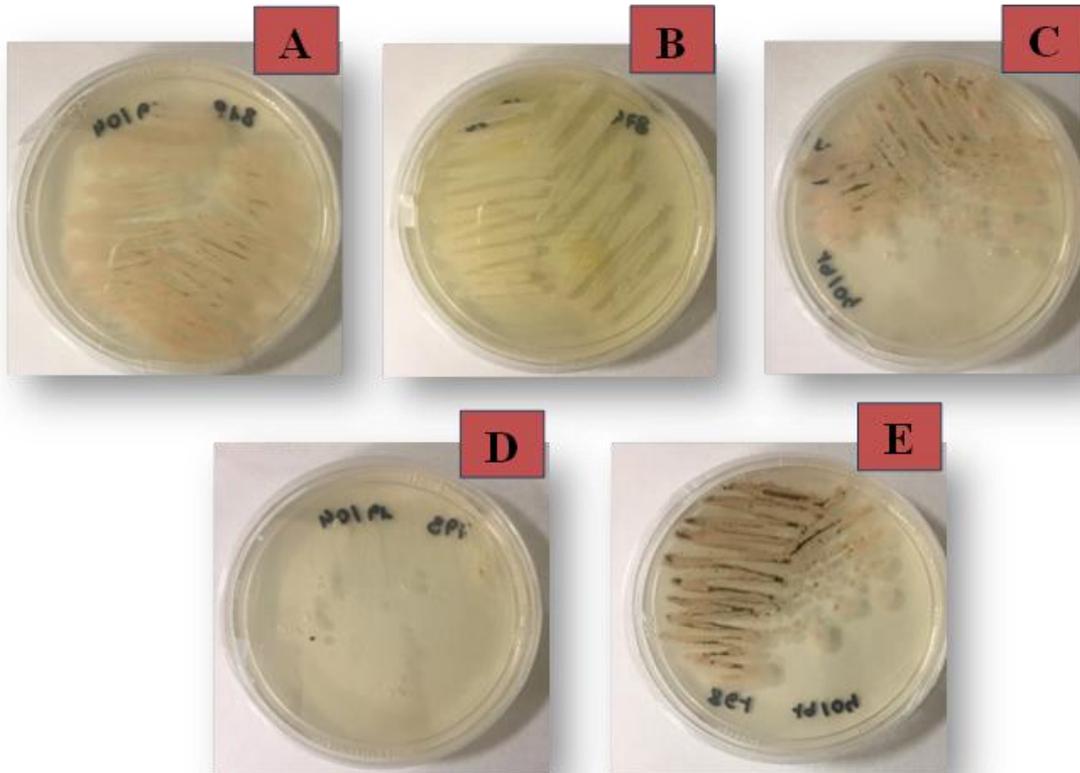


FIGURA 4.1. Imágenes de los tipos de crecimiento de las diferentes especies de levaduras en medio PDA crecidas a 25°C durante 3-5 días. A) *Vishniacozyma carnescens*; B) *Candida carpophila*; C) *Filobasidium oeirense*; D) *Hanseniaspora uvarum*; y E) *Aureobasidium pullulans*.

Por otro lado los cultivos en medio PDA han mostrado diferentes morfologías dentro de la misma especie. En la siguiente figura (Figura 4.2) la imagen A, B y C pertenecen a la especie *Aureobasidium pullulans*, pero se puede observar como cada una tiene una morfología diferente. En este estudio hemos utilizado muchas cepas de esta especie ya que se encuentra de manera habitual en el ambiente (suelo, polvo, superficie de otras plantas) y es por ello que puede aparecer en alta probabilidad en la superficie de cualquier cultivo y actuar como biocontrol de enfermedades.

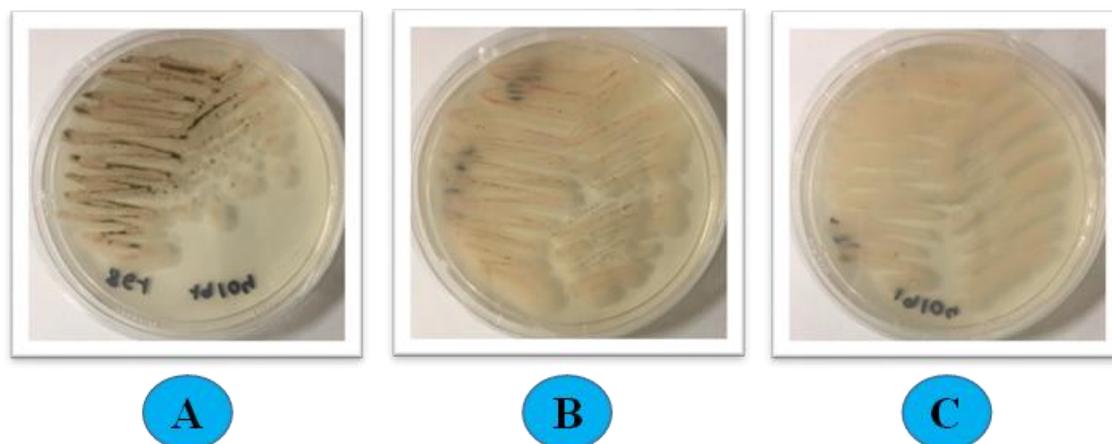


FIGURA 4.2. Diferentes tipos de morfología de *Aureobasidium pullulans* crecidas en medio PDA a 25°C durante 3-5 días.

Las morfologías que presenten las levaduras en medios de cultivo específicos también pueden ser una herramienta discriminadora para la identificación de levaduras antagonistas en caso de su utilización tanto en experimentos como en una fase comercial. Para ello debe tener una morfología muy característica y diferente a otras especies.

#### 4.2. ENFRENTAMIENTO LEVADURAS-BOTRITIS CINEREA IN VITRO

Para determinar el efecto de las levaduras sobre el moho se realizaron mediciones periódicas del crecimiento radial de *B. cinerea* tras los enfrentamientos con las levaduras. Como se muestra en la siguiente figura (Figura 4.3), en la que se representa el crecimiento de *B. cinerea* cuando no se enfrentó a ninguna levadura, el crecimiento del mismo presentó un modelo lineal ( $R^2=0,8874$ ). Esta representación también permitió determinar que la tasa de crecimiento del moho en condiciones óptimas de crecimiento fue de 11,614 mm/día, velocidad algo superior a los 9,50 mm/día obtenidos por Capilla (2017). Una vez obtenidos los datos de crecimiento por día del moho en cuestión se pasó a estudiar el efecto que las levaduras producían sobre el crecimiento de *B. cinerea* y observar con ello si se producía un efecto de control debido a la generación de VOCs.

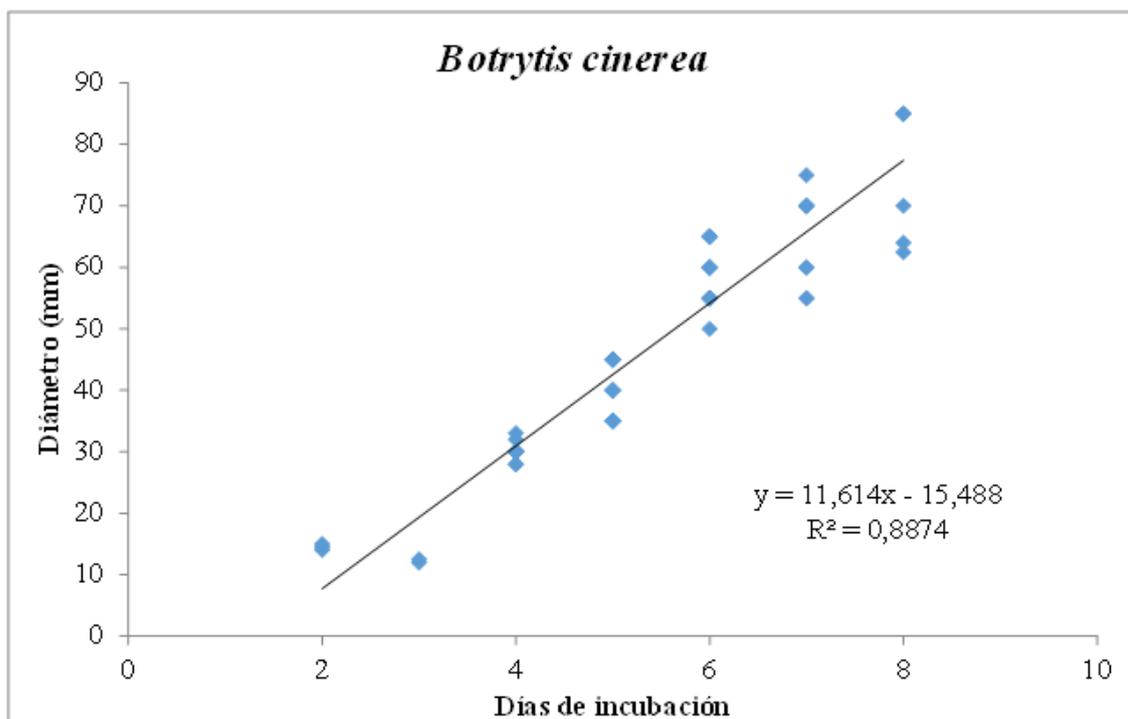


FIGURA 4.3. Gráfica de la tasa de crecimiento (mm/día) de *B. cinerea* representando el crecimiento radial-diámetro (mm) frente a días de incubación, en medio PDA (sistema de doble placa) a 25°C.

En la siguiente tabla (Tabla 4.3) se recogen todas las tasas de crecimiento tanto para el *B. cinerea* sin confrontación con levaduras, como para las confrontaciones con las levaduras expresadas como diferencia respecto al control. En la tabla se puede observar que la tasa de crecimiento para el *B. cinerea* en las confrontaciones con las levaduras se ajustan a modelos lineales ( $R^2 \geq 0,90$ ). Las tasas de crecimiento (mm/día) del enfrentamiento del moho en las diferentes levaduras presentan, en general, pocas modificaciones en las diferentes confrontaciones. Ninguna levadura tuvo el efecto de incrementar la velocidad de crecimiento de *B. cinerea* sensiblemente, siendo la confrontación con la levadura 153 la que mayor incremento se obtuvo (0,49 mm/día). Sin embargo un total de 10 levaduras provocaron la disminución de la tasa de crecimiento del moho en valores superiores a 2 mm/día. Estas cepas fueron: 156, 497, 619, 733, 768, 781, 793, 803, 818 y 874. La cepa que más disminuyó la velocidad de crecimiento de *B. cinerea* fue la 793 de la especie *Hanseniaspora uvarum*, reduciendo el crecimiento en 7,59 mm/día respecto al control.

TABLA 4.3. Parámetros de crecimiento de todas las confrontaciones *Botrytis*-levadura estudiados.

Microorganismo	$\Delta$ tasa crecimiento (mm/día)	R <sup>2</sup>	$\Delta$ latencia (días)
<i>Botrytis cinerea</i> (Control)	11,61	0,89	1,33
153	0,49	0,99	-0,64
156	-2,77	0,96	-0,50
191	0,05	0,99	-0,47
209	-0,78	0,98	-0,17
283	-1,64	0,98	-0,92
298	-0,36	0,98	-0,17
327	-1,71	0,99	-0,92
352	-0,98	0,98	0,03
366	0,03	0,99	-0,48
390	-1,81	0,91	-1,13
398	-0,78	0,97	-0,63
408	-1,60	0,96	-1,00
475	0,05	1,00	-0,44
497	-3,05	0,96	-0,22
619	-2,17	0,94	-1,06
632	-0,44	0,89	-0,60
665	-0,52	0,96	0,03
677	-1,15	0,97	<b>0,23</b>
693	-1,71	0,98	-0,92
714	-1,71	0,98	-0,93
733	-2,69	0,97	-0,52
768	-3,05	0,93	-0,27
781	-2,59	0,90	-0,07
793	<b>-7,59</b>	0,96	<b>0,51</b>
803	-2,69	0,94	-0,73
818	-2,52	0,99	-0,57
840	-1,45	0,95	0,10
861	-1,29	0,96	0,03
874	-2,47	1,00	-0,29
913	-1,81	0,97	-0,09
928	-1,65	0,98	-0,93
973	-1,29	0,99	-0,11

\*El valores para *B. cinerea* (muestra control) son valores absolutos.

Los valores para los enfrentamiento con las levaduras representan valores relativos respecto a la diferencia con el control.

También se compararon los datos obtenidos de los periodos de latencia (Tabla 4.3), ya que los enfrentamientos pudieron tener incidencia en los tiempos necesarios para la germinación de las esporas del moho. El periodo de latencia se define como el

tiempo necesario para que las esporas comiencen a germinar y con ello empiece el desarrollo del micelio. Como se puede observar en la tabla, el periodo de latencia de *B. cinerea* sin enfrentarse a ninguna levadura en medio PDA e incubado a 25°C fue de 1,33 días. No sólo es interesante que las levaduras sean capaces de hacer que *B. cinerea* crezca más lentamente, sino que es igualmente deseable que retrasen la germinación de las esporas. Las cepas que más retrasaron la germinación y con ello aumentaron el periodo fueron la 677 (*Aureobasidium pullulans*), retrasando la germinación de las esporas en 0,23 días, y 793 (*Hanseniaspora uvarum*), retrasando la germinación en 0,51 días.

Para determinar cuál es la levadura que más inhibe el crecimiento enfrentadas al *B. cinerea* se relacionó la tasa de crecimiento con el periodo de latencia y la cepa que más reducción y efecto tuvo fue la 793 (*Hanseniaspora uvarum*) ya que redujo la velocidad de crecimiento y aumento el periodo de latencia del moho. A diferencia de la 677 (*Aureobasidium pullulans*), que retrasó la germinación de *B. cinerea* (control) pero la tasa de crecimiento (mm/día) no disminuyó respecto al control y por ello la cepa 677, no es una cepa idónea para utilizar como biocontrol para la reducción del *B. cinerea*.

En nuestro trabajo evaluamos la influencia de la posible generación de VOC por diferentes aislamientos de levaduras sobre el crecimiento radial de *B. cinerea*. En la siguiente tabla (Tabla 5.4), se recoge el crecimiento medio del micelio en medio PDA de *B. cinerea* que osciló entre 26,91 mm a los 4 días de incubación y 58,12 mm a los 7 días de incubación, lo que supone un crecimiento medio de 11,69 mm/día cuando no se enfrentó a ninguna levadura, en medio PDA e incubado a 25°C.

En la misma tabla se recogen los valores medios del porcentaje reducción del crecimiento radial frente a *B. cinerea* durante los días de incubación y los valores de reducción media totales, así como los valores de reducción media globales en las diferentes confrontaciones con levaduras. Si nos fijamos en los datos globales, en los que se evalúa el efecto global de todas las levaduras sobre *B. cinerea*, podemos comprobar que la reducción del crecimiento es más acusada ( $P < 0,05$ ) en los primeros días de incubación (16,16% en el día 4) mientras que en el día 7 prácticamente no hay reducción del crecimiento de *B. cinerea* (1,95%). Observaciones muy similares fueron obtenidas por Capilla (2017), cuando evaluó la influencia de otros aislamientos de levaduras sobre el mismo moho. Esto puede ser debido no sólo a la producción de VOC

si no al consumo de oxígeno y producción de CO<sub>2</sub> por las levaduras, que pueden modificar la atmosfera, especialmente en los primeros días; y que tras un periodo de adaptación el moho *Botrytis* recupere el crecimiento normal.

En cuanto a los valores de reducción de los enfrentamientos individuales, en negrita aparecen resaltados aquellos que producen una reducción significativa ( $P < 0,05$ ), bien en alguno de los días de incubación o bien por su efecto durante todo el experimento. En cuanto a los valores de reducción media totales se situaron entre 1,23% del aislamiento 768 a 39,32% del aislamiento 793. Además se constató que *Botrytis cinerea* mostró una notable sensibilidad a la confrontación con los compuestos generados por las levaduras, siendo así que 15 de los 32 aislamientos ensayados tuvieron efecto significativo ( $P < 0,05$ ) en la reducción del crecimiento micelial, lo que supone que tuvieron efecto sobre el crecimiento de este moho el 46,87% de los aislamientos ensayados. En la investigación de Capilla (2017) de los 41 aislamientos ensayados sólo 5 (12,19%) redujeron el crecimiento radial de *B. cinerea* durante el ensayo. Los aislamientos capaces de reducir significativamente el crecimiento del moho en nuestro ensayo fueron los siguientes: 156, 298, 352, 398, 497, 714, 781, 793, 818, 840, 861, 874, 913, 928 y 973. El comportamiento de los aislamientos de levadura no fue uniforme durante el ensayo. Las levaduras 352, 398, 714, 840, 861 y 973 ejercen su efecto principalmente al inicio del ensayo (día 4), mientras que 156, 781 y 793 ejercen su efecto inhibitorio durante todo el ensayo.

El análisis de correlación mostró que el porcentaje de reducción y el diferencial de la tasa de crecimiento estaban negativamente relacionados (coeficiente de Pearson = -0,602;  $P < 0,001$ ). Esto era esperable ya que quiere decir que cuando disminuye la tasa de crecimiento aumenta el porcentaje de reducción del micelio de *B. cinerea*. Además, también hubo un efecto de los periodos de latencia (coeficiente de Pearson = 0,373;  $P < 0,035$ ), lo que quiere decir que cuando aumentaron los periodos de latencia aumentó el porcentaje de reducción del micelio.

TABLA 4.4. Crecimiento radial de *B. cinerea* en ágar PDA (25°C) y porcentajes de reducción del crecimiento tras la confrontación con las levaduras.

Microorganismo	Crecimiento radial (mm) de <i>B. cinerea</i>								
	día 4		día 5		día 6		día 7		Total
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media (mm/día)
<i>Botrytis cinerea</i>	26,91 <sup>a</sup>	3,72	38,75 <sup>a</sup>	4,48	48,00 <sup>a</sup>	11,11	58,12 <sup>a</sup>	14,43	11,69 <sup>a</sup>

Cepa de levadura enfrentada	% de reducción del diámetro radial de <i>B. cinerea</i>									
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Sin levadura	0,00 <sup>a</sup>	0,00	0,00 <sup>a</sup>	0,00	0,00 <sup>a</sup>	0,00	0,00 <sup>a</sup>	0,00	0,00 <sup>a</sup>	0,00
153	10,00 <sup>abcd</sup>	10,95	2,38 <sup>ab</sup>	5,83	9,09 <sup>ab</sup>	5,75	2,38 <sup>ab</sup>	3,69	5,96 <sup>abcde</sup>	7,56
156	<b>34,34<sup>hi</sup></b>	2,47	<b>28,70<sup>efg</sup></b>	5,17	<b>30,93<sup>cd</sup></b>	30,10	—	—	<b>31,32<sup>hi</sup></b>	16,78
191	10,00 <sup>abcd</sup>	10,95	0,00 <sup>a</sup>	0,00	12,12 <sup>abc</sup>	4,69	0 <sup>abc</sup>	0,00	5,53 <sup>abcde</sup>	10,95
209	11,66 <sup>abcde</sup>	9,83	2,38 <sup>ab</sup>	5,83	12,12 <sup>abc</sup>	4,69	1,19 <sup>abc</sup>	2,92	6,83 <sup>abcde</sup>	7,87
283	10,00 <sup>abcd</sup>	10,95	4,76 <sup>aab</sup>	7,38	13,63 <sup>abc</sup>	4,98	5,95 <sup>abc</sup>	2,92	8,58 <sup>abcdef</sup>	7,61
298	<b>17,92<sup>bedefgh</sup></b>	3,09	<b>20,83<sup>bcdefg</sup></b>	7,76	8,33 <sup>ab</sup>	13,94	2,30 <sup>ab</sup>	3,57	<b>12,34<sup>cdefgh</sup></b>	10,85
327	10,00 <sup>abcd</sup>	10,95	7,14 <sup>abcd</sup>	7,82	10,60 <sup>ab</sup>	3,71	1,19 <sup>abc</sup>	2,92	7,23 <sup>abcde</sup>	7,66
352	<b>19,04<sup>cdefgh</sup></b>	7,32	5,55 <sup>bcd</sup>	6,09	13,00 <sup>bcd</sup>	4,61	1,11 <sup>bcd</sup>	2,72	9,67 <sup>bcdef</sup>	8,68
366	10,00 <sup>abcd</sup>	10,95	3,80 <sup>bcd</sup>	8,41	9,09 <sup>bc</sup>	5,75	2,38 <sup>bc</sup>	3,69	6,32 <sup>bcdef</sup>	7,93
390	10,00 <sup>abcd</sup>	10,95	0,00 <sup>b</sup>	0,00	9,09 <sup>bc</sup>	5,75	4,76 <sup>bc</sup>	3,69	5,96 <sup>bcdef</sup>	7,26
398	<b>19,04<sup>cdefgh</sup></b>	3,69	12,96 <sup>bcdef</sup>	16,36	14,01 <sup>bcd</sup>	15,46	2,30 <sup>bcd</sup>	3,57	<b>12,08<sup>defghi</sup></b>	12,43
408	13,33 <sup>abcdef</sup>	16,33	4,76 <sup>abc</sup>	7,38	6,06 <sup>a</sup>	11,01	3,57 <sup>a</sup>	3,91	6,93 <sup>abcde</sup>	10,70
475	10,00 <sup>abcd</sup>	10,95	0,00 <sup>a</sup>	0,00	7,57 <sup>ab</sup>	3,71	1,19 <sup>abc</sup>	2,92	4,69 <sup>abcde</sup>	7,03
497	<b>31,11<sup>ghi</sup></b>	3,44	<b>34,25<sup>fgh</sup></b>	8,73	18,30 <sup>abc</sup>	18,42	3,49 <sup>abc</sup>	3,83	<b>21,79<sup>i</sup></b>	15,80
619	<b>17,50<sup>bcdefg</sup></b>	5,00	7,14 <sup>a</sup>	8,25	4,54 <sup>a</sup>	5,25	7,14 <sup>a</sup>	0,00	9,08 <sup>a</sup>	7,11
632	6,66 <sup>abc</sup>	10,33	14,28 <sup>abcde</sup>	0,00	5,15 <sup>a</sup>	11,86	-3,57 <sup>a</sup>	6,46	4,02 <sup>abcd</sup>	10,58
665	15,55 <sup>abcdefg</sup>	4,25	-0,52 <sup>a</sup>	8,07	2,82 <sup>a</sup>	9,26	—	—	5,94 <sup>abcde</sup>	10,03
677	7,39 <sup>abc</sup>	6,61	5,02 <sup>abc</sup>	14,87	8,37 <sup>ab</sup>	7,20	—	—	6,92 <sup>abcde</sup>	9,76
693	1,63 <sup>ab</sup>	6,14	5,55 <sup>abc</sup>	6,09	8,49 <sup>ab</sup>	4,91	—	—	5,23 <sup>abcde</sup>	6,12
714	<b>27,87<sup>efghi</sup></b>	11,26	13,42 <sup>abcde</sup>	8,27	7,76 <sup>ab</sup>	7,28	—	—	<b>16,35<sup>fghij</sup></b>	12,20
733	—	—	9,52 <sup>abcd</sup>	11,66	3,86 <sup>a</sup>	10,80	5,27 <sup>a</sup>	14,15	6,22 <sup>abcde</sup>	11,80
768	0,00 <sup>a</sup>	0,00	11,42 <sup>abcde</sup>	7,23	5,20 <sup>a</sup>	6,44	-7,22 <sup>a</sup>	9,10	1,23 <sup>ab</sup>	9,73
781	<b>29,66<sup>fghi</sup></b>	7,21	<b>38,16<sup>gh</sup></b>	4,67	<b>27,62<sup>bcd</sup></b>	12,73	—	—	<b>31,81<sup>j</sup></b>	9,56
793	<b>40,4<sup>hi</sup></b>	7,34	<b>43,73<sup>h</sup></b>	10,82	<b>42,97<sup>d</sup></b>	13,93	<b>28,35<sup>d</sup></b>	5,57	<b>39,32<sup>k</sup></b>	11,86
803	—	—	4,76 <sup>abc</sup>	7,38	-0,29 <sup>a</sup>	8,48	6,23 <sup>a</sup>	11,40	6,23 <sup>abc</sup>	11,40
818	<b>26,66<sup>defghi</sup></b>	8,16	<b>22,91<sup>cdefg</sup></b>	6,68	19,06 <sup>abc</sup>	7,24	2,30 <sup>abc</sup>	3,57	<b>17,73<sup>ghi</sup></b>	11,35
840	<b>21,81<sup>cdefghi</sup></b>	6,64	17,12 <sup>abcdefg</sup>	5,60	9,84 <sup>ab</sup>	9,73	7,06 <sup>ab</sup>	9,04	<b>13,96<sup>efghi</sup></b>	9,50
861	<b>18,52<sup>cdefghi</sup></b>	6,06	13,95 <sup>abcde</sup>	4,22	6,85 <sup>ab</sup>	7,94	—	—	<b>13,11<sup>defghi</sup></b>	7,68

Microorganismo	Crecimiento radial (mm) de <i>B. cinerea</i>									
	día 4		día 5		día 6		día 7		Total	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media (mm/día)	
<i>Botrytis cinerea</i>	26,91 <sup>a</sup>	3,72	38,75 <sup>a</sup>	4,48	48,00 <sup>a</sup>	11,11	58,12 <sup>a</sup>	14,43	11,69 <sup>a</sup>	

Cepa de levadura enfrentada	% de reducción del diámetro radial de <i>B. cinerea</i>									
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
874	<b>20,60</b> <sup>cdefgh</sup>	6,21	<b>22,68</b> <sup>cdefgh</sup>	9,32	9,84 <sup>ab</sup>	9,73	2,30 <sup>ab</sup>	3,57	<b>13,86</b> <sup>efghi</sup>	11,04
913	<b>26,86</b> <sup>defghi</sup>	9,10	<b>19,74</b> <sup>bcdef</sup>	5,07	14,22 <sup>abc</sup>	7,63	–	–	<b>20,27</b> <sup>hi</sup>	8,80
928	<b>21,52</b> <sup>cdefgh</sup>	11,06	<b>25,29</b> <sup>defg</sup>	9,79	14,22 <sup>abc</sup>	7,63	–	–	<b>20,35</b> <sup>hi</sup>	10,18
973	<b>26,68</b> <sup>defghi</sup>	10,62	15,27 <sup>abcde</sup>	8,87	14,19 <sup>abc</sup>	8,30	–	–	<b>18,72</b> <sup>hi</sup>	10,51
<b>P<sub>levadura</sub></b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	
<b>Global días</b>	<b>16,16</b> <sup>b</sup>	<b>13,62</b>	<b>11,86</b> <sup>a</sup>	<b>16,09</b>	<b>10,75</b> <sup>a</sup>	<b>16,44</b>	<b>1,95</b> <sup>a</sup>	<b>10,51</b>	<b>10,52</b> <sup>a</sup>	<b>15,36</b>
<b>P<sub>levadura*días</sub></b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	

<sup>1</sup>Por columnas, valores medios con letras minúsculas diferentes presentaron valores significativamente diferentes (P<0,05).

<sup>2</sup>Valores en negrita indican una reducción del diámetro significativa respecto al control (P<0,05).

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

Una vez determinado el efecto de las levaduras sobre el crecimiento de *B. cinerea* se pretendió identificar los compuestos responsables de tal efecto. Para ello se realizó el análisis por cromatografía de gases e identificación por detector de masas de los compuestos captados por fibra de microextracción en el espacio presente en el sistema de doble placa empleado para las confrontaciones. En la siguiente tabla se muestran los compuestos presentes en el espacio de los ensayos de confrontación en los sistemas de doble placa. En la tabla se muestra los compuestos, el índice de Kovats (IK), el tiempo de retención, el origen de los compuestos y el grupo químico al que pertenecen.

TABLA 4.5. Compuestos volátiles identificados por CG-MS del espacio del sistema de doble placa utilizado para las confrontaciones *B.cinerea*-levaduras.

Compuesto volátil	IK <sup>1</sup>	Tiempo	Origen	Grupo químico	Compuesto volátil	IK	Tiempo	Origen	Grupo químico
Etil eter	504	4,04	PDA	Éter	1-Octen-3-ol	978	23,70	Levaduras	Alcohol
Propanal	511	5,10	Levaduras	Aldehído	3-Octanona	984	24,00	Levaduras	Cetona
2-metil pentano	558	5,34	PDA	Hidrocarburo	2-Furanmetanol acetato	995	24,30	Levaduras	Ester
3-metil pentano	579	5,76	PDA	Hidrocarburo	2-acetil tiazol	1015	25,61	PDA	C. orgánico policíclico
Ácido acético	595	5,93	PDA, Levaduras	Ácido	Hidrocarburo cíclico	1026	26,18	PDA	Hidrocarburo
Hexano	600	6,27	PDA	Hidrocarburo	D-Limoneno	1031	26,20	Levaduras	Terpeno
Acetato de etilo	610	6,85	BC	Éster	Benceneacetaldehído	1053	26,73	PDA	Aldehído
Butanal 3-metil	652	8,40	Levaduras	Aldehído	Hidrocarburo 2	1066	27,20	Levaduras	Hidrocarburo
Butanal 2-metil	664	8,80	Levaduras	Aldehído	2-Nonanona	1070	28,50	Levaduras	Cetona
Hexano 3-metil	670	9,30	Levaduras	Hidrocarburo	Nonanal	1102	29,05	PDA	Aldehído
Ácido propanoico	693	9,71	PDA	Ácido	Fenil etil alcohol	1141	29,70	Levaduras	Alcohol
Heptano	700	10,30	BC, Levaduras	Hidrocarburo	Ácido octanoico	1168	31,20	Levaduras	Acido
2-Butanona 3-hidroxi	702	10,70	Levaduras	Cetona	Ácido acético fenil metil ester	1170	31,50	Levaduras	Ester
Ácido propanoico etil ester	704	10,81	BC, Levaduras	Éster	Benceno 1,3-dimetoxi	1182	31,80	Levaduras	H. aromático
n-Propil acetato	707	11,00	Levaduras	Éster	Dodecano	1200	32,80	Levaduras	Hidrocarburo
1-Butanol 3-metil	732	11,90	BC, Levaduras	Alcohol	Ácido acético 2-fenil etil ester	1256	34,90	Levaduras	Ester
1-Butanol 2-metil	743	12,10	BC, Levaduras	Alcohol	Benceno 1	1263	35,00	Levaduras	H. aromático
Ácido propanoico, 2 metil	790	12,70	PDA, Levaduras	Ácido	Tridecano	1300	35,30	Levaduras	Hidrocarburo
Hidrocarburo 1	805	13,54	BC	Hidrocarburo	Hidrocarburo 3	S.I. <sup>2</sup>	35,70	Levaduras	Hidrocarburo
Ácido butanoico	830	13,92	BC	Ácido	Alcohol 1	S.I.	35,90	PDA	Alcohol
Cetona 1	835	14,30	Levaduras	Cetona	Hidrocarburo 4	S.I.	36,20	Levaduras	Hidrocarburo
Ácido butanoico, 3-metilo	850	16,73	BC, Levaduras	Ácido	Ester 1	S.I.	36,41	PDA	Ester
Ácido butanoico, 2-metilo	854	17,23	BC, Levaduras	Ácido	Alcohol 2	S.I.	36,73	PDA	Alcohol
Etil benceno	864	18,43	PDA	H. aromático	Terpeno/derv naptaleno 1	S.I.	37,50	Levaduras	Terpeno
1-Butanol 3-metil acetato	876	18,91	BC, Levaduras	Éster	Terpeno/derv naptaleno 2	S.I.	38,10	Levaduras	Terpeno
1-Butanol 2-metil acetato	880	19,00	Levaduras	Éster	hidroxitolueno butilado	1508	38,87	PDA	H. aromático
2-Heptanona	891	19,60	Levaduras	Cetona	Terpeno/derv naptaleno 3	S.I.	39,00	Levaduras	Terpeno
Propanal 3- (metiltio)	910	20,32	PDA	Aldehído	Terpeno/derv naptaleno 4	S.I.	39,30	Levaduras	Terpeno
Benzaldehído	961	20,08	PDA	Aldehído					

<sup>1</sup>Índice de retención de Kovats

<sup>2</sup>Sin identificar

Respecto al estudio de los compuestos volátiles mediante la técnica de cromatografía de gases se detectaron una serie de grupos funcionales todos ellos recogidos en la tabla 4.5. Como se puede observar hay gran variedad de estos grupos. Un total de 57 compuestos fueron identificados agrupados en los siguientes grupos funcionales: comenzando con los menos representativos como son los éteres (1), compuesto orgánicos policíclicos (1), hidrocarburos aromáticos (4), terpenos (5), cetonas (5), alcoholes (6), ácidos (7), aldehídos (7); y los más representados son los ésteres (9) y los hidrocarburos (12).

Estos grupos químicos procedieron de distinto origen; el medio PDA, el control de *B. cinerea* o por las propias levaduras. En la tabla 4.5 se asigna el origen de todos ellos, con un total de 57 compuestos como se ha mencionado anteriormente, en los que 16 están presentes exclusivamente debido al medio PDA, 3 compuestos fueron producidos por *B. cinerea*, y 29 propios de las levaduras. Como se puede observar en la tabla 4.5 también aparece compuestos cuyo origen es conjuntamente *B. cinerea*, levaduras y/o PDA. Esto quiere decir que ese compuesto se genera en el medio PDA o por *B. cinerea* y se ve incrementado con la confrontación con las levaduras.

En este estudio, nos centramos en los compuestos químicos producidos por las levaduras ya que algunos de ellos pueden ser los responsables de reducir el crecimiento del moho *B. cinerea*. En total se detectaron 38 compuestos que o tenían su origen exclusivamente en la actividad de las levaduras o se incrementaba su presencia en las confrontaciones levadura-moho. En la siguiente tabla (Tabla 4.6) se enumeran esos 38 compuestos y se presentan los valores de las áreas y el porcentaje que representan respecto al total de los compuestos volátiles.

TABLA 4.6. VOCs generados por las levaduras expresados en valores absolutos y porcentuales de unidades arbitrarias de área (UAA).

Compuestos asociados a Levaduras	UAA Valor absoluto/10 <sup>5</sup>			UAA Porcentaje		
	Medias	Rangos		Medias	Rangos	
		Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo
v1	0,97	0,00	31,20	0,03	0,00	1,00
v2	74,63	0,00	575,94	6,28	0,00	59,30
v3	0,73	0,00	23,52	0,05	0,00	1,50
v4	2,03	0,00	37,55	0,18	0,00	3,40
v5	1,80	0,00	57,75	0,22	0,00	7,20
v6	10,49	0,00	309,93	1,26	0,00	38,40
v7	1,36	0,00	23,09	0,07	0,00	2,00
v8	1,94	0,00	62,20	0,04	0,00	1,20
v9	1,73	0,00	55,48	0,03	0,00	1,10
v10	454,61	0,00	1481,39	29,58	0,00	58,20
v11	289,01	0,00	1305,00	17,59	0,00	37,90
v12	19,11	0,00	611,56	0,37	0,00	11,70
v13	3,44	0,00	110,04	0,13	0,00	4,10
v14	6,57	0,00	210,39	0,13	0,00	4,00
v15	17,11	0,00	547,41	0,33	0,00	10,50
v16	12,40	0,00	396,81	0,25	0,00	8,10
v17	3,42	0,00	109,33	0,00	0,00	0,00
v18	105,21	0,00	1262,99	17,29	0,00	100,00
v19	6,42	0,00	205,54	0,24	0,00	7,60
v20	7,08	0,00	148,11	0,30	0,00	5,50
v21	3,04	0,00	97,33	0,13	0,00	4,30
v22	19,49	0,00	100,38	1,83	0,00	15,30
v23	0,76	0,00	24,44	0,05	0,00	1,60
v24	2,84	0,00	90,84	0,12	0,00	4,00
v25	281,80	0,00	1255,61	16,59	0,00	45,10
v26	0,78	0,00	24,97	0,03	0,00	1,10
v27	0,69	0,00	22,23	0,03	0,00	1,00
v28	4,52	0,00	144,48	0,17	0,00	5,40
v29	2,60	0,00	83,09	0,05	0,00	1,60
v30	47,71	0,00	1341,71	1,71	0,00	42,20
v31	15,57	0,00	201,63	1,56	0,00	26,40
v32	12,35	0,00	110,65	0,90	0,00	13,70
v33	1,74	0,00	55,53	0,03	0,00	1,10
v34	3,82	0,00	79,61	0,31	0,00	9,90
v35	13,88	0,00	275,31	0,49	0,00	10,20
v36	13,11	0,00	246,56	0,47	0,00	8,90
v37	15,52	0,00	206,56	0,54	0,00	7,70
v38	14,97	0,00	235,54	0,51	0,00	7,60

En la tabla anterior (Tabla 4.6) se muestran los 38 VOC asociados a levaduras identificados, presentados de menor a mayor en función de su retención. Se puede observar que tanto en valores porcentuales y en valores absolutos los compuestos mayoritarios fueron el v10 (1-butanol 3-metil), seguido de v11 (1-butanol 2-metil), v25 (fenil etil alcohol) y v18 (2-heptanona). Por el contrario, los compuestos con menor concentración fueron v1 (propanal), v3 (butanal 3-metil), v23 (hidrocarburo 1), v26 (ácido octanoico) y v27 (ácido acético fenil metil ester). El compuesto mayoritario v10 representó, de media, el 29,58% del total de los VOC generados por las levaduras. Además en la tabla se muestra los rangos de las UAA, tanto en valores absolutos como porcentuales. Con ello se puede observar que ninguno de los compuestos asociados a levaduras se encuentra presente en todos los perfiles volátiles analizados.

Tras la identificación de los VOCs asociados a levaduras se trató de identificar aquellos compuestos que presentaban una actividad biológica antifúngica. Para ello se realizó un análisis de componentes principales (Figura 4.4) y un estudio de correlación entre los compuestos detectados y los parámetros de crecimiento del moho (Tabla 4.6).

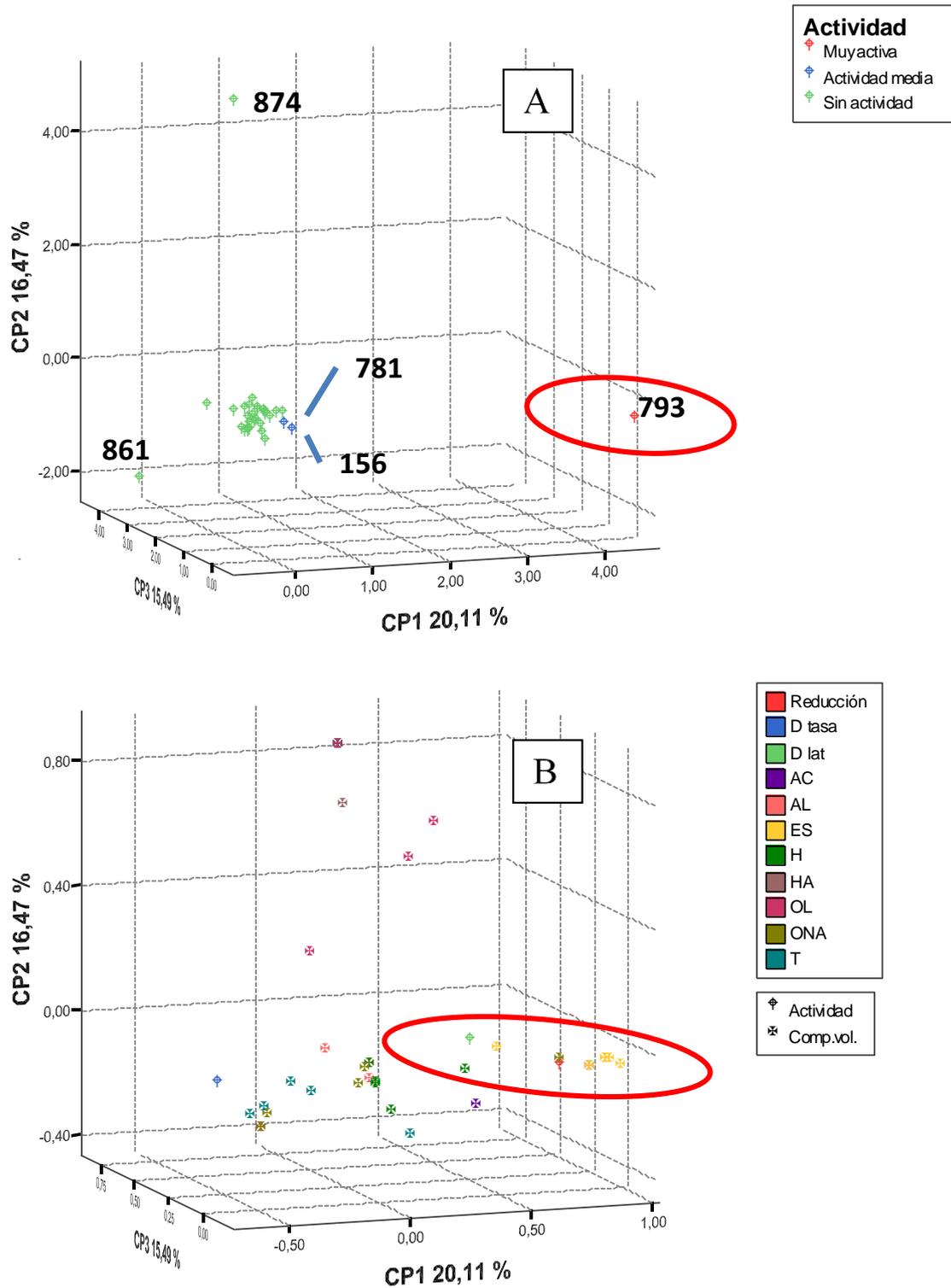


FIGURA 4.4. Representación tridimensional definida por las componentes principales 1, 2 y 3 de las actividades de las cepas de levaduras ensayadas (A), los VOCs identificados y los parámetros de crecimiento de *B. cinerea* (B).

La relación entre las variables definidas por las componentes principales 1, 2 y 3 explicó un total del 52,07% de la variabilidad. En la figura 4.4A las cepas sin actividad fueron agrupadas en su mayoría en los ejes negativos de las tres componentes a excepción de 861 y 874. Las dos cepas con actividades medias la 156 y 781 se caracterizaron por su asociación al eje positivo de la componente principal 1. Finalmente la cepa 793, con alta actividad estuvo asociada muy positivamente a la componente principal 1.

En la figura 4.4B se puede observar como los compuestos asociados a una alta actividad de las levaduras fueron mayoritariamente esteres (representados por color amarillo). Además también se asoció a esta alta actividad la reducción del crecimiento de *B. cinerea*, el aumento de periodo de latencia, y negativamente con la variación de la tasa de crecimiento.

TABLA 4.6. Correlaciones de Pearson entre los parámetros de cinéticas de crecimiento de *B. cinerea* y los VOCs cuyo origen son las levaduras implicados en el antagonismo.

Correlaciones				
		Reducción	Tasa crecimiento	Latencia
<b>Reducción</b>	Correlación de Pearson	1,000	0,602**	0,373*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,035
<b>Dtasa</b>	Correlación de Pearson	-0,602	1,000	-0,290
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,108
<b>Dlat</b>	Correlación de Pearson	0,373*	-0,290	1,000
	Sig. (bilateral)	0,035	0,108	0,000
<b>v2</b>	Correlación de Pearson	0,419*	-0,139	0,220
	Sig. (bilateral)	0,017	0,449	0,226
<b>v7</b>	Correlación de Pearson	0,314	0,582**	0,246
	Sig. (bilateral)	0,080	0,000	0,175
<b>v8</b>	Correlación de Pearson	0,660**	0,731**	0,409*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,020
<b>v9</b>	Correlación de Pearson	0,660**	0,731**	0,409*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,020
<b>v16</b>	Correlación de Pearson	0,660**	0,731**	0,409*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,020
<b>v21</b>	Correlación de Pearson	0,660**	0,731**	0,409*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,020
<b>v26</b>	Correlación de Pearson	0,660**	0,731**	0,409*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,020
<b>v27</b>	Correlación de Pearson	0,660**	0,731**	0,409*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,020
<b>v30</b>	Correlación de Pearson	0,645**	0,752**	0,432*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000	0,013

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Como se puede observar en la tabla anterior (Tabla 4.6), se determinó que VOCs son los que provocan cambios significativos ( $P < 0,05$ ) en el crecimiento de *B. cinerea* mediante en el análisis de correlación. El efecto, como se observa en la tabla, puede ser asociado a la disminución en la tasa de crecimiento (representado con una correlación negativa de Pearson), al aumento el porcentaje de reducción (correlación de Pearson positiva) y/o al aumento de los periodos de latencia (correlación positiva de Pearson). Estos compuestos que presentaron una correlación positiva fueron un total de ocho: ácido propanoico etil ester (v8), n-propil acetato (v9), 1-butanol 3-metil acetato (v16), 2-furanmetanol acetato (v21), ácido octanoico (v26), ácido acético fenil metil ester (v27), y ácido acético 2-fenil etil ester (v30).

Existe bibliografía relacionada con los compuestos que hemos determinado. Entre ellos el estudio realizado por Strobel y col. (2001) que se basó en el análisis de *Muscodor albus* que es un hongo endofítico aislado de *Cinnamomum zeylanicum* (árbol de canela). Este hongo xilófago inhibe y mata a otros hongos y bacterias, en virtud de una mezcla de compuestos volátiles que produce. La mayoría de estos compuestos se identificaron mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. La clase más efectiva de compuestos inhibidores fueron los ésteres, de los cuales 1-butanol 3-metil acetato fue el más activo biológicamente. También producían ácido propanoico etil ester y ácido acético 2-fenil etil ester. En otro trabajo Cheung y col. (2014) determinaron que los organismos marinos, incluidas las bacterias, los hongos, las algas, las esponjas, los equinodermos, los moluscos y los cefalocordados, producen una variedad de productos con actividad antifúngica. Uno de estos compuestos era el ácido octanoico. Todos los compuestos producidos se podría utilizar en agricultura y en la industria alimentaria.

Otros compuestos detectados en nuestro estudio, como el fenil etil alcohol (v25) han sido previamente asociados a actividades antifúngicas. Mo y Sung (2007) investigaron el efecto del fenil etil alcohol sobre el grado de vida útil y la calidad en fresas. Observaron que el crecimiento fúngico en la superficie de las fresas tratadas con este compuesto creció significativamente menos que el control. Los resultados sugirieron que este compuesto puede usarse para prolongar la vida poscosecha de esta fruta. Sin embargo este compuesto, en nuestro estudio, no presentó correlación ( $P > 0,05$ ) con el control de nuestra cepa de *B. cinerea*.

Finalmente, en la siguiente figura mostramos cromatogramas obtenidos del análisis de los compuestos volátiles presentes en el espacio entre placas de los ensayos de confrontación, analizado mediante CG-MS.

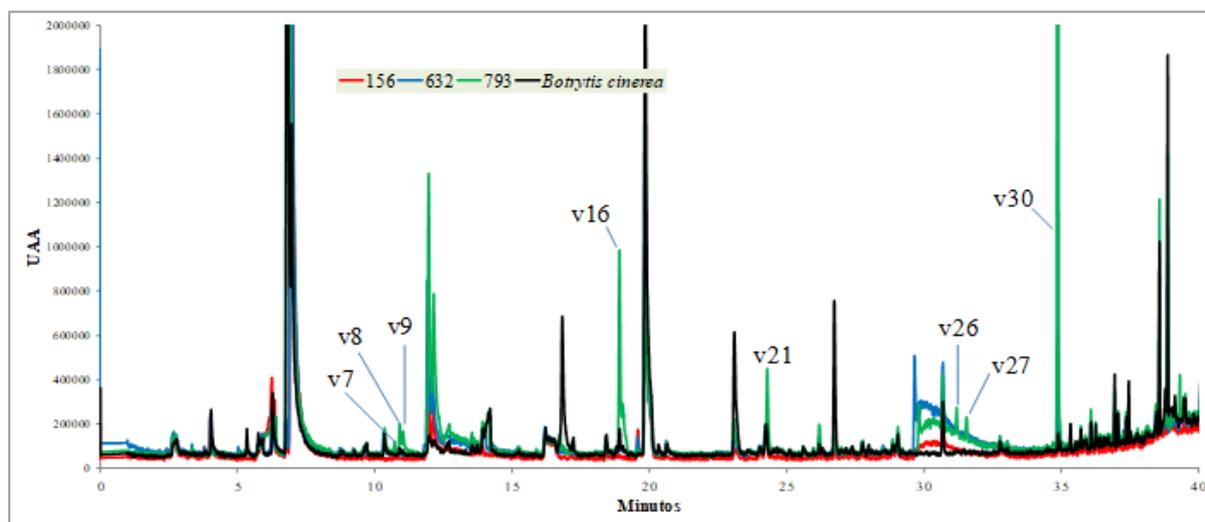


FIGURA 4.5. Cromatogramas de los perfiles de compuestos volátiles generados en el espacio del sistema de doble placa de confrontaciones con actividad antibotrytis: control (línea negra), sin actividad (línea azul), actividad media (línea roja), alta actividad (línea verde). Los compuestos indicados están relacionados con el antagonismo levadura-moho.

Como se puede observar en la figura 4.5, la mayoría de los compuestos producidos son comunes en los tres cromatogramas (control, sin actividad y alta actividad). Las levaduras con actividad media no presentan compuestos asociados al control y esto podría confirmar que el antagonismo se debe a la modificación de los gases  $O_2/CO_2$  en los primeros momentos de confrontación. Por último, el cromatograma de la confrontación con la levadura 793 (*Hanseniaspora uvarum*) presenta los compuestos asociados al control del moho. Estos compuestos, mayoritariamente ésteres, representaron entre el 1% y el 8,10% del total de los compuestos en el espacio entre placas. Esto sugiere que bajas concentraciones son efectivas para controlar al moho.

En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio, la cepa 793 de la especie *H. uvarum* es un buen candidato para futuros ensayos del control de mohos patógenos de frutas en condiciones comerciales. Además, se pretende investigar próximamente la actividad inhibitoria sobre *B. cinerea* y otras especies de mohos patógenos de los compuestos, puros y sus mezclas, asociados a esta actividad.

## **CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

1. La especie *Aureobasidium pullulans* se encuentra de forma muy mayoritaria en los aislamientos procedentes de higos y brevas. Otras especies identificadas fueron *Vishniacozyma carnescens*, *Candida carpophila*, *Filobasidium oeirense* y *Hanseniaspora uvarum*.
2. El análisis del fragmento ITS1-5,8S ARNr-ITS4 ha permitido encontrar marcadores moleculares en algunas cepas de levaduras (298, 475, 733, 781, 793, 818,874) que posibilitan su identificación en caso de aplicación como tratamiento biocontrol.
3. El 46,87% de los aislamientos de levaduras ensayados tuvieron un efecto significativo en la reducción del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, siendo esta reducción más acusada en los primeros días de confrontación moho-levadura. Además, el 31,25% de las confrontaciones redujeron la velocidad de crecimiento > 2 mm/día y el 6,25% de las levaduras provocaron un periodo de latencia mayor en las esporas de *Botrytis cinerea*.
4. Un total de 38 compuestos químicos tuvieron su origen en el metabolismo de las levaduras, siendo 9 de ellos (ácido acético, ácido octanoico, 1-butanol 3-metil acetato, 2-furanmetanol acetato, ácido acético fenil metil ester, ácido acético 2- fenil etil ester, 2-butanona 3-hidroxi, ácido propanoico etil ester, n-propil acetato) los que están implicados con el control de *Botrytis cinerea*.
5. La cepa 793 de la especie *Hanseniaspora uvarum* es la que mayor efecto ha tenido en la reducción del crecimiento de *Botrytis cinerea* debido a la disminución de la velocidad y el aumento del periodo de latencia del mismo. Los compuestos volátiles generados por esta cepa asociados al control del moho son del grupo químico de los ésteres. Además, esta cepa presenta una modificación en su secuencia genómica del fragmento ITS1-5,8S ARNr-ITS4 (delección en la posición 170) que puede ser utilizada como marcador molecular para su monitorización.
6. La cepa 793 de la especie *Hanseniaspora uvarum* es propuesta para ensayos de control biológico en condiciones de manipulación y comercialización de fruta.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Altomare, C., Perrone, G., Zonno, M.C., Evidente, A., Pengue, R., Fanti, F., Polonelli, L. (2000). Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *Journal of Natural Products*. 63, 1131–1135.
- Benito, E. P., Arranz, M., & Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 43-46.
- Capilla H.A. (2017). Selección de levaduras antagónicas por su capacidad de producir compuestos volátiles orgánicos antifúngicos y parasitar hifas.
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Pan, W. L., Chan, Y. S., Yin, C. M., Dan, X. L., & Xia, L. X. (2014). Antifungal and antiviral products of marine organisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(8), 3475-3494.
- Chu, C.L., Liu, W.T., Zhou, T., Tsao, R. (1999). Control of post harvest gray mold rot of modified atmosphere packaged sweet cherries by fumigation with thymol and acetic acid. *Can. Journal of plant Sciences*. 79, 685–689.
- Coletto, J.M., Bartolomé, T.J., Velázquez, R. (2008). Un análisis del sector hortofrutícola en la provincia de Badajoz a través de la metodología, DAFO. La agricultura y la ganadería Extremeñas en 2008. Capítulo 9.
- Daniel, C. K., Lennox, C. L., & Vries, F. A. (2015). In vivo application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. *Postharvest biology and technology*, 99, 88-92.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29.
- Enyiukwu, D. N., Awurum, A. N., & Nwaneri, J. A. (2014). Efficacy of plant-derived pesticides in the control of myco-induced postharvest rots of tubers and agricultural products: A review. *Net Journal of Agricultural Science*, 2(1), 30-46.

- Garmendia, G., & Vero, S. (2006). Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura*, 197, 18-27.
- Gatto, M. A., Sergio, L., Ippolito, A., & Di Venere, D. (2016). Phenolic extracts from wild edible plants to control postharvest diseases of sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 120, 180-187.
- Hamby, K. A., Hernández, A., Boundy-Mills, K., & Zalom, F. G. (2012). Associations of yeasts with spotted-wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries. *Applied and environmental microbiology*, 78(14), 4869-4873.
- Hamby, K. A., Hernández, A., Boundy-Mills, K., & Zalom, F. G. (2012). Associations of yeasts with spotted-wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries. *Applied and environmental microbiology*, 78(14), 4869-4873.
- Hong, P., Hao, W., Luo, J., Chen, S., Hu, M., & Zhong, G. (2014). Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest biology and technology*, 88, 96-102.
- Huang, R., Li, G. Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H. J., Jiang, D. H., & Huang, H. C. (2011). Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101(7), 859-869.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., & Alizadeh, A. (2011). A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPPO Bulletin*, 41(1), 65-71.
- Kupfer, V. M., Vogt, E. I., Ziegler, T., Vogel, R. F., & Niessen, L. (2017). Comparative protein profile analysis of wines made from *Botrytis cinerea* infected and healthy grapes reveals a novel biomarker for gushing in sparkling wine. *Food Research International*, 99, 501-509.

- Li, Q.L., Ning, P., Zheng, L., Huang, J.B., Li, G.Q., Hsiang, T. (2010). Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharvest Biology and Technology*. 58, 157–165.
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Rodriguez, M. E., Sosa, M. C., & Sangorrín, M. P. (2013). Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International journal of food microbiology*, 164(2-3), 166-172.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mercier, J., Smilanick, J.L. (2005). Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biology Control* 32, 401–407.
- Mo, E. K., & Sung, C. K. (2007). Phenylethyl alcohol (PEA) application slows fungal growth and maintains aroma in strawberry. *Postharvest biology and technology*, 45(2), 234-239.
- Montuschi, C., De Paoli, E., Mari, M., Gengotti, S., Ceredi, G., & Antoniaci, L. (2008, March). Ten years of field trials on grey mold control on strawberries. In VI International Strawberry Symposium 842 (pp. 327-330).
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology*, 47, 85-92.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology*, 47, 85-92.
- Plascencia-Tenorio, R. I., Olalde-Portugal, V., Mena-Violante, H. G., Ceja-Torres, L. F., Venegas-González, J., Oyoque-Salcedo, G., y Angoa-Pérez, M. V. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai*, 8(3).

- Poveda Parra, D. C. (2006). Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinérea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).
- Prasad, K., Stadelbacher, G.J. (1973). Control of post harvest decay of fresh raspberries by acetaldehyde vapor. *Plant Disease Report*. 57,795–797.
- Serradilla, M. J., del Carmen Villalobos, M., Hernández, A., Martín, A., Lozano, M., & de Guía Córdoba, M. (2013). Study of microbiological quality of controlled atmosphere packaged 'Ambrunés' sweet cherries and subsequent shelf-life. *International journal of food microbiology*, 166(1), 85-92.
- Sholberg, P.L., Gaunce, A.P. (1995). Fumigation of fruit with acetic acid to prevent post harvest decay. *HortScience* 30, 1271–1275.
- Song, J., Leepipattanawit, R., Deng, W., Beaudry, R.M. (1996). Hexenal vapor is a natural, metabolizable fungicide: inhibition of fungal activity and enhancement of aroma biosynthesis in apple slices. *Journal of the American Society for Horticulture Science*. 121, 937–942.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49
- Strobel, G. A., Dirkse, E., Sears, J., & Markworth, C. (2001). Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 147(11), 2943-2950.
- Ugolini, L., Martini, C., Lazzeri, L., D'Avino, L., & Mari, M. (2014). Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allyl-isothiocyanate treatments. *Postharvest biology and technology*, 90, 34-39.

- Usall,J.(2008). El control de las alteraciones postcosecha de fruta en las dos últimas décadas. *Phytoma*.201.
- Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C. P., Meyer, S. A., & O'Neill, E. B. (2005). Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *Federation of European Microbiological Societies, yeast research*, 5(4-5), 463-469.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. En: *PCR Protocols: a guide to methods and application*. Inis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. (Eds.). Academic Press, San Diego, California, pp. 315-322.
- Zhang, H.,Wang, L., Zheng, X.,Dong, Y. (2007). Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and *Rhizopus* decay of peaches. *International Journal of Food Microbiology*. 155,53-58
- Zhang, J., & Swingle, P. P. (2005). Effects of curing on green mold and stem-end rot of citrus fruit and its potential application under Florida packing system. *Plant disease*, 89(8), 834-840.

#### **PAGINAS WEB:**

- MAPAMA. (1996): Clasificación climática de J. Papadakis. En la web: <http://www.mapama.gob.es/ide/metadatos/srv/spa/metadata.show?id=6981&currTab=simple>
- FAO report. (2011). Global food losses and food waste: extent, causes and prevention. FAO, Rome. En la web: <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>
- OSCAE. (2015): Macromagnitudes del Cooperativismo Agroalimentario Español. En la web: <http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/05375.pdf>
- AGROTERRA. (2016): Fungicidas para combatir *Botrytis cinerea*. En la web: <https://www.agroterra.com/blog/descubrir/top-10-productos-contra-la-botrytis/78960/>

Fepex. (2018): Informe económico del sector de frutas y hortalizas en España. En la web:  
[http://www.ifema.es/PresentacionInet/groups/public/documents/binario/if\\_135317.pdf](http://www.ifema.es/PresentacionInet/groups/public/documents/binario/if_135317.pdf)