



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Desarrollo y evaluación de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras contra *Botrytis cinerea* en rosas

Hugo Enrique Rivera Arévalo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología
Bogotá D.C., Colombia

2014

Desarrollo y evaluación de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras contra *Botrytis cinerea* en rosas

Hugo Enrique Rivera Arévalo

Código: 2635143

Tesis de investigación científica presentada como requisito parcial para optar al
título de
Magíster en Ciencias-Microbiología

Director:

Ph. D. Daniel Uribe Vélez

Línea de investigación:

Microbiología Agrícola

Grupo de Investigación:

Microbiología Agrícola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2014

*A Dios por no abandonarme en los
momentos de crisis y permitirme
perseverar en esta vida... un esfuerzo más.*

*A mi madre María Leonor Arévalo Orjuela
por parirme, ser mi inspiración y un ejemplo de vida.*

*A mi sobrino Mauricio Romero Rivera (Tunda) y
a mi hermana Margarita Rivera Arévalo... mi núcleo familiar y de apoyo.*

Agradecimientos

A Dios.

A mi madre, mi sobrino y mi hermana.

Al profesor Daniel Uribe Vélez (Procesos de pensamiento profundos).

A los miembros del grupo Microbiología Agrícola: Lorena y Helver (Equipo de levaduras; disciplina y criterio. Momentos gratos en mi vida), Adriana, Carlos, LuisFer, Diana, Ana Mesa, Fernanda, Karen, Johan y Yoli.

A la Familia Chavarria Duarte; Andrea Chavarria (Amiga mía).

A Socorrito (Por escucharme imparcialmente. Dios te bendiga).

A la comunidad IBUN.

A Colciencias e I.C. Flores Prisma S.A.

Al Posgrado Interfacultades de Microbiología.

A la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres (Por la beca otorgada).

A mis compañeros de Maestría: Katherin (Zurda), Lady y Cristhian.

Al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias; Grupo Ecomic: profesora Jimena Sánchez (Una amiga de corazón que creyó en mí siempre), Elkin Ruíz y Sandra Campos.

Al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias: profesora María Cecilia Delgado y Rubén Cruz.

A mis colegas y compañeros de pregrado.

Al Grupo Interfacultades Estudiantil de Trabajo Metal UN (Once años): Miguel, Marco, Gustavo, Alexander (El Artista), Emiro, Paula, Germán, Mackley, Daniel, Omar.

A mis muchachos SARCOPHAGIDAE (Mateo Páez y Danilo Romero).

Al *metal* como fenómeno social y cultural colombiano.

Y a todas las personas que indirecta o directamente promovieron este trabajo... ustedes saben quiénes son.

Resumen

Las levaduras poseen mecanismos de acción contra *B. cinerea*: competencia por espacio y nutrientes, producción de metabolitos secundarios inhibitorios, producción de compuestos orgánicos volátiles, entre otros. Sin embargo, las levaduras requieren ser formuladas para su estabilización y actividad bio-controladora en función del tiempo. Las formulaciones han usado mono-inóculos de antagonistas como principio activo, no obstante, sus mezclas también han sido empleadas, pero relegadas a un segundo plano. En este trabajo se desarrolló un prototipo de formulación liofilizado, a base de mezclas de levaduras con capacidad antagónica contra *Botrytis cinerea*. Se usaron seis aislamientos de levaduras: LvGr20, LvSb29, LvGr3, LvGr26, LvGr1 y LvGr10, del cepario del Laboratorio de Microbiología Agrícola del IBUN, Bogotá D.C. La evaluación de sus actividades bio-controladoras se llevó a cabo mediante antagonismo *in vitro*, empleando la técnica del enfrentamiento dual e, *in vivo*, sobre pétalos de rosa (*Rosa* sp. variedad Vendela), donde también se estimó la dosis-respuesta a concentraciones celulares que oscilaron entre 10^5 y 10^8 UFC/mL de levadura. El efecto de la producción de VOCs en el desarrollo de la enfermedad sobre pétalos de rosa también fue evaluado. Una vez se determinó la compatibilidad entre los aislamientos seleccionados (LvGr20 y LvSb29), se evaluó *in vivo* el efecto de las proporciones en mezclas celulares entre estas dos levaduras y, se estudió, el efecto de las interacciones de sus mezclas (a concentraciones entre 10^6 - 10^8 UFC/mL), para el desarrollo de una formulación con actividad bio-controladora de *B. cinerea*. Con lo anterior se desarrolló un prototipo de formulación con manitol y trehalosa al 1% y 5% m/v como excipientes de formulación, usando una mezcla con proporción 2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29 y, empleando la liofilización como estrategia de estabilización celular; la formulación se almacenó a 4°C durante sesenta días. Al cabo de este tiempo, se evaluó viabilidad y actividad antagónica de las formulaciones en co-inoculación con *B. cinerea*. Después de 60 días, la viabilidad del prototipo de formulación con trehalosa registró valores más altos que manitol, 18% y 14% respectivamente, sin embargo, el control de sólo leche produjo la misma viabilidad que trehalosa. A pesar que en todas las formulaciones no hubo control de la enfermedad en co-inoculación, se evidenció que todos los aislamientos presentaron al menos un mecanismo de acción. Adicionalmente, se notó que la liofilización afectó diferentemente la viabilidad celular de los aislamientos seleccionados, lo cual, además de potenciar la patogenicidad de *B. cinerea* con leche, no permitió evidenciar la expresión de los mecanismos de control de los aislamientos en un ambiente oligotrófico.

Palabras clave: Formulación, mezclas, liofilización, levaduras antagónicas, *B. cinerea*, rosas.

Abstract

The yeasts have action mechanisms against *B. cinerea*: competence for nutrients and space, production of inhibitory secondary metabolites, production of volatile organic compounds (VOCs), and others. However, the yeasts need to be formulated for their stabilization and biological activity in function of time. The formulations have used mono-inoculums of antagonistic yeasts as active principle, however, the antagonistic mix have been used too, but relegated them to a second place. This work did development a prototype of lyophilized formulation (freeze-drying), with antagonistic capacity of a yeasts mix against *B. cinerea*. Six isolates yeasts were employed: LvGr20, LvSb29, LvGr3, LvGr26, LvGr1 and LvGr10, from strain collection agricultural microbiology laboratory, IBUN, Bogotá D.C. The evaluation of their biocontrol activities was made by *in vitro* antagonism, using the dual culture technique and, *in vivo*, employing petals of rose (*Rosa* sp. var. Vendela), calculating the dose-response to cellular concentrations that ranged between 10^5 and 10^8 CFU/mL of yeast. The effect of the VOCs production during the development of disease using petals of rose was evaluated too. To determinate the compatibility between the two selected isolates (LvGr20 y LvSb29), the effect of the proportions on cellular mixes with two yeasts and the effect of the interactions in two mixes yeasts (10^6 - 10^8 CFU/mL) were evaluated *in vivo*, for the development of a prototype of formulation with biocontrol activity against *B. cinerea*. With these results, the prototype was developed, using mannitol and trehalose 1% y 5% m/v like additives of a formulation, employing a mix with ratio 2:1 of LvGr20 in respect to LvSb29 and using lyophilization as cellular stabilization strategy; the formulations were storing to 4°C during sixty days. After this time the viability and antagonistic activity of the formulations in co-inoculation with *B. cinerea* were assessed. After 60 days, the formulation with trehalose was higher than mannitol formulation viability values, 18% and 14% respectively, however, the control milk produced the same viability than trehalose. Although in all formulations there was not disease biocontrol with co-inoculation, all isolates showed at least one action mechanism. In addition, the lyophilization affected differently the cellular viability of the selected isolates, it, furthermore of to potentiate the *B. cinerea*'s pathogenicity with not fat milk, didn't permit to show the expression of the action mechanisms of the isolates in an oligotrophic environment.

Keywords: Formulation, mixes, lyophilization, antagonistic yeasts, *B. cinerea*, roses.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	5
Abstract.....	6
1. Introducción.....	13
2. Marco teórico.....	20
2.1. Importancia del sector floricultor colombiano	20
2.2. Aspectos generales de control de enfermedades de las flores y rosas	20
2.3. Antecedentes moho gris en Colombia.....	22
2.4. Formulaciones en el control biológico	23
2.4.1. Funciones de una formulación	23
2.4.2. Tipos de formulaciones.....	24
2.4.3. Aditivos en formulaciones	24
2.4.4. Formulaciones con mezclas celulares y pasos para su uso comercial	26
3. Problema	27
4. Justificación	28
5. Objetivos	30
5.1. Objetivo general	30
5.2. Objetivos específicos	30
6. Metodología	31
6.1. Caracterización antagónica de seis aislamientos de levaduras	31
6.1.1. Aislamientos de levaduras y patógeno	31
6.1.2. Antagonismo <i>in vitro</i> de seis aislamientos de levaduras contra <i>Botrytis cinerea</i>	32
6.1.3. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela.....	33
6.1.4. Efecto de la concentración celular de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela	34
6.1.5. Compatibilidad entre dos aislamientos de levaduras seleccionadas	35
6.2. Criterios de mezcla de dos aislamientos de levaduras compatibles para formulación	36
6.2.1. Efecto de la proporción celular de dos levaduras seleccionadas (mezclas) contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela.....	36
6.2.2. Efecto de las interacciones de dos levaduras seleccionadas contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela.....	37

6.3. Desarrollo de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras	38
6.3.1. Evaluación del efecto de la liofilización en la formulación empleando manitol y trehalosa al 1% y 5% como agentes crio-preservantes con una restitución	39
6.3.2. Evaluación del proceso de liofilización sobre diferentes prototipos de formulación en función del tiempo	40
6.4. Evaluación de la actividad antagónica de los prototipos de formulación contra <i>B. cinerea</i> en pétalos de rosa variedad Vendela.....	41
6.5. Análisis estadístico.....	41
7. Resultados y Discusión	43
7.1. Caracterización antagónica de seis aislamientos de levaduras	43
7.1.1. Antagonismo <i>in vitro</i> de seis aislamientos de levaduras contra <i>Botrytis cinerea</i>	43
7.1.2. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela.....	44
7.1.3. Efecto de la concentración celular de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela	49
7.1.4. Compatibilidad entre dos aislamientos de levaduras seleccionadas para desarrollar el prototipo de formulación.....	57
7.2. Criterios de mezcla de dos aislamientos de levaduras compatibles para formulación	57
7.2.1. Efecto de la proporción celular de dos levaduras seleccionadas (mezclas) contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela.....	58
7.2.2. Efecto de las interacciones de dos levaduras seleccionadas contra el moho gris <i>in vivo</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela.....	60
7.3. Desarrollo de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras	63
7.3.1. Evaluación del efecto de la liofilización (secado-congelado) en la formulación empleando manitol y trehalosa al 1% y 5% con una restitución	63
7.3.2. Evaluación de la liofilización sobre diferentes prototipos de formulación a base de levaduras antagónicas en función del tiempo	65
7.4. Evaluación de la actividad antagónica de los prototipos de formulación contra <i>B. cinerea</i> en pétalos de rosa variedad Vendela.....	73
8. Conclusiones	75
9. Recomendaciones.....	76
10. Bibliografía.....	77
11. Anexos	84

TABLA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de tres levaduras contra <i>B. cinerea</i> en pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	45
Figura 2. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de tres levaduras contra <i>B. cinerea</i> en pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	46
Figura 3. Efecto de la concentración celular de LvGr20 contra <i>Botrytis cinerea</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	49
Figura 4. Efecto de la concentración celular de LvSb29 contra <i>Botrytis cinerea</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	50
Figura 5. Efecto de la concentración celular de LvGr3 contra <i>Botrytis cinerea</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	51
Figura 6. Efecto de la concentración celular de LvGr1 contra <i>Botrytis cinerea</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	52
Figura 7. Efecto de la concentración celular de LvGr10 contra <i>Botrytis cinerea</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	53
Figura 8. Efecto de la concentración celular de LvGr26 contra <i>Botrytis cinerea</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	54
Figura 9. Efecto de tres proporciones celulares de mezclas de LvGr20 y LvSb29 contra <i>Botrytis cinerea</i> sobre pétalos de rosa variedad Vendela <i>in vivo</i>	58

Figura 10. Efecto de la concentración celular en dos proporciones celulares (mezclas) de LvGr20 y LvSb29 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*.. 60

Figura 11. Recuento de células totales de las formulaciones en mezcla 2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29 después de liofilizar usando manitol y trehalosa al 1% y 5% m/v..... 64

Figura 12. Recuento de células totales de los prototipos de formulación con mezcla 2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29 antes de liofilizar usando manitol al 1% y 5% m/v más leche descremada..... 65

Figura 13. Log₁₀ de la viabilidad (UFC/mL) del prototipo de formulación desarrollado con manitol a dos concentraciones m/v durante sesenta días después de liofilizar en combinación con leche descremada 10% m/v, empleando dos restituciones..... 66

Figura 14. Recuento de células totales de los prototipos de formulación con mezcla 2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29 antes de liofilizar usando trehalosa al 1% y 5% m/v más leche descremada..... 67

Figura 15. Log₁₀ de la viabilidad (UFC/mL) del prototipo de formulación desarrollado con trehalosa a dos concentraciones m/v durante sesenta días después de liofilizar en combinación con leche descremada 10% m/v, empleando dos restituciones..... 68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Antagonismo <i>in vitro</i> de seis levaduras contra <i>Botrytis cinerea</i> en medio de cultivo PDA.....	44
Tabla 2. Porcentaje de viabilidad total de las formulaciones elaboradas al cabo de sesenta días.....	69
Tabla 3. Porcentaje de incidencia (%) y grado de severidad de los prototipos de formulación desarrollados en combinación con leche en co-inoculación con <i>B. cinerea</i> después de sesenta días de almacenamiento a 4°C.....	73

LISTA DE SÍMBOLOS Y DEFINICIONES

Símbolos	Definición
®	Marca registrada
°C	Grados Celsius
ADE	Agua destilada estéril
Células/mL	Células por mililitro
Conidias/mL	Conidias por mililitro
h	Hora
I	Restitución con agua destilada estéril
II	Restitución con Buffer
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
m/v	Porcentaje masa a volumen
mBar	MiliBares
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ²	Milímetros cuadrados
pH	Potencial de hidrogeniones
PROC GLM	Programm general lineal model
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S.A.S.	Statistical analysis system
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro
µL	Microlitro

1. Introducción

En cuanto a su hábito ecológico, los microorganismos patógenos que atacan a las plantas han sido estudiados desde la interacción que ejercen con sus simbiontes y han sido clasificados como biotrófos y necrótrofos (**Punja & Utkhede 2003**). Los biotrófos (ej. hongo mildew polvoso) sólo crecen y se reproducen en el hospedero vegetal vivo (parásitos obligados), mientras que los necrótrofos (ej. enfermedad del moho gris) como *Botrytis cinerea*, son hongos oportunistas que crecen y se reproducen en los desechos vegetales o materia orgánica, pero pueden invadir tejidos vegetales senescentes o heridos (**Punja & Utkhede 2003**). Siguiendo esta estrategia *B. cinerea* puede invadir más de 200 especies de plantas de interés agronómico (**Huang et al. 2011**).

En su ciclo de vida en frutos de fresa, *B. cinerea*, empleando estructuras vegetativas como conidias utiliza pétalos, sépalos, estambres, pistilos y pedúnculos senescentes como fuentes de sustrato importantes para desarrollar su micelio; tal micelio es capaz de invadir receptáculos contiguos e iniciar la pudrición del fruto (**Sutton 1995**). Por ello, el conocer el ciclo de vida de un fitopatógeno es importante para implementar estrategias de control de la enfermedad (**Punja & Utkhede 2003**).

El uso de hongos y, particularmente levaduras biocontroladoras, conduce a la interrupción del ciclo de vida del patógeno, lo cual sucede por varios mecanismos: prevención de la infección; reducción en la colonización de los tejidos de los hospederos y reducción de la esporulación o de la supervivencia del patógeno (**Punja & Utkhede 2003**). Las levaduras están en los clados Ascomycota y Basidiomycota, los cuales actualmente están anidados en el sub-reino Dikarya, el cual a su vez reside en el reino Fungi (**Hibbett et al. 2007**). Muchos de estos hongos existen en o cerca de las hojas, raíces y en otras estructuras actuando como epífitos o saprófitos, empleando nutrientes disponibles en varios nichos (**Punja & Utkhede 2003**).

Las levaduras han sido evaluadas durante las dos últimas décadas con mayor atención, enfocándose contra las enfermedades que promueven otros hongos

en sus hospederos (Liu et al. 2013). De esta manera se han postulado mecanismos varios para explicar la interacción antagónica entre los simbios: **competencia por recursos nutricionales y espacio; micoparasitismo en el patógeno; secreción de compuestos antifúngicos (producción de enzimas y toxinas que degradan las paredes celulares del patógeno); inducción de resistencia en el hospedero; formación de bio-películas; relación en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) en la respuesta de defensa y; generación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en inglés) (Janisiewicz & Korsten 2002; Huang et al. 2011; Lima et al. 2013; Liu et al. 2013).**

En cuanto al mecanismo de control reportado para el agente bio-controlador *Gliocladium roseum* contra *B. cinerea* en fresa se consideran varias relaciones ecológicas, entre ellas, la mejor conocida es la que se lleva a cabo en las hojas. Este agente bio-controlador igual que el patógeno, tiene la capacidad de penetrar en las hojas mientras que ellas están verdes y colonizan los tejidos progresivamente hasta que senescen y mueren; se ha reportado que después de inocular el patógeno, se evidenció una supresión en el crecimiento del mismo. En esa vía el bio-controlador coloniza y explora los tejidos de la hoja, pero más rápido que el patógeno, evitando ampliamente la colonización del mismo. Sin embargo, la capacidad antagónica del microorganismo se ve relegada cuando se inocula en tejidos senescentes y muertos, puesto que el patógeno ya ha invadido casi todo. Lo anterior evidencia que existe una competencia –en este caso particular- por sustrato, sin descartar competencia por antibiosis o hiperparasitismo, como mecanismo bio-controlador de *Gliocladium roseum* contra *B. cinerea* en hojas de fresa (Sutton 1995).

Por otro lado las levaduras usadas para manejar enfermedades pos-cosecha en huertas, se enfrentan a una gran cantidad de condiciones de estrés, incluyendo temperatura extrema, baja humedad, estrés oxidativo, ausencia de nutrientes y pH adverso, factores que pueden afectar su viabilidad y eficacia. Por lo tanto, la tolerancia ante estrés abiótico es un atributo esencial para las levaduras usadas como agentes bio-controladores. En esa lógica, varios métodos que incluyen manipulación fisiológica, adaptación al estrés y, uso de

sustancias exógenas anti-estrés, han sido empleadas para optimizar las respuestas, mejorando la eficacia. Frente a ello una formulación apropiada y una evaluación a gran escala, son pasos fundamentales en el proceso de desarrollo de un producto bio-controlador comercial y, por tanto, algunos estudios piloto en formulación líquida y sólida han sido realizados. Al respecto, las levaduras marinas representan una opción oportuna para la manipulación de las condiciones de estrés, puesto que provienen de lugares con condiciones ambientales diferentes, lo cual, les permite a la hora de generar agentes bio-controladores, ser más tolerantes a dichas condiciones (Liu et al. 2013).

Particularmente, cuando las levaduras tienen contacto con la superficie de la fruta, estas colonizan las heridas del hospedero, creciendo rápidamente y, durante las 24 primeras horas disminuyen la oferta de nutrientes y físicamente ocupan el espacio de la herida; este es el paso más importante de la acción de las levaduras, porque allí se determina **la competencia por nutrientes y exclusión de nicho**. Una vez establecida la levadura, esta genera una serie de moléculas que interactúan con el tejido del hospedero, lo cual activa los mecanismos de defensa del mismo, regulando la densidad poblacional de la levadura a través de cambios de pH, producción de compuestos oxidantes e induciendo cambios morfológicos del antagonista. Por su parte, las levaduras se adhieren a los tejidos del hospedero y a las paredes celulares del patógeno formando bio-películas, secretando enzimas degradadoras de paredes celulares fúngicas y, capturando el hierro (mediante sideróforos) necesario para el crecimiento del patógeno. Al respecto de la captura de hierro, se ha evidenciado que el contenido de este elemento en el hospedero es un recurso para aprovechar el efecto antagónico de las levaduras sobre el patógeno. Por otro lado, las ROS generadas a partir de la interacción entre el hospedero y la levadura, determinan la viabilidad del antagonista; al respecto se ha evidenciado que al someter las levaduras a niveles sub-letales de ROS, posteriormente pueden tolerar niveles más altos de estrés oxidativo y, se ha reportado, que la cisteína-betaína determina tal tolerancia. Lo anterior pone en evidencia la capacidad adaptativa de las levaduras (Liu et al. 2013).

Adicionalmente, se han considerado dos atributos determinantes en la actividad de las levaduras: **la capacidad de alcanzar una densidad celular específica en el sitio de la infección y, la habilidad de las mismas células de unirse entre sí a los tejidos del hospedero y a las esporas e hifas del patógeno.** Una vez establecidos estos dos fenómenos, se promueve en las levaduras un cambio en la expresión de genes y metabolismo, lo cual, conlleva a la generación de bio-películas. Este cambio en la morfología de la población de las levaduras promueve a que disminuyan el espacio físico disponible para el patógeno, interfiriendo con el flujo de nutrientes y/o señales de germinación desde el hospedero a las esporas del patógeno (Liu et al. 2013). **No obstante, existen criterios generales para un antagonista ideal:** Ser un organismo genéticamente estable; efectivo a bajas concentraciones; no ser específico en sus requerimientos nutricionales; efectivo contra un rango amplio de patógenos y en diferentes productos cosechados; resistente a pesticidas; no ser productor de metabolitos de riesgo para los humanos o para el hospedero; preparable en una forma que pueda ser efectivamente almacenado y dispersado y, compatible con tratamientos físicos y químicos (Sharma et al. 2009).

En cuanto a formulación, se ha demostrado que al aumentar la cantidad de polioles y azúcares en *Candida sake*, adicionando glucosa, glicerol o trehalosa al medio de crecimiento, se puede incrementar su tolerancia ante estrés hídrico. Sin embargo, se debe recordar que la exposición leve o subletal a un estrés ambiental determina la tolerancia ante el mismo estrés aumentado en las levaduras (Liu et al. 2013).

En términos prácticos, la preparación comercial de un producto biológico necesita retener eficacia y poseer vida útil prolongada (viabilidad). Por consiguiente, entre las ventajas de las formulaciones sólidas comparadas con las líquidas están: una vida útil más prolongada bajo condiciones no refrigeradas, protección del producto de contaminación durante el almacenamiento y, fácil envío en la distribución del producto. Sin embargo, las formulaciones líquidas ofrecen producción a menor costo y la necesidad de la rehidratación es eliminada. **A pesar de las diferencias entre las dos clases de formulaciones, un aditivo con función de protector es aplicado a los**

dos tipos (sólida y líquida) para disminuir el impacto de los estreses ambientales en la viabilidad celular y eficacia (Liu et al. 2013).

Esencialmente, en las formulaciones la efectividad de los inoculantes microbianos antagonistas está determinada por dos características: **la primera hace referencia al tiempo de aplicación pos-cosecha**, puesto que se ha evidenciado que hay más control del patógeno cuando se hace la inoculación lo más inmediatamente posible después a la cosecha; **la segunda característica hace referencia a la disponibilidad de agua que tiene el agente microbiano antagonista**, puesto que este posee mayor control del patógeno cuando hay un mínimo de humedad para su supervivencia; en otras palabras ambientes secos, hacen ineficaz su efecto (**Sharma et al. 2009**).

Sin embargo, hay que destacar que los antagonistas deben también tener estrategias adaptativas respecto al patógeno; entre las estrategias están las tasas de crecimiento muy sensibles a factores ambientales, por ejemplo la temperatura. No obstante, los antagonistas microbianos no tienen un 100% de eficiencia de actividad contra el patógeno, por tanto es necesario incluir estrategias químicas (nutrientes) que garanticen la actividad lo más alta posible (**Sharma et al. 2009**).

En el desarrollo de una formulación es imperativo considerar: 1. La calidad y procesamiento del transportador (generalmente llamado “*carrier*” (**Jones & Burges, 1998**), el cual, deberá cumplir con dos características: apoyar el crecimiento del microorganismo a propagar y, mantener densidades poblacionales deseadas de cepas inoculantes sobre un periodo de tiempo relacionado con una aplicación industrial (ej. manejo pos-cosecha que implica tiempo de transporte hasta el consumidor final); 2. La pureza y eficiencia de la cepa (actividad) y; 3. La presencia de un adecuado número de células viables (viabilidad) en el producto final (**Stephens & Rask 2000**).

Los inoculantes y formulaciones poseen tres presentaciones físicas: líquido, polvo y granular; estas dos últimas generalizadas como **sólidas**. Cada uno de ellos determina limitaciones en la viabilidad del formulado; ejemplo de ello,

implementando formulaciones granulares con algunos *carrier* como la turba (si es la aplicación deseada), se obtiene actividades de agua altas, las cuales no se pueden disminuir sin vulnerar la vida útil del producto activo (**Jones & Burges, 1998; Stephens & Rask 2000**).

Por lo anterior existen restricciones mínimas para el desarrollo de una formulación con el objetivo de aumentar la actividad, viabilidad y pureza de las levaduras antagonistas: **manipulaciones físicas y químicas durante el almacenamiento**: frutos y vegetales generalmente son almacenados a temperaturas, humedad relativa y combinaciones de gas predeterminadas. Los antagonistas (principio activo biológico) **se seleccionan** con base en la tolerancia a las condiciones pos-cosecha del producto a almacenar (**Sharma et al. 2009**).

También existen otras estrategias para aumentar la eficacia de la actividad controladora de los principios activos biológicos de productos formulados y, dentro de tales, está el empleo de mezclas o poli-inóculos de tales microorganismos (**Xu et al. 2011**). Al respecto se ha buscado aprovechar los **mecanismos complementarios** de diversos microorganismos con potencial para ser implementados en formulaciones, mezclándolos por su actividad antagónica más alta contra alguna enfermedad, pero ello representa que el efecto neto pueda ser incrementado, disminuido o similar como si se usara uno solo. Esto puede representar interacciones entre los agentes bio-controladores de tipo sinergia, aditividad o antagonismo (**Xu et al. 2011**). Existen dos modelos de estudio de mezclas de microorganismos desde sus mecanismos de acción: 1. Independencia de Bliss: asume que los agentes bio-controladores empleados poseen mecanismos diferentes, así el uso combinado de tales agentes es representado como la unión de dos eventos probabilísticamente independientes. 2. Aditividad de Loewe: asume que los agentes empleados actúan a través de mecanismos similares, llevando al concepto de sustitución de dosis. Cualquiera que sea el enfoque podrá darse sinergia, aditividad o antagonismo (**Xu et al. 2011**). Por lo anterior lo fundamental es conocer los mecanismos de acción de los microorganismos para desarrollar una formulación.

Por todo lo anterior el objetivo general de este trabajo es diseñar y evaluar un prototipo de formulación a base de la mezcla de dos levaduras filosféricas con actividad biocontroladora contra *Botrytis cinerea* en rosas.

2. Marco teórico

2.1. Importancia del sector floricultor colombiano

Colombia es el segundo productor mundial de flores, **siendo** Holanda el primero y Ecuador el tercero a nivel mundial. E.E.U.U es el mayor importador de flores colombianas (85,01% de la producción total), para el año 2012 Colombia exportó a ese país de 57,1% de las rosas producidas, el 86,8% de los ramos mixtos, el 88,5% de los claveles, el 99,5% de los pompones, el 69,9% de los ramos de rosas, el 96,5% de las alstroemerias y el 97,6% de los claveles miniatura, lo cual representó un ingreso anual de 1267 millones de dólares, donde las rosas determinaron el 28.5%. Los principales destinos de exportación de rosas frescas desde Colombia son Estados Unidos, Japón, Canadá y la Unión Europea (**Agronet 2013**)(**Sectorial 2013**), países que determinan el cumplimiento de **normas de calidad** para la importación de flores (**Boletín Exterior 2011**).

Adicionalmente el área y producción de rosas en Colombia, se ha incrementado entre el año 2008 y 2011. No obstante, para el mismo período el rendimiento en la producción de rosas se ha mantenido entre 8-10 ton/ha, siendo el 2011 el año con menor rendimiento. Entre los principales departamentos productores de rosas en Colombia se encuentran: Cundinamarca, Antioquia, Boyacá y Quindío, siendo los dos primeros con la producción más alta; 89.8% y 8.2% de participación en el mercado internacional, respectivamente. Sin embargo, al considerar el rendimiento como criterio de clasificación Antioquia es el primero, seguido de Cundinamarca, Quindío y Boyacá consecutivamente (**Agronet 2013**).

2.2. Aspectos generales de control de enfermedades de las flores y rosas

Los productos agrícolas **enfrentan varios estreses ambientales en su producción**, así las plantas y en particular las rosas son susceptibles de ser

atacadas por un espectro considerable de patógenos, enfermedades y desórdenes fisiológicos, lo que va en detrimento de su calidad y, por tanto, en la aceptación del producto en mercados internacionales (**Gill et al.** 2001; **Marschner** 2012), NTC ISO 9000 (**García & Peña** 2008). Por tal motivo para contrarrestar el efecto de tales estrés y, particularmente de las enfermedades, se han considerado tres etapas de producción pre-cosecha, cosecha y pos-cosecha, dentro de este sistema agrícola, para la generación de estrategias en el manejo de los patógenos; tales estrategias pueden ser culturales o técnicas soportadas a partir de la biología, física y química (**Janisiewicz & Korsten** 2002).

Dentro de las estrategias técnicas primordialmente está la aplicación de agentes químicos (fungicidas, insecticidas y herbicidas) con un propósito específico en la mitigación de los efectos generados por algún organismo en el cultivo. Esta estrategia se aplica durante las tres etapas de producción mencionadas arriba (**Janisiewicz & Korsten** 2002; **Punja & Utkhede** 2003; **Liu et al.** 2013). Existe una gran variedad de fungicidas empleados en el cultivo de las rosas (**Moorman** 2013), sin embargo, los más empleados a nivel nacional en todo el sector agrícola son Mancozeb, Clorotalonil y, Propineb (**Agronet** 2013).

Por su parte las estrategias físicas (manejo de temperatura, humedad relativa, presión, empaquetamiento, etc.) son implementadas mayoritariamente cuando el producto agronómico ya ha sido cosechado (**Janisiewicz & Korsten** 2002). Además, se ha evidenciado que tanto estrategias físicas y/o químicas pueden ser consideradas como condiciones ambientales que puedan favorecer la supervivencia de los microorganismos bio-controladores (**Liu et al.** 2013).

Adicionalmente, el control biológico consiste en aplicar organismo(s) como principio activo y, particularmente las levaduras han sido de gran interés para su estudio y uso con mayor fuerza en los últimos veinte años (**Liu et al.** 2013). Los agentes bio-controladores son: virus, bacterias, hongos, insectos, siendo empleados solos o en combinaciones contra un agente etiológico de una enfermedad (**Janisiewicz & Korsten** 2002). Fundamentalmente se aprovechan las propiedades de los principios activos para contrarrestar el efecto de agentes

patógenos en los productos agrícolas, como frutos y flores (**Janisiewicz & Korsten 2002; Punja & Utkhede 2003; Liu et al. 2013**).

En el cultivo de las rosas se han identificado numerosas enfermedades generadas a partir de una especie patógena: antracnosis (*Sphaceloma rosarum*), mancha negra (*Diplocarpon rosae*), moho gris (*Botrytis cinerea*), canchales (*Coniothyrium fuckelii*, *Cryptosporella umbrina*, *Coniothyrium wernsdorffiae*, *Cylindrocladium scoparium*), tumores de cuellos (*Agrobacterium tumaciens*), ahogamiento y pudrición (*Phytium* sp.), mildew veloso (*Peronospora sparsa*), mildew polvoso (*Sphaerotheca pannosa*) y virosis de diferentes clases (**Pizano de Márquez 2003; Moorman 2013**).

2.3. Antecedentes moho gris en Colombia

La enfermedad causada por *B. cinerea* es denominada el **moho gris** de las flores y frutos (**García et al. 2008**). *B. cinerea* es uno de los principales agentes patógenos en la producción comercial de plantas (**Gill et al. 2001**). En Colombia existen antecedentes del ataque de *B. cinerea* en las flores, con reporte de pudrición en rosas (Arbeláez-Torres 1987), particularmente en hojas y tallos (**Montoya & Hincapié 1997**). Si la infección llega a podrir la corona, causa la muerte de plantas de estátice (**Arbeláez-Torres 1987**).

Adicionalmente existen factores ambientales que favorecen la enfermedad en plantas y, a pesar de la integridad anatómica que la planta pueda tener, esta puede ser colonizada por *B. cinerea* (**Pizano de Márquez 2003**). *B. cinerea* ataca principalmente las plantas herbáceas, siendo especialmente susceptibles las flores y hojas maltratadas, pero bajo condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas, los tallos y follaje vigorosos pueden verse afectados. En todas las especies afectadas por *B. cinerea*, el primer síntoma es la aparición de una pequeña mancha de color habano que se puede agrandar rápidamente (**Gill et al. 2001**). Una vez el tejido enfermo rodea el tallo, el tejido del hospedero se marchita. La enfermedad se evidencia fácilmente por la presencia de un moho gris algodonoso sobre las partes afectadas y, dependiendo del ambiente, este hongo puede podrir las flores rápidamente; los

pétalos infectados caen sobre las hojas o tallos extendiendo así el tizón. Por lo anterior entre las estrategias de control de la enfermedad, se usa una disminución en el tiempo de exposición de las flores a situaciones de humedad relativa alta. También se implementan estrategias de riego por goteo y **fungicidas**, sin embargo, en cuanto a los fungicidas *Botrytis* sp. ha mostrado resistencia a los mismos (**Gill et al.** 2001).

Existen reportes de aparición de la enfermedad del moho gris en Colombia, tanto en frutales como en ornamentales, sin embargo, hay un desconocimiento en el impacto del mismo en la producción pos-cosecha de las rosas, empero se reconoce que esta enfermedad disminuye la calidad de las mismas y, por tanto, se han evaluado estrategias químicas y físicas para contrarrestar la enfermedad (**Bojacá & Gómez** 2008; **Asocolflores, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial** 2009).

2.4. Formulaciones en el control biológico

Las alternativas biológicas (organismos vivos), al ser aplicadas en los cultivos de interés para el control de enfermedades, si bien actúan por sí solas, requieren de una formulación para asegurar su estabilidad en función del tiempo en su nuevo nicho (fruto o flor). Cada hospedero ofrece un ambiente particular que representa condiciones ambientales adversas para el agente bio-controlador (**Liu et al.** 2013), por lo tanto se han empleado diferentes **formulaciones** para garantizar la **viabilidad, actividad y pureza** de los principios activos (agentes bio-controladores, en este caso levaduras) mediante la aplicación de aditivos que estabilizan las condiciones mínimas de funcionamiento de los microorganismos (**Jones & Burges** 1998; **Stephens & Rask** 2000).

2.4.1. Funciones de una formulación

Las principales funciones de una formulación son: 1. Estabilización del agente bio-controlador durante su producción, distribución y almacenamiento, previniendo el crecimiento y muerte del principio activo; no promover el crecimiento de contaminantes, ni producción de proteasas del principio activo; 2. Fácil manipulación y aplicación sobre el sustrato a usar; 3. Protección del

agente bio-controlador ante condiciones ambientales adversas del sustrato usado, incrementando la persistencia celular; 4. Mejorar la actividad bio-controladora sobre el sustrato, incrementando el antagonismo, reproducción, contacto e interacción del agente bio-controlador con el agente fitopatógeno (**Jones & Burges 1998**).

2.4.2. Tipos de formulaciones

Existen dos tipos principales de formulaciones: 1. Sólidas o secas: pueden ser en polvo y granular y, sus diferencias radican en el tamaño de las partículas o agregados del *carrier* en el que se re-suspenden inicialmente los agentes bio-controladores. También están los polvos hidratables, los cuales una vez son diseñados como formulados en polvo secos, se les adiciona un *carrier* líquido (generalmente agua) para restituir el producto antes de usarse; 2. Líquidas: implementan un *carrier* líquido, usualmente agua o aceite, sin embargo solventes orgánicos también pueden usarse. Las más comunes son concentrados en suspensión y emulsión, aunque también hay otros tipos especializados como los microencapsulados (**Jones & Burges 1998**). Adicionalmente, las formulaciones tienen variaciones en su desarrollo, puesto que pueden incorporar condiciones ambientales diferentes (estrés térmico, nutricional, hídrico) desde la producción hasta el almacenamiento del agente bio-controlador, con el fin de obtener un máximo de estabilización celular (vida útil) en el tiempo evaluado (**Liu et al. 2009; Melin et al. 2011; Navarta et al. 2014**).

2.4.3. Aditivos en formulaciones

Adición de aditivos de sales en los cultivos microbianos: la adición de sales aumenta la bio-eficacia de algunos antagonistas contra patógenos en frutas y vegetales. Entre diferentes aditivos de sales están: cloruro de calcio, propionato de calcio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, metasulfito de potasio y molibdato de potasio, los cuales aumentan la actividad antagónica en

post-cosecha de frutas y vegetales. Ello depende de la concentración del antagonista, concentración de aditivos de sal, su compatibilidad mutua y duración y tiempo en el que ellos son aplicados (**Sharma et al.** 2009).

Adición de nutrientes y productos vegetales en cultivos microbianos: la actividad de los antagonistas también puede ser mejorada con la adición de compuestos nutritivos o productos naturales vegetales: compuestos nitrogenados como L-asparagina y L-prolina y, de azúcares como 2-deoxi-D-glucosa (0.2%) (**Sharma et al.** 2009) y trehalosa concentraciones de 5% o 10% incrementa marcadamente la viabilidad celular en las levaduras *Cryptococcus laurentii* y *Rhodotorula glutinis* después de liofilización (**Sharma et al.** 2009; **Liu et al.** 2013).

Independientemente del tipo de formulación, se ha contemplado la incorporación de aditivos -o también llamados excipientes- en diferentes concentraciones para promover un posible efecto protector en los agentes bio-controladores. Adicionalmente, también existen técnicas que promueven la estabilización celular y, entre ellas la liofilización (también nombrada secado-congelado), son catalogadas como las más eficientes por mucho tiempo, pero también las más costosas de implementar (**Day & Stacey** 2007; **Sharma et al.** 2009; **Joshi & Thorat** 2011). Esta técnica genera una deshidratación al vacío de muestras líquidas previamente congeladas, promoviendo un producto soluble, estable, activo y seco en función del tiempo (**Day & Stacey** 2007).

La liofilización consiste en: 1. Enfriamiento de una muestra líquida, seguida por la conversión de una solución congelable de agua en hielo. La cristalización de productos cristalizables y formación de una matriz amorfa constituida por productos no cristalizantes asociados a una humedad sin congelar; 2. Sublimación del hielo bajo el vacío; 3. “Evaporación” del agua a partir de la matriz amorfa y; 4. Desorción de la humedad químio-absorbida en el aparente bloque seco (**Day & Stacey** 2007). Adicionalmente, en las investigaciones científicas que han empleado liofilización, existen diferencias en las condiciones de cada paso enunciado, sin embargo, ha sido implementada para evaluar la estabilización de levaduras, comparar eficiencias con otros métodos

de crio-preservación y, evaluar su efecto en la actividad bio-controladora contra algún fitopatógeno pos-cosecha en productos agrícolas (**Liu et al. 2009; Melin et al. 2011; Navarta et al. 2014**).

2.4.4. Formulaciones con mezclas celulares y pasos para su uso comercial

La mayoría de estudios han desarrollado formulaciones como productos comerciales que están constituidos a base de **mono-inoculos** de agentes bio-controladores, principalmente empleando bacterias u hongos, incluyendo levaduras (**Sharma et al. 2009; Liu et al. 2013; Cañamás et al. 2011**). Sin embargo, pocos son los trabajos que contemplan las mezclas celulares de levaduras como posibles principios activos en un prototipo de formulación (**Guetsky et al. 2001; Calvo et al. 2003**), aún así, existen evidencias experimentales *in vivo* del efecto bio-controlador de mezclas de agentes antagonistas contra enfermedades en productos agrícolas, poniendo en evidencia interacciones sinérgicas, aditivas y antagonistas entre ellos, evaluando el desarrollo de la enfermedad (**Guetsky et al. 2001; Calvo et al. 2003**). No obstante, al considerar mezclas de microorganismos es necesario evaluar qué tan eficientes son frente a uno solo a implementar. Además, se debe indagar las condiciones físico-químicas de mezcla, puesto que ello representa la forma en que desarrollaría el prototipo de formulación (**Guetsky et al. 2001; Calvo et al. 2003; Sharma et al. 2009; Liu et al. 2013**).

3. Problema

Son varias las ventajas que puede tener una formulación (sólida o líquida) para el desarrollo de producto comercial a base de microorganismos para el control biológico de un agente fitopatógeno, puesto que esta determina la viabilidad de dicho principio activo, manteniendo el funcionamiento de los mecanismos de acción de los antagonistas, estabilizándolos en función del tiempo (**Sharma et al. 2009; Liu et al. 2013**). Es importante tener presente además, que no existe una formulación estándar para un agente bio-controlador, puesto que son muchas las diferencias en los requerimientos fisiológicos específicos para cada microorganismo de interés (**Janisiewicz & Korsten 2002; Punja & Utkhede 2003; Liu et al. 2013**).

Merece mencionar además, que la mayoría de formulaciones han implementado como principio activo un mono-inoculo de un agente bio-controlador, sin considerar que al incorporar mezclas de aislamientos se podría aumentar su efecto antagónico (**Sharma et al. 2009; Liu et al. 2013**). Aunque tal efecto está supeditado al tiempo en que se aplique el microorganismo sobre el sustrato de interés, el cual puede ser flores o frutas.

Es importante mencionar que si se contempla el uso de mezclas de agentes bio-controladores, pueden existir interacciones entre ellos, positivas o negativas, las cuales podrían determinar la eficacia del control de la enfermedad y, por tanto, establecer el costo/beneficio de usar una mezcla o un solo agente antagónico contra *B. cinerea* (**Xu et al. 2011**).

Por lo anterior es importante considerar la pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto de una formulación que implemente liofilización sobre la viabilidad, pureza y actividad de cada producto activo y su mezcla?

4. Justificación

El cultivo de las rosas es de gran importancia para la producción agrícola nacional debido a que es una actividad que involucra aproximadamente 182.174 empleos directos e indirectos. Adicionalmente Colombia es el segundo productor y exportador mundial de flores y, por tanto, las áreas destinadas para el cultivo de flores han aumentado (**Asocolflores, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 2009**), promoviendo el 95% de la producción total exportada (**Asocolflores, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 2009; Florverde 2009**) de la cual el 30% equivale a rosas (**Exterior 2011**). Adicionalmente, el mercado internacional de las flores es altamente exigente no únicamente en cuanto a la calidad, sino también en cuanto a la residualidad de los productos químicos y de un manejo ambientalmente amigable del cultivo, por lo que Colombia se ha visto avocada a implementar sellos verdes (ej. Flor Verde) que aseguren la incorporación de prácticas agrícolas ambientalmente amigables (**Asocolflores, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 2009**). Dentro de las exigencias para las flores se incluye unas flores libres de **plagas y enfermedades, sin daño visual**, que los botones se abran cuando corresponda y, que exista un manejo pos-cosecha que permita mantener a las flores un tiempo prolongado. Adicionalmente, los consumidores piden una producción amigable con el medio ambiente, lo cual, incide directamente en el menor uso posible de **agentes químicos de protección**, energía y fertilizantes, lo que a su vez son criterios para adquirir sellos de calidad internacional (**Boletín Exterior 2011**).

En ese sentido el producir limpiamente y conservar la calidad en pos-cosecha de las rosas, es un factor determinante para garantizar su mercado internacional, por consiguiente, el uso de estrategias sostenibles para garantizar la calidad es un criterio definitivo para el mantenimiento de un comercio efectivo de las flores de corte (**Janisiewicz & Korsten 2002; Punja & Utkhede 2003; Liu et al. 2013**).

Por ello la selección y uso de microorganismos como agentes bio-controladores que se presentan naturalmente en las plantas, es una herramienta sostenible, para garantizar la calidad del producto (flores) de manera natural (**Sharma et**

al. 2009). Adicionalmente, representan una alternativa de control frente al empleo de fungicidas químicos para contrarrestar las enfermedades ocasionadas por agentes fitopatógenos, (ej. *B. cinerea*); los fungicidas también representan un problema de salud pública, como también causa de la selección de aislamientos de patógenos resistentes, lo que eleva los costos de su implementación, de tal manera que el empleo de alternativas biológicas solos o en asocio a los fungicidas de origen químico para combatir este tipo de fitopatógenos son muy importantes para la industria de flores (**Ge et al.** 2010).

Las levaduras están entre los microorganismos como agentes potenciales para el control de enfermedades vegetales debido a su habilidad para colonizar la superficie de las hojas y frutos, poseer tasas reproductivas altas, bajos requerimientos nutricionales (Droby & Chalutz 1994; citado por Lima y colaboradores (2013) e inocuidad a partir de sus usos en fermentaciones industriales por cientos de años. Además las levaduras no producen esporas o micotoxinas a diferencia de otros potenciales microorganismos bio-controladores, tales como los hongos filamentosos, característica que en la aplicación de productos de consumo humano son oportunas para la inocuidad de los mismos (**Lima et al.** 2013).

Sin embargo, todos los antagonistas microbianos no tienen una vida útil prolongada y 100% de eficiencia de actividad contra el patógeno en condiciones naturales, por tanto, es necesario incluir estrategias que garanticen su viabilidad y actividad lo más altas posibles. Por ello es fundamental establecer formulaciones (sólidas y/o líquidas) que permitan mantener actividad antagónica en función del tiempo, cuyo proceso se hace a partir de la inclusión de aditivos de sales, nutrientes y productos vegetales (aminoácidos y/o azúcares) (**Sharma et al.** 2009).

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Diseñar y evaluar un prototipo de formulación a base de la mezcla de dos levaduras filosféricas con actividad biocontroladora contra *Botrytis cinerea* en rosas.

5.2. Objetivos específicos

- Seleccionar dos levaduras filosféricas compatibles entre sí que posean un alto potencial antagónico contra *B. cinerea* en Rosas de corte variedad vendela.
- Diseñar un prototipo de formulación basada en la mezcla de levaduras filosféricas como principio activo con actividad antagónica contra *B. cinerea*.
- Evaluar actividad antagónica contra *B. cinerea*, viabilidad y pureza del prototipo de formulación en función del tiempo.

6. Metodología

En el presente capítulo se dan a conocer mediante sub-secciones las metodologías implementadas, las cuales, van de la mano con un objetivo específico discriminado en la sección 5. A su vez cada metodología inicia con su objetivo correspondiente y, después, con la descripción del contexto experimental.

6.1. Caracterización antagónica de seis aislamientos de levaduras

El trabajo realizado por López (2012) permitió identificar las diez levaduras filósfericas con mayor potencial como bio-controladores de *B. cinerea* en flores de corte, de una colección de 25 aislamientos previamente seleccionados por Medina y colaboradores (2009). Partiendo de estos aislamientos, se seleccionaron dos levaduras para este trabajo empleando como criterio de selección las siguientes variables: antagonismo *in vitro*, porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea in vitro* por acción de compuestos orgánicos volátiles producidos por las levaduras y, valores bajos en los porcentajes de incidencia *in vivo*. La identificación molecular de los aislamientos, se realizó previamente mediante secuenciación de regiones variables del rDNA por López (2012).

Al realizar un análisis en conjunto de todas estas variables, se seleccionaron los seis aislamientos más promisorios de estas levaduras, IBUNLvGr3 (*Cryptococcus* sp.), IBUNLvGr20 (*Rhodotorula mucilaginosa*), IBUNLvSb29 (*Pseudozyma tsukubaensis*), IBUNLvGr1 (*Rhodotorula* sp.), IBUNLvGr10 (*Cryptococcus magnus*) e IBUNLvGr26 (*Candida hawaiiiana*). A partir de estos aislamientos de levaduras, se decidió hacer una **selección de los dos más promisorios**, considerando los resultados obtenidos en los experimentos que se describen a continuación:

6.1.1. Aislamientos de levaduras y patógeno

Los aislamientos de las levaduras seleccionados fueron obtenidos del Cepario del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la

Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Tales aislamientos de levaduras fueron recolectados a partir de folíolos de plantas sanas de mora de castilla *Rubus glaucus* Benth provenientes de cultivos localizados en el departamento de Cundinamarca (Colombia) en los municipios de Fusagasugá (Fusa) (1.728 m.s.n.m. y 19 °C temperatura promedio) y San Bernardo (1.600 m.s.n.m. y 20 °C temperatura promedio) (**Medina et al.** 2009). Todos los aislamientos de levaduras se mantuvieron semanalmente en agar-Sabouraud a 4°C. El aislamiento de *Botrytis cinerea* fue obtenido de cultivos de rosa y su mantenimiento en laboratorio se realizó en cultivos de placas de potato-dextrose-agar (PDA) incubadas a temperatura ambiente por 10 días.

Una vez preparados los aislamientos, se contempla realizar una caracterización antagónica, evaluando tres mecanismos de acción: producción de compuestos inhibitorios *in vitro*, producción de compuestos orgánicos volátiles *in vivo* y competencia por espacio y nutrientes *in vivo*. Las metodologías para la evaluación de cada mecanismo, se consignan en las siguientes tres secciones:

6.1.2. Antagonismo *in vitro* de seis aislamientos de levaduras contra *Botrytis cinerea*

Con el objetivo de evaluar la producción de compuestos inhibitorios difusibles en agar por parte de las levaduras contra *B. cinerea*, se empleó la técnica de enfrentamiento dual siguiendo la metodología de Medina et al. (2009) que consiste en:

Realizar siembras por agotamiento de cada uno de los seis aislamientos de levaduras en placas de Petri con PDA a 25°C durante 48 horas. Posteriormente a partir de tales cultivos, se sembraron dos estrías paralelas por levadura en nuevas placas de Petri con PDA y se llevaron a incubación a 25°C durante 48 horas. Al cabo de este periodo, se inoculó un “plug” de 25 mm² de *B. cinerea* con 10-15 días de crecimiento en la mitad de cada par de estrías incubadas. El tratamiento control consistió en no sembrar estrías de levaduras; todas las unidades experimentales se llevaron a cámara de crecimiento con temperatura

de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Al día cuatro se evaluó cualitativamente la categoría de inhibición *in vitro*: Categoría 1: Formación de halo inhibitorio. Categoría 2: Crecimiento de *B. cinerea* hasta el borde de la levadura. Categoría 3: Crecimiento de *B. cinerea* sobre la levadura. Cada tratamiento concebido como cada levadura se hizo por triplicado.

6.1.3. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de determinar si los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de cada levadura tienen un efecto en el desarrollo de la enfermedad moho gris sobre pétalos de rosa (tomado y modificado de López (2012)), se llevó a cabo el siguiente experimento:

Se realizaron cultivos en 20 mL de caldo Sabouraud contenidos en frascos Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, de cada uno de los seis aislamientos de levadura. Tales cultivos se incubaron en agitador a 29°C , 150 r.p.m., por 48 h. Pasado este tiempo, se determinó la concentración celular de cada producción por conteo directo en cámara de Neubauer, la cuál fue $2\pm 0.5\cdot 10^8$ Células/mL y se sembraron por extensión 100 μL con asa de Drigalski cada uno de los cultivos sobre PDA, para llevarlos a incubación a 25°C por 48 h. Posteriormente, se unió la base de placa de Petri donde se encontraba la levadura sembrada a otra base de placa de Petri que contenía un pétalo de rosa, sobre el cual se dispuso previamente una gota de 10 μL de una suspensión de *B. cinerea* previamente ajustada a $1\pm 0.5\cdot 10^4$ Conidias/mL. Las dos bases se sellaron con Parafilm®. Estas unidades experimentales se llevaron a cuarto de crecimiento a temperatura $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ por seis días. Al cabo de este tiempo se observó la incidencia y severidad de la enfermedad sobre cada unidad experimental, cualificando con la escala de severidad del Laboratorio de Microbiología Agrícola del IBUN (Medina et al. 2009)(Anexo A). Cada pétalo de rosa inoculada con el patógeno y enfrentado a la levadura correspondió a una unidad de muestreo y, nueve unidades de muestreo, conformaron una unidad experimental; el tratamiento control consistió en no usar levadura, sino solamente el mismo volumen de caldo Sabouraud. Se

realizaron tres réplicas experimentales por tratamiento bajo un diseño completamente al azar.

6.1.4. Efecto de la concentración celular de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de determinar el efecto de la concentración celular de cada uno de los seis aislamientos de levaduras, en la cual se observa actividad bio-controladora contra *B. cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela, asumiendo competencia por espacio y nutrientes (exclusión de nicho), se llevó a cabo el siguiente experimento:

Se realizaron por triplicado siembras por agotamiento de los seis aislamientos de levaduras en placas de Petri con agar-Sabouraud a 25°C durante 48 h. Luego del período de incubación se tomó una asada de la biomasa, la cual se re-suspendía en 1000µL de agua destilada estéril (ADE). Se estimó la concentración de esta suspensión mediante recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente, la suspensión se ajustó a 4×10^8 Células/mL a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones de 4×10^7 , 4×10^6 y 4×10^5 Células/mL, respectivamente; para corroborar cada una de las concentraciones celulares de trabajo, se usó la técnica de recuento en placa para cuantificar las unidades formadoras de colonias reales por mililitro (UFC/mL) empleadas. Una vez se obtuvieron las suspensiones celulares de las levaduras, se realizaron co-inóculos de las concentraciones de levadura previamente preparadas con un inóculo de *B. cinerea* ajustado a 3×10^4 Conidias/mL, mezclando 500 µL de cada una de las suspensiones de levaduras con 500 µL de la suspensión del hongo. Esta mezcla se agitó con vortex y se aplicaron 10 µL a cada pétalo de nueve contenidos en recipiente plástico cúbico, el cual contenía papel absorbente con 5 mL de ADE. Cada pétalo conformó una unidad de muestreo y nueve pétalos conformaron una unidad experimental. A cada unidad experimental se le aplicó por triplicado el mismo tratamiento y, cada tratamiento, fue cada una de las cuatro o tres concentraciones celulares de cada levadura; el tratamiento control de la enfermedad consistió en no usar levadura, sino solamente el mismo volumen

de ADE. Las unidades experimentales se llevaron a cuarto de crecimiento donde se ha evidenciado que la enfermedad se desarrolla efectivamente (temperatura $20\pm 1^{\circ}\text{C}$). Al cabo de siete días se realizó la evaluación de incidencia y severidad según la escala del laboratorio de Microbiología Agrícola (**Medina et al.** 2009) (Anexo A). Todos los tratamientos fueron elaborados concibiendo un diseño completamente al azar con un factor (cuatro o tres concentraciones celulares por levadura).

El siguiente paso de la caracterización antagónica de los seis aislamientos, consiste en generar criterios para seleccionar los dos con el antagonismo más alto contra *B. cinerea* y, con ello, evaluar la compatibilidad cualitativamente mediante el siguiente experimento:

6.1.5. Compatibilidad entre dos aislamientos de levaduras seleccionadas

Con el objetivo de establecer cualitativamente la compatibilidad entre los dos **aislamientos de levaduras seleccionados** para desarrollar el prototipo de formulación, se elaboró el siguiente experimento:

Se realizaron por triplicado e independientemente, siembras por agotamiento de (IBUNLvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* y (IBUNLvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis* en placas de Petri con agar-Sabouraud a 25°C durante 48 horas. Posteriormente, se prepararon suspensiones celulares a concentraciones de $4\cdot 10^8$ y $4\cdot 10^6$ Células/mL con ADE, de cada una de las levaduras. Después se usaron discos de papel de filtro estériles y se mojaron con las dos concentraciones celulares de cada levadura y se colocaron sobre una caja de Petri que estaba inoculada en extensión a las dos concentraciones celulares de levadura diferente. Se llevaron a incubación a 25°C durante 48 h y se evidenció la posible compatibilidad, observando o no halo de inhibición.

La compatibilidad entre todos los aislamientos se evaluó previamente a la evaluación de los dos aislamientos seleccionados.

Una vez evaluada la compatibilidad entre los aislamientos seleccionados, se plantean dos experimentos que involucran mezclas, con el objetivo de

evidenciar el efecto de proporciones celulares e interacciones en el desarrollo del moho gris. Tales experimentos se describen en la siguiente sección:

6.2. Criterios de mezcla de dos aislamientos de levaduras compatibles para formulación

En esta etapa de experimentos se evaluó el efecto de las proporciones celulares y el efecto de las interacciones en la mezcla de (IBUNLvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* y (IBUNLvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis* para considerarlos en el desarrollo del prototipo de la formulación, basado en Calvo et al. (2003) con modificaciones. La metodología correspondiente se da a continuación.

6.2.1. Efecto de la proporción celular de dos levaduras seleccionadas (mezclas) contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de evaluar el efecto de las proporciones celulares de dos agentes bio-controladores ((IBUNLvGr20) *R. mucilaginosa* e (IBUNLvSb29) *P. tsukubaensis* en la mezcla celular contra *B. cinerea in vivo*, se realizó el siguiente experimento:

Se realizaron por triplicado e independientemente, siembras por agotamiento de (LvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* y (LvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis* en placas de Petri con agar-Sabouraud a 25⁰C durante 48 h. Posteriormente, se realizaron suspensiones celulares “stock”, usando ADE y ajustando con cámara de Neubauer cada una de las réplicas de tratamiento para obtener una concentración de $4 \cdot 10^8$ Células/mL; para corroborar las concentraciones celulares de trabajo, se usó la técnica de recuento en placa para conocer las unidades formadoras de colonias reales por mililitro (UFC/mL). A partir de estas suspensiones celulares, se hicieron tres mezclas de proporciones diferentes entre las levaduras, las cuales fueron: proporción 2(666µL):1(333µL), 1(333µL):1(333µL) y 1(333µL):2(666µL) de (LvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* y (LvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis*, respectivamente. Los tratamientos sin

mezclas de cada levadura también fueron incluidos. A partir de estas mezclas, se realizaron co-inóculos con *B. cinerea* a una concentración de $3 \cdot 10^4$ Conidias/mL, incorporando en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, el 50% de volumen de suspensión celular de cada mezcla o levadura sola y, otro 50% de volumen del fitopatógeno. Después se homogeneizó con vortex y se aplicaron 10 μ L del co-inóculo en cada uno de los nueve pétalos. El tratamiento control consistió en no usar levadura, sino solamente el mismo volumen en ADE. Las unidades experimentales se llevaron a cuarto de crecimiento donde se ha evidenciado que la enfermedad se desarrolla efectivamente (temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$). Al cabo de siete días se realizó la evaluación de incidencia y severidad según la escala del laboratorio de Microbiología Agrícola (**Medina et al.** 2009) (Anexo A). Todos los tratamientos fueron elaborados concibiendo un diseño completamente al azar con un factor (seis estados de mezcla celular).

6.2.2. Efecto de las interacciones de dos levaduras seleccionadas contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración celular de dos proporciones celulares seleccionadas (**2:1** y **1:1**) de dos agentes biocontroladores ((IBUNLvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* y (IBUNLvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis*) en la mezcla celular contra *B. cinerea in vivo*, se realizó el siguiente experimento:

Se realizaron por triplicado e independientemente, siembras por agotamiento de (LvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* y (LvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis* en placas de Petri con agar-Sabouraud a 25°C durante 48 h. Posteriormente, se realizaron suspensiones celulares “stock”, usando ADE y ajustando con cámara de Neubauer cada una de las réplicas de tratamiento para obtener una concentración de $4 \cdot 10^8$ Células/mL; a estas suspensiones celulares se le realizaron diluciones seriadas subsecuentes, de tal manera que se obtuvieran las concentraciones $4 \cdot 10^7$ y $4 \cdot 10^6$ Células/mL. Para corroborar las concentraciones celulares de trabajo, se usó la técnica de recuento en placa para conocer las unidades formadoras de colonias reales por mililitro (UFC/mL) empleadas. En este experimento se usaron proporciones **2:1** y **1:1** y las

levaduras solas. En ese sentido, para cada proporción que se usó se aplicó el volumen necesario para obtener un volumen total de 1000 μL de cada mezcla (666:333 y 500:500 de (LvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* y (LvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis*, respectivamente). A partir de estas mezclas y levaduras solas, se realizaron co-inóculos con *B. cinerea* a una concentración de 3×10^4 Conidias/mL, incorporando en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, el 50% de volumen de suspensión celular de cada mezcla o levadura sola y otro 50% de volumen del fitopatógeno. Después se homogeneizó con vortex y se aplicaron 10 μL del co-inóculo en cada uno de los nueve pétalos. El tratamiento control de la enfermedad consistió en no usar levadura, sino solamente el mismo volumen de ADE. Las unidades experimentales se llevaron a cuarto de crecimiento donde se ha evidenciado que la enfermedad se desarrolla efectivamente (temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$). Al cabo de siete días se realizó la evaluación de incidencia y severidad según la escala del laboratorio de Microbiología Agrícola (Medina et al. 2009) (Anexo A). Todos los tratamientos fueron elaborados concibiendo un arreglo factorial, donde factor uno fue concentración (tres concentraciones: 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^8 UFC/mL) y factor mezclas o no de levaduras (cuatro estados de mezclas celulares: proporción 2:1; 1:1; L20 y L29).

Hasta este punto se tienen metodologías que buscaron obtener criterios estándares experimentales, los cuales, pueden ser involucrados en el desarrollo *per se* del prototipo de formulación, a base de una mezcla de levaduras antagonistas contra *B. cinerea* en pétalos de rosa. Por tanto, la sección siguiente aborda metodologías que evalúan el efecto de la liofilización como técnica de preservación en la viabilidad celular de las mezclas celulares formuladas.

6.3. Desarrollo de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras

En esta etapa se usaron las levaduras compatibles ((IBUNLvGr20) *R. mucilaginosa* e (IBUNLvSb29) *P. tsukubaensis*), con actividad antagonica alta

contra el fitopatógeno y con criterios de mezcla para el desarrollo de la formulación, empleando liofilización como insumo para su preservación.

6.3.1. Evaluación del efecto de la liofilización en la formulación empleando manitol y trehalosa al 1% y 5% como agentes crio-preservantes con una restitución

Con el objetivo de evaluar el efecto de la liofilización sobre la formulación a base de dos levaduras con actividad antagónica contra *B. cinerea*, se realizó el siguiente experimento:

Se obtuvo bio-masa celular después de 48 h de incubación a 29 °C, 150 r.p.m. en agitador de (LvGr20) *Rhodotorula mucilaginosa* en medio MEM modificado (Lesmes Ávila 2015) y de (LvSb29) *Pseudozyma tsukubaensis* con caldo-Sabouraud. Al culminar la incubación, las producciones se llevaron a tubos Nalgene® esterilizados y se centrifugaron a 7500 r.p.m. por cinco minutos a 20 °C. Después a cada pasta celular de cada levadura de cada Erlenmeyer, se le hicieron dos lavados subsecuentes, que consistían en re-suspender con 10 mL de buffer Fosfato Sodio 50 mM con vortex y posteriormente centrifugar a 7500 r.p.m. por cinco minutos a 20°C.

De acuerdo a Navarta et al. (2014) se ha reportado un efecto en la re-suspensión de la biomasa celular luego del proceso de liofilizado con el objetivo de mitigar el efecto de la liofilización sobre la viabilidad celular. Tanto para manitol y trehalosa al 1% y 5% m/v se empleó el buffer Fosfato Sodio 50 mM con leche descremada a una concentración de 10% m/v para re-suspender las levaduras. Los tratamientos control sólo usaron leche más buffer y sólo buffer; todos los tratamientos se pasteurizaron a 10 libras/pulgada por 10 minutos y se les hizo prueba de calidad. LvGr20 se re-suspendió en el doble de volumen que LvSb29. Estos volúmenes se implementaron como proporción **2:1** de los experimentos 6.2.1. y 6.2.2. Para asegurar la concentración celular de cada pre-formulado, se usó cámara de Neubauer, obteniendo $1.5 \pm 0.5 \cdot 10^8$ Células/mL. Después de homogeneizar con vortex, se mezcló la suspensión celular de LvGr20 en la de LvSb29, manteniendo estrictamente el mismo tratamiento. De inmediato se distribuían alícuotas de 1000 µL en viales de

vidrio esterilizados con capacidad para 10 mL y, a partir de ellos, se tomaron 100 µL de la suspensión para determinar la viabilidad real antes de congelar y de liofilizar, mediante la técnica de diluciones seriadas y siembra para recuento en placa.

Las muestras se congelaron a -80°C por 48 h y posteriormente se llevaron a liofilización (secado-congelado) a -49°C, 0.120 mBar por 48 h en liofilizador Labconco®. Finalmente, las formulaciones se llevaron a almacenamiento a 4°C durante el tiempo de evaluación e, inmediatamente después de liofilizar, se hizo un muestreo destructivo para tres viales de cada tratamiento para determinar viabilidad celular por cada unidad experimental.

Este experimento se concibió como un diseño completamente al azar, considerando factor uno (concentración del aditivo: 1% y 5%) con una restitución agua destilada estéril.

6.3.2. Evaluación del proceso de liofilización sobre diferentes prototipos de formulación en función del tiempo

Con el objetivo de evaluar la liofilización sobre la viabilidad de diferentes prototipos de formulación en función del tiempo se realizó el siguiente experimento:

Los prototipos de formulaciones se almacenaron durante dos meses a 4 °C sin hacer muestreo destructivo inmediatamente después de la liofilización. La concentración inicial registrada correspondió cuatro días antes de liofilizar (-4 días del día 0).

Este experimento se concibió como un arreglo factorial, considerando factor uno (concentración del aditivo (dos concentraciones): 1% y 5% m/v) y factor dos (tipo de restitución (dos restituciones): agua destilada estéril y buffer). Al hacer cada restitución se esperaron aproximadamente diez minutos para realizar recuento en placa por diluciones seriadas.

Al cabo de esta sección, se plantea una metodología que evalúe el efecto biocontrolador de los prototipos de formulaciones desarrollados, empleando co-inoculación con *B. cinerea* en pétalos de rosa variedad Vendela. Tal metodología se muestra en la sección siguiente.

6.4. Evaluación de la actividad antagónica de los prototipos de formulación contra *B. cinerea* en pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de evaluar la actividad antagónica de los prototipos de formulación desarrollados contra el moho gris, se hizo el siguiente experimento: Cada uno de los prototipos de formulación desarrollados se restituyeron con ADE o buffer y, se tomaron 100 μL de suspensión celular para estimar la concentración celular por recuento en placa. Después de ello, se tomaron 500 μL de cada formulación y se preparó un co-inoculo con 500 μL a $1.5 \cdot 10^4$ Conidias/mL de *B. cinerea*, entre 10-15 días de crecimiento. Posteriormente se hicieron inoculaciones con 10 μL sobre cada uno de los nueve pétalos que conformaban cada una de las tres unidades experimentales de cada tratamiento. Esto se llevó a cuarto de crecimiento donde se ha evidenciado que la enfermedad se desarrolla efectivamente (temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$) y a los siete días se evaluó porcentaje de incidencia y grado de severidad (Anexo A).

Finalmente, se plantea una sección exclusiva para la explicación de los análisis estadísticos, cuyo análisis de varianza (ANOVA), dependió del diseño experimental o arreglo factorial empleado en cada metodología durante este capítulo. Tal sección es:

6.5. Análisis estadístico

En todos los experimentos de tipo cuantitativo y de variables no categóricas se usó un análisis de varianza, considerando el diseño experimental o arreglo factorial implementado con previo cumplimiento de parametricidad. Se usaron los estadísticos Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises y Anderson-Darling para evaluar distribución normal y, para homogeneidad de varianza se implementó la prueba estadística Levene (**Montgomery** 2010); los dos supuestos de parametricidad se usaron con un nivel de significancia de ($p < 0.05$). Una vez evidenciada la parametricidad, se usaron pruebas de comparación de medias tipo LSD, Duncan, Tukey y Scheffe (**Montgomery**

2010), sin embargo la prueba de rangos múltiples de Duncan (**Montgomery** 2010) fue la seleccionada para comparar las medias de todos los tratamientos de cada experimento; las pruebas se usaron con un nivel de significancia de ($p < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el comando de programación **PROC GLM**, empleando el software estadístico S.A.S. versión 9.4, licenciado y auspiciado por la Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología y Facultad de Ciencias, sede Bogotá. Para ilustrar un ejemplo de los análisis estadísticos generados por S.A.S., se adjunta el **output** de una repetición de la dosis-respuesta de IBUNLvGr20 (Anexo B).

7. Resultados y Discusión

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos al implementar las metodologías postuladas en el capítulo 6. Cada sub-sección de resultados tiene involucrada su discusión, la cual se finaliza con una conclusión. Los resultados son mostrados a través de figuras y tablas, las cuales tienen sus correspondientes convenciones y explicaciones.

7.1. Caracterización antagónica de seis aislamientos de levaduras

Los aislamientos de levaduras fueron aislados a partir de folíolos de plantas sanas de cultivos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) de los municipios de Fusagasugá, San Bernardo y Granada del departamento de Cundinamarca, Colombia (Medina et al. 2009). Se evidenciaron experimentalmente algunos de los mecanismos antagónicos que podría usar cada uno de los seis aislamientos de levaduras al interactuar con *B. cinerea*. Entre ellos están: producción de compuestos inhibitorios difusibles en agar, producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y competencia por espacio y nutrientes; este último conllevando a la exclusión de nicho del fitopatógeno. Por lo anterior, a cada uno de los experimentos se le generó un análisis individual, para llegar a una conclusión general que permita desarrollar el objetivo específico 1. La caracterización antagónica de los seis aislamientos se muestra en las siguientes tres secciones.

7.1.1. Antagonismo *in vitro* de seis aislamientos de levaduras contra *Botrytis cinerea*

Con el objetivo de evaluar la producción de compuestos inhibitorios difusibles en agar contra *B. cinerea in vitro*, se obtuvieron los siguientes resultados: Las categorías mostradas en la Tabla 1 confirman lo reportado por López (2012) con excepción de LvGr10 que mostró categoría 3, lo cual hace pensar de la inestabilidad de este aislamiento al interactuar con *B. cinerea*.

Tabla 1. Antagonismo *in vitro* de seis levaduras contra *Botrytis cinerea* en medio de cultivo PDA. Categoría 1: Formación de halo inhibitorio. Categoría 2: Crecimiento de *Botrytis* hasta el borde de la levadura. Categoría 3: Crecimiento de *Botrytis* sobre la levadura.

Categorías de antagonismo <i>in vitro</i>					
LvGr20	LvSb29	LvGr3	LvGr26	LvGr1	LvGr10
3	1	2	2	2	3

En el presente trabajo se evidenció halo de inhibición de crecimiento de *B. cinerea in vitro* en crecimiento dual con LvSb29, lo cual indica la producción de metabolitos secundarios, los cuales, promovieron antagonismo (Tabla 1). La inhibición del crecimiento de un fitopatógeno (*Phomopsis* sp.) en cultivo dual *in vitro* con *Pseudozyma flocculosa*, es por la producción de metabolitos secundarios de la levadura, lo cual es determinante en la formación del halo inhibitorio (Neveu et al. 2007). Adicionalmente, existen diferentes géneros de levaduras que producen metabolitos secundarios, siendo *Pseudozyma* spp. el más predominante; a tales metabolitos secundarios, se les ha atribuido capacidad de inhibición de bacterias y hongos diferentes. (Kulakovskaya & Kulakovskaya 2014). Empero, en el presente trabajo las demás levaduras no tuvieron el mismo efecto sobre *B. cinerea*, indicando que entre sus mecanismos de acción no está la inhibición de crecimiento por efecto de la producción de metabolitos secundarios (López 2012).

7.1.2. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de evaluar el efecto de la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el desarrollo de la enfermedad sobre pétalos de rosa por los aislamientos de levaduras, se obtuvieron los resultados siguientes:

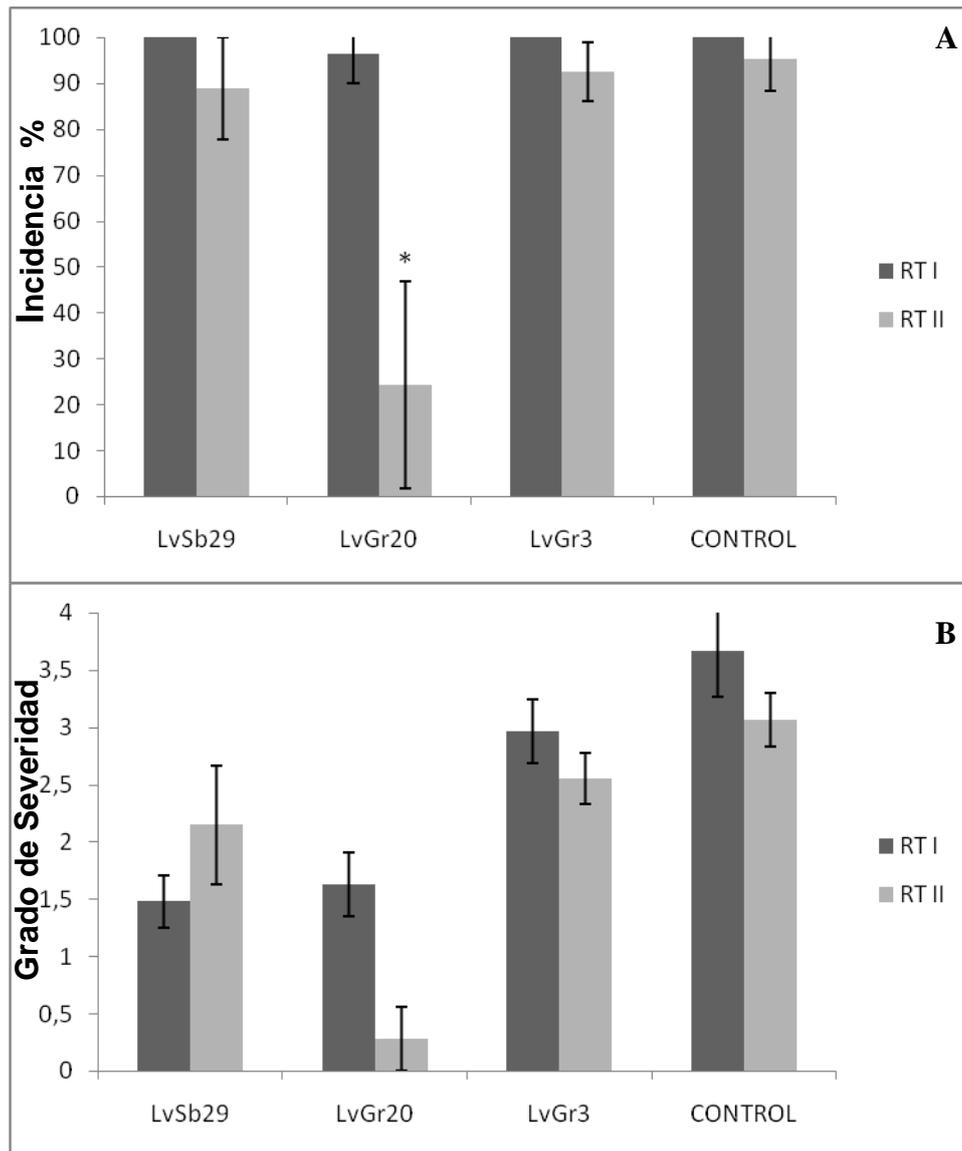


Figura 1. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de tres levaduras contra *B. cinerea* en pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. El asterisco indica diferencias significativas del porcentaje de incidencia de LvGr20 con relación a los demás tratamientos en **RT II**.

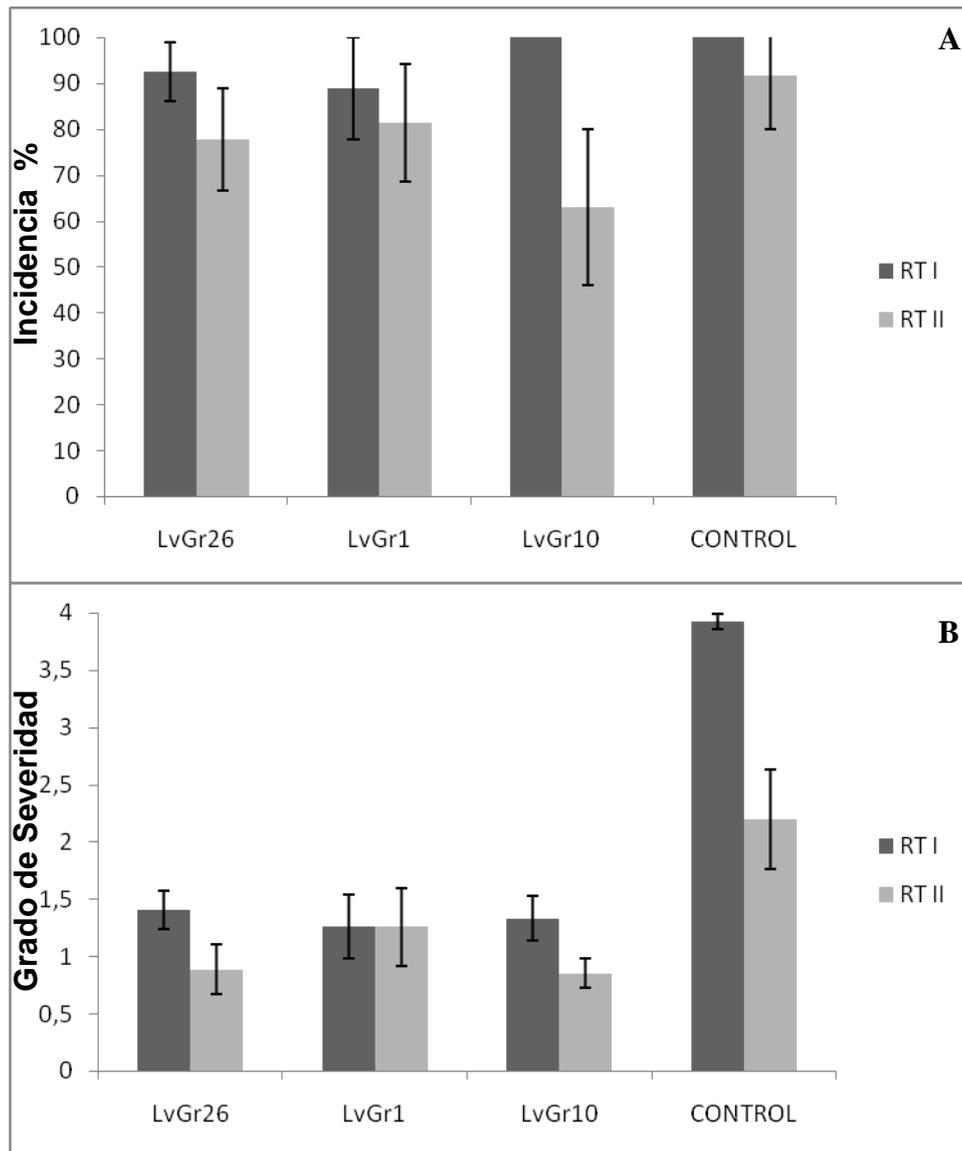


Figura 2. Efecto de compuestos orgánicos volátiles de tres levaduras contra *B. cinerea* en pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. No hubo diferencias significativas entre las medias de porcentaje de incidencia para cada tratamiento en las dos repeticiones temporales.

De los seis aislamientos de levaduras en la repetición temporal uno, se evidenció que ninguna redujo el porcentaje de incidencia de la enfermedad a través de la expresión de compuestos orgánicos volátiles. Sin embargo, en cuanto al **grado de severidad**, cinco de los seis aislamientos (LvGr20, LvSb29,

LvGr26, LvGr1 y LvGr10) no permitieron incrementar el área afectada en los pétalos por el moho gris al compararlas con el tratamiento control (Figuras 1 y 2). El aislamiento LvGr3 no mostró algún nivel de control sobre el moho gris al compararlo con el control (Figura 1). Los resultados de las dos repeticiones temporales permiten concluir que las levaduras producen compuestos orgánicos volátiles fungiestáticos que restringen el crecimiento de *B. cinerea* sobre los pétalos de rosa, lo cual no había sido demostrado antes por López (2012), puesto que la evaluación del efecto de VOCs en dicho estudio se realizó sobre el medio de cultivo PDA. Ello indica el alcance de este mecanismo de acción al cambiar el medio de crecimiento de *B. cinerea*, puesto que en este trabajo se implementó un sustrato diferente de crecimiento para el hongo como lo es el pétalo de rosa sin tratamientos pos-cosecha.

En la repetición temporal dos, LvSb29 y LvGr3 tuvieron valores de incidencia estadísticamente iguales al tratamiento control (Figura 1). En esta misma repetición temporal, LvGr20 sí tuvo diferencias significativas de incidencia con respecto al control: 25% y 90%, respectivamente. Sin embargo, esto contrasta determinantemente con los valores de la repetición temporal uno, en la que se reportó 95% (Figura 1). Esto último está en mayor concordancia con lo reportado por López (2012), donde los VOCs de LvGr20 no promovieron efecto fungiestático de *B. cinerea* en cajas de Petri con PDA.

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) son sustancias de bajo peso molecular (usualmente <300 Da), de baja polaridad y de alta presión de vapor (Huang et al. 2011; Huang et al. 2012). Dentro de los VOCs reportados se encuentran para levaduras: ésteres, alcoholes, alcanos, alquenos, alquinos, ácidos orgánicos, cetonas y aldehídos (Rowan, 2011; Huang et al. 2011; Huang et al. 2012). En presente trabajo, los VOCs generaron un **efecto fungiestático** en *B. cinerea*, que promovió una reducción en los síntomas de grado de severidad de la enfermedad sobre pétalos de rosa. Lo anterior fue similar a lo reportado en un estudio donde se evaluó el efecto de VOCs producidos por *Candida intermedia* contra el moho gris sobre fresas en desecadores. Allí evidenciaron que la concentración celular de la levadura de 8×10^{10} Células/desecador, el grado de severidad disminuyó y fue significativamente diferente con relación al tratamiento control de la

enfermedad. Adicionalmente el porcentaje de incidencia de la enfermedad tuvo el mismo comportamiento (**Huang et al.** 2011). En otro estudio se evaluó el efecto de VOCs producidos por *Sporidiobolus pararoseus* en el control del moho gris sobre fresas en desecadores, incrementando la concentración celular de la levadura de $1 \cdot 10^{10}$ hasta $5 \cdot 10^{10}$ Células/desecador, evidenciando que tanto el porcentaje de incidencia como el grado de severidad disminuyeron (**Huang et al.** 2012). En el presente estudio el porcentaje de incidencia no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos (seis levaduras), pero con relación al control el **grado de severidad sí**, lo cual pone en evidencia el efecto de los VOCs sobre *B. cinerea*. De acuerdo a los reportes mencionados (Figuras 1 y 2), sería deseable implementar concentraciones celulares mayores a las usadas, a saber $2 \pm 0.5 \cdot 10^8$ Células/mL, con el objeto de verificar si se logra un mayor efecto al punto de incidir sobre la incidencia del patógeno.

7.1.3. Efecto de la concentración celular de seis aislamientos de levaduras contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración celular de cada aislamiento de levadura en el control de *B. cinerea* sobre pétalos de rosas y, con ello, evidenciar el mecanismo de competencia por espacio y nutrientes, se obtuvieron los siguientes resultados:

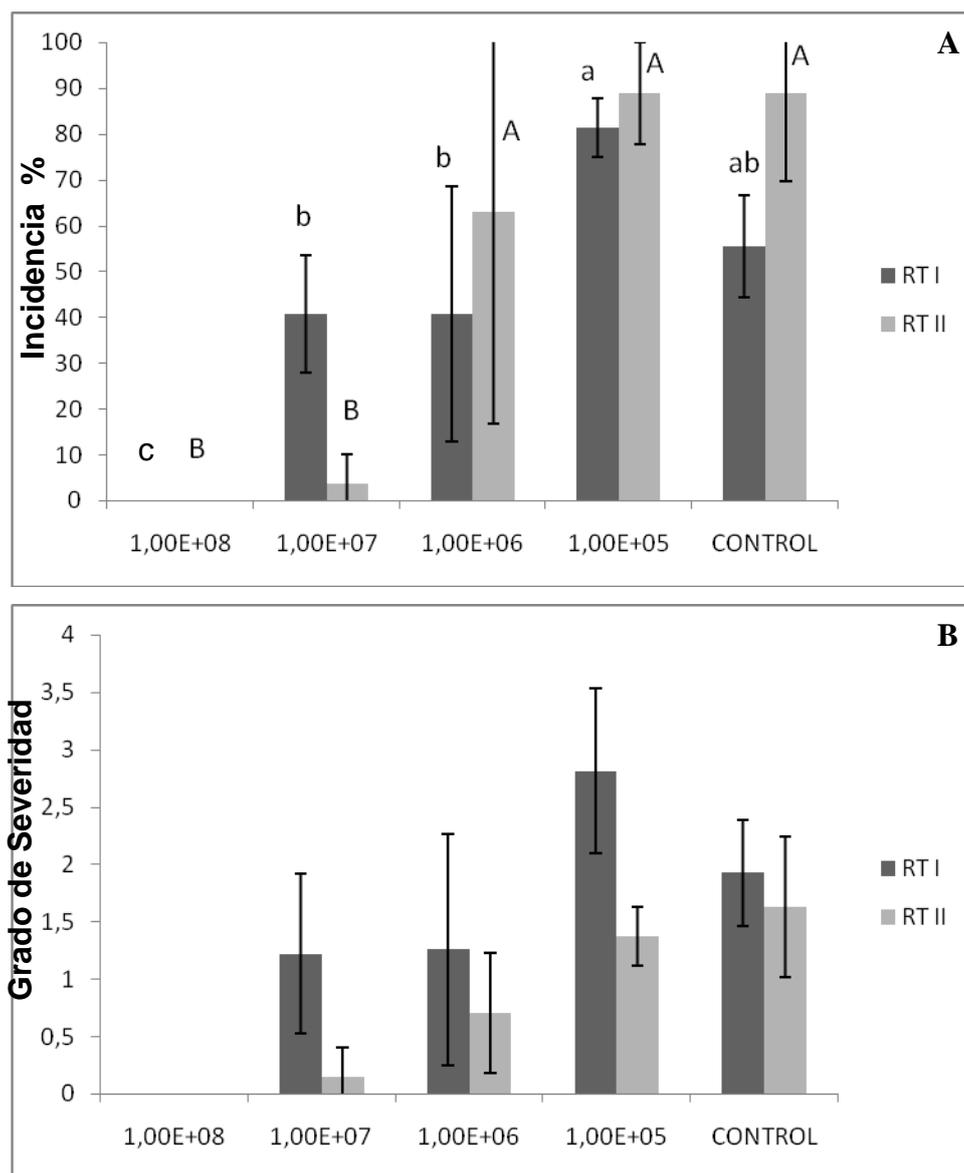


Figura 3. Efecto de la concentración celular de LvGr20 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. En A letras minúsculas corresponden a las diferencias de **RT I** y letras mayúsculas corresponden a las diferencias de **RT II**.

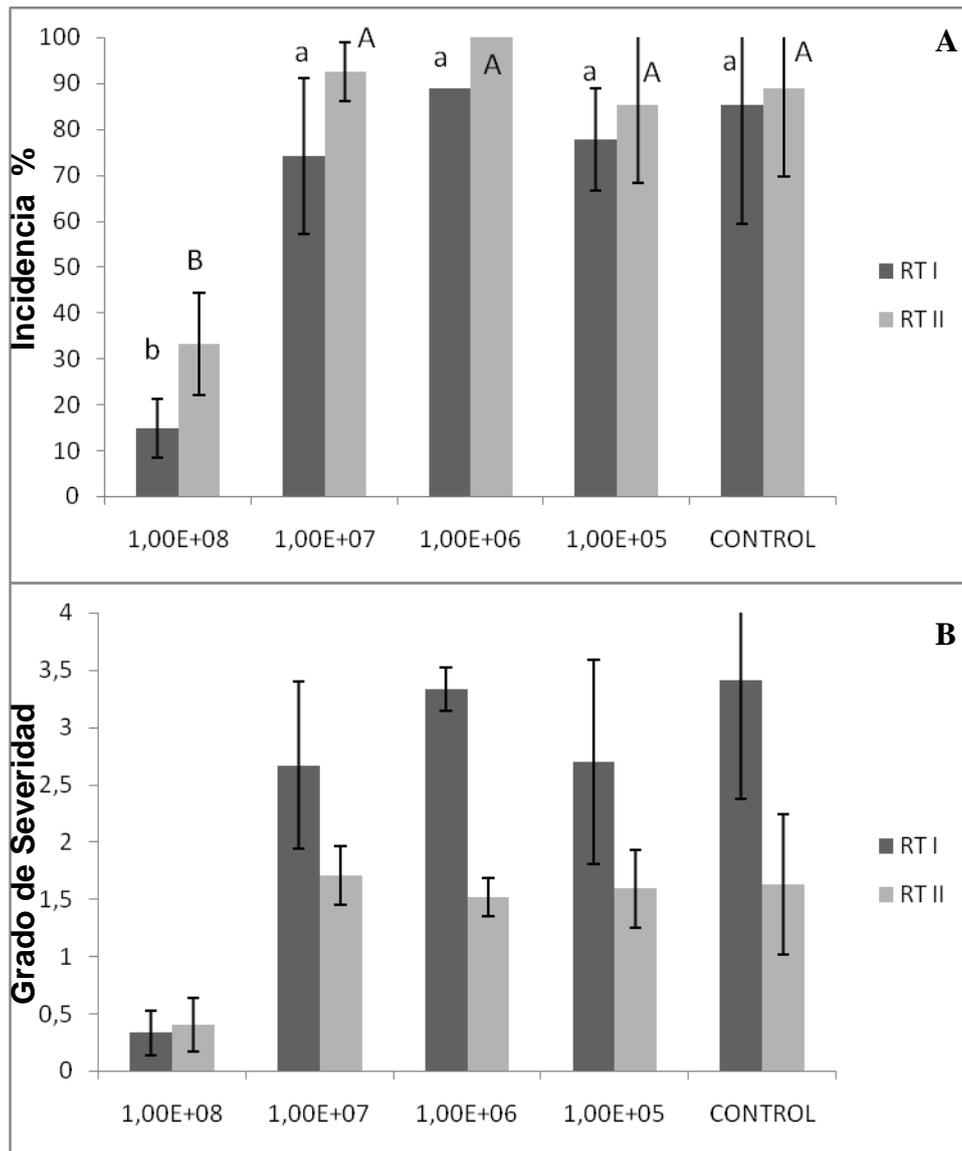


Figura 4. Efecto de la concentración celular de LvSb29 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. En **A** letras minúsculas corresponden a las diferencias de **RT I** y letras mayúsculas corresponden a las diferencias de **RT II**.

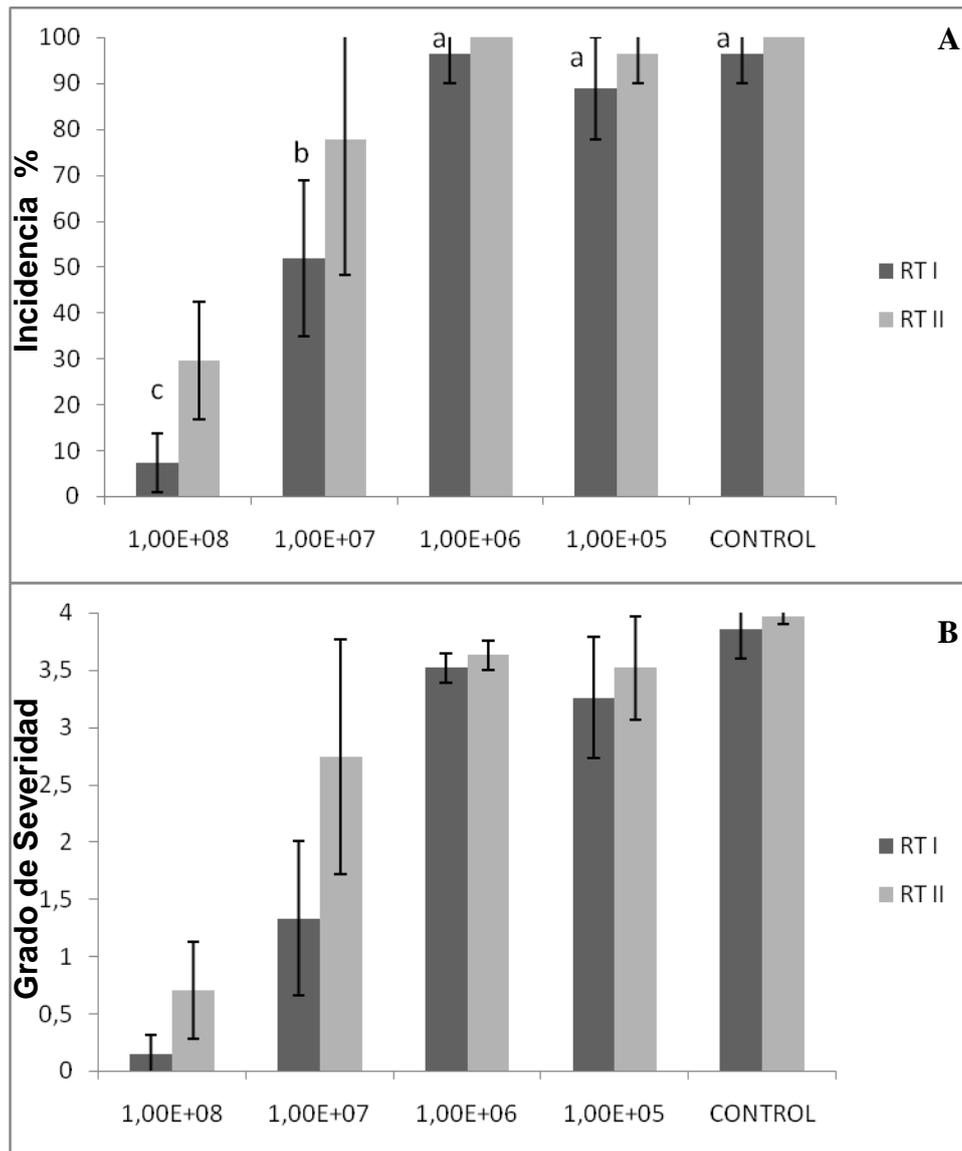


Figura 5. Efecto de la concentración celular de LvGr3 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. En **A** letras minúsculas corresponden a las diferencias de **RT I** y letras mayúsculas corresponden a las diferencias de **RT II**; **RT II** no mostró parametricidad.

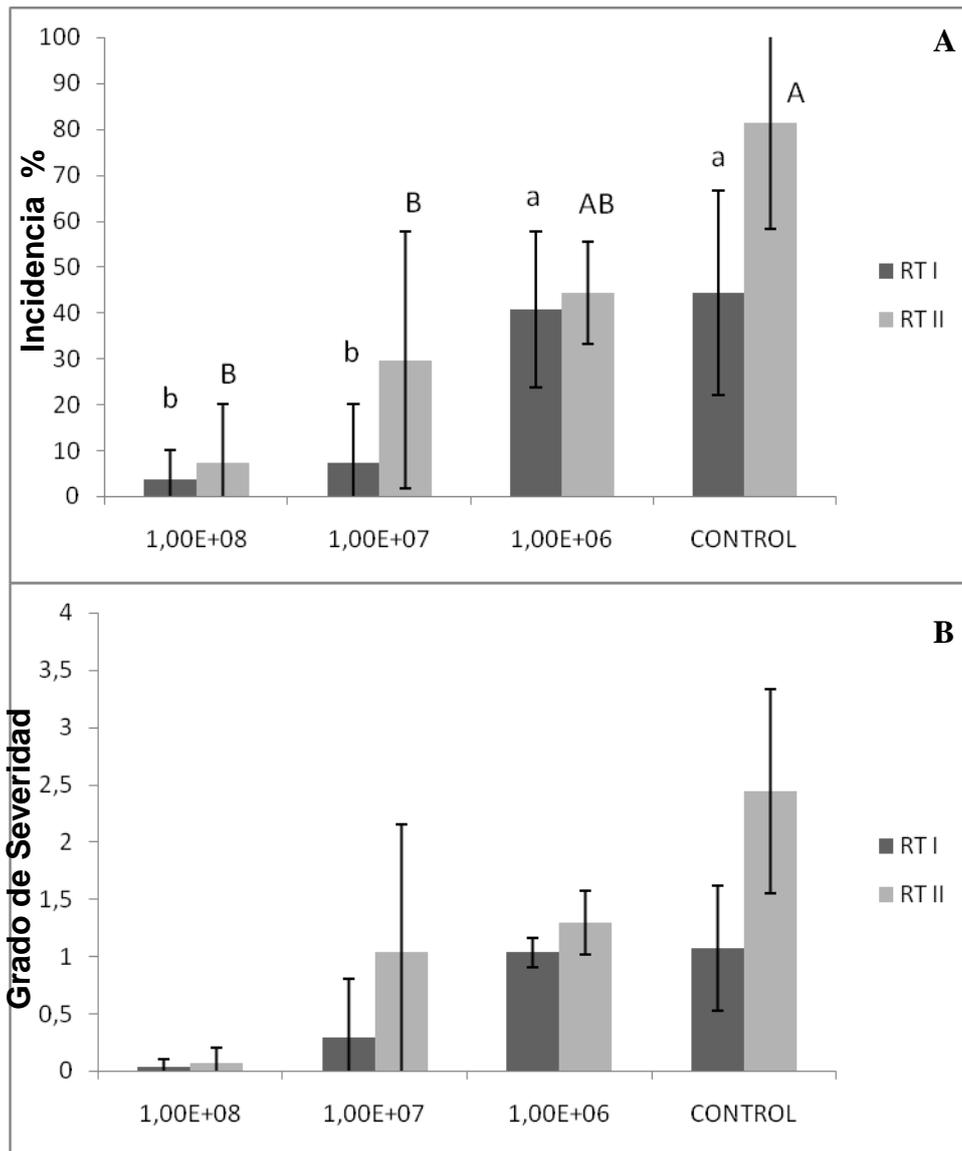


Figura 6. Efecto de la concentración celular de LvGr1 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. En A letras minúsculas corresponden a las diferencias de **RT I** y letras mayúsculas corresponden a las diferencias de **RT II**.

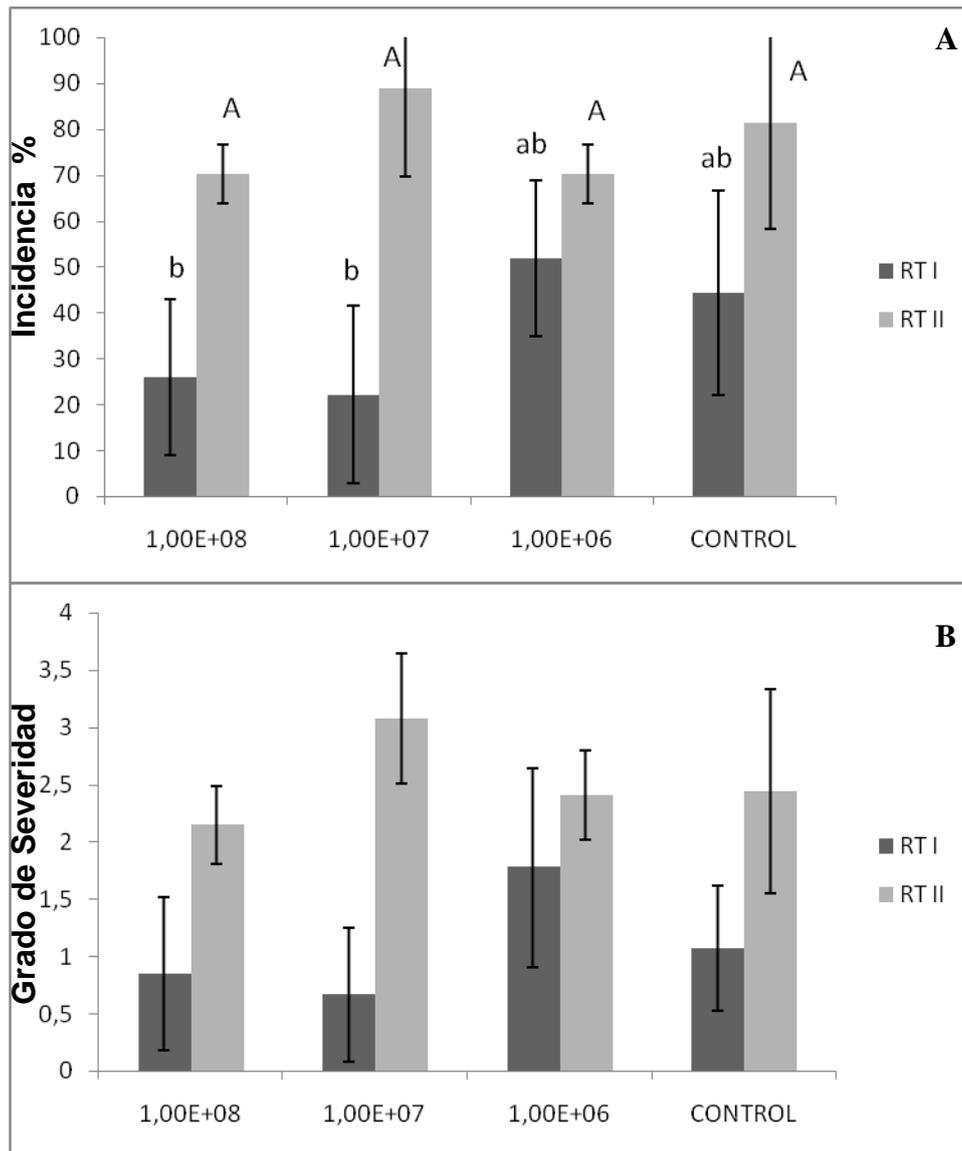


Figura 7. Efecto de la concentración celular de LvGr10 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. En **A** letras minúsculas corresponden a las diferencias de **RT I** y letras mayúsculas corresponden a las diferencias de **RT II**.

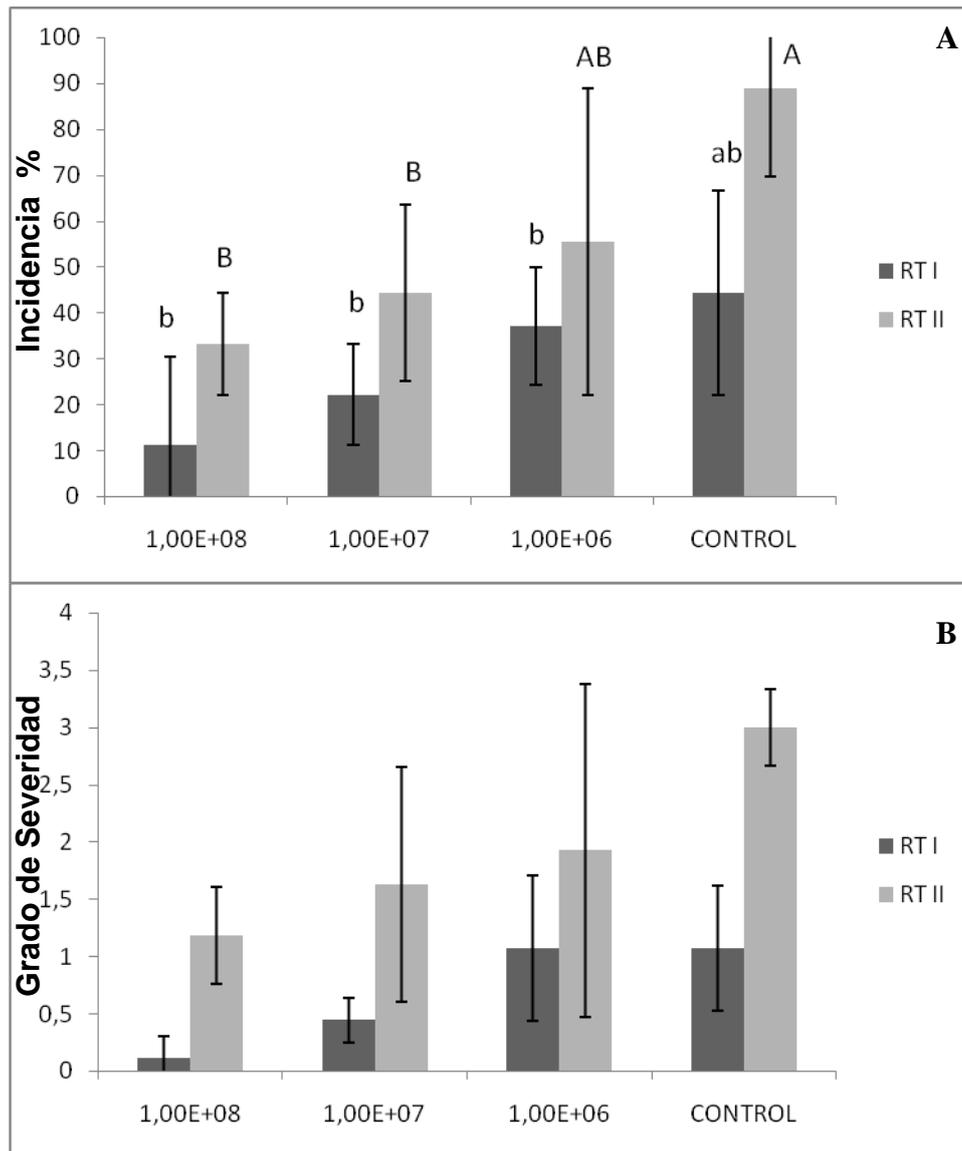


Figura 8. Efecto de la concentración celular de LvGr26 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **A.** Porcentaje de incidencia (%) y **B.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **RT I:** repetición temporal uno y **RT II:** repetición temporal dos. En **A** letras minúsculas corresponden a las diferencias de **RT I** y letras mayúsculas corresponden a las diferencias de **RT II**.

En el presente estudio se evidenció experimentalmente el efecto de dosis respuesta de la concentración celular de las levaduras empleadas en el control de fitopatógenos en productos agrícolas diferentes, empleando en este trabajo, *B. cinerea* en pétalos de rosas variedad Vendela (Sansone et al. 2005; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2008; Zhang et al. 2009; Li et al. 2011; Capdeville et al. 2007; Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2005; Yao et al. 2004; Zahavi et al.,

2000; **Saligkarias et al.** 2002; **Lassois et al.** 2008; **Buxdorf et al.** 2013; **Zhang et al.** 2010). Lo anterior puesto que el porcentaje de incidencia y grado de severidad se vieron afectados a medida que se aumentaba la densidad celular. LvGr20 y LvGr1 mostraron un comportamiento de dosis-respuesta en el control de la enfermedad más que los demás aislamientos, no obstante, LvGr26 lo hizo, pero sin diferencias significativas. Todas las levaduras con excepción de LvGr10, mostraron control del fitopatógeno a 1×10^8 UFC/mL, con valores de incidencia entre 0-30% a esa concentración (Figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8). Los valores de incidencia en la concentración 1×10^7 UFC/mL estuvieron entre 5-70%, lo cual contrasta con lo reportado por López (2012) con valores no mayores al 10%. Sin embargo, en tal estudio no se aplicó la técnica de recuento en placa para estimación de la concentración celular real de trabajo. Este último aspecto pudo sobrevalorar la concentración empleada en tal trabajo, puesto que en el presente se usó recuento por cámara de Neubauer y se corroboró la concentración celular por recuento en placa mediante diluciones seriadas en todas las repeticiones. Adicionalmente, Medina y colaboradores (2009) y López (2012) reportan el uso de cinco pétalos por unidad experimental y en el presente trabajo, se involucró nueve pétalos, lo cual, puede representar un efecto en la objetividad del aporte de porcentaje de incidencia por pétalo y con ello, la explicación del desarrollo de la enfermedad.

LvGr20 y LvSb29 fueron seleccionados como los dos aislamientos para ser empleados como principio activo de los prototipos de formulación. LvSb29 únicamente produce sustancias inhibitorias difusibles en agar a diferencia que los demás aislamientos (Tabla 1) y, por tanto, se aprovechó tal mecanismo para abordar la mezcla de levaduras **desde la complementariedad de sus mecanismos de acción** (Xu et al. 2011). Adicionalmente, LvSb29 controló el desarrollo de la enfermedad en las dos repeticiones a 1×10^8 UFC/mL (Figura 4). Por su parte, LvGr20 fue seleccionado porque en las dos repeticiones a 1×10^8 UFC/mL, el porcentaje de incidencia y el grado de severidad fueron 0, mostrando reproducibilidad en el control de *B. cinerea* (Figura 3). Sin embargo, el aislamiento LvGr1 también mostró control del fitopatógeno, pero se descartó para ser usado en las formulaciones porque en 1×10^8 UFC/mL, los valores de

incidencia y grado de severidad no fueron 0, así como LvGr20 (Figuras 3 y 6). Por otro lado, aunque LvGr3 controló la enfermedad con valores de porcentaje de incidencia y grado de severidad similares a los de LvSb29 (19% y 0.48 en promedio, respectivamente) (Figura 5), fue descartado porque no producía compuestos inhibitorios difusibles en agar (Tabla 1), lo cual no permitiría implementar la complementariedad de mecanismos antagónicos entre las mezclas de levaduras. En cuanto a LvGr10, está también se descartó, puesto que no presentó reproducibilidad en el control de la enfermedad (Figura 7). Finalmente, a pesar que LvGr26 controla el moho gris casi de la misma manera que LvGr3 y LvSb29 en $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, en la primera repetición temporal no hubo diferencias significativas en el porcentaje de incidencia, al comparar el valor de incidencia de tal concentración con el tratamiento control (Figura 8). Adicionalmente, LvGr26 tampoco produjo compuestos inhibitorios difusibles en agar como LvSb29 (Tabla 1).

Con los resultados obtenidos hasta esta fase del trabajo, se evidenciaron los mecanismos antagónicos de los seis aislamientos de levaduras empleados: **difusión de compuestos inhibitorios difusibles en agar, producción de compuestos orgánicos volátiles y, competencia por espacio y nutrientes;** estos dos últimos evaluados en pétalos de rosa variedad Vendela. Con lo anterior se notó lo reportado por López (2012), quien dice que estos aislamientos de acuerdo a los géneros de especies, pueden tener una especialización en la presencia de unos mecanismos antagónicos con respecto a otros. Ejemplo de ello, el género *Pseudozyma* evidenció que usa antagonismo por compuestos difusibles en agar, como también competencia por espacio y nutrientes, lo cual es diferente con los géneros *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, los cuales emplean competencia por espacio y nutrientes. El género *Candida* mostró tener versatilidad en ese sentido, puesto que usó todos los mecanismos, pero no con la misma magnitud como los otros tres géneros (López 2012).

En este sentido los aislamientos seleccionados para las etapas subsecuentes de este trabajo, fueron IBUNLvGr20 e IBUNLvSb29, puesto que los dos mostraron actividades antagónicas altas y reproducibles en cada experimento

de caracterización. Además LvSb29 se incorpora porque el producto agrícola en este trabajo no está destinado para el consumo humano, lo cual es un punto crítico que reclama López (2012) para involucrar el género *Pseudozyma* en el control biológico de enfermedades. Sin embargo, el postular a *Pseudozyma* como uno de los agentes bio-controladores de la mezcla predeterminada, implica aprovechar su potencial bio-tecnológico (Zhang et al. 2010; López 2012; Buxdorf et al. 2013).

7.1.4. Compatibilidad entre dos aislamientos de levaduras seleccionadas para desarrollar el prototipo de formulación

Con el objetivo de evidenciar cualitativamente compatibilidad entre IBUNLvGr20 e IBUNLvSb29 para postularlos como principio activo de los prototipos de formulación, se evaluó si las levaduras se inhibían entre sí, encontrando que ninguna de las levaduras inhibió el crecimiento de la otra (datos no mostrados).

Los aislamientos seleccionados se involucran en las etapas de mezclas celulares, en secciones subsecuentes:

7.2. Criterios de mezcla de dos aislamientos de levaduras compatibles para formulación

Con los dos aislamientos de levaduras seleccionados (IBUNLvGr20 e IBUNLvSb29), los cuales, mostraron al menos un mecanismo antagónico diferente contra *B. cinerea* y compatibilidad entre ellos, se presentan los resultados de su actividad contra *B. cinerea in vivo*, empleando mezclas celulares para involucrar en prototipos de formulación. El primer experimento muestra el efecto de la proporción celular y, el segundo, indica el efecto de las interacciones entre los aislamientos en el desarrollo del moho gris sobre pétalos de rosa variedad Vendela.

7.2.1. Efecto de la proporción celular de dos levaduras seleccionadas (mezclas) contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de evaluar el efecto de la proporción celular de LvGr20 y LvSb29 en una mezcla celular contra *B. cinerea in vivo*, se presentan los siguientes resultados:

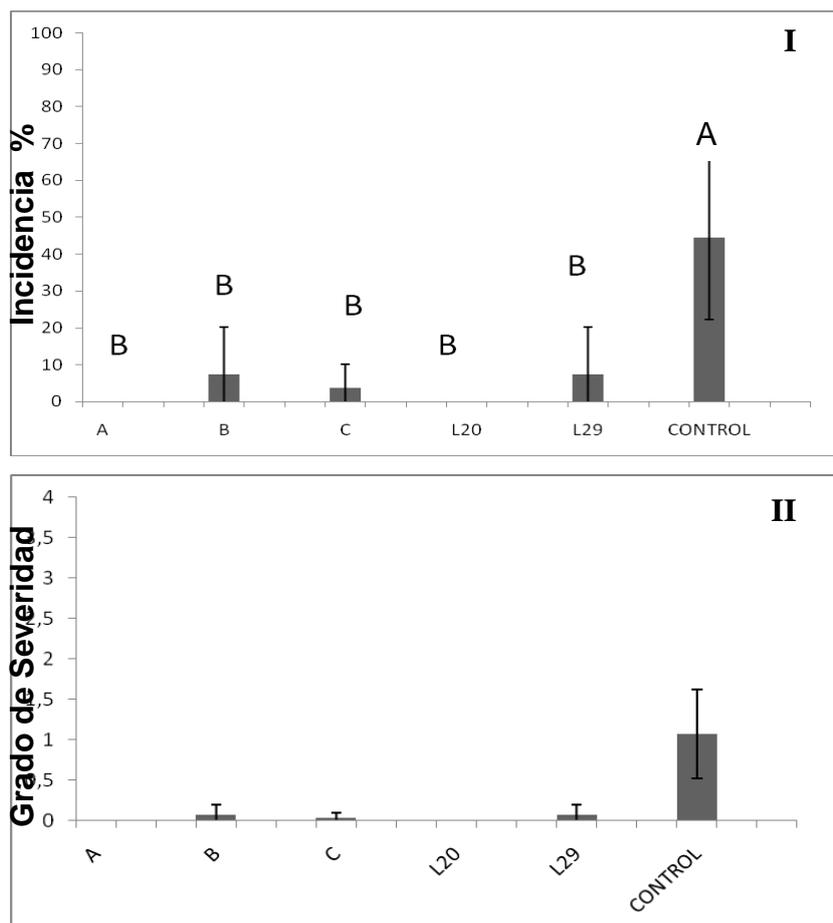


Figura 9. Efecto de tres proporciones celulares de mezclas de LvGr20 y LvSb29 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **I.** Porcentaje de incidencia (%) y **II.** Grado de severidad de la enfermedad. CONTROL es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **A.** Proporción 2:1. **B.** Proporción 1:1. **C.** Proporción 1:2 de LvGr20 con respecto a LvSb29. **L20** (LvGr20). **L29** (LvSb29).

Se evidenció que al implementar tres proporciones celulares en una mezcla de levaduras compatibles (LvGr20 y LvSb29), conservando la misma concentración celular entre los tratamientos ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL), no hubo

diferencias significativas con los valores de porcentaje de incidencia entre ellos, pero sí con relación al tratamiento control de la enfermedad (Figura 9). Adicionalmente, se encontró que $1 \cdot 10^8$ UFC/mL es la concentración celular en la cual las mezclas ejercen efecto sobre el control del moho gris, lo cual se evidenció al compararlas con los tratamientos que poseen levaduras sin mezclar y, a la misma concentración celular en el mismo experimento (Figura 9). Los resultados del experimento de la Figura 9 contrastan con los obtenidos por Guetsky y colaboradores (2001), quienes a un orden de magnitud menor ($1 \cdot 10^7$ Células/mL) de cada agente bio-controlador en una mezcla conformada por la bacteria *Bacillus mycooides* y, la levadura *Pichia guillermondii* contra *B. cinerea* en hojas de fresas, obtuvieron un porcentaje de incidencia y grado de severidad de 0; en el presente trabajo a una concentración de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, únicamente con la mezcla en proporción **2:1** se obtuvieron los mismos valores que Guetsky y cols. (2001) en el desarrollo de la enfermedad (Figura 9, tratamiento A). Con lo anterior, para observar un control de la enfermedad moho gris con mezclas proporción **2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29**, es necesario emplear una concentración celular de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL con los aislamientos seleccionados.

Es de resaltar que los resultados del experimento de la Figura 9, permitieron establecer los criterios experimentales de mezcla de las levaduras en términos de proporción celular de cada una de ellas, considerando un volumen total. También permitió hacer una posible aproximación al éxito de control del moho gris, usando diferentes mezclas celulares de agentes bio-controladores (Figura 9). No obstante, se ignora el efecto posible del control de la enfermedad, evaluando órdenes de magnitud celulares inferiores a los empleados en la Figura 9, con el objetivo de saber si el control de *B. cinerea* es dependiente de la concentración y del tipo de proporción en una mezcla de las dos levaduras.

Por lo anterior, se estableció un experimento que involucrara órdenes de magnitud celulares inferiores a $1 \cdot 10^8$ UFC/mL de levaduras en dos proporciones celulares diferentes con mezclas, sus resultados se muestran en la sección siguiente:

7.2.2. Efecto de las interacciones de dos levaduras seleccionadas contra el moho gris *in vivo* sobre pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de identificar el posible efecto de las interacciones entre IBUNLvGr20 e IBUNLvSb29 contra *B. cinerea in vivo*, se obtuvieron los siguientes resultados:

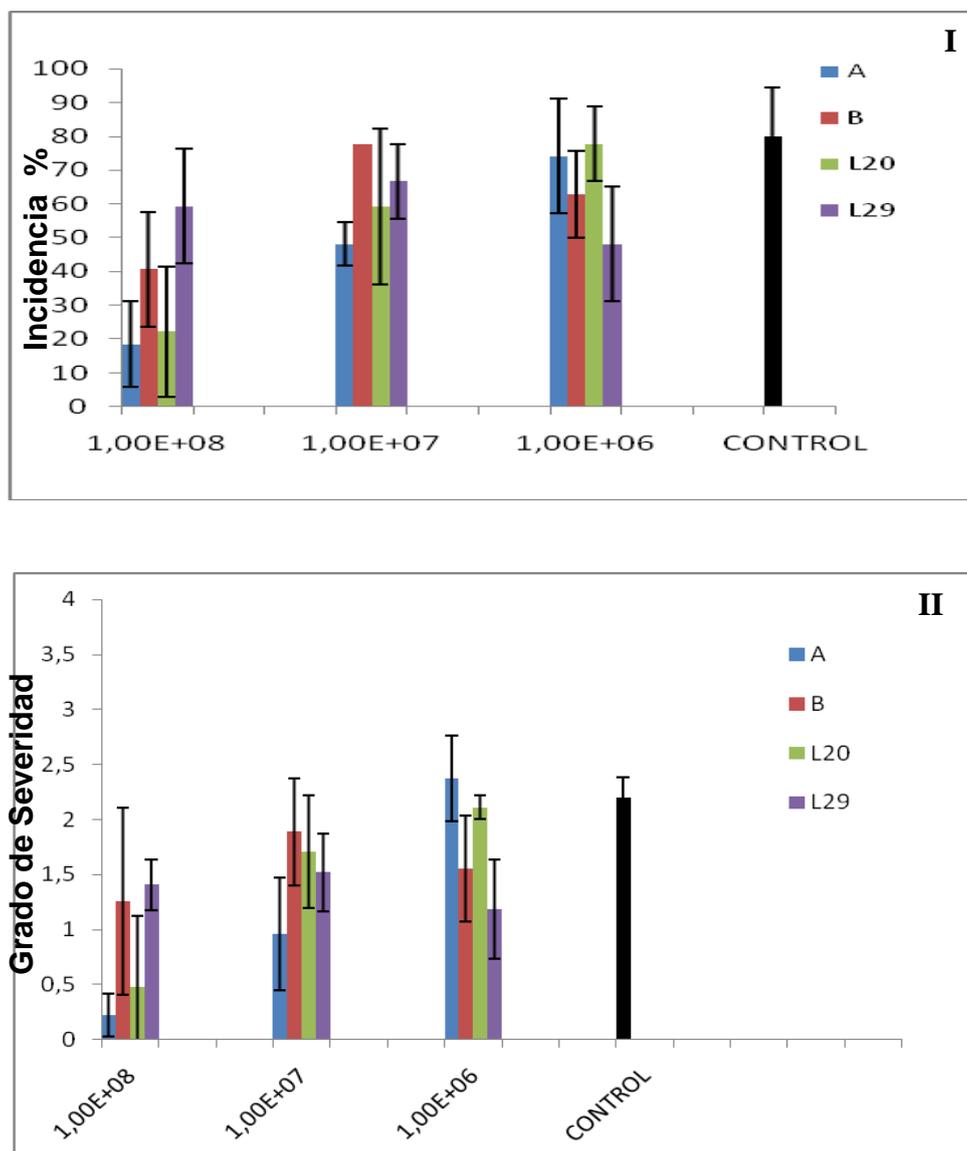


Figura 10. Efecto de la concentración celular en dos proporciones celulares (mezclas) de LvGr20 y LvSb29 contra *Botrytis cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela *in vivo*. **I.** Porcentaje de incidencia (%) y **II.** Grado de severidad de la enfermedad. Control es el tratamiento control *Botrytis* de la enfermedad. **A.** Proporción 2:1. **B.** Proporción 1:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29. **L20** (LvGr20). **L29** (LvSb29).

Con los resultados obtenidos en la sección 7.2.2., se generó un experimento que pusiera en evidencia el efecto de las interacciones de los agentes bio-controladores en dos mezclas celulares seleccionadas contra el fitopatógeno. Al igual que en los experimentos de la sección 7.1.3., se evidenció que existe una concentración celular en la que se ejerce control de *B. cinerea*, la cual fue 1×10^8 UFC/mL. Sin embargo, al comparar el bio-control de las mezclas celulares con células solas, no hubo diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan con un $p < 0.05$. No obstante, el efecto de la concentración celular sí fue significativo, de tal manera que si se empleara o no una mezcla celular, esta debe ir a una concentración mínima de 1×10^8 UFC/mL y, para efecto de este estudio se usaría la mezcla **2:1** de LvGr20 con respecto a LvSb29. Los resultados de la Figura 10 se asemejan a los de Calvo y colaboradores (2003), que involucran tres proporciones de mezclas celulares de dos cepas de *Rhodotorula glutinis* (SL1 y SL 30) a una concentración de 1×10^6 Células/mL en pre-inoculación contra *Botrytis cinerea* 1×10^6 Conidias/mL en manzanas *red delicious*. Allí se implementó proporción 2:1, 1:1 y 1:2 de una cepa con respecto a la otra y, se obtuvo, que al medir diámetro de la lesión de la enfermedad en mm, los tratamientos 1:1 y 1:2 fueron iguales entre ellos y significativamente menores que el tratamiento control. Por otro lado, en el mismo experimento de Calvo y colaboradores (2003) compararon el porcentaje de efectividad de control de la enfermedad para evidenciar interacciones en las mezclas y, evidenciaron que existió antagonismo entre las cepas. Adicionalmente, reportaron que tal antagonismo fue producto de la competencia por espacio y nutrientes, siendo este último aspecto determinante puesto que una cepa metabolizaba glicerol y la otra no, lo cual reflejó el éxito de supervivencia de una cepa con respecto a la otra. A pesar de ello, en el presente trabajo se evidenció que el efecto de la concentración celular fue significativo en el experimento de la Figura 10 y, se observó la consistencia del efecto de la dosis-respuesta, puesto que los niveles de control son similares a los mostrados en el numeral 7.1.3., aún cuando no se observó un efecto sumatorio de las actividades antagónicas del control de la enfermedad en la mezcla 2:1 de las levaduras.

Hasta este punto del trabajo, de acuerdo a los resultados del diseño experimental y arreglo factorial empleados de la sección anterior, se generaron los criterios de mezclas celulares para ser implementados en el desarrollo de los prototipos de formulación; tales criterios de mezcla son: 1. A partir de un volumen total, emplear proporción 2:1 de los aislamientos IBUNLvGr20 con respecto a IBUNLvSb29 y; 2. Los dos agentes bio-controladores deben iniciar a una concentración celular inicial de $2 \pm 0.5 \cdot 10^8$ Células/mL. No obstante, a pesar de evidenciar que estadísticamente el control que ofrece una mezcla en comparación con sólo LvGr20 es el mismo, se continúa con la propuesta de mezclas celulares puesto que se ignora el efecto de la liofilización en la viabilidad celular de las levaduras seleccionadas al ser formuladas. Ello puesto que en otros trabajos IBUNLvGr20 ha sido formulado únicamente como principio activo en gránulos y en suspensiones líquidas con diferentes excipientes, obteniendo valores altos que han evidenciado su estabilización al cabo de 120 días (**Bautista** 2014; **Caicedo** 2014).

Por tanto, en la sección siguiente se desarrollará el prototipo de formulación con base en los insumos experimentales generados hasta este momento: involucrar dos aislamientos de levaduras (IBUNLvGr20 e IBUNLvSb29) compatibles con al menos un mecanismo de acción diferente, **implementando complementariedad** y, cuya competencia por espacio y nutrientes depende de la concentración celular. Adicionalmente, al hacer combinaciones de tales aislamientos en proporciones diferentes en volumen a volumen, existen mezclas que controlan mejor el moho gris y, ello también depende de la concentración celular ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL).

7.3. Desarrollo de un prototipo de formulación a base de una mezcla de levaduras

Para esta sección se seleccionaron los aislamientos IBUNLvGr20 e IBUNLvSb29 con las siguientes características: los dos aislamientos usan competencia por espacio y nutrientes a una concentración celular de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, aunque IBUNLvGr20 tiene control a un orden de magnitud celular menor *in vivo*; los dos aislamientos produjeron VOCs, los cuales afectan el grado de severidad del moho gris *in vivo* e; IBUNLvSb29 a diferencia de IBUNLvGr20, produce compuestos inhibitorios difusibles en agar determinando el crecimiento del fitopatógeno *in vitro*, lo cual, permite involucrar complementariedad antagónica. Adicionalmente, los dos aislamientos son compatibles y, a una concentración celular de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL de cada uno en una mezcla con proporción **2:1**, ejercen un efecto de control de *B. cinerea* sobre pétalos de rosa variedad Vendela. Aún cuando el porcentaje de incidencia de la mezcla 2:1 reflejó un antagonismo diferente al esperado por la compatibilidad entre las levaduras, la incidencia es menor en comparación con la proporción 1:1 y de las levaduras solas. Por ello, en las dos secciones siguientes se muestran los resultados del efecto de la liofilización en prototipos de formulación al cabo de sesenta días:

7.3.1. Evaluación del efecto de la liofilización (secado-congelado) en la formulación empleando manitol y trehalosa al 1% y 5% con una restitución

En esta sección se evidenció el efecto de la liofilización en la viabilidad celular total del prototipo de formulación, empleando una mezcla en proporción 2:1 de IBUNLvGr20 con respecto a IBUNLvSb29. La formulación se hizo con dos concentraciones m/v de manitol y trehalosa, **los cuales estaban en combinación con leche descremada al 10% m/v en buffer**. Se realizaron tratamientos control para evidenciar el efecto protector de la leche: uno consistió en re-suspender directamente la biomasa de las levaduras en una solución buffer y, el otro tratamiento control, consistió en re-suspender la biomasa en buffer más leche descremada estéril al 10% m/v.

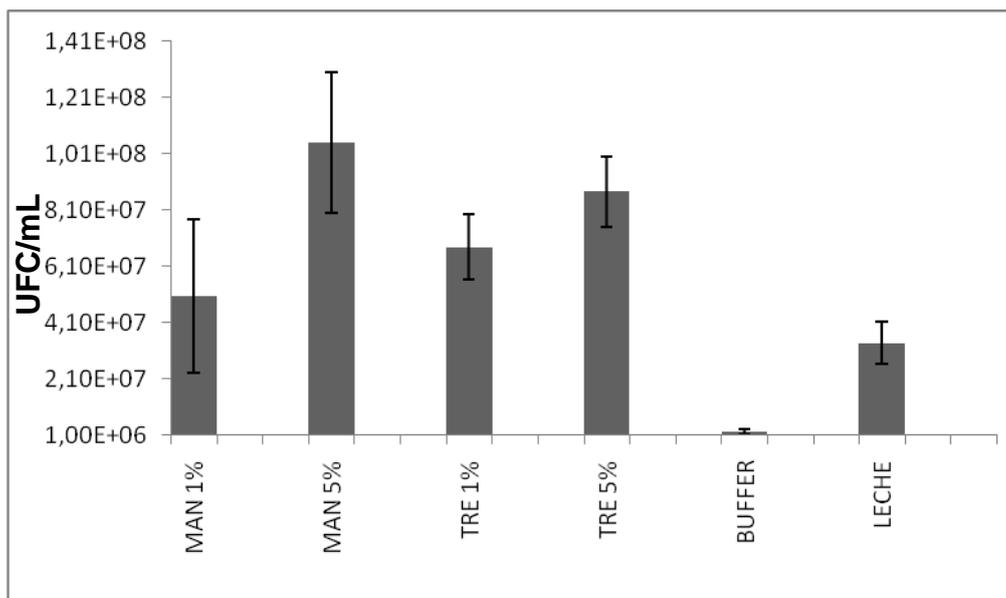


Figura 11. Recuento de células totales de las formulaciones en mezcla 2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29 después de liofilizar usando manitol y trehalosa al 1% y 5% m/v en suspensión con leche estéril. BUFFER es el tratamiento control solamente con buffer. LECHE es el tratamiento control con buffer y leche descremada estéril al 10% m/v.

Inmediatamente después de hacer la liofilización se determinó la concentración celular de los prototipos de formulaciones, empleando sólo agua destilada estéril (ADE) como restituyente y, se evidenció, que el tratamiento LECHE es la línea base para comparar los efectos de los aditivos en las formulaciones (Figura 11). El tratamiento BUFFER, el cual no tenía leche, tuvo un orden de magnitud muy bajo, con una viabilidad del 0.4%. En contraste, el tratamiento LECHE sin aditivos, tuvo una viabilidad del 12.67%, conservando significativamente la viabilidad celular de la mezcla. Los aditivos promovieron un efecto de protección de las levaduras, siendo manitol y trehalosa al 5%, los tratamientos con mayor viabilidad ($1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL y $9.0 \cdot 10^7$ UFC/mL, respectivamente) (Figura 11). Adicionalmente, en todos los tratamientos LvGr20 después de la liofilización fue más bajo que LvSb29 (datos no mostrados). Con lo anterior, se corroboró el efecto crio-protector ampliamente reportado de la leche descremada y, para este trabajo, en adición con **manitol y trehalosa** sobre las células de LvSb29 (Day & Stacey 2007), sin embargo LvGr20 se vio más afectada (Figura 11).

7.3.2. Evaluación de la liofilización sobre diferentes prototipos de formulación a base de levaduras antagonicas en función del tiempo

Con el objetivo de evaluar el efecto de la liofilización sobre diferentes prototipos de formulación con manitol y trehalosa como aditivos en función del tiempo, se obtuvieron los siguientes resultados:

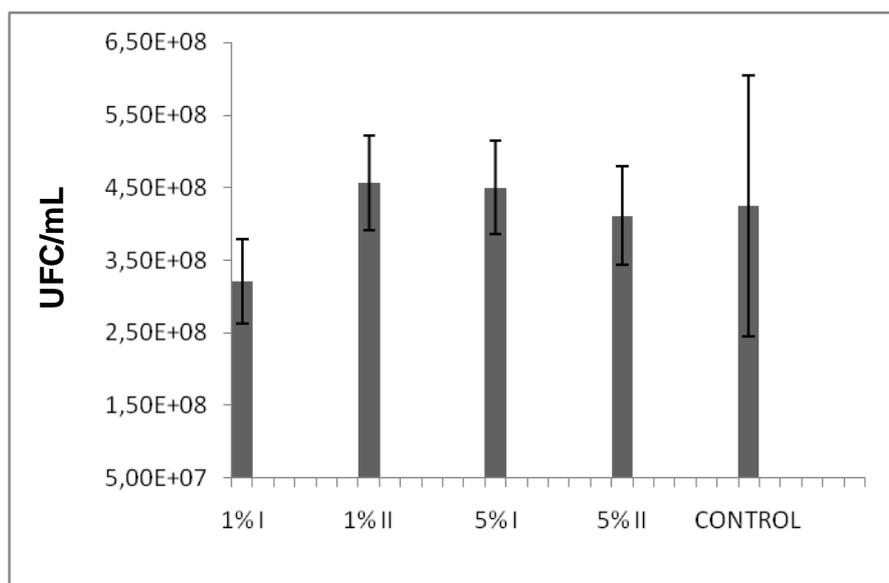


Figura 12. Recuento de células totales de los prototipos de formulación con mezcla 2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29 antes de liofilizar **usando manitol** al 1% y 5% m/v más leche descremada. CONTROL es el tratamiento control solamente con leche descremada al 10% m/v. **I.** Son los tratamientos destinados para restituirse con ADE. **II.** Son los tratamientos destinados para restituirse con buffer.

Todas las concentraciones celulares de cada tratamiento empleando manitol como vehículo de células durante el proceso de liofilización, no tuvieron diferencias significativas. Esto indica que todos los tratamientos partieron de la misma concentración celular (Figura 12). La variabilidad en las UFC/mL reportadas para cada tratamiento es la implícita a la experimentación.

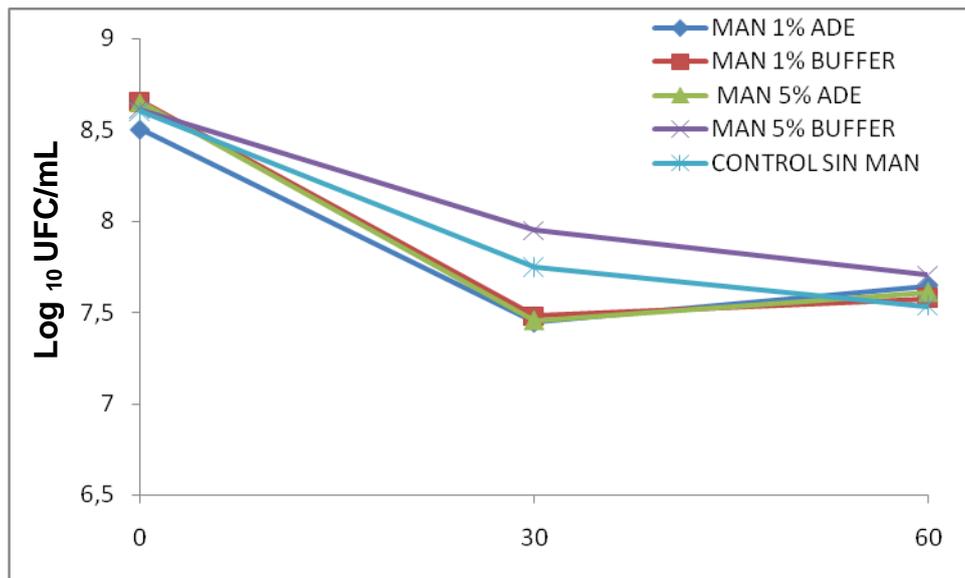


Figura 13. Log₁₀ de la viabilidad (UFC/mL) del prototipo de formulación desarrollado **con manitol** a dos concentraciones m/v durante sesenta días después de liofilizar en combinación con leche descremada 10% m/v, empleando dos restituciones: **I. ADE** y **II. BUFFER**.

Después de liofilizar se registraron las viabilidades a los treinta y sesenta días, usando manitol como excipiente en combinación con leche descremada al 10% m/v (Figura 13). A los treinta días, se evidenció que al restituir el prototipo de formulación a base de manitol 5%, restituyendo con buffer y, leche como crioprotector, se mantuvo la concentración celular, sin embargo, los demás tratamientos tuvieron un orden de magnitud inferior en la viabilidad. El tratamiento CONTROL (sólo leche) fue el segundo con mayor concentración a los treinta días, lo cual indica que al cabo de **un mes** manitol 1% y 5% no estabilizan a las células como la leche, considerando el tipo de restitución (Figura 13). A los sesenta días todos los tratamientos tuvieron la misma concentración, no obstante, el tratamiento **manitol 5% con restitución buffer** (Figura 13, línea morada), tuvo una reducción de 0.3 unidades en Log₁₀(UFC/mL) de concentración celular en comparación al día treinta. A los sesenta días de almacenamiento a 4°C, se observó que todos los tratamientos, a pesar de bajar un orden de magnitud en comparación al inicial, estabilizaron la viabilidad celular de las levaduras en comparación a los treinta días (Figura 13). Sin embargo, al evaluar la viabilidad de **LvGr20 sola con leche 10% m/v**

a los sesenta días de hacer liofilización, implementando restitución buffer, la concentración celular fue de $1,33 \cdot 10^6$ UFC/mL (datos no mostrados).

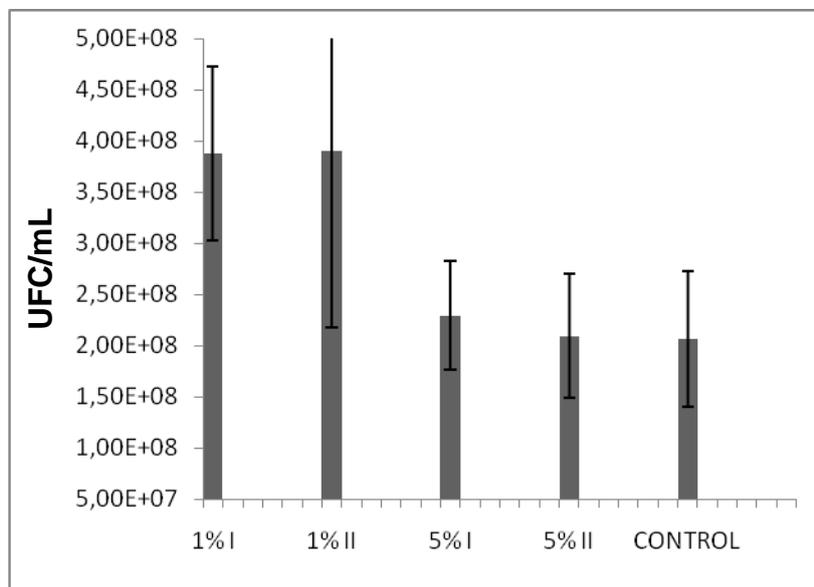


Figura 14. Recuento de células totales de los prototipos de formulación con mezcla 2:1 de LvGr20 con respecto a LvSb29 antes de liofilizar **usando trehalosa** al 1% y 5% m/v más leche descremada. CONTROL es el tratamiento control solamente con leche descremada al 10% m/v. **I.** Son los tratamientos destinados para restituirse con ADE. **II.** Son los tratamientos destinados para restituirse con buffer. Asterisco indica diferencias significativas con Duncan a $p < 0.05$.

Se evidenció que entre las concentraciones celulares de cada tratamiento empleando trehalosa para liofilizar posteriormente, tuvieron diferencias significativas. Los tratamientos de trehalosa al 1% destinados para restituir con agua destilada estéril (ADE) y BUFFER (Figura 14, I y II respectivamente), tuvieron una mayor cantidad de células viables que los otros tratamientos. Los tratamientos partieron del mismo orden de magnitud (10^8) (Figura 14). La variabilidad en las UFC/mL reportadas para cada tratamiento es la implícita a la experimentación.

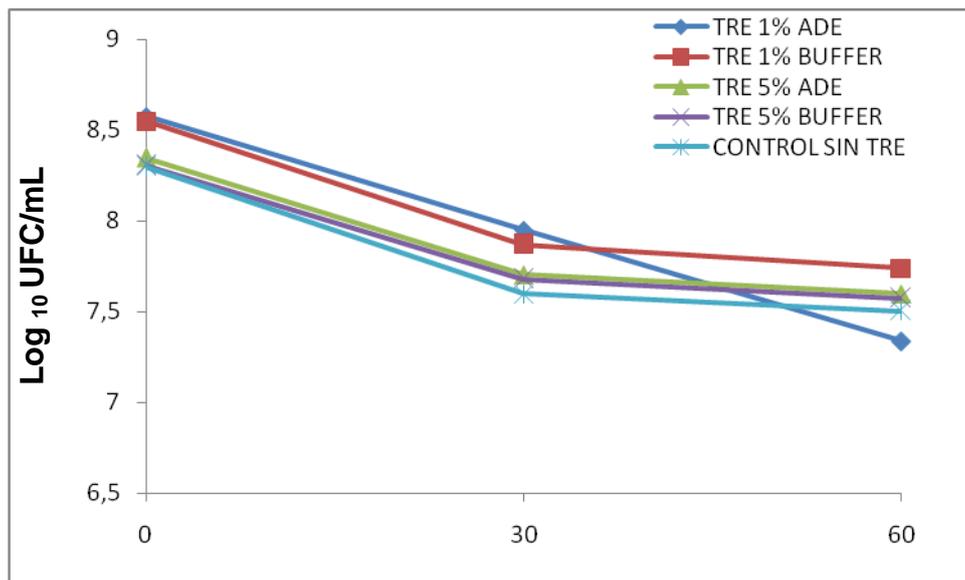


Figura 15. Log₁₀ de la viabilidad (UFC/mL) del prototipo de formulación desarrollado **con trehalosa** a dos concentraciones m/v durante sesenta días después de liofilizar en combinación con leche descremada 10% m/v, empleando dos restituciones: **I. ADE** y **II. BUFFER**.

Después de liofilizar se registraron las viabilidades a los treinta y sesenta días, usando trehalosa como excipiente en combinación con leche descremada al 10% m/v (Figura 15). A los treinta días todos los tratamientos bajaron medio orden de magnitud en su concentración celular (Figura 15). No obstante, a los sesenta días todos los tratamientos estuvieron en el mismo rango, $3.8 \cdot 10^7$ UFC/mL (Figura 15). Trehalosa 1% con restitución ADE fue el tratamiento más bajo y con restitución buffer el más alto, lo cual indica que probablemente el mantenimiento de unas condiciones de pH controladas y/o la osmolaridad de la suspensión, tiene un efecto determinante en el mantenimiento de la viabilidad celular de *Pseudozyma* (LvSb29) durante el proceso de liofilización. Adicionalmente al igual que manitol, en las formulaciones de mezclas de levaduras con trehalosa tanto al mes como a los dos meses, se obtuvo en promedio el mismo orden de magnitud celular, lo que hace pensar que probablemente la liofilización está determinando la estabilización de las formulaciones.

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad total de las formulaciones elaboradas al cabo de sesenta días. **I.** Restitución con ADE y **II.** Restitución con buffer. Los valores presentados corresponden a tres replicas por cada restitución por aditivo.

Aditivo	Concentración y restitución				LECHE
	1% I	1% II	5% I	5% II	
Manitol	14,16	8,35	9,59	14,00	8,24
Trehalosa	5,70	14,12	17,7	17,9	16,97

A los sesenta días tanto para manitol como para trehalosa 1% y 5%, restituyendo con ADE o buffer, las viabilidades se mantuvieron en el rango de $5 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^8$ UFC/mL (Figuras 13 y 15). Abadias y colaboradores (2001) evaluaron el efecto de algunos aditivos a concentraciones diferentes en la viabilidad de *Candida sake* después de implementar liofilización, partiendo inicialmente de $1 \cdot 5 \cdot 10^9$ UFC/mL. Los aditivos empleados, la trehalosa y manitol a 1%, 5% y 10% m/v se restituyeron con agua destilada. Para trehalosa se evidenció que a mayor concentración, hubo mayor porcentaje de supervivencia, además en 10% m/v se obtuvo un 12.5% de viabilidad. Por su parte, el manitol sólo al 10% tuvo el valor más alto de viabilidad con un 6.4% inmediatamente después de liofilizar. Adicionalmente, ese mismo estudio también evaluó el efecto de trehalosa mezclada con leche descremada a concentraciones de 1%, 5% y 10% para evaluar la viabilidad de *Candida sake* después de liofilizar. Se evidenció que con trehalosa y leche al 5% y 10%, en promedio se obtuvo un 24% de viabilidad. En el presente trabajo el porcentaje de viabilidad de manitol al 1% restituido con BUFFER y manitol al 5% restituido con ADE, al cabo de sesenta días fue más baja que trehalosa, con excepción a trehalosa al 1% restituida con ADE. Sin embargo, manitol al 1% restituido con ADE y manitol al 5% restituido con BUFFER tuvieron un porcentaje de viabilidad de 14% (Tabla 2). Esto sugiere que el manitol no garantiza la estabilización de las levaduras al término del tiempo evaluado en comparación al día cero, no obstante, existen tratamientos que mantienen el mismo porcentaje viabilidad entre manitol y trehalosa entre treinta y sesenta días. En cuando a trehalosa, se obtuvieron valores cercanos a los registrados por Abadias y colaboradores (2001) con 29% de viabilidad, empleando una concentración de leche y aditivo igual. Sin

embargo, los valores de leche y trehalosa al 5% con las dos restituciones fueron similares, usando tres replicas experimentales por tratamiento con Duncan a un $p < 0.05$, mostrando que es igual usar trehalosa o sólo leche, lo cual podría recomendar la no aplicación de trehalosa para la formulación.

Melin y colaboradores (2007) evaluaron el efecto del tiempo de fermentación en la viabilidad de *Pichia anomala* antes de formular con 5%, 20% y 35% trehalosa, implementando liofilización. Obtuvieron valores más altos de viabilidad usando levaduras de fermentaciones de 24 horas, la cuales en promedio después de tres meses registraron un 70% para las tres concentraciones, no obstante, para las fermentaciones de 48 horas después del mismo tiempo, la viabilidad fue más alta cuando se adicionó trehalosa al 20%; en la concentración de trehalosa al 5% la viabilidad fue aproximadamente de 13%. En el presente trabajo se usaron levaduras (LvGr20 y LvSb29) con tiempos de fermentación de 48 horas y, se obtuvieron valores superiores de porcentaje de viabilidad con trehalosa al 5% y, relativamente cercanos con manitol al 1% y 5% con diferentes restituciones a los reportados por Melin y colaboradores (2007) (Tabla 2), lo cual indica que las condiciones de fermentación de este trabajo, ofrecen mejor eficiencia en cuanto a viabilidad, usando un porcentaje menor de trehalosa. En otro estudio, Li y colaboradores (2008) evaluaron el efecto de la adición de trehalosa como protectante de *Cryptococcus laurentii* y *Rhodotorula glutinis* en la tolerancia al estrés (liofilización), usando una concentración celular inicial de 2×10^8 UFC/mL de cada una, procedentes de fermentaciones con o sin trehalosa. Al incorporarle a la formulación a base de *C. laurentii* trehalosa 5%, se logró un 90% de viabilidad cuando la bio-masa celular se obtuvo a partir de un medio suplementado con trehalosa y, 30% cuando se fermentó sin ella; valores menores a 10% se observaron en el tratamiento control, el cual consistió en no adicionar un protectante. *R. glutinis* al incorporarle como aditivo trehalosa 5%, tuvo 75% de viabilidad cuando se fermentó con este azúcar, mientras que sin trehalosa se obtuvo una viabilidad del 10%. En el presente trabajo se usaron dos levaduras en mezcla para generar una formulación, sin embargo después de sesenta días la proporción que se esperaba que permaneciera no se mantuvo, puesto que la viabilidad de LvGr20 se afectó drásticamente. Esto

hace pensar que posiblemente sería necesario considerar alternativas como la pre-adaptación en fermentación para LvGr20, con el objetivo de garantizar su supervivencia después de liofilizar. Lo anterior es posible, puesto que se evidenció que el aislamiento IBUNLvGr20 no soportó las condiciones de formulación con liofilización implementadas en el presente trabajo, hecho que aporta conocimiento sobre los tipos de formulaciones que tal aislamiento puede soportar. Por ejemplo, Bautista (2014) y Caicedo (2014) desarrollaron prototipos de formulaciones granulares y líquidas, respectivamente, usando IBUNLvGr20 como único principio activo y, encontraron una estabilización de la levadura a los sesenta días en comparación con el día inicial, usando 1×10^8 – 1×10^9 UFC/mL de partida. El tratamiento control de las formulaciones de Bautista (2014) para LvGr20 fue de 4×10^5 UFC/mL, lo cual refleja que la concentración de **leche descremada** del presente trabajo, en gran medida está protegiendo a IBUNLvSb29, pero no de la misma manera a IBUNLvGr20. Adicionalmente, se generó conocimiento sobre la tolerancia de IBUNLvSb29 a la liofilización, puesto que de tal aislamiento se hace por primera vez un desarrollo de prototipo de formulación.

Por lo anterior, se podrían considerar estrategias complementarias para la promoción de supervivencia de las levaduras seleccionadas al formularlas con liofilización. Navarta y colaboradores (2014) evaluaron el efecto de la pre-adaptación térmica más formulaciones liofilizadas con azúcares y leche descremada en *C. laurentii* (concentración celular inicial de 10^9 UFC/mL), se evidenció que las formulaciones pre-adaptadas a 4°C fueron más estables con un 90% de viabilidad después de noventa días de almacenamiento, en comparación a 70% de viabilidad en las células que no se pre-adaptaron. Tal estudio implementó como recurso de restitución en cada mes, la misma solución con la que se generaba cada formulación. En el presente trabajo no se empleó pre-adaptación térmica, pero sí dos restituciones con un tiempo de 10 minutos aproximadamente, sin implementar las mismas soluciones con que se hizo cada formulación. En cuanto a trehalosa, la restitución podría ser una causa de por qué se generó una viabilidad relativamente baja a los sesenta días, sin embargo una posible pre-adaptación podría representar una mayor estabilización en las formulaciones.

Por otro lado el manitol en comparación a la trehalosa tuvo un efecto negativo en la estabilización de la formulación, además, la trehalosa generó valores muy cercanos a los de la leche sólo sin vehículo, lo que hace pensar que posiblemente la leche descremada estéril, es suficiente para hacer una formulación con liofilización, promoviendo la estabilización principal de LvSb29. Adicionalmente, se evidenció la estabilización de los agentes bio-controladores entre los treinta y sesenta días, sin embargo la concentración al día treinta fue alrededor de un orden de magnitud menor al día cero antes de liofilizar.

Finalmente, el implementar la liofilización como técnica para formulación, genera costos altos, sin embargo, **esta es una de las metodologías que garantiza mayor estabilización de agentes bio-controladores (Melin et al. 2011)**. No obstante, cuando se incorpora liofilización en el desarrollo de una formulación, es necesario considerar las tasas de congelamiento, densidades celulares iniciales y las temperaturas de sublimación del producto (**Melin et al. 2011**). Adicionalmente, el éxito de la estabilización de los productos bajo liofilización, en gran medida depende de las sustancias crio-protectoras, las cuales determinan el crecimiento del hielo en el producto (**Melin et al. 2011**). En el presente trabajo se empleó una concentración celular inicial de $2 \pm 0.5 \cdot 10^8$ UFC/mL de levaduras total en combinación con leche descremada, sin considerar qué podría suceder a un orden de magnitud mayor o un aumento de concentración celular en el mismo orden. También se consideró sólo un esquema de congelamiento y sublimación, sin considerar experimentalmente otras condiciones. Todo esto amplía las posibilidades para el desarrollo de prototipos de formulación a base de mezclas celulares, empleando liofilización como herramienta de preservación con los aislamientos de levaduras seleccionados.

A partir de estos prototipos de formulación **con leche descremada**, se procedió a realizar la evaluación de los mismos contra *B. cinerea*, empleando co-inoculación con el patógeno en pétalos de rosa variedad Vendela. Esta evaluación se realizó después de sesenta días de almacenamiento de las formulaciones a 4 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente sección:

7.4. Evaluación de la actividad antagónica de los prototipos de formulación contra *B. cinerea* en pétalos de rosa variedad Vendela

Con el objetivo de evaluar el efecto de los prototipos de formulación en el desarrollo del moho gris sobre pétalos de rosa variedad Vendela, empleando co-inoculación, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3. Porcentaje de incidencia (%) y grado de severidad de los prototipos de formulación desarrollados **en combinación con leche** en co-inoculación con *B. cinerea* después de sesenta días de almacenamiento a 4°C. **ADE.** Formulaciones restituidas con agua destilada estéril. **Buffer.** Formulaciones restituidas con BUFFER. **SOLO Leche:** formulación sólo con leche. **L20 Leche:** LvGr20 sólo con leche restituida con buffer. Control de *B. cinerea* **CB Leche:** *B. cinerea* + leche 10% m/v pasteurizada. Control de *B. cinerea* **CB ADE:** *B. cinerea* + agua destilada estéril.

Tratamiento restituido en	Incidencia %		Grado de severidad	
	Manitol	Trehalosa	Manitol	Trehalosa
1% ADE	100	100	3,3	2,9
1% Buffer	100	100	2,9	3,2
5% ADE	100	100	2,4	2,1
5% Buffer	100	100	3,0	2,8
SOLO Leche	100	100	3,7	3,5
L20 Leche		100		3,8
CB Leche		100		4,0
CB ADE		70,4		1,1

Los prototipos de formulaciones al cabo de un período de almacenamiento de sesenta días, bajo las condiciones de estudio, no ejercieron control en el porcentaje de incidencia, pero sí en el grado de severidad del moho gris sobre pétalos de rosa variedad Vendela en **co-inoculación** (Tabla 3). Esto pudo ser por la disminución celular de LvGr20 después de la liofilización, quien después de formular únicamente reportó $1.33 \cdot 10^6$ UFC/mL. Mediante los experimentos del efecto de la concentración celular de LvGr20 sobre el moho gris (numeral 6.1.3.) se demostró que a esa concentración celular esta levadura no posee control biológico de la enfermedad.

Por otro lado, se evidenció que LvSb29 tuvo un orden de magnitud celular mayor que LvGr20, sin embargo, no fue suficiente para controlar la

enfermedad. Según los experimentos del numeral 6.1.3. y 6.2.2., LvSb29 a una concentración $1 \cdot 10^7$ UFC/mL no tiene control de *B. cinerea*, además, se evidenció que esta fue la levadura que predominó después de la liofilización a una concentración de $4 \pm 0.5 \cdot 10^7$ UFC/mL, pero a esa concentración la levadura no ejerce control del moho gris (Figuras 4 y 10). De acuerdo a los resultados del numeral 6.1.1., LvSb29 produce metabolitos secundarios inhibitorios, los cuales requieren de un **tiempo para su producción** y, en el experimento de co-inoculación con *B. cinerea*, el potencial bio-controlador de esta levadura podría ser imperceptible, no obstante, la afectación del grado de severidad del moho gris se controló por los prototipos de formulación por IBUNLvSb29 (Tabla 3).

En el presente trabajo no se evidenció bio-control de la incidencia, pero sí en el grado de severidad del moho gris sobre pétalos de rosa variedad Vendela con los prototipos de formulaciones desarrollados a base de leche descremada estéril como crio-preservante. Sin embargo, el tener prototipos de formulaciones a base de leche y usar un enfoque de competencia, **empleando co-inoculación**, pudo ser causa de tales resultados; al haber exceso de nutrientes, como lo es la leche empleada como crio-protector, es muy difícil que la competencia por espacio y, especialmente nutrientes, sea efectiva contra *B. cinerea* en un ambiente oligotrófico como lo es el pétalo de rosa. Adicionalmente, se evidenció que el desarrollo de la enfermedad depende de los requerimientos nutricionales que tenga *B. cinerea*, puesto que al incorporar recursos de carbono y energía como fue en este trabajo la leche al 10% m/v, se mejoró su patogenicidad (Elad et al. 1994), en contraste como si tuviera sólo ADE (Tabla 3).

Finalmente de acuerdo todos los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, se generan las conclusiones y recomendaciones en:

8. Conclusiones

- Los aislamientos de levaduras estudiados poseen al menos un mecanismo de acción para competir contra *B. cinerea*. Entre ellos está producción de compuestos difusibles en agar (metabolitos secundarios, IBUNLvSb29 (*Pseudozyma tsukubaensis*)), producción de compuestos orgánicos volátiles y competencia por espacio y nutrientes, cuya efectividad depende de la concentración celular.
- Los prototipos de formulación mantienen hasta un 18% de viabilidad celular en la proporción 2:1 en almacenamiento.
- La liofilización afecta drásticamente la viabilidad de *R. mucilaginosa*.
- La liofilización afecta la concentración celular de las mezclas celulares, determinando el comportamiento dosis-respuesta para el control de *B. cinerea*.
- *B. cinerea* en un ambiente rico en nutrientes tiene más patogenicidad. Además, las levaduras no expresaron el mecanismo de competencia por nutrientes.

9. Recomendaciones

- Se recomienda generar experimentos que identifiquen la clase de metabolitos secundarios de *P. tsukubaensis*, con el objetivo de entender y aplicar este mecanismo de acción.
- Se recomienda incrementar la concentración celular de partida, para que al restituir se evidencie la dosis-respuesta del control de la enfermedad.
- Se recomienda incrementar más aditivos y concentraciones en el desarrollo de nuevos prototipos de formulaciones con liofilización para el control del moho gris.

10. Bibliografía

- Abadias, M. et al., 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), pp.173–182. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500005134>.
- Agronet, 2013. Sistema de Estadísticas Agropecuarias - SEA. *Estadísticas*. Available at: <http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estadísticas.aspx> [Accessed December 8, 2013].
- Arbeláez-Torres, G., 1987. Enfermedades fungosas y bacteriales del clavel en Colombia. *Agronomía Colombiana*, pp.3–8 p. Available at: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/viewFile/20913/21822>.
- Asocolflores, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, R. de C. y C., 2009. Utilización de Bioinsumos en Colombia. Estudio de caso en flores de corte. , p.60 pp. Available at: <http://biblovirtual.minambiente.gov.co:3000/DOCS/MEMORIA/MAVDT-0034/MAVDT-0034.pdf> [Accessed December 8, 2014].
- Bautista Silva, J.P., 2014. Desarrollo de un prototipo de formulación sólida a base de levaduras filoféricas contra *Botrytis cinerea* en rosas. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.
- Bojacá, CR., Gómez, S., 2008. Mildew veloso y clima bajo invernadero en la Sabana de Bogotá. *Revista de la Asociación Colombiana de Exportadores de Flores, Asocolflores*, pp.10–11. Available at: <http://www.asocolflores.org/asocolflores/servlet/Download?idExternalFile=400&name=revista%2070.pdf> [Accessed December 8, 2013].
- Bond, C., 2007. Freeze-Drying of Yeast Cultures. In S. G. N. Day John G., ed. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc., pp. 99–107 p.
- Buxdorf, K. et al., 2013. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. *Plant physiology*, 161(4), pp.2014–22. Available at: <http://www.plantphysiol.org/content/161/4/2014> [Accessed December 3, 2014].
- Caicedo Ortega, A.R., 2014. Diseño de un prototipo de formulación líquida a base de levaduras filoféricas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en rosas. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa

de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.

Calvo, J. et al., 2003. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. *BioControl*, 48(5), pp.579–593. Available at: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025738811204>.

Cañamás, T.P. et al., 2011. Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56(2), pp.150–158. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964410002422>.

Conway, W.S. et al., 2005. Improving biocontrol using antagonist mixtures with heat and/or sodium bicarbonate to control postharvest decay of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 36(3), pp.235–244. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521405000438>.

Day John & Stacey Glyn, 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Second Edi. D. J. & S. Glyn, ed., New Jersey: Humana Press Inc.

De Capdeville, G. et al., 2007. Selection and testing of epiphytic yeasts to control anthracnose in post-harvest of papaya fruit. *Scientia Horticulturae*, 111(2), pp.179–185. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423806003931>.

Elad, Y., Köhl J., Fokkema, N. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology* 84: 1193-1200.

Exterior, I.B. de C., 2011. Perfil de Mercado Flores. Available at: http://ibce.org.bo/images/estudios_mercado/perfil_mercado_flores.pdf [Accessed December 8, 2013].

Florverde, A. y, 2009. No. *Cambiando el Rumbo*, p.10 pp. Available at: http://www.cecodes.org.co/descargas/casos_sostenibilidad/casosind/asocoflores.pdf [Accessed December 8, 2013].

García Bernal, HR., Peña, AC., G.P.C., 2008. Manual de prácticas de cosecha y acondicionamiento de la uchuva con fines de exportación Produmedio., Bogotá D.C. Colombia: Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Ge, L. et al., 2010. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved. *Food Chemistry*, 120(2), pp.490–495. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609012357>.

- Gill, S., Clement, D., Dutky, E., 2001. Plagas y enfermedades de los cultivos de flores, Estrategias Biológicas, Bogotá D.C.: Ball Publishing y EdicionesHortiTecnica.
- Guetsky, R. et al., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91(7), pp.621–627. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034914758&partnerID=40&md5=5980381da5bb07b309b9d3199faa03be>.
- Hibbett, D.S. et al., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), pp.509–547. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756207000615>.
- Huang, R. et al., 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101(7), pp.859–869. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79959989242&partnerID=40&md5=082d03445de2d1eb01407d052f8cf2a4>.
- Huang, R. et al., 2012. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. *Biological Control*, 62(1), pp.53–63. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964412000448>.
- Janisiewicz, W.J. & Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), p.411. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=7392202&lang=es&site=ehost-live>.
- Jones, K., B.H., 1998. Chapter 2: Technology of formulation and application. In B. H. Jones, K., ed. *Formulation of Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 412.
- Joshi, V.S. & Thorat, B.N., 2011. Formulation and Cost-Effective Drying of Probiotic Yeast. *Drying Technology*, 29(7), pp.749–757. Available at: 10.1080/07373937.2010.537006.
- Köhl, J. et al., 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, 57(1), pp.1–12. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964410002641>.
- Kulakovskaya, E. & Kulakovskaya, T.B.T.-E.G. of Y. eds., 2014. Copyright. , p.iv. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012420069200008X>.
- Lassois, L., de Lapeyre de Bellaire, L. & Jijakli, M.H., 2008. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila*

- strain O. *Biological Control*, 45(3), pp.410–418. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964408000145>.
- Lesmes Ávila, H.J., 2015. Producción de biomasa a partir de levaduras con actividad biológica para controlar *Botrytis cinerea* en cultivos de rosas. Tesis de Maestría. Maestría en Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Li, B.Q., Zhou, Z.W. & Tian, S.P., 2008. Combined effects of endo- and exogenous trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of two antagonistic yeasts. *Biological Control*, 46(2), pp.187–193. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-45949110348&partnerID=40&md5=04471364d4fa7e6f62e96378daf99db4>.
- Li, R. et al., 2011. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), pp.151–156. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511000821>.
- Lima, J.R. et al., 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, 83(0), pp.58–64. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521413000884>.
- Liu, J. et al., 2009. Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *BioControl*, 54(6), pp.817–824. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79952324617&partnerID=40&md5=66ae7c7ac69b464f8e093a9abe49508e>.
- Liu, J. et al., 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), pp.153–160. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051300411X>.
- López Ortega, M. del P., 2012. Control Biológico de *Botrytis* sp. mediante levaduras filoféricas en rosas de corte tipo exportación. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Posgrado Interfacultades de Microbiología. Bogotá D.C.
- Marschner, P., 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, The University of Adelaide, Germany: Elsevier Ltd. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84895401535&partnerID=40&md5=036bcba70c115e418cb2eb61fcb165d5>.
- Medina, C. Cristancho, D. & Uribe, D. 2009. Respuesta fisiológica y capacidad antagonista de aislamientos filoféricos de levaduras obtenidos en cultivos

- de mora (*Rubus glaucus*). *Acta Biológica Colombiana*, 14(3), pp.179–196 p.
- Melin, P., Håkansson, S. & Schnürer, J., 2007. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5), pp.1008–1016.
- Melin, P., Schnürer, J. & Håkansson, S., 2011. Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(1), pp.107–112. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79451475324&partnerID=40&md5=40f23a23d25251f3c3262f3fb101319b>.
- Montgomery, D., C. 2010. Diseño y análisis de experimentos. México. Segunda edición. Limusa Wiley.
- Montoya Carlos, Hincapié Luis, U.V., 1997. Principales enfermedades y plagas en el cultivo de la mora, Caldas, Risaralda. Colombia. Available at: <http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/24381/24381.pdf> [Accessed December 8, 2013].
- Moorman, G., 2013. Enfermedades de La Rosa. College of Agricultural Sciences. Available at: <http://extension.psu.edu/pests/plant-diseases/all-fact-sheets/spanish/enfermedades-de-la-rosa> [Accessed December 8, 2013].
- Navarta, L.G. et al., 2014. Postharvest Control of Gray Mold in Apples with Lyophilized Formulations of *Cryptococcus laurentii*: the Effect of Cold Stress in the Survival and Effectiveness of the Yeast. *Food and Bioprocess Technology*. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84897348206&partnerID=40&md5=3eb548e0edf7ea7748981b5e3fc8d0ce>.
- Neveu, B., Labbé, C. & Bélanger, R.R., 2007. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: A case study with *Pseudozyma flocculosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), pp.275–281. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701206002521>.
- Pizano de Márquez, M., 2003. Cultivo moderno de la Rosa Bajo Invernadero: investigación vegetal aplicada 2001, Bogotá D.C.: Ediciones Hortitecnia.
- Punja, Z.K. & Utkhede, R.S., 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 21(9), pp.400–407. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0041423778&partnerID=40&md5=3673e01d9cc6f6e7d5fdb575c2da1dd8>.

- Rowan, D.D., 2011. Volatile Metabolites. *Metabolites*, 1(1), pp.41–63. Available at: <http://www.mdpi.com/2218-1989/1/1/41>.
- Saligkarias, I.D., Gravanis, F.T. & Epton, H.A.S., 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. *Biological Control*, 25(2), pp.143–150. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964402000518>.
- Sansone, G. et al., 2005. Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology*, 35(3), pp.245–251. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521404002303>.
- Sectorial, B.E., 2013. Sector Flores. *ENALCO, INVESTIGA*, p.número 20. Available at: http://www.fenalcoantioquia.com/res/itemsTexto/recursos/no_20_floriculturafinal.pdf [Accessed January 18, 2014].
- Sharma, R.R., Singh, D. & Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), pp.205–221. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964409001236>.
- Stephens, J.H.G. & Rask, H.M., 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2–3), pp.249–258. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378429099000908>.
- Sutton, J.C., 1995. 9 Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. In J. H. A. and I. C. T. B. T.-A. in P. Pathology, ed. Academic Press, pp. 173–190. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0736453906800115>.
- Xu, X.-M. et al., 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101(9), pp.1024–1031. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80052608705&partnerID=40&md5=be62e9c84ecd88ba7efdd0cb678826e1>
- Yao, H., Tian, S. & Wang, Y., 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology*, 93(3), pp.297–304. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503006147>.
- Zahavi, T. et al., 2000. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, 20(2), pp.115–124. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521400001186>.

- Zhang, D. et al., 2010. Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 55(3), pp.174–181. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521409002166>.
- Zhang, H. et al., 2008. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. *Biological Control*, 47(1), pp.60–65. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964408001680>.
- Zhang, H. et al., 2009. Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *Biological Control*, 48(1), pp.79–83. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964408002302>.
- Zhang, H., Wang, L., et al., 2007. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control*, 40(2), pp.287–292. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964406002775>.
- Zhang, H. et al., 2005. Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*. *Postharvest Biology and Technology*, 35(1), pp.79–86. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092552140400081X>.
- Zhang, H., Zheng, X. & Yu, T., 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*, 18(4), pp.287–291. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713505002471>.

11. Anexos

Anexo A

GRADO DE SEVERIDAD



0-25 %

26-50%

51-75%

76-100%

Anexo B

Análisis estadísticos de la primera repetición temporal de la dosis-respuesta de IBUNLvGr20.

Convenciones:

Tratamiento 1= 1,0E+08 UFC/mL

Tratamiento 2= 1,0E+07 UFC/mL

Tratamiento 3= 1,0E+06 UFC/mL

Tratamiento 4= 1,0E+05 UFC/mL

Tratamiento 0= Sin Levadura

Todos los tratamientos que tuvieron levadura se hicieron en co-inoculación con *B. cinerea* a la misma concentración celular. El tratamiento control no tuvo levadura y, determinó cuál era la magnitud del desarrollo de la enfermedad basal en cada experimento *in vivo*.