

**Prohibida la reproducción total o parcial de este documento sin la autorización expresa de los autores**

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO BIOCONTROLADOR DE LEVADURAS  
AISLADAS DE FILOPLANO DE *Physalis peruviana* Linneaus, 1783, (UCHUVA)  
SOBRE EL HONGO FITOPATÓGENO *Alternaria* sp.**

**MARIA TERESA CASTELL OCHOA  
MAGDA LUCÍA ESCALLÓN RODRIGUEZ**

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS, BIOLOGÍA APLICADA  
BOGOTÁ, Abril de 2009**

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO BIOCONTROLADOR DE LEVADURAS  
AISLADAS DE FILOPLANO DE *Physalis peruviana* Linneaus, 1783, (UCHUVA)  
SOBRE EL HONGO FITOPATÓGENO *Alternaria* sp.**

**MARIA TERESA CASTELL OCHOA  
MAGDA LUCÍA ESCALLÓN RODRIGUEZ**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito para optar al título de  
BIÓLOGA**

**Pedro A. Jiménez PhD  
Director**

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS, BIOLOGÍA APLICADA  
BOGOTÁ, Abril de 2009**

## RESUMEN

La mancha negra de las hojas, producida por *Alternaria* sp. , es una de las enfermedades que más afecta a la uchuva, tanto en el cultivo como en post-cosecha. El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción inhibitoria *in vitro* de algunos aislados de levadura sobre el crecimiento del patógeno *Alternaria* sp. A partir de la filósfera de plantas sanas de uchuva se aislaron y evaluaron 24 morfotipos de levaduras. De plantas de uchuva, que presentaban síntomas de la mancha negra se obtuvieron tres aislados de *Alternaria* sp para ser confrontados contra las levaduras. Los 24 morfotipos de levadura afectaron las características macroscópicas de las colonias de los patógenos, y dos de éstos mostraron un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de las colonias de *Alternaria* sp.

**Palabras clave:** *Physalis peruviana*.Filosfera, *Alternaria* sp., levaduras biocontroladoras

Black leaf spot caused by *Alternaria* sp. is a disease that affects *Physalis* sp., both in cultivation and in post-harvest. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* inhibitory action of yeasts, isolated from *Physalis* sp, on .the growth of *Alternaria* sp. 24 morphotypes of yeast were isolated, and assessed, from the healthy *Physalis* sp. phyllosphere, . From *Physalis* sp. plants showing symptoms of black spots on the leaves, three samples of *Alternaria* sp. were isolated and evaluated. The 24 morphotypes of yeast affected the macroscopic characteristics of the colonies of pathogens; however only two out of these 24 morphotypes showed a distinct inhibitory effect on the radial growth of colonies of *Alternaria* sp.

**Key words:** *Physalis peruviana*, phyllosphere, *Alternaria* sp., biocontrol, yeast,

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, especialmente a mi hija Manuela, por su apoyo incondicional.

A Ernesto De Castro, Rudy Jordan y Luis Guillermo Gómez por su valiosa colaboración y aportes en el desarrollo de este trabajo.

A los estudiantes, jóvenes investigadores y auxiliares de laboratorio y campo de la sede experimental de la Universidad Militar Nueva Granada por su amistad y colaboración.

Magda Lucía Escallón Rodríguez

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por estar presente en cada momento.

A mis padres. Sus enseñanzas, su amor incondicional y su ejemplo me inspiran para ser mejor cada día; gracias a sus esfuerzos he llegado hasta aquí.

A Pedro Jiménez, por darme la oportunidad de trabajar y aprender a su lado, por ser director, compañero y amigo.

A Magda Lu por su amistad y paciencia; y a su familia por acompañarnos y apoyarnos.

A mis compañeros de laboratorio, jóvenes investigadores y auxiliares de laboratorio y campo de la sede experimental de la Universidad Militar Nueva Granada por su colaboración.

A Lulú y a María I por su amistad incondicional, por creer en mi, tenderme la mano y animarme a continuar.

MARIA TERESA CASTELL OCHOA

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	16
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Physalis peruviana</i> L. ....	17
3.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y PRODUCCIÓN DE UCHUVA EN COLOMBIA .....	18
3.3 PROBLEMAS FITOSANITARIOS EN EL CULTIVO DE UCHUVA .....	20
3.3.1 Características de <i>Alternaria</i> sp. ....	20
3.4 CONTROL BIOLÓGICO 3.3.1 .....	22
3.4.1 Las levaduras como agentes de control biológico .....	23
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	26
4.1.1 Aislamiento de <i>Alternaria</i> sp. ....	26
4.1.2 Aislamiento de levaduras a partir de la filósfera .....	26
4.2 PROCEDIMIENTO: FASE DE LABORATORIO .....	27
4.2.1 Aislamiento de microorganismos de interés .....	27
4.2.1.1. Aislamiento y preservación de levaduras .....	27
4.2.1.2. Aislamiento y preservación de los patógenos .....	28
4.3 PRUEBA DE ANTAGONISMO (PATÓGENO VS. LEVADURA)	29
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	31

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
5.1 CARACTERIZACIÓN DEL PATÓGENO .....	31
5.1.1 <i>Alternaria</i> 1 .....	32
5.1.2 <i>Alternaria</i> 2 .....	34
5.1.3 <i>Alternaria</i> 3 .....	35
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS .....	39
5.3 ECALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS AISLAMIENTOS DE LEVADURAS SOBRE LOS PATÓGENOS .....	40
5.3.1 Efecto de los morfotipos de levaduras sobre el crecimiento de <i>Alternaria</i> 1 .....	41
5.3.2 Efecto de los morfotipos de levaduras sobre el crecimiento de <i>Alternaria</i> 2 .....	42
5.3.3 Efecto de los morfotipos de levaduras sobre el crecimiento de <i>Alternaria</i> 3 .....	44
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>7. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS ELECTRÓNICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema general del procedimiento para el aislamiento de microorganismos de interés .....	21
<b>Figura 2.</b> Montaje prueba de antagonismo. Disposición del inóculo de levadura .....	24
<b>Figura 3.</b> Montaje prueba de antagonismo. Disposición del inóculo de levadura e inóculo del patógeno .....	24
<b>Figura 4.</b> Curva de crecimiento de los tres patógenos caracterizados ....	25
<b>Figura 5.</b> Características macroscópicas de <i>Alternaria 1</i> en PDA al sexto día de incubación a 25°C <b>A)</b> Anverso <b>B)</b> Reverso .....	26
<b>Figura 6.</b> Cadenas de conidios producidos por colonias de <i>Alternaria 1</i> sembradas en PDA al sexto día de incubación a 25°C (Magnificación 400X) .....	27
<b>Figura 7.</b> <i>Alternaria 1</i> , conidios con septos transversales y longitudinales (magnificación 400x) .....	27
<b>Figura 8.</b> Características macroscópicas de <i>Alternaria 2</i> en PDA al cuarto día de incubación a 25°C <b>A)</b> Anverso <b>B)</b> Reverso .....	28
<b>Figura 9.</b> Cadenas de conidios producidos por colonias de <i>Alternaria 2</i> sembradas en PDA al cuarto día de incubación a 25°C (Magnificación 400X) .....	28
<b>Figura 10.</b> <i>Alternaria 1</i> , conidios con septos transversales y longitudinales (magnificación 400x) .....	29
<b>Figura 11.</b> Características macroscópicas de <i>Alternaria 3</i> en PDA al quinto día de incubación a 25°C <b>A)</b> Anverso <b>B)</b> Reverso .....	29
<b>Figura 12.</b> Conidios producidos por colonias de <i>Alternaria 2</i> sembradas en PDA al quinto día de incubación a 25°C (Magnificación 400X) .....	30

<b>Figura 13.</b> <i>Alternaria</i> 3, conidios con septos transversales de coloración oscura (magnificación 400x) .....	30
<b>Figura 14.</b> Comparación macroscópica de colonias de <i>Alternaria</i> 1 <b>A)</b> Incubación a temperatura constante (25°C).durante 6 días <b>B)</b> Incubación a temperatura ambiente durante 17 días .....	31
<b>Figura 15.</b> Comparación macroscópica de colonias de <i>Alternaria</i> 2 <b>A)</b> Incubación a temperatura constante (25°C).durante 4 días <b>B)</b> Incubación a temperatura ambiente durante 15 días .....	31
<b>Figura 16.</b> Comparación macroscópica de colonias de <i>Alternaria</i> 2 <b>A)</b> Incubación a temperatura constante (25°C).durante 5 días <b>B)</b> Incubación a temperatura ambiente durante 16 días .....	32
<b>Figura 17.</b> Observación al estereoscopio de tres colonias de levadura (Aumento 4.5 x). Colonias de levadura con borde liso (morfortipo 8, <b>B)</b> Colonias de levadura con borde rugoso (morfortipo 17) <b>C)</b> Colonias de levadura que presenta producción de difusible en el medio (morfortipo 5) .....	33
<b>Figura 18.</b> Efecto de los diferentes morfortipos sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria</i> 1 .....	36
<b>Figura 19.</b> Efecto de los diferentes morfortipos sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria</i> 2 .....	37
<b>Figura 20.</b> Efecto de los diferentes morfortipos sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria</i> 3 .....	39
<b>Figura 21.</b> Comparación del efecto de los morfortipos que mejores resultados arrojaron en común sobre el crecimiento micelial de los patógenos (morfortipos 17 y 18) .....	40
<b>Figura 22.</b> Comparación del efecto de distintos tratamientos sobre <i>Alternaria</i> 1. <b>A)</b> Testigo <b>B)</b> Tratamiento con nivel de inhibición nulo (Patógeno vs Morfortipo 11) <b>C)</b> tratamiento con nivel de inhibición medio (Patógeno vs Morfortipo 6) <b>D)</b> tratamiento con nivel de inhibición alto (Patógeno vs Morfortipo 17) .....	41

<b>Figura 23.</b> Comparación del efecto de distintos tratamientos sobre <i>Alternaria 2</i> <b>A)</b> Testigo <b>B)</b> Tratamiento con nivel de inhibición nulo (Patógeno vs Morfotipo 11) <b>C)</b> tratamiento con nivel de inhibición medio (Patógeno vs Morfotipo 6) <b>D)</b> tratamiento con nivel de inhibición alto (Patógeno vs Morfotipo 18) .....	42
<b>Figura 24.</b> Comparación del efecto de distintos tratamientos sobre <i>Alternaria 3</i> <b>A)</b> Testigo <b>B)</b> Tratamiento con nivel de inhibición nulo (Patógeno vs Morfotipo 11) <b>C)</b> tratamiento con nivel de inhibición medio (Patógeno vs Morfotipo 6) <b>D)</b> tratamiento con nivel de inhibición alto (Patógeno vs Morfotipo 18) .....	43

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características macroscópicas y microscópicas de morfotipos de levaduras aisladas .....	33
<b>Tabla 2.</b> Efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria</i> 1 por los morfotipos de levadura aislados del filoplano .....	34
<b>Tabla 3.</b> Efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria</i> 2 por los morfotipos de levadura aislados del filoplano .....	37
<b>Tabla 4.</b> Efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria</i> 3 por los morfotipos de levadura aislados del filoplano .....	38

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Resultados ANOVA (0.05) para crecimiento micelial de los tres patógenos bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

**Anexo 2.** Resultados comparación de rangos múltiples (prueba de Tukey) para crecimiento micelial de *Alternaria 1* bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

**Anexo 3.** Resultados comparación de Rangos múltiples (prueba de Tukey) para crecimiento micelial de *Alternaria 2* bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

**Anexo 4.** Resultados comparación de Rangos múltiples (prueba de Tukey) para crecimiento micelial de *Alternaria 3* bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO BIOCONTROLADOR DE LEVADURAS  
AISLADAS DE FILOPLANO DE *Physalis peruviana* Linneaus, 1783, (UCHUVA)  
SOBRE EL HONGO FITOPATÓGENO *Alternaria* sp.**

**1. JUSTIFICACIÓN.**

En Colombia, uchuva es el nombre con que se denomina al arbusto frutícola *Physalis peruviana* L. el cual, en la última década, pasó de ser una especie silvestre, o semisilvestre, a convertirse en un importante monocultivo tecnificado que tiene el cubrimiento de importantes extensiones en la región andina de Colombia (Zapata *et al.*, 2005). Este cambio es impulsado por la alta demanda alcanzada como fruta fresca, debido a la gran aceptación que tiene en el mercado internacional y el creciente consumo interno en los últimos años. De acuerdo a Herrera (2000), además de la calidad del fruto, la presentación y la inocuidad del mismo, los mercados externos presentan una serie de exigencias con respecto al cumplimiento de normas ambientales, sanitarias y gubernamentales para la comercialización del producto. Por ejemplo, las exportaciones de uchuva al mercado europeo, y las expectativas generadas por la entrada del producto al mercado norteamericano, demandan la implementación de las denominadas buenas prácticas agrícolas (BPA). Estas prácticas, involucran factores relacionados con la calidad e inocuidad de los alimentos producidos, el cuidado del medio ambiente y el bienestar y salud de los trabajadores, entre otros (Marin *et al.*, 2005; Sanabria. 2005).

Como se mencionó antes, el incremento de las exportaciones de uchuva ha propiciado el aumento del área cultivada en forma de monocultivos. Estos sistemas favorecen el incremento de la incidencia y severidad de las enfermedades que atacan la uchuva, las cuales deben ser controladas (Zapata *et al.*, 2005). Por otra parte, el manejo fitosanitario de los cultivos a base de agroquímicos se convierte en factor limitante para la comercialización del producto, pues se desvían de las BPA que se exigen para la exportación. Además, el uso de productos químicos de síntesis es también el método más empleado para el control de enfermedades que se presentan en poscosecha, en diferentes frutas y verduras que se consumen frescas (Viñas, 2005). Los residuos de estos productos químicos que se acumulan,

en el proceso de producción de cultivos o en tratamientos de poscosecha, representan un problema para la salud humana por lo cual se han establecido una serie de límites máximos de residuos (LMR) permitidos. Estos límites son restrictivos y en muchos casos están por debajo de los recomendados por el Codex Alimentarius (Viñas, 2005; <http://www.mincomercio.gov.co/econtent/newsdetail.asp?id=2691&idcompany=1>, [http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_es.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp)). El uso de pesticidas, restringe la comercialización de frutas y conduce a la reducción o pérdida de su eficacia pues los patógenos suelen desarrollar resistencia a ellos como resultado de la exposición continuada (Saligkarias *et al.*, 2002; de Capdeville *et al.*, 2007).

La situación planteada, demanda nuevos esquemas y técnicas que permitan sustituir, en alguna medida, el uso de productos químicos en la producción frutícola. Debe tenderse entonces hacia la producción de frutos sanos y libres de residuos nocivos, resultado de procesos agrícolas compatibles con las exigencias de las BPA. Parece clara la necesidad de realizar trabajos de investigación tendientes al desarrollo de métodos alternativos o, al menos, complementarios del control con químicos de baja toxicidad. Estos métodos deberían estar orientados a interrumpir el inicio de la enfermedad, limitar su propagación y a lograr la calidad e inocuidad requerida por el mercado (Saligkarias *et al.*, 2002; de Capdeville *et al.*, 2007). Entre los diferentes métodos de tratamiento y control de enfermedades de plantas, el uso de agentes biológicos es susceptible a ser explorado como una alternativa de solución a los problemas que presenta la uchuva.

Entre las enfermedades que más afectan al cultivo de la uchuva se encuentra la llamada “mancha negra de las hojas”, producida por el ataque del hongo *Alternaria* sp. Esta enfermedad reduce la calidad del fruto pues afecta el capacho, produciendo manchas de forma irregular, las cuales avanzan hasta la decoloración y acartonamiento casi transparente en la parte afectada. La presencia de ésta, y otras enfermedades, en poscosecha representa un riesgo de pérdida total del producto o disminución de su calidad, lo que se traduce directamente en pérdidas económicas importantes (Angulo, 2003).

Las levaduras se presentan como candidatas apropiadas para ser estudiadas como agentes biocontroladores. En la bibliografía se ha reportado un importante número de microorganismos, con efectos antagónicos contra patógenos, entre ellos las levaduras, como ejemplo tenemos a *Pichia guilliermondii*, *P. membranefaciens*, *P. anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus laurentii*, y *Rhodotorula glutinis*, los cuales han sido probados para el control de diferentes patógenos de la poscosecha (Petersson & Schnürer, 1995; Qin *et al.*, 2004; Viñas, 2005).

Los métodos desarrollados con tales levaduras pueden, en principio, ser aprovechadas dentro de un esquema de control de *Alternaria* sp. en uchuva. De allí, en este trabajo se busca evaluar *in vitro*, bajo condiciones no controladas, el efecto biocontrolador de levaduras, aisladas de la filósfera de uchuva, sobre tres aislados del patógeno *Alternaria* sp. Se aspira a que los resultados del estudio puedan servir como investigaciones iniciales en la búsqueda de alternativas viables para el manejo y control de la enfermedad.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto biocontrolador de levaduras asociadas al filoplano de *Physalis peruviana* sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria* sp.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- Aislar de la filósfera de uchuva (*Physalis peruviana*) levaduras y el hongo *Alternaria* sp.
- Evaluar *in vitro* el efecto de las levaduras aisladas sobre el crecimiento de *Alternaria* sp.



### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Physalis peruviana* L.

El origen de la especie se ubica en uno de los mayores centros de domesticación de plantas del mundo, el llamado Centro Principal Sudamericano, ubicado en los territorios andinos de Colombia, Perú, Ecuador y Bolivia, regiones en las cuales su fruto ha sido utilizado como alimento silvestre desde épocas precolombinas (Vavilov, 1951, citado por Hawkes, 1991). El rango altitudinal, naturalmente ocupado por la especie en el territorio de origen, y en el cual los expertos han registrado muchas de sus variedades silvestres, está entre 1.500 a 3.000 msnm (Hawkes, 1991). Aprovechando la capacidad adaptativa que naturalmente le confiere este amplio rango de distribución altitudinal, la especie ha sido introducida a otras partes del mundo, lo que ha permitido que actualmente se encuentre en casi todos los altiplanos de los trópicos y en varios lugares de los subtrópicos (CCI 2001). El proceso de introducción a otras partes del mundo se inició hace cerca de 200 años cuando fue llevada por los españoles a Sudáfrica y desde allí se extendió a Kenia, Zimbabwe, Australia, Nueva Zelanda, India y Hawai, lugares en los cuales también se cultiva actualmente con fines comerciales (Mora *et al.*, 2006).

En general, el rango de condiciones ambientales en las cuales se desarrolla la uchuva son: temperaturas entre los 13 y 18° C, precipitación pluvial anual de 1.000 a 2.000 mm., humedad relativa de 70 a 80%; suelos con estructura granular, textura areno-arcillosa, buena disponibilidad de materia orgánica, buen drenaje y pH entre 5.5 y 7.0 (Zapata *et al.*, 2002). Esta planta desarrolla una raíz fibrosa, que logra profundizar hasta los 60 cm. Presenta un tallo quebradizo, de color verde, con vellosidades de textura muy suave. Las ramas laterales se desarrollan más rápido que el tallo principal, por lo cual la planta crece hacia los lados. Las hojas tienen forma acorazonada, altamente pubescentes y de disposición alterna. Las flores son hermafroditas, pentámeras con corola amarilla y de forma tubular, los pétalos son persistentes, cubren el fruto durante todo su desarrollo proporcionando protección y carbohidratos durante los primeros 20 días de crecimiento de éste (Fischer, 2000; CCI, 2001). El fruto es una baya carnosa que contiene de 100 a 300 semillas, se

desarrolla en un período de 60 a 80 días, es azucarado y tiene altos contenidos de vitaminas A y C, así como hierro, fósforo y proteínas (CCI, 2001; Mora *et al.*, 2006;).

La uchuva, bajo condiciones de cultivo, se presenta como una planta perenne y de tipo arbustivo, que suele crecer sin tutorado hasta una altura de 1 m, y que puede alcanzar hasta los 2,5 m cuando las plantaciones se realizan bajo condiciones ambientales ideales. Con el aumento de la altitud, la planta produce un sistema radical más superficial, un porte más bajo, hojas más pequeñas y gruesas y aplaza el primer pico de producción (Fischer, 2000). Esta especie no es resistente a temperaturas bajas, pero puede rebrotar después de una helada de corta incidencia. La temperatura, la luz y las condiciones del suelo influyen tanto sobre la altura de la planta, como sobre el tamaño, color, contenido nutricional, sabor y tiempo de maduración de los frutos (Mora *et al.*, 2006).

### **3.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y PRODUCCIÓN DE UCHUVA EN COLOMBIA**

En Colombia el cultivo de uchuva inició su desarrollo comercial en la década de los ochenta, con la dinámica que le imprimió el hecho de tener un fruto de amplia acogida en los mercados internacionales (Corporación Colombiana Internacional (CCI) 2001). Con tan buenos resultados que un aumento significativo de las áreas cultivadas no se hizo esperar, pasando de 221 Has, en el año de 1999, a 316 Has, en el 2000, 534 Has, en el 2003 y a 792 en el 2004 (Sanabria, 2005; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2005). Para el 2007, la uchuva logró posicionarse como la principal fruta de exportación dentro de los frutales exóticos, al concentrar el 75,2% del mercado, seguido por el banano bocadillo con el 13.3%, y el tomate de árbol con el 4.1% ([www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est\\_col\\_frutas\\_exot\\_6pd f.](http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est_col_frutas_exot_6pd f.)).

La demanda y los beneficios económicos generados en su mercado, han mantenido un creciente interés por el aumento de la producción de la fruta en los últimos años, al punto que Colombia es, actualmente, el primer productor de uchuva a nivel mundial, seguido de Zimbabwe, Kenya, Sudáfrica, Ecuador, Perú, Bolivia y México.

Según el Departamento Nacional de Estadística (DANE) para el 2007 Países Bajos fue el principal destino de las exportaciones de uchuva colombiana, con 10,2 millones de dólares, seguido por Alemania, con 6,3 millones y Bélgica, con 5 millones, concentrándose en estos tres países el 84% del mercado. (Mejía, 2005; CCI 2005, Lanchero *et al.*, 2007, ([www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est\\_col\\_frutas\\_exot\\_6pdf](http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est_col_frutas_exot_6pdf))).

Las plantas que se cultivan en el país se registran como ecotipo Colombia, este ecotipo presenta frutos con peso promedio de cinco gramos, pequeños y de un color más vistoso si se les compara con los ecotipos Kenia y Sudáfrica. En éstos últimos se hacen presentes algunas características morfológicas diferentes, como la forma del cáliz, pero también se diferencian en sus respuestas fisiológicas y en el sabor (Mazorra *et al.*, 2006). La producción de uchuva en Colombia se registra en la región andina entre los 1.800 y 2.800 msnm. Zapata *et al.* (2008) reportan que para el 2005 los principales departamentos productores fueron Cundinamarca con 581 ha y un rendimiento de 16.842 kg/ha, y Boyacá con 73 ha y un rendimiento de 11.219 kg/ha.

Esta producción es continua durante todo el año, con épocas de mayor oferta entre octubre y enero. Teniendo en cuenta que la mayor parte de la producción de uchuva en Colombia es dedicada a la exportación, existen cultivos programados de acuerdo a las ventas de exportación del mercado europeo, que se presentan de octubre a mayo (Novoa *et al.*, 2006).

Dentro de los manejos empleados para mantener dicha producción, se encuentra el control químico. Este es el más utilizado por los productores para el manejo de plagas y enfermedades que afectan el cultivo. La Corporación Colombiana Internacional (CCI) (2005), reporta que la aplicación de los químicos se realiza generalmente sin tener en cuenta requerimientos específicos o si se presentan o no plagas y enfermedades que lo ameriten. Es importante recordar que una de las consecuencias de este tipo de manejo es la acumulación de residuos químicos inaceptables en el producto, que limitan la posibilidad de ingreso de la uchuva a los mercados externos (CCI, 2005). Esta situación permite ver la importancia de

desarrollar estudios que den la posibilidad de encontrar el antagonista o antagonistas adecuados, conocer o aproximarse al conocimiento de sus mecanismos de acción y desarrollar un método o métodos apropiados de aplicación, dirigidos concretamente a enfermedades en uchuva.

### **3.3 PROBLEMAS FITOSANITARIOS EN EL CULTIVO DE UCHUVA**

La uchuva es afectada por diferentes patógenos: bacterias, nemátodos, virus y hongos. Entre las enfermedades de origen bacteriano tenemos la mancha grasienta, producto del ataque por *Xanthomonas* sp., y la marchitez bacterial, debida al ataque de *Ralstonia solanacearum* (Angulo, 2003). Entre los nemátodos reportados se encuentra *Meloidogyne* sp. y entre los virus encontramos enrollamiento de la hoja (PLRV), virus Y de la papa (PVY) y virus Moteado Andino (APMV) (Blanco, 2000; Angulo, 2003). Los hongos son los patógenos más abundantes, y estos pueden causar enfermedades como: Damping-off (*Pythium* sp.), mancha gris (*Cercospora* sp.), muerte descendente (*Phoma* sp.), moho blanco o pudrición algodonosa (*Sclerotinia sclerotiorum*), moho gris (*Botrytis* sp.), marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*) y mancha negra de las hojas (*Alternaria* sp.) (Ariza, 2000; Blanco, 2000; Angulo *et al.*, 2005).

#### **3.3.1 Características de *Alternaria* sp.**

*Alternaria* sp. es un hongo fitopatógeno que pertenece al phylum Ascomycota, subdivisión Pezizomycotina, clase dothideomycetes, orden pleosporales, familia pleosporacea

(<http://tolweb.org/onlinecontributors/app?service=external/ViewImageData&sp=13913>). El género *Alternaria* fue establecido en 1817 por Nees. Según Rotem (1994) el número de especies establecidas varía dependiendo del taxónomo.

Este hongo produce esporas asexuales y conidias expuestas, la reproducción se realiza a través de conidias que se originan de una hifa o conidióforo (Agrios, 2005). El hongo prevalece durante la estación de lluvias, con máximo desarrollo del micelio a una temperatura de 27° C, mientras que para el desarrollo de conidióforos y

conidias se requiere una temperatura óptima entre 19 y 23° C. La mayor esporulación ocurre cuando las colonias del hongo son expuestas a 18° C, y en un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las esporas, se presentan en cadenas simples o ramificadas en extremidades de los conidióforos, ambas estructuras presentan coloración oscura (Agrios, 2005).

*Alternaria* sp. es el agente causal de una enfermedad común que afecta hojas, tallos, flores y frutos de plantas anuales, generalmente hortalizas y ornamentales. Habitualmente se manifiestan por medio de manchas y tizones foliares, en ocasiones produce el ahogamiento de la plántula, pudriciones del cuello, frutos y tubérculos (Agrios, 2005). El hongo produce, en principio, manchas pequeñas de color marrón oscuro a negro, más tarde dichas manchas crecen a modo de anillos concéntricos. A medida que muere el tejido afectado, las lesiones presentan forma redonda, ovalada o angular. Usualmente las manchas aparecen en las hojas inferiores y senescentes, luego la enfermedad sube al resto de la planta haciendo que las hojas afectadas se tornen amarillentas y senescentes. Las lesiones presentes en tallos de plántulas pueden formar úlceras, éstas a su vez pueden extenderse y rodear el tallo causando la muerte de la plántula (Agrios, 2005).

Esta enfermedad afecta en mayor grado a tejidos senescentes, plantas fertilizadas pobremente o sometidas a algún tipo de estrés (Agrios, 2005). La enfermedad tiene mayor incidencia cuando los cultivos están expuestos a una alternancia de períodos lluviosos y secos. El hongo puede subsistir en estado de latencia en el suelo, en residuos de cultivos infestados, entre las malezas y en las mismas semillas. La dispersión del hongo puede realizarse por el viento, el agua y los insectos y aún por los trabajadores y maquinaria agrícola, los riegos por aspersión también favorecen una mayor incidencia de la enfermedad (Agrios, 2005).

Dentro de las medidas de prevención contra el ataque de *Alternaria* sp. se encuentran el uso de variedades de plantas resistentes, el uso de semillas libres de enfermedad y mantener niveles de nitrógeno adecuados. Cuando se ha establecido la enfermedad las principales medidas de control tomadas son el uso de radiación UV dentro de invernaderos y la aplicación de fungicidas. Entre los fungicidas ampliamente utilizados para combatir la mancha negra de las hojas se señalan

productos químicos a base de clorotalonil, mancozeb, hidróxido cúprico, captan y mancozeb más sales de hierro y cobre (Zapata *et al.*, 2005).

Frente al problema que representa el uso de fungicidas sintéticos para el control de enfermedades, no solo de uchuva sino también de una gran variedad de frutas y hortalizas, se han estudiado algunas alternativas eficaces y económicamente viables (He *et al.*, 2003; Ippolito *et al.*, 2005). Una de las alternativas que ha presentado un considerable éxito en cultivo y en la prevención y control de enfermedades en postcosecha ha sido el control biológico de los patógenos mediante la utilización de microorganismos antagonistas (Qing & Shiping, 2000; He *et al.*, 2003; Ippolito *et al.*, 2005).

### **3.4 CONTROL BIOLÓGICO.**

En términos generales Cook & Baker (1996) definen control biológico como la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en un estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o del antagonista del patógeno o plaga que se quiere controlar. Dentro del contexto de la fitopatología, Pal & McSpadden (2006) definen este término como la utilización de determinados microorganismos residentes o introducidos en un hospedero, para suprimir las actividades y las poblaciones de uno o más patógenos. Además, plantean que el fundamento del control biológico está dado por la manipulación del mutualismo entre los microorganismos y sus plantas hospederas o de la manipulación de los antagonismos entre los microorganismos y agentes patógenos (Pal & McSpadden, 2006).

Entre los diferentes mecanismos de antagonismo se encuentran: antibiosis, competencia, interacciones directas con el patógeno e inducción de resistencia (Fernández & Vega, 2001). Una rápida interpretación de tales mecanismos de acción puede relacionarse en la forma siguiente: la antibiosis se presenta cuando sustancias que resultan del metabolismo del antagonista se liberan e inhiben el crecimiento del patógeno. Por ejemplo, algunos microorganismos como

*Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus pumilus* secretan compuestos volátiles con efectos fungicidas frente a *Botrytis cinerea* en fresas (Guetsky *et al.*, 2002) y *Pichia anomala* produce la enzima  $\beta$  1-3 glucanasa que digiere la pared celular de hongos como *Botrytis cinerea* (Grevesse *et al.*, 2003)

La competencia por nutrientes presentes en la superficie de las plantas es otro de los mecanismos empleados por los agentes biocontroladores frente a patógenos que dependen de nutrición externa (Reyes *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004). Por ejemplo, varios aislados de bacterias compiten por glucosa y asparagina en la germinación de oosporas de *Pythium aphanidermatum*. Si el medio de cultivo cuenta con buena disponibilidad de recursos puede surgir competencia por cualquier otra condición ambiental como espacio habitacional, luz u oxígeno.

Guetsky *et al.* (2002) proponen que un organismo biocontrolador puede presentar más de un método de acción contra el patógeno, pero cada mecanismo puede ser afectado de forma diferente por las condiciones bióticas y abióticas en las cuales se desarrolla. Así mismo, plantean la hipótesis de que si un agente biocontrolador presenta distintos mecanismos de control éstos tendrán efectos aditivos o sinérgicos, pero no antagónicos. Finalmente, concluyen que el control biológico mediante múltiples mecanismos de acción puede conseguirse por medio del uso de un organismo que presente varios mecanismos, o por la aplicación de la mezcla de más de un agente biocontrolador, en la cual cada uno de éstos presenta uno o varios mecanismos de acción diferentes frente a los patógenos (Guetsky *et al.*, 2002)

#### **3.4.1 Las levaduras como agentes de control biológico.**

La superficie de las plantas es colonizada por una amplia variedad de bacterias, levaduras y hongos, a estos organismos se les denomina epífitos, y la superficie de la planta que habitan es llamada filósfera (Lindow & Brandl, 2003). El primer punto de contacto entre los microorganismos y las hojas ocurre usualmente sobre la cutícula. Ésta es una capa cerosa que recubre todos los órganos aéreos de la planta, actúa como interfase entre la célula vegetal y el medio, además, se destaca como la principal barrera protectora frente a pérdidas de agua por transpiración

excesiva, acción de patógenos, radiaciones solares y contaminantes (Beattie, 2002). La cantidad, composición y estructura de las ceras cuticulares se ven afectadas por factores como la especie de planta, condiciones ambientales (intensidad lumínica, exposición a rayos UV-B, estrés por agua y temperatura, viento y lluvias) y contaminación del aire. Estos factores hacen que la microflora de la filósfera sea dinámica en el tiempo y el espacio, los patrones de variación espacial y temporal de su composición reflejan el balance sucesivo de procesos poblacionales como inmigración, emigración, crecimiento y muerte de especies (Beattie, 2002).

Dentro de los microorganismos encontrados en las hojas, como se mencionó antes, se incluyen diferentes géneros de bacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas, y con menos frecuencia, protozoos y nemátodos. Los hongos filamentosos se consideran habitantes transitorios de la superficie de las hojas y se encuentran principalmente en forma de esporas, mientras que levaduras y especies de hongos de rápida esporulación colonizan más activamente la filósfera. Sin embargo, las bacterias son los colonizadores predominantes, encontrándose en promedio de  $10^6$  a  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> de hoja (Lindow & Brandl, 2003).

Entre los microorganismos de la filósfera las levaduras se presentan como opciones importantes para ser estudiadas como agentes de control, no sólo por los mecanismos de acción que poseen, si no también por las ventajas que le conceden algunas características propias de ese grupo. Entre ellas se puede mencionar requerimientos nutricionales simples, capacidad de crecer en medios de cultivo de bajo costo, habilidad de sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales, no presentar producción de compuestos antiprotóxicos, ser genéticamente estables, tener gran efectividad a bajas concentraciones y no presentar riesgos de patogenicidad a plantas, animales o al hombre (Ippolito *et al.*, 2005; Zapata *et al.*, 2005).

Entre las levaduras asociadas a la filósfera, varias especies han sido evaluadas por presentar efectos biocontroladores sobre hongos que afectan diferentes tipos de frutas. Se han realizado diversos estudios en el tema, bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Resaltan trabajos como el de Karabulut & Baykal (2003) quienes evaluaron el efecto de levaduras aisladas de frutos de durazno frente a *Penicillium expansum* y



*Botrytis cinerea*. Por otra parte, He *et al.* (2003) estudiaron la capacidad biocontroladora de levaduras, aisladas de rizósfera de pera, sobre el patógeno *Penicillium expansum* atacando manzanas. Más cercano a nuestro interés actual, Qin *et al.* (2004) demostraron la alta efectividad de *Trichosporon pullulans*, para controlar cuatro patógenos: *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. que afectan las cerezas dulces. Para terminar esta lista de ejemplos, Benítez & Carrillo (2004) reportan el uso de levaduras como *Candida oleophila*, *C. guilliermondii* y *Debaryomyces hansenii* en el control de enfermedades presentes en cítricos.

En los últimos años el control biológico con microorganismos ha mostrado efectividad en el control de enfermedades postcosecha (Janisciewicz & Korsten, 2002., citado en Bautista-Baños, 2006) Sin embargo, aunque en condiciones controladas algunos estudios reportan una alta efectividad de los agentes biocontroladores, en los casos en que éstos han sido llevados a formulaciones de presentación comercial se ha observado que la efectividad puede llegar a ser menor que la observada en dichas condiciones (Guetsky *et al.*, 2002). La diferencia en la eficacia, mostrada por los organismos biocontroladores, entre condiciones controladas y situaciones comerciales puede deberse principalmente a que las condiciones medioambientales en la segunda no son completamente controladas. En estas condiciones, la filósfera está sujeta a fluctuaciones de temperatura, humedad relativa, humedad en la superficie, gases y movimientos de aire, lo cual puede afectar el establecimiento, la sobrevivencia y la actividad biocontroladora de los microorganismos principalmente porque modifican las características de la planta hospedera y alteran la química de la superficie de las hojas (Guetsky *et al.*, 2001).

Para incrementar la eficacia de los agentes biocontroladores bajo condiciones ambientales no controladas, Guetsky *et al.* (2002) sugieren algunas estrategias. Entre ellas podemos mencionar el uso combinado, o la alternancia de los agentes biocontroladores con otras medidas que sean menos afectadas por las condiciones ambientales. Se propone el uso de fungicidas químicos en dosis bajas, o la aplicación de varios agentes biocontroladores de manera simultánea, previendo que

estos tengan diferentes requerimientos ecológicos para su sobrevivencia, crecimiento y actividades.

#### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada, ubicado en la Estación Experimental Hacienda Río Grande. La estación se localiza en el municipio de Cajicá, Cundinamarca, a 2.558 msnm y con una temperatura media anual de 14° C.

##### **4.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

**4.1.1 Aislamiento de *Alternaria* sp.:** Para el aislamiento del patógeno se colectaron estructuras de plantas de uchuva que mostraran manchas y tizones foliares, anillos concéntricos, formas redondas, ovaladas o angulares y un halo clorótico circundando las partes lesionadas. El cuadro descrito enmarca los síntomas de la mancha negra de la hoja y los signos más relevantes de *Alternaria* sp. (Blanco, 2000). Las muestras se colectaron en una plantación que seguía prácticas agronómicas convencionales, localizada en el municipio de Sylvania, Cundinamarca, a 1.470 msnm.

**4.1.2 Aislamiento de levaduras a partir de la filósfera:** Para el aislamiento de levaduras se recolectaron folíolos vigorosos y sanos, libres de síntomas y signos de alguna enfermedad o de deficiencias nutricionales. Las muestras vegetales sanas se colectaron de plantas de uchuva silvestres en el municipio de Tabio, Cundinamarca, a 3.100 msnm.

## 4.2 PROCEDIMIENTO:

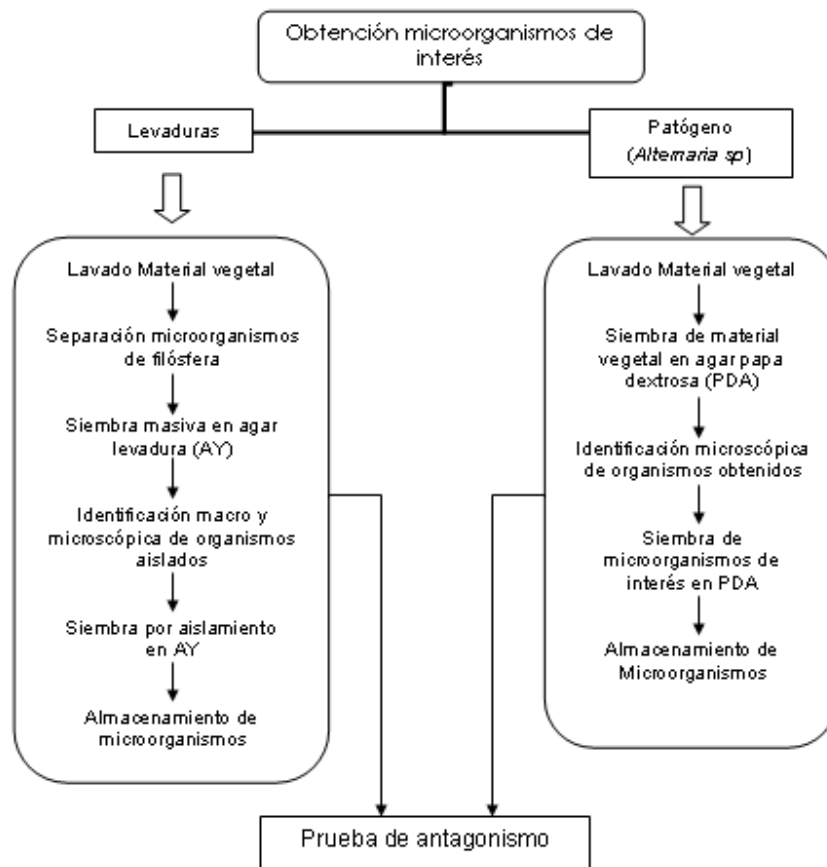


Figura 1. Esquema general del procedimiento para el aislamiento de microorganismos de interés.

### 4.2.1 Aislamiento de microorganismos de interés

#### 4.2.1.1 Aislamiento y preservación de levaduras

El proceso de aislamiento de levaduras, a partir de hojas o folíolos, se realizó siguiendo el protocolo propuesto por CORPOICA (2006) cedido por Zapata J.

- Para reducir la carga microbiana presente en la muestra, al material recolectado se le realizaron los siguientes lavados: a) hipoclorito al 0.2% durante dos minutos, b) dos lavados con agua destilada estéril (ADE), c) etanol al 70% durante un minuto d) tres lavados con ADE.

- El lavado del material se realizó en un erlenmeyer de 250 ml el cual contenía una solución estéril de tween 80 al 0.5% (50 ml de tween por cada 2.5g de muestra), el erlenmeyer fue puesto en agitación en un agitador orbital, marca Lab. Companion SK600, a 150 rpm durante 90 minutos, con el fin de favorecer la separación de las levaduras de la superficie foliar.
- El agua del lavado fue centrifugada a 5500 rpm durante 10 minutos.
- El pellet se resuspendió en 1 ml de ADE, de allí se tomó una alícuota de 0.3 ml para sembrar masivamente en agar levadura (AY).

Posteriormente, se realizó la identificación macroscópica para diferenciar las colonias de microorganismos (bacteria y hongos levaduriformes) de los hongos pluricelulares. Se prosiguió a la identificación microscópica, en la que se diferenciaron las levaduras de las bacterias, principalmente por la reproducción y el tamaño de las células. Una vez realizada esta distinción cada una de las colonias fue sembrada por agotamiento en agar malta (AM) (Restrepo *et al.*, 2007).

Para el almacenamiento de las levaduras se siguió el procedimiento propuesto por Sherman *et al.* (1986), (en [http://humgen.wustl.edu/hdk\\_lab\\_manual/yeast/yeast2.html](http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/yeast/yeast2.html)), las colonias aisladas, obtenidas de la siembra en AM, se almacenaron en una solución 80% caldo papa-dextrosa (PDB) y 20% glicerol, en tubos eppendorf, en volumen de un mililitro y conservadas a – 20° C.

#### **4.2.1.2 Aislamiento y preservación de los patógenos**

El material afectado por *Alternaria* sp. fue sometido al mismo tratamiento y secuencia de lavados que a las muestras sanas, descrito arriba. Las zonas afectadas de las hojas fueron cortadas en fragmentos pequeños, con un tamaño no mayor a 5mm<sup>2</sup>, y se sembraron en agar papa-dextrosa (PDA). Una vez los microorganismos presentes en el material vegetal colonizaron el medio, se realizó una revisión microscópica para identificar colonias de *Alternaria* sp. Posteriormente, a partir de éstas se reaislaron los hongos y se establecieron cultivos monospóricos, sobre papel de filtro, para finalmente almacenarlos a -20° C.

Para la caracterización de los patógenos se realizaron estudios preliminares sobre placas de PDA incubadas a 25° C, se calculó la tasa de crecimiento micelial (cm/día), teniendo en cuenta el radio de crecimiento de la colonia fúngica mediante la expresión sugerida por Mead en 1993 (citado por Benítez *et al.*, 2007)

$$TC = (Cf - Ci) / (Tf - Ti)$$

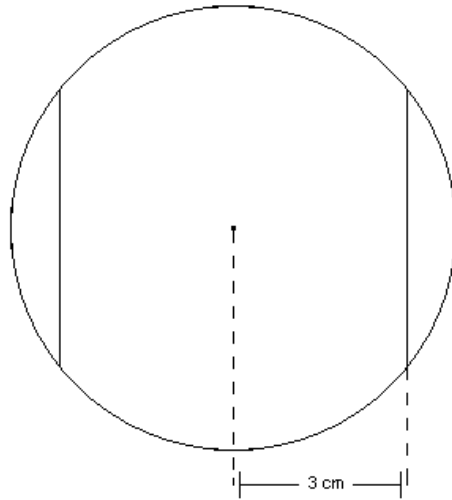
donde: Cf es el crecimiento final, expresado en cm. Ci: es el crecimiento inicial (día uno) expresado en cm. Tf: es el tiempo final (momento en el cual el patógeno coloniza completamente la caja de Petri). Ti: es el tiempo inicial (día uno).

#### **4.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO PATÓGENO VS. LEVADURA**

Partiendo de lo establecido por Guetsky *et al.* (2001), sobre las diferencias importantes en la efectividad de los controladores biológicos bajo condiciones controladas y no controladas, los bioensayos se desarrollaron dentro del laboratorio bajo condiciones no controladas las cuales se acercan más a la situación que enfrentan los productores de uchuva.

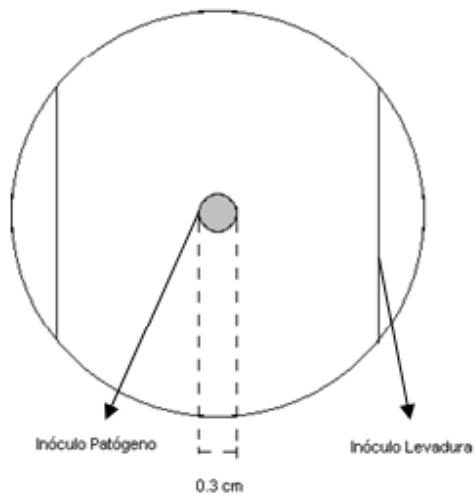
Para los ensayos de antagonismo se adoptó el protocolo empleado por Benítez *et al.* (2007).

- I. Se emplearon cajas de Petri con PDA. En cada placa de agar se trazaron dos estrías paralelas, a 3 cm del centro de la caja, como se ilustra en la figura 2. En cada estría se colocaron 10 µL de una suspensión de levaduras a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.



**Figura 2.** Montaje prueba de antagonismo. Disposición del inóculo de levadura.

- I. En el centro de cada placa de agar se colocó un disco de 0.3 cm de diámetro de inóculo de patógeno, éste provenía del borde de colonias sembradas previamente sobre placas de PDA incubadas a 25° C durante 5 días (figura 3)



**Figura 3.** Montaje prueba de antagonismo. Disposición del inóculo de levadura e inóculo del patógeno

- II. Los testigos de cada tratamiento tenían ADE en las estrías. Cada tratamiento consistía en enfrentar un morfotipo de levadura contra un aislado de *Alternaria* sp. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento.
- III. El crecimiento fúngico se determinó midiendo el radio de la colonia. Se registró el radio a los cinco, ocho, once, catorce y diecisiete días de realizado el montaje.

El rango de temperatura en el cual se desarrollaron los ensayos de biocontrol estuvo entre los 18 y 23° C y expuestos a fotoperíodos que oscilaban entre 5 y 9 horas de luz diarias (régimen de luz del interior del laboratorio).

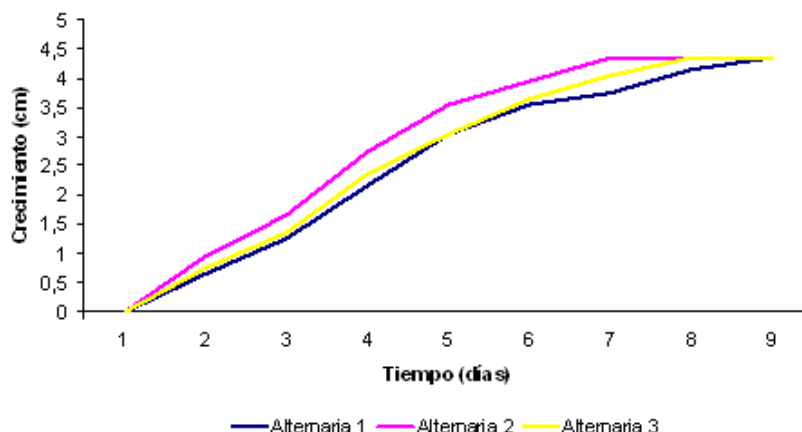
#### **4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se asumió normalidad en los datos, se realizó un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey (5%) utilizando el programa SPSS. La determinación de promedios y graficación se completó utilizando el programa Excel (Microsoft™).

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1 CARACTERIZACIÓN DEL PATÓGENO**

Se obtuvieron seis aislados de *Alternaria* sp., después de calcular las tasas de crecimiento y evaluar su patogenicidad mediante los postulados de Kock se decidió caracterizar y evaluar en las pruebas de antagonismo los tres aislados que presentaron las tasas de crecimiento más altas. La curva de crecimiento de los tres patógenos se presenta en la figura 4.



**Figura 4.** Curva de crecimiento de los tres patógenos caracterizados en placas de agar PDA.

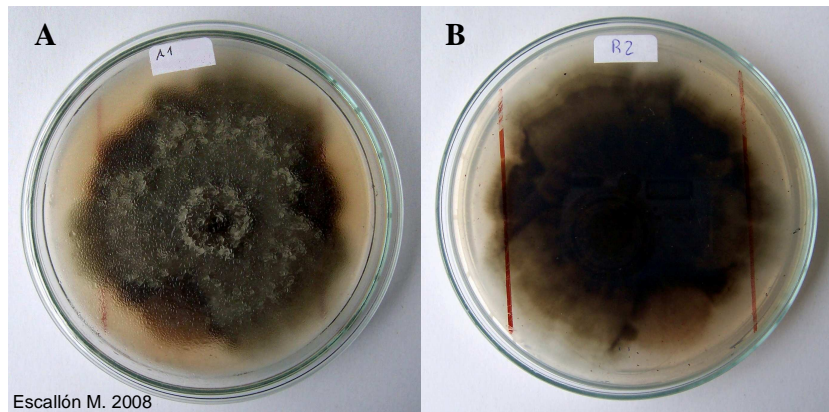
La gráfica permite ver que la *Alternaria 2* es el aislado que presentó la tasa de crecimiento más alta, 0.87 cm/día. Seguido de la *Alternaria 3* con 0.72 cm/día y *Alternaria 1* con 0.62 cm/día, esta diferencia en la velocidad de crecimiento es más marcada entre la *Alternaria 2* con respecto a los otros dos aislados, y a su vez las *Alternarias 1* y *3* presentan un comportamiento similar.

### 5.1.1 *Alternaria 1*

Las colonias de *Alternaria 1* fueron filamentosas de color pardo oscuro, crecimiento en mosaico, de forma circular con borde irregular (figuras 5). Presentaron micelio aéreo, éste tomaba una coloración blanca después de aproximadamente cinco días de establecida la colonia. Produjo cadenas de conidios poco ramificadas (figura 6), con el tiempo estas ramificaciones eran cada vez más densas. Las cadenas estaban formadas por 5 a 10 conidios elipsoidales a ovoides de color marrón, con varios septos transversales (3-5 septos) y longitudinales (1-3 septos) (figura 7).

Según la clasificación dada por Rotem (1994) esta este aislado de *Alternaria* se encuentra dentro del grupo longicatenatae (Cadenas largas de aproximadamente 10 conidios). Teniendo en cuenta las características descritas por Simmons en 1999 ([http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria\\_species/pages/Alternaria\\_Alternata.htm](http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria_species/pages/Alternaria_Alternata.htm)), este patógeno fue clasificado tentativamente como *Alternaria alternata*.





**Figura 5.** Características macroscópicas de *Alternaria 1* en PDA al sexto día de incubación a 25°C  
A) Anverso. B) Reverso



**Figura 6.** Cadenas de conidios producidos por colonias de *Alternaria 1* sembradas en PDA al sexto día de incubación a 25°C (magnificación 100X)

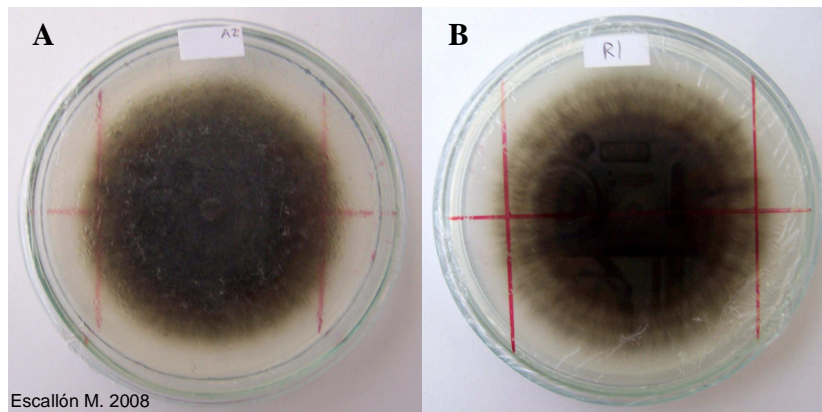


**Figura 7.** *Alternaria 1*, conidios con septos transversales y longitudinales (magnificación 400x)

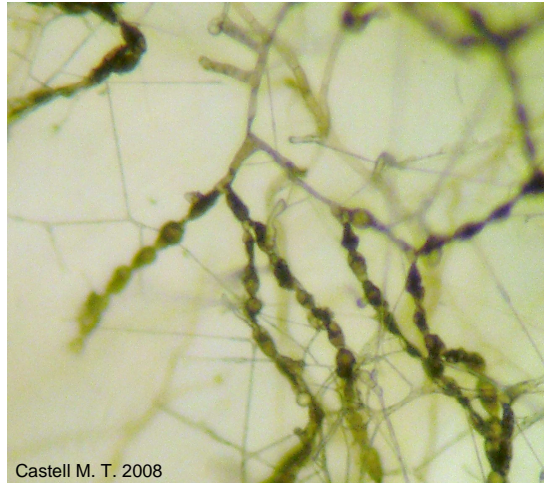
### 5.1.2 *Alternaria 2*

*Alternaria 2* formó colonias de color marrón oscuro, presentó crecimiento circular con borde regular (Figura 8). En el anverso de la colonia se observó la formación de anillos de crecimiento de la colonia (figura 8B). Presentó micelio aéreo, su coloración se tornó más oscura cuando la colonia llevaba aproximadamente cinco días de establecida. Produjo cadenas con un mayor número de ramificaciones (figura 9) comparado con las que se observaron en *Alternaria 1*. Las cadenas tenían de 5 a 8 conidios, los cuales fueron de color marrón que presentan de 1 a 3 septos transversales y entre 1 y 2 septos longitudinales (figura 10)

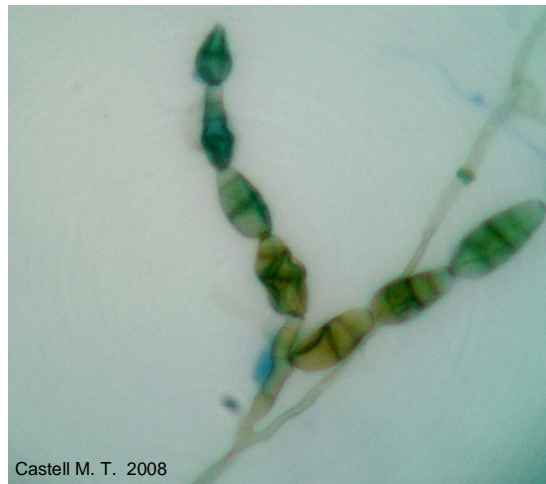
Esta *Alternaria* se encuentra dentro del grupo *longicatenatae* (Rotem 1994). Según las características observadas esta *Alternaria* se clasificó tentativamente como *Alternaria arborescens* (Simmons, 1999 en ([http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria\\_species/pages/alternaria\\_arborescens.htm](http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria_species/pages/alternaria_arborescens.htm))). Andersen *et al.* (2002) mencionan que la formación de anillos en las colonias es una característica típica de *Alternaria arborescens*



**Figura 8.** Características macroscópicas de *Alternaria 2* en PDA al cuarto día de incubación a 25°C  
**A)**Anverso. **B)** Reverso



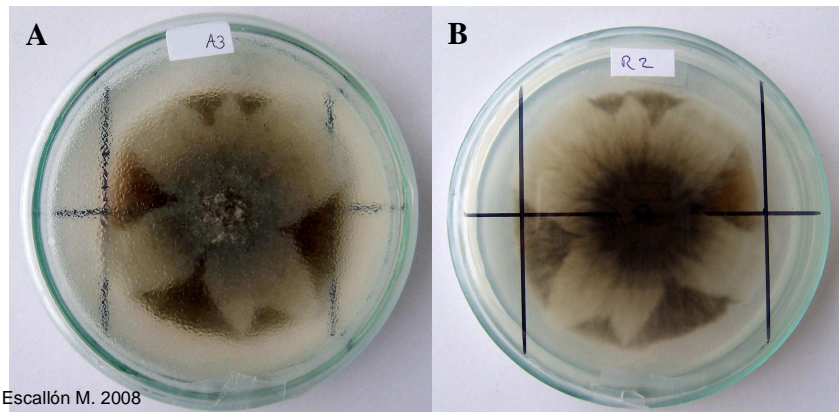
**Figura 9.** Cadenas de conidios producidos por colonias de *Alternaria 2* sembradas en PDA al cuarto día de incubación a 25°C (Magnificación 100X)



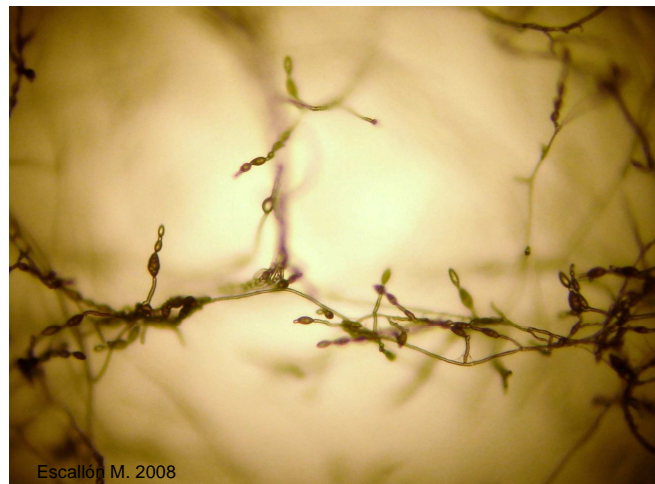
**Figura 10.** *Alternaria 2*, conidios con septos transversales y longitudinales (magnificación 400x)

### 5.1.3 *Alternaria 3*

Este aislado presentó colonias filamentosas de crecimiento en mosaico con doble coloración, marrón oscuro y marrón claro, similar a una estrella, en forma circular con borde irregular (figura 11). Desarrolló micelio aéreo, éste tomaba una coloración blanca después de aproximadamente cinco días de establecida la colonia, produjo conidióforos abundantes pero no en forma saturada; los conidios, solitarios o en cadenas cortas de hasta 4 conidios (figura 12), fueron ovoides, presentaron de 3 a 4 septos transversales y 1 ó 2 longitudinales, los septos transversales fueron más oscuros que la pared del conidio (Figura 13)



**Figura 11.** Características macroscópicas de *Alternaria 3* en PDA al quinto día de incubación a 25°C  
**A)**Anverso. **B)** Reverso



**Figura 12.** Conidios producidos por colonias de *Alternaria 3* sembradas en PDA al quinto día de incubación a 25°C (Magnificación 100X)



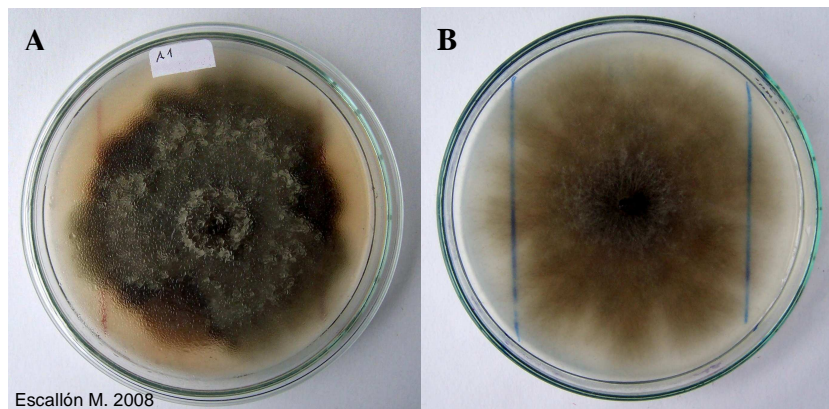
**Figura 13.** *Alternaria 3*, conidios con septos transversales de coloración oscura (magnificación 400x)

De acuerdo con la longitud de las cadenas esta *Alternaria* se ubica dentro del grupo *brevicatenatae* (Rotem, 1994). Teniendo en cuenta las características microscópicas descritas por Simmons en 1993, este aislado se puede clasificar tentativamente como *Alternaria arbusti*.

Debido a que la clasificación realizada a los tres aislados es tentativa y no se ha obtenido reconfirmación de esta determinación se seguirán nombrando como *Alternaria*1, *Alternaria* 2, y *Alternaria* 3.

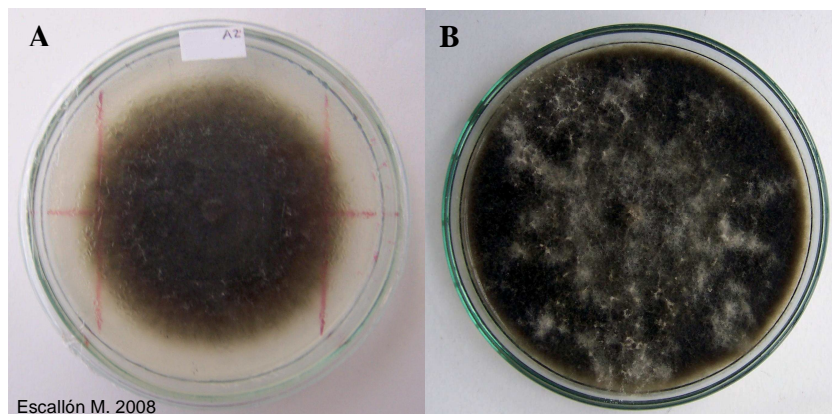
Dentro de los resultados obtenidos en este trabajo se observó que las características macroscópicas de colonias testigo de los tratamientos presentaron patrones de coloración y crecimiento diferentes, a las de las colonias utilizadas para la caracterización de los patógenos (condiciones controladas).

*Alternaria* 1 bajo condiciones no controladas de luz y temperatura presentó una coloración de colonia más clara y se observó una menor producción de micelio (figura 14), el tiempo que tardó el hongo en colonizar la placa de agar fue mayor, (17 días bajo condiciones no controladas y 8 días bajo condiciones controladas).



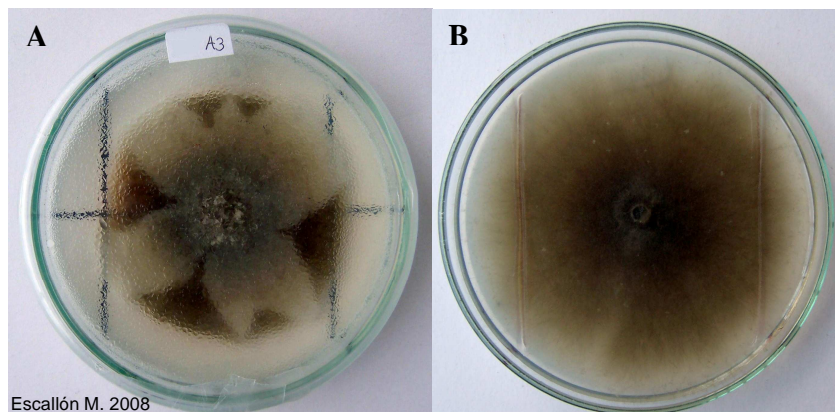
**Figura 14.** Comparación macroscópica de colonias de *Alternaria* 1 **A)** Incubación a temperatura constante (25°C).durante 6 días **B)** Incubación a temperatura ambiente durante 17 días

Para *Alternaria* 2 bajo condiciones no controladas de luz y temperatura se observó una mayor producción de micelio aéreo y la coloración de la colonia fue más oscura en comparación a las colonias incubadas bajo condiciones controladas, (figura 15), adicionalmente el tiempo de colonización del medio fue mayor (14 días bajo condiciones no controladas y 6 días bajo condiciones controladas).



**Figura 15.** Comparación macroscópica de colonias de *Alternaria 2* **A)** Incubación a temperatura constante (25°C).durante 4 días **B)** Incubación a temperatura ambiente durante 15 días

En el caso de *Alternaria 3*, en condiciones no controladas de luz y temperatura la coloración de la colonia fue uniforme, de un tono marrón claro y no en mosaico (figura 16). La producción de micelio fue menor en comparación con las colonias crecidas bajo condiciones controladas, y al igual que en los casos anteriores el tiempo de colonización del medio fue mayor (16 días bajo condiciones no controladas y 7 días bajo condiciones controladas).



**Figura 16.** Comparación macroscópica de colonias de *Alternaria 2* **A)** Incubación a temperatura constante (25°C).durante 5 días **B)** Incubación a temperatura ambiente durante 16 días

La baja velocidad de crecimiento micelial para los tres patógenos en condiciones no controladas se puede deber a que las temperaturas que favorecen dicho crecimiento están cercanas a los 27°C (Agrios, 2005) y la temperatura máxima promedio alcanzada en el laboratorio durante el desarrollo de los bioensayos fue de 23°C. La diferencia en los patrones de coloración dada por las condiciones controladas y no controladas posiblemente tiene explicación por la manera en que la formación de

conidióforos y conidias es afectada por la alternancia de periodos de exposición a luz y oscuridad (Agrios, 2005).

## 5.2 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS

Se aislaron en total 24 morfotipos de levaduras. En la tabla 1 se presentan las características macroscópicas y microscópicas observadas en dichos microorganismos.

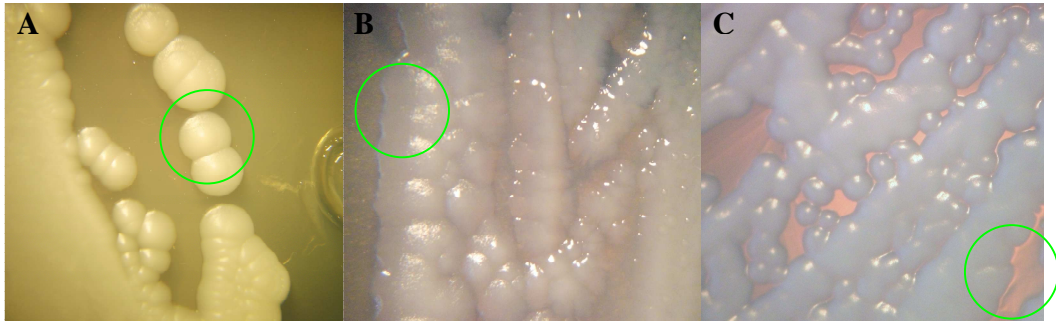
En algunos de los morfotipos aislados se observó la presencia de un metabolito difusible, el cual se caracterizó como una sustancia mucoide no pigmentada presente alrededor de las colonias.

**Tabla 1.** Características macroscópicas y microscópicas de morfotipos de levaduras aisladas

LEVADURA	COLOR DE COLONIA	MARGEN DE COLONIA	TEXTURA			DIFUSIBLE		REPRODUCCIÓN
			Cerosa	Mucoide	Cremosa	Presente	ausente	
1	Rosado	Entero	x				x	Gm
2	Blanco	Rugosa			x		x	Gm
3	Beige	Rugosa		X			x	F
4	Blanco	Entero			x		x	Gm
5	Beige	Rugosa		X		x		F
6	Beige	Rugosa		X		x		F
7	Beige	Rugosa		x		x		F
8	Blanco	Entero			x		x	Gm
9	Blanco	Entero			x		x	Gs
10	Blanco	Entero			x		x	Gs
11	Beige	Rugosa		x			x	F
12	Blanco	Entero			x		x	Gs
13	Beige	Rugosa		x			x	F
14	Blanco	Entero			x		x	Gm
15	Rosado	Entero			x	x		Gs
16	Blanco	Entero			x		x	Gm
17	Beige	Rugosa		x		x		F
18	Beige	Rugosa		x		x		F
19	Beige	Rugosa		x		x		F
20	Blanco	Entero			x		x	Gs
21	Beige	Rugosa		x		x		F
22	Blanca	Rugosa			x		x	Gm
23	Beige	Rugosa		x		x		F
24	Rosado	Rugosa	x				x	Gm

**Gm:** Gemación múltiple **Gs:** Gemación simple **F:** Fisión

Características de las colonias como margen entero y ausencia de difusible (A), margen Rugoso (B), y presencia de difusible (C) se pueden observar en la figura 17.



**Figura 17.** Observación al estereoscopio de tres colonias de levadura (Aumento 4.5 x)  
**A)** Colonias de levadura con borde liso (morfortipo 8, **B)** Colonias de levadura con borde rugoso (morfortipo 17) **C)** Colonias de levadura que presenta producción de difusible en el medio (morfortipo 5)

### 5.3 EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS AISLAMIENTOS DE LEVADURAS SOBRE LOS PATÓGENOS.

Se evaluaron los 24 morfortipos de levaduras contra los tres patógenos. El nivel de inhibición mostrado por los diferentes aislados se agrupó de la siguiente manera:

**Muy bajo:** porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la colonia fúngica menor a 10%.

**Bajo:** porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la colonia fúngica entre 10 - 34%.

**Medio:** porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la colonia fúngica entre 35 - 64%.

**Alto:** porcentaje de inhibición del crecimiento radial de la colonia fúngica mayor a 65%.

El análisis estadístico mostró que el efecto inhibitorio de cada morfortipo fue significativamente diferente para cada uno de los aislados fúngicos enfrentados a las levaduras (anexo 1).



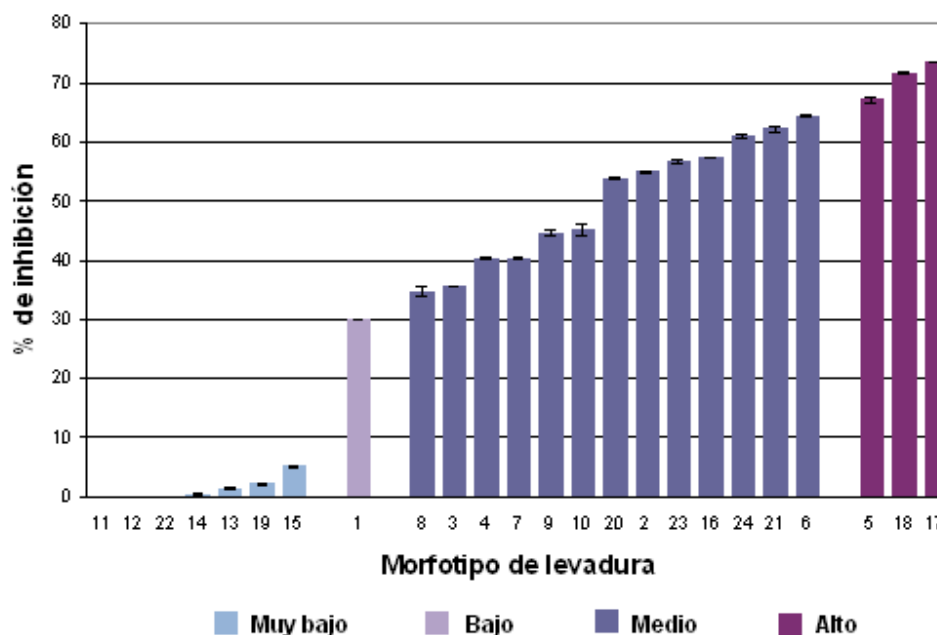
### 5.3.1 Efecto de los morfotipos de levaduras sobre el crecimiento de *Alternaria*

El porcentaje de inhibición sobre el crecimiento radial de *Alternaria* 1 dado por los diferentes morfotipos evaluados se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2.** Efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *Alternaria* 1 por los morfotipos de levadura aislados del filoplano de uchuva.

Morfotipo	% Inhibición	Desviación estandar
1	29,88	0,17
2	54,78	0,10
3	35,63	0,08
4	40,22	0,1
5	67,04	0,32
6	64,40	0,21
7	40,22	0,21
8	34,67	0,74
9	44,63	0,64
10	45,01	0,93
11	0	0
12	0	0
13	1,53	0,10
14	0,38	0,04
15	5,17	0,20
16	57,47	0,08
17	73,37	0,08
18	71,64	0,13
19	2,10	0,22
20	53,83	0,28
21	62,06	0,47
22	0	0
23	56,70	0,29
24	61,11	0,21

La figura 18 muestra la agrupación de los diferentes aislamientos dentro de las categorías de inhibición anteriormente establecidas, de acuerdo con el ANOVA realizado (anexo 1) existió diferencia significativa entre los efectos de todos los morfotipos de levaduras frente a este patógeno, presentando el morfotipo 17 el mejor efecto inhibitorio con 73,37% seguido de los morfotipos 18 y 5.



**Figura 18.** Efecto de los diferentes morfotipos de levaduras sobre el crecimiento micelial de *Alternaria 1*.

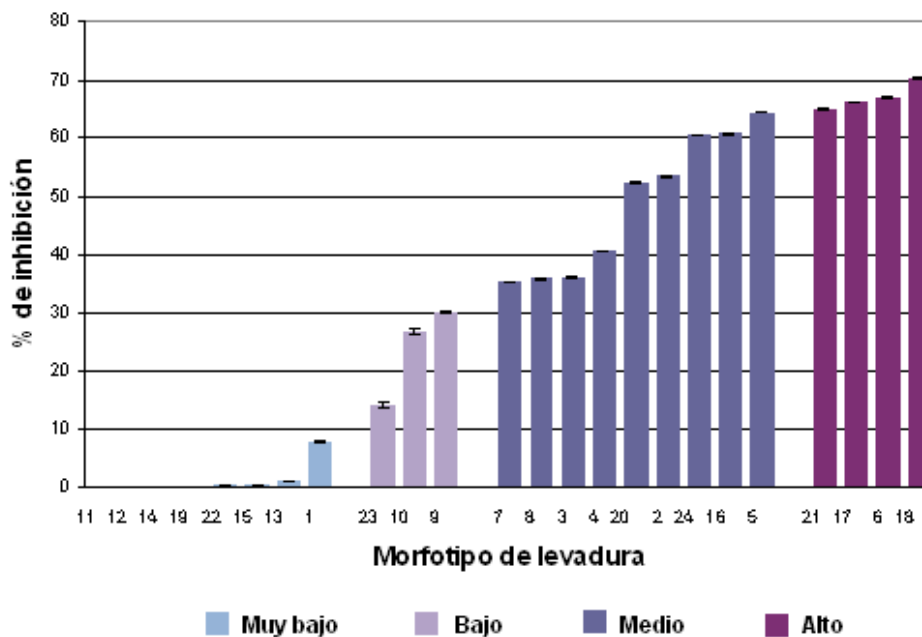
### 5.3.2 Efecto de los morfotipos de levaduras sobre el crecimiento de *Alternaria 2*.

La acción inhibitoria ejercida por cada morfotipo de levadura sobre *Alternaria 2* es presentada en la tabla 3, su agrupación dentro de las categorías de inhibición se muestra en la figura 19.

Para este patógeno los aislados de levaduras que presentaron un alto nivel de inhibición fueron 6, 17, 18 y 21, teniendo el mayor efecto el aislamiento 18 con un 70.3% de inhibición sobre el crecimiento radial del hongo. Al igual que en el caso anterior, y de acuerdo con el ANOVA (anexo 1) todos los morfotipos de levaduras presentaron diferencia significativa sobre el crecimiento radial de *Alternaria 2*.

**Tabla 3.** Efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *Alternaria* 2 por los morfotipos de levadura aislados del filoplano de uchuva

<b>Morfotipo</b>	<b>% de Inhibición</b>	<b>Desviación estandar</b>
1	7,66	0,09832
2	53,25	0,06831
3	36,01	0,22286
4	40,42	0,12416
5	64,36	0,17607
6	66,85	0,1633
7	35,05	0,09874
8	35,82	0,14972
9	30,07	0,34845
10	26,62	0,57915
11	0	0
12	0	0
13	1,14	0,1
14	0	0
15	0,38	0,02582
16	60,53	0,1169
17	66,18	0,07874
18	70,30	0,17725
19	0	0
20	52,29	0,06892
21	64,94	0,12942
22	0,19	0,02041
23	13,98	0,63751
24	60,34	0,12942



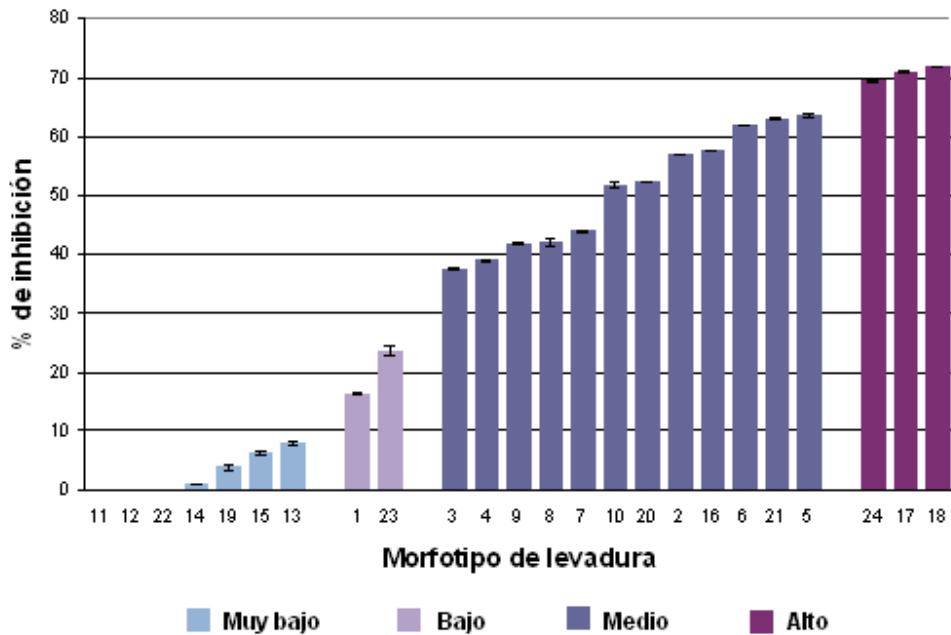
**Figura 19.** Efecto de los diferentes morfotipos de levaduras sobre el crecimiento radial de *Alternaria 2*

### 5.3.3 Efecto de los morfotipos de levaduras sobre el crecimiento de *Alternaria 3*

La inhibición presentada por cada morfotipo de levadura sobre *Alternaria 3* se observa en la tabla 4, la figura 20 muestra su agrupación en las diferentes categorías de inhibición. Para este patógeno los aislamientos que presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 65% en orden descendente fueron 18, 17 y 24, siendo significativamente diferentes los resultados obtenidos para todos los aislamientos frente a esta *Alternaria*.

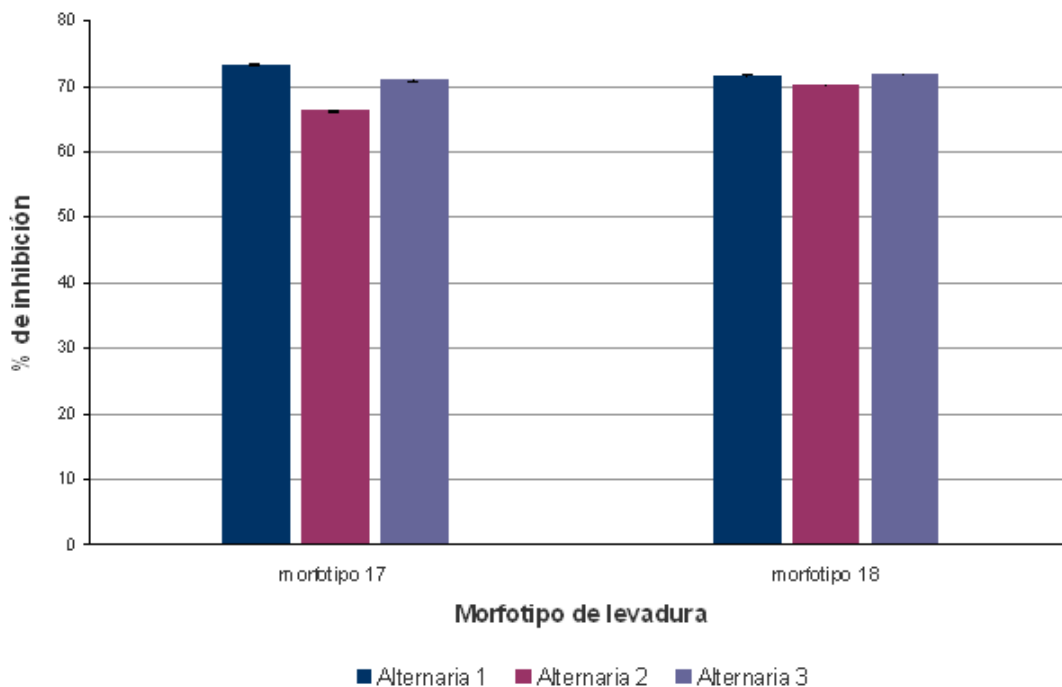
**Tabla 4.** Efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *Alternaria* 3 por los morfotipos de levadura aislados del filoplano de uchuva

<b>Morfotipo</b>	<b>% de Inhibición</b>	<b>Desviación estandar</b>
1	16,28	0,11143
2	56,70	0,06055
3	37,54	0,14024
4	38,88	0,1744
5	63,40	0,25183
6	61,82	0,09704
7	43,86	0,12813
8	41,95	0,54106
9	41,76	0,06831
10	51,72	0,54129
11	0	0
12	0	0
13	7,85	0,24983
14	0,956	0,10206
15	6,13	0,3587
16	57,66	0,04916
17	70,88	0,16021
18	71,83	0,16047
19	3,83	0,40825
20	52,29	0,04183
21	63,02	0,14289
22	0	0
23	23,56	0,72371
24	69,34	0,1291



**Figura 20** Efecto de los diferentes morfotipos de levadura sobre el crecimiento micelial de *Alternaria 3*

Para los tres patógenos los aislamientos que arrojaron mejores resultados en común fueron 17 y 18. Presentado un promedio de efecto inhibitorio de 70.14 y 71.1% respectivamente. La figura 21 muestra la comparación del efecto de estos morfotipos sobre el crecimiento radial de los patógenos, se puede observar que el comportamiento inhibitorio del morfotipo 18 fue muy similar para los tres patógenos. A diferencia de ello, para el morfotipo 17 se observa que sobre *Alternaria 2* el efecto inhibitorio es más bajo que para los otros 2 patógenos, la diferencia entre *Alternaria 1* y 2 es de 7.1% y entre *Alternaria 2* y 3 es de 4.7%. Por otro lado, también se observa que el menor efecto inhibitorio se presenta sobre *Alternaria 2*. Por último se determinó que la sensibilidad de cada patógeno frente al morfotipo 17 y al 18 es diferente. Según la estadística realizada (anexo 1) se presentó diferencia significativa, no solo entre estos dos aislamientos, sino entre todos los morfotipos de levadura evaluados al comparar los resultados entre patógenos.



**Figura 21.** Comparación del efecto de los morfotipos que mejores resultados arrojaron en común sobre el crecimiento micelial de los patógenos (morfotipos 17 y 18)

En los morfotipos 17 y 18 se observó la producción de difusibles (tabla 1). No todos los morfotipos que presentaron la producción de dicha sustancia evidenciaron buenos resultados. Por ejemplo, en los morfotipos 15 y 19 se observó la presencia de un difusible pero su acción inhibitoria fue muy bajo, por lo cual concluimos que la producción de dichas sustancias por parte de un microorganismo no garantiza que éste tenga un efecto inhibitorio.

En contraste a lo anterior, en el morfotipo 24 no fue visible la producción de algún tipo de difusible en la placa de agar, no obstante la inhibición del crecimiento radial de los patógenos fue superior al 60%, para las *Alternaria* 1 y 2 los porcentajes de inhibición fueron del 61.11 y 60.24% respectivamente, clasificándose dentro del grupo de inhibición media. Y para la *Alternaria* 3 la acción inhibitoria fue del 69.34% ubicándose en el grupo de inhibición alta. Estos resultados nos permiten plantear que no es fácil determinar con precisión los mecanismos empleados por los agentes biocontroladores frente a los diferentes patógenos, a su vez este planteamiento es reforzado con lo propuesto por Guetsky *et al.* (2002), quienes establecen que un organismo biocontrolador puede presentar más de un método de acción contra un patógeno.

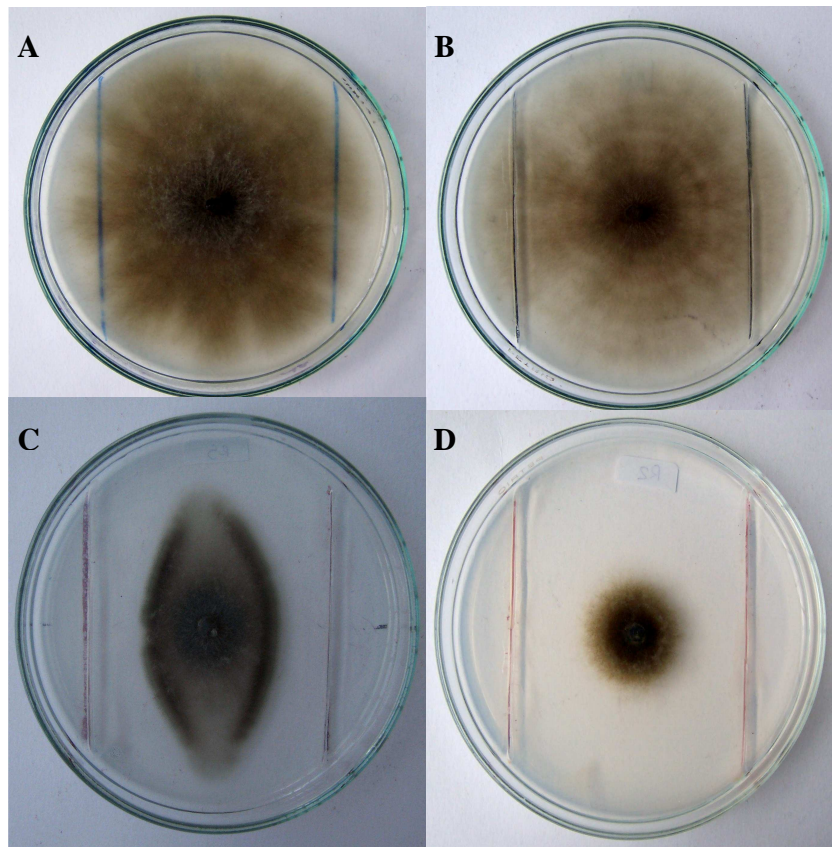
Todos los morfotipos de levadura evaluados afectaron las características macroscópicas de las colonias de los patógenos, independientemente de si inhibieron o no el crecimiento micelial.

Por ejemplo, al enfrentar *Alternaria* 1 con el morfotipo 11 (efecto de inhibición muy bajo) la colonia presenta coloración más clara (figura 22B) en comparación con el testigo (figura 22A). Aún cuando estos parámetros no fueron evaluados parece evidente que la producción de micelio fue menos densa y se puede suponer que la esporulación fue afectada, lo que conlleva al cambio de color.

Cuando el mismo patógeno fue enfrentado al morfotipo 6 (efecto de inhibición medio) el crecimiento de la colonia se dirigió principalmente hacia los lugares en donde ésta no fue enfrentada directamente con el biocontrolador (figura 22C), además el borde de la colonia es más oscuro, presentándose en esta zona una mayor producción de conidios.

La figura 22D corresponde al tratamiento *Alternaria* 1 vs morfotipo 17, el cual presentó el más alto porcentaje de inhibición sobre este patógeno. En este caso, la colonia no se ve afectada en cuanto a su forma de crecimiento (radial), pero es evidente la inhibición de la extensión radial de ésta. Esto puede indicar que el patógeno es altamente sensible a la acción inhibitoria del morfotipo 17.



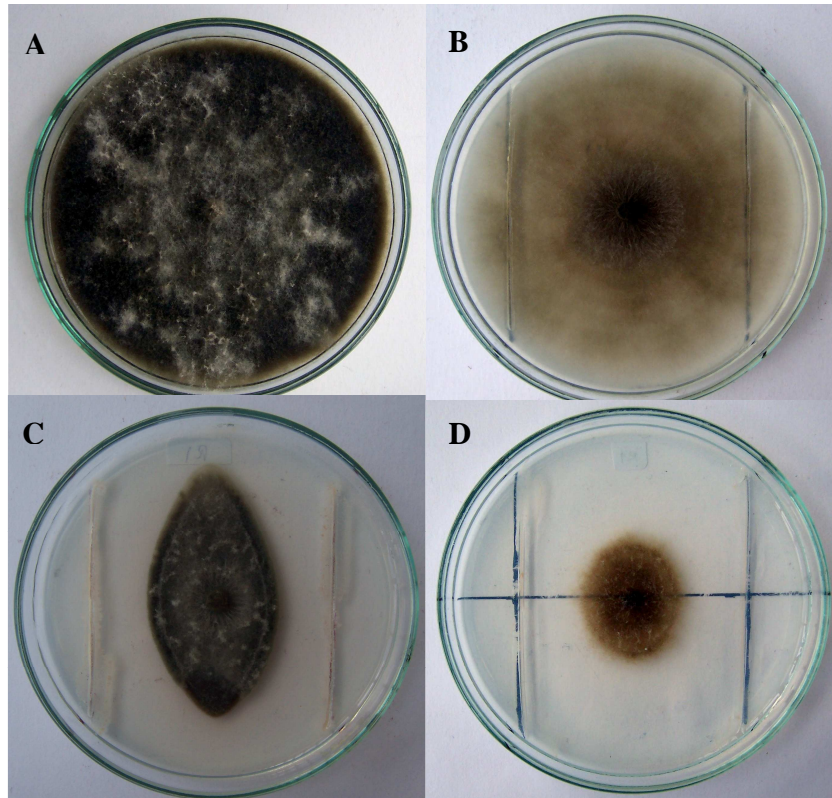


**Figura 22.** Comparación del efecto de distintos tratamientos sobre *Alternaria 1* **A)** Testigo. **B)** Tratamiento con nivel de inhibición muy bajo (Patógeno vs Morfotipo 11) **C)** tratamiento con nivel de inhibición medio (Patógeno vs Morfotipo 6) **D)** tratamiento con nivel de inhibición alto (Patógeno vs Morfotipo 17)

En cuanto a *Alternaria 2*, cuando fue enfrentada al morfotipo 11 (efecto de inhibición muy bajo) la colonia presentó coloración más clara y no hubo abundante producción de micelio aéreo (figura 23B), comparada con el testigo (figura 23A).

En el ensayo *Alternaria 2* vs morfotipo 6 (figura 23C) (efecto de inhibición medio) el crecimiento de la colonia fue restringido hacia los lugares en los que se enfrentaba directamente con el biocontrolador (figura 23C), la coloración de la colonia fué igual a la que se observó en el testigo (figura 23A), en el margen de la colonia se observó una mayor esporulación por lo que se tornó levemente más oscuro que el resto de la colonia. En comparación con la acción del morfotipo 11 (figura 23B) la colonia presentó una alta producción de micelio.

Para el enfrentamiento del patógeno con el morfotipo 18 (figura 23D) la forma de crecimiento y la coloración de la colonia fue diferente que la del testigo (figura 23A), mientras que este último fue muy oscuro y creció de forma circular, en el montaje *Alternaria* vs levadura la colonia creció de manera levemente ovalada y fue marrón.

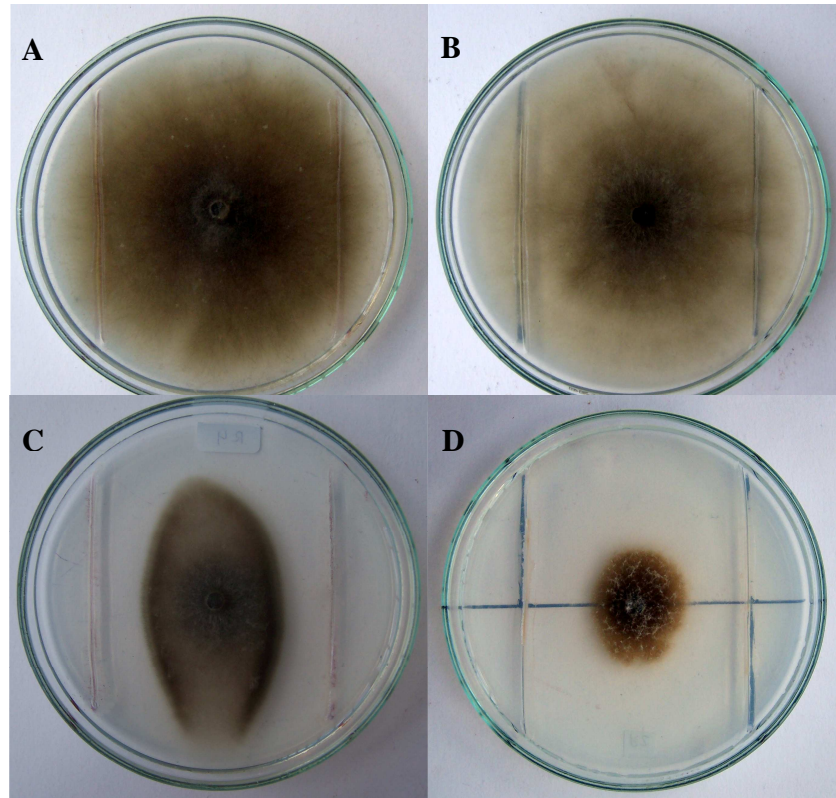


**Figura 23.** Comparación del efecto de distintos tratamientos sobre *Alternaria 2* **A)** Testigo. **B)** Tratamiento con nivel de inhibición muy bajo (Patógeno vs Morfotipo 11) **C)** tratamiento con nivel de inhibición medio (Patógeno vs Morfotipo 6) **D)** tratamiento con nivel de inhibición alto (Patógeno vs Morfotipo 18)

Cuando *Alternaria 3* fue enfrentada al morfotipo 11 (figura 24B) en la medida que la colonia se extendió hacia el borde de la caja de Petri fue tomando una coloración levemente más clara que el testigo (figura 24A). Hacia el centro de la colonia la producción de micelio aéreo fue similar a la colonia testigo.

En la figura 24C se puede observar el mismo patrón de crecimiento exhibido en *Alternaria 1* vs morfotipo 6 (figura 22C) en donde el crecimiento de la colonia fue limitado hacia las estrías con inóculo del biocontrolador (figura 22C), el margen de la colonia fue más oscuro y presentó una mayor producción de conidios,

La figura 24D muestra que cuando el patógeno fue enfrentado al morfotipo 18 además de detener su crecimiento, la colonia tuvo forma levemente ovoide, presentó coloración más oscura que el testigo (figura 24A) y la producción de micelio aéreo fue mayor.



**Figura 24.** Comparación del efecto de distintos tratamientos sobre *Alternaria 3* **A)** Testigo. **B)** Tratamiento con nivel de inhibición muy bajo (Patógeno vs Morfotipo 11) **C)** tratamiento con nivel de inhibición medio (Patógeno vs Morfotipo 6) **D)** tratamiento con nivel de inhibición alto (Patógeno vs Morfotipo 18)

Los resultados anteriormente discutidos permiten plantear la posible acción fungistática de los morfotipos 6, 17 y 18, debido a que se detuvo el crecimiento radial de la colonia pero se observó que continuó la producción de micelio aéreo. También se puede inferir que en los tratamientos en los que se inhibió el crecimiento radial de las colonias se presentó una relación de amensalismo entre morfotipos de levadura y patógenos. Para determinar con precisión el tipo de efecto y modo de acción de las levaduras se requiere de estudios más específicos.

## 6. CONCLUSIONES

- Los datos obtenidos en este trabajo dan una evidencia del potencial inhibitorio, *in vitro*, de los morfotipos de levadura sobre los patógenos aislados.
- Dentro de los aislados evaluados los que mejor efecto inhibitorio presentaron, para los tres aislados de *Alternaria*, están 17 y 18, lo que los hace promisorios para seguir siendo estudiados.
- La producción de difusible por parte de los microorganismos es evidente por la forma que adquieren las colonias al ser confrontadas con el controlador. Sin embargo, investigaciones adicionales son requeridas para poder identificar la naturaleza de estos productos.
- La inhibición del crecimiento micelial ejercida por algunas levaduras evaluadas en este trabajo puede deberse a efectos fungistáticos o fungicidas.
- Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser considerados como la base en la búsqueda de alternativas viables para el manejo y control de la enfermedad producida por *Alternaria* sp. en uchuva (*Physalis peruviana*)

## 7. RECOMENDACIONES

- Es pertinente realizar la identificación de las levaduras promisorias encontradas en este trabajo para posteriores estudios.
- Es preciso realizar estudios *in vivo*, para determinar si los microorganismos que mostraron buenos resultados puedan ser utilizados como agentes biocontroladores en poscosecha.
- Estudiar ,*in vitro* y/o *in vivo*, la efectividad de las levaduras diferentes concentraciones

- Es importante realizar estudios enfocados a determinar cómo las condiciones ambientales afectan el establecimiento y desarrollo de las levaduras que presentaron potencial para ser utilizados como microorganismos biocontroladores.
- Estudiar a fondo los mecanismos empleados por las levaduras que resultaron biocontroladoras exitosas para poder explicar el origen de su actividad controladora.
- Se sugiere explorar los posibles efectos de utilizar las levaduras que mejores resultados mostraron en consorcio, efectos tales como sinergia, aditividad, o antagonismos entre estas levaduras podría abrir las puertas a desarrollo de estrategias de control.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. 2005. Plant pathology. Editorial Academic Press. San Diego. USA.

ANDERSEN, B.; KROGER, E.; ROBERTS, G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A.infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. Mycological Research. 106(2):170-182.

ANGULO R., 2003. Frutales exóticos de clima frío. Bayer CropScience S. A. Bogotá. Colombia.

ANGULO. R; COOMAN, A; NIÑO, N; ESPINOSA, L. 2005. Manejo integrado de enfermedades. p. 31-36. En: Angulo, R. (ed.) Uchuva: El cultivo. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Colciencias, Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales. Bogotá. Colombia. 78p.

ARIZA, R. 2000. Manejo de plagas, p. 67-73. En: Flórez, V; Fisher, G; Sora, A. (eds). Cultivos de uchuva. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva

(*Physalis peruviana L.*). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia. 221p.

BAUTISTA-BAÑOS S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. (México). 8 (1):1-6.

BEATTIE, G.A. 2002. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganism. p. 3-21. en Lindow, S.E.; Hecht-Poinar, E. I.; Elliott, V. J. (eds) 2002. Phyllosphere Microbiology. APS Press. St. Paul, USA 408 p

BENITEZ, M. R.; CARRILLO I. 2004 Levaduras inhibidoras de *Penicillium*. Revista Argentina de Microbiología 36: 182-186

BENÍTEZ S.; BENTLEY J.; BUSTAMANTE P.; SÁNCHEZ L.C.; CORRALES L. 2007. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizósfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas (Colombia). 5 (8): 101-212

BLANCO, J. 2000. Manejo de enfermedades, p. 57-65. En: Flórez, V; Fisher, G; Sora, A. (eds). Cultivos de uchuva. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana L.*). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia. 175p.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. 1996. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS PRESS . St Paul, Minnesota. p. 60

CORPORACIÓN COLOMBIANA INTERNACIONAL. 2001. Perfil producto: Uchuva. En: Sistema de inteligencia de mercados, No 13. Bogotá. p. 1-12

CORPORACIÓN COLOMBIANA INTERNACIONAL 2005. Perfil del Producto: Uchuva. En: Inteligencia de mercados, No 34. Bogotá. p. 1-14

De CAPDEVILLE G.; TEIXEIRA M.; PEREIRA J. R.; MIRANDA S.; RODRIGUES A.; ARARIPE F. 2007. Selection and testing of epiphytic yeasts to control anthracnose in post-harvest of papaya fruit. *Scientia Horticulturae* 111: 179–185

FERNANDEZ, O.; VEGA, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. (62). p. 96 – 100.

FISCHER, G. 2000. Crecimiento y desarrollo. p. 9-26 En: Flórez, V.; Fisher, G.; Sora, A. (eds) *Cultivos de uchuva. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.)*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía 175p.

GREVEESSE, C.; LEPOIVRE, P.; JIJAKLI, M. H. 2003. Characterization of the Exoglucanase-Encoding Gene *PaEXG2* and study of Its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala* strain K. *Biological Control*. 93 (9):1145-1152

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; DINOOR, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*. 91 (7): 621-627

GUETSKY, R.; SHTIENBERG; D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR; A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92 (9): 976- 985

HAWKES J.G. 1991. Centros de diversidad genética vegetal en Latinoamérica. *Diversity*. (Estados Unidos). 7 (1-2): 7-9.

HE, D.; ZHENG, X.; YIN, Y.; SUN, P.; ZHANG, H. 2003. Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44: 211-216

HERRERA, A. 2000. Manejo poscosecha. En: En: Flórez, V; Fisher, G; Sora, A. (eds). *Cultivos de uchuva. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.)*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia. 175p.

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; PENTIMONE, I.; NIGRO F. 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology* 36: 245–252

KARABULUT. O.A; BAYKAL, N. 2003. Biological control of postharvest diseases of peaches and nectarines by yeast. *Journal of Phytopathology* 151: 130–134

LANCHERO O., VELANDIA, G., FISCHER G., VARELA N.C.; GARCIA H. 2007. Comportamiento de la uchuva ( *Physalis peruviana* L.) en poscosecha bajo condiciones de atmósfera modificada activa. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8 (1): 61-68.

LINDOW S. & BRANDLM., 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and environmental microbiology* 69 (4): 1875-1883.

MARIN, A.; MIRANDA, D.; PIEDRAHITA, W. 2005. Buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de uchuva. En: Fischer, G.; Miranda, D.; Piedrahíta, W.; Romero, J. (eds) *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la Uchuva (Physalis peruviana) L. en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia. 221p

MAZORRA, M.F.; QUINTANA A.P.; MIRANDA, D.; FISCHER, G.; CHAPARRO M. 2006. Aspectos anatómicos de la formación y crecimiento del fruto de huchuva *Physalis peruviana (Solanaceae)*. *Acta Biológica Colombiana* 11 (1): 69-81.

MEJIA A., 2005. Exportación de la uchuva a la unión europea y otros países. En: Fischer, G.; Miranda, D.; Piedrahíta, W.; Romero, J. (eds) *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la Uchuva (Physalis peruviana) L. en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia. 221p

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2005. Área, producción y rendimientos-Colombia. Observatorio Agrocadenas Colombia.



MORA, R.; PEÑA, A.; LOPEZ, E.; AYALA, J. J.; PONCE D. 2006. Agrofenología de *Physalis Peruviana* L. en invernadero y fertirriego. Revista Chapingo serie horticultura (Méjico) 12 (1): 57-63.

NOVOA, R. H.; BOJACÁ, M.; GALVIS, J. A.; FISCHER; G. 2006. La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12°C (*Physalis peruviana* L.). Agronomía Colombiana 24(1): 77-86

PAL K.. & McSPADDEN B., 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. Biological Control:1-25.

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. 1995. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored in airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology 61 (3): 1027-1032.

QIN, G.; TIAN, S.; XU, Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. Postharvest Biology and Technology 31: 51-58

QIN, G; SHIPING, T. 2000. Postharvest biological control of rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. Plant Disease 84 (11) : 1212- 1216

RESTREPO. S.; GARCÍA, M.C.; CARDENAS. M.; ROJAS A. 2007 Curso de identificación de Ascomycetes y Deuteromycetes. Laboratorio de micología y fitopatología de la Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

REYES. M.E.; ROHRBACH, K. G.; PAULL, R. 2004. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. Postharvest Biology and Technology 33: 193-203

ROTEM J. 1994 The genus *Alternaria*. Biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press, St. Paul, USA. 326p.

SALIGKARIAS, I.; GRAVANIS, F. & EPTON H., 2002. Biocontrol of *Botrytis cinérea* 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: 143–150

SANABRIA S., 2005. Situación Actual de la uchuva en Colombia. En: Fischer, G.; Miranda, D.; Piedrahíta, W.; Romero, J. (eds.) *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la Uchuva (Physalis peruviana) L. en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia. 221p.

SANTOS. A; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159: 331 – 338.

SIMMONS, E. G. 1993. *Alternaria* themes and variations (63-72). *Micotaxon* 48: 91-107.

VIÑAS I., 2005. Control biológico en la poscosecha de frutas. p 169-182. En: Jacas. J.; Caballero, P.; Avilla, J. (eds.). *El control biológico de plagas y enfermedades: la sostenibilidad de la agricultura mediterránea*. Universitat Jaume I. Castellón de la Plana. España. 222p.

ZAPATA. J.; NAVAS; G.; FRANCO. G. 2008. Capacitación de productores sobre el manejo sostenible del cultivo de la uchuva (*Physalis Peruviana* L.) en el municipio de Apía, Risaralda. *Artículos científicos CORPOICA*: 1-6

ZAPATA, J. L.; SALDARRIAGA, A.; LONDOÑO, M.; DÍAZ, C. 2005. Las enfermedades limitantes en cultivo y poscosecha de la uchuva y su control. En: Fischer, G.; Miranda, D.; Piedrahíta, W.; Romero, J. (eds) *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la Uchuva (Physalis peruviana) L. en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá. Colombia. 221p

ZAPATA, J. L.; SALDARRIAGA, A.; LONDOÑO, M.; DÍAZ, C. 2002. Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia. *CORPOICA*. Rionegro. Colombia. 41p.

## REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ (CENICAFE). 2006. Caracterización de frutas y hortalizas y normas técnicas. Disponible en: [http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Frutas\\_Hortalizas&file=viewstd&op=2&idstd=NTC-4580](http://www.cenicafe.org/modules.php?name=Frutas_Hortalizas&file=viewstd&op=2&idstd=NTC-4580) [Fecha revisión: 15 diciembre 2008]

DONIS-KELLER LAB. 1990. Method: Long Term Storage of Yeast Stocks. Disponible en: [http://humgen.wustl.edu/hdk\\_lab\\_manual/yeast/yeast2.html](http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/yeast/yeast2.html) [Fecha revisión: 11 Enero 2008]

FAO ; OMS. 2009 Normas alimentarias FAO/OMS, codex alimentarius. Disponible en: [http://ftp.fao.org/codex/Publications/understanding/Understanding\\_ES.pdf](http://ftp.fao.org/codex/Publications/understanding/Understanding_ES.pdf) [Fecha revisión: 8 enero 2009]

LEGISCOMEX.COM. 2008. Frutas exóticas en Colombia /Inteligencia de mercados. Disponible en: [http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est\\_col\\_frutas\\_exot\\_6.pdf](http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est_col_frutas_exot_6.pdf) [Fecha revisión: 25 febrero 2009]

UNIVERSITY OF ARIZONA. 2003. *Alternaria alternata*. Disponible en: [http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria\\_species/pages/Alternaria\\_Alternata.htm](http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria_species/pages/Alternaria_Alternata.htm) [Fecha revisión: 23 noviembre 2008]

UNIVERSITY OF ARIZONA. 2003. *Alternaria arborescens*. Disponible en : [http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria\\_species/pages/alternaria\\_arborescens.htm](http://ag.arizona.edu/plp/alternaria/online/alternaria_species/pages/alternaria_arborescens.htm) [Fecha revisión: 23 noviembre 2008]

MINISTERIO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO. 2008. Direccion de regulación codex alimentarius. Disponible en: <http://www.mincomercio.gov.co/econtent/newsdetail.asp?id=2691&idcompany=1>. [Fecha revisión: 2 septiembre 2008]

TREE OF LIFE WEB PROJECT. 2007. Explore the Tree of life. Disponible en:  
<http://tolweb.org/onlinecontributors/app?service=external/ViewImageData&sp=13913>  
[Fecha revisión: 22 Enero 2008]

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resultados ANOVA (0.05) para crecimiento micelial de los tres patógenos bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

		df	F	Sig.
Alternaria 1	Dentro del grupo	23	70,553	,000
	Entre Grupos	120		
	Total	143		
Alternaria 2	Dentro del grupo	23	172,597	,000
	Entre Grupos	120		
	Total	143		
Alternaria 3	Dentro del grupo	23	106,984	,000
	Entre Grupos	120		
	Total	143		

**Anexo 2.** Resultados comparación de rangos múltiples (prueba de Tukey) para crecimiento micelial de *Alternaria 1* bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

Trat.	N	$\alpha=0.05$							
		1	2	3	4	5	6	7	8
17	6	1,15							
18	6	1,23	1,23						
5	6	1,43	1,43	1,43					
6	6	1,59	1,59	1,59					
21	6	1,65	1,65	1,65					
24	6	1,69	1,69	1,697	1,69				
16	6	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85			
23	6		1,88	1,88	1,88	1,88			
2	6			1,96	1,96	1,96	1,96		
20	6			2,00	2,00	2,00	2,00		
10	6				2,39	2,39	2,39	2,39	
9	6					2,40	2,40	2,40	
4	6						2,60	2,60	
7	6						2,60	2,60	
3	6							2,80	
8	6							2,84	
1	6							3,05	
15	6								4,12
19	6								4,25
13	6								4,28
14	6								4,33
11	6								4,35
12	6								4,35
22	6								4,35
Sig.		,07	,13	,31	,06	,37	,16	,11	1,00

**Anexo 3.** Resultados comparación de Rangos múltiples (prueba de Tukey) para crecimiento micelial de *Alternaria 2* bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

Trat.	N	$\alpha= 0.05$					
		1	2	3	4	5	6
18	6	1,29					
17	6	1,47					
6	6	1,48					
21	6	1,52					
5	6	1,55					
16	6	1,71	1,71				
24	6	1,72	1,72				
2	6		2,03				
20	6		2,07				
4	6			2,59			
3	6			2,78	2,78		
8	6			2,79	2,79		
7	6			2,82	2,82		
9	6			3,04	3,04		
10	6				3,19		
23	6					3,74	
1	6					4,01	4,01
13	6						4,30
15	6						4,33
22	6						4,34
11	6						4,35
12	6						4,35
14	6						4,35
19	6						4,35
Sig.		,10	,40	,07	,17	,86	,55

**Anexo 4.** Resultados comparación de Rangos múltiples (prueba de Tukey) para crecimiento micelial de *Alternaria 3* bajo los diferentes tratamientos evaluados *in vitro*.

		$\alpha = 0.05$																	
Trat.	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11							
18	6	1,22																	
17	6	1,26	1,26																
24	6	1,33	1,33	1,33															
5	6	1,59	1,59	1,59	1,59														
21	6	1,60	1,60	1,60	1,60														
6	6	1,70	1,70	1,70	1,70														
16	6		1,84	1,84	1,84														
2	6			1,88	1,88	1,88													
20	6				2,07	2,07	2,07												
10	6				2,10	2,10	2,10	2,10											
7	6					2,44	2,44	2,44	2,44										
8	6						2,52	2,52	2,52										
9	6							2,53	2,53	2,53									
4	6								2,65	2,65									
3	6									2,71									
23	6										3,32								
1	6											3,64							
13	6												4,00						
15	6													4,08					
19	6														4,18				
14	6															4,30			
11	6																4,35		
12	6																	4,35	
22	6																		4,35
Sig.		,24	,05	,08	,16	,07	,339	,07	,98	,927	,09	,860							