



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Agronomía -Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

**Levaduras nativas para el biocontrol de *Botrytis cinerea*  
Pers. en uva de mesa y determinación de sus mecanismos  
de acción**

XIMENA PATRICIA SEPÚLVEDA BRITO  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2012

Profesor Guía: Marisol Vargas Concha  
Dpto. de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía  
Universidad de Concepción

## LEVADURAS NATIVAS PARA EL BIOCONTROL DE *BOTRYTIS CINEREA* PERS. EN UVA DE MESA Y DETERMINACIÓN DE SUS MECANISMOS DE ACCIÓN

INDIGENOUS YEASTS FOR THE BIOCONTROL OF *BOTRYTIS CINEREA* PERS. ON TABLE GRAPES AND ITS DETERMINATION OF MODES OF ACTION

**Palabras índice adicionales:** antagonistas, pudrición gris, control biológico.

### RESUMEN

*Botrytis cinerea* Pers., agente causal de la pudrición gris es el principal problema fitosanitario en uva de mesa en Chile, se ha controlado tradicionalmente con fungicidas. Sin embargo, la creciente demanda de alimentos libres de pesticidas, hace necesario reducir el uso de fungicidas, siendo el control biológico con levaduras una alternativa promisorio. En este estudio 125 levaduras aisladas desde la superficie de uva de mesa y manzana fueron evaluadas para el control de *B. cinerea* *in vitro* e *in vivo*. Diez aislados fueron seleccionados por su capacidad de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* *in vitro*. En los ensayos *in vivo* estas levaduras fueron evaluadas a 20 °C en bayas 'Thompson Seedless' por 7 días, seleccionando tres aislados (m11, me99 y ca80), los cuales redujeron significativamente la incidencia de la pudrición gris. Estos tres aislados de levadura fueron posteriormente evaluados a dos tiempos de colonización en la fruta (2 y 24 h), a diferentes concentraciones ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>) y temperaturas (0 y 20 °C) en bayas de uva 'Thompson seedless'. Los aislados m11, me99 y ca80 redujeron la incidencia de *B. cinerea* entre un 11,9 y 32,1 %, cuando las bayas fueron sumergidas en una suspensión de levaduras a una concentración de  $1 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>, 24 h antes de la aplicación de conidias de *B. cinerea* e incubadas a 20 °C por 7 días. Los mecanismos de acción evaluados en los aislados de levadura fueron la producción de enzimas hidrolíticas, la formación de biopelículas, la resistencia a estrés oxidativo, la actividad antifúngica a distintos pH (4,2, 4,6, 5,0 y 5,4) y la producción de sideróforos. Los tres aislados de

levadura produjeron enzimas hidrolíticas quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa y una baja resistencia al estrés oxidativo. El pH 4,6 fue el más favorable para la actividad antifúngica en los tres aislados y dos de ellos (me99 y ca80) presentaron la capacidad de producir sideróforos y sólo uno (m11) presentó la capacidad de formar biopelículas. Los aislados fueron identificados mediante análisis PCR-RFLP de la región ITS del ADN ribosómico, correspondiendo a las especies *Pichia guilliermondii* Wick. (m11) y *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (me99 y ca80). Estos resultados sugieren que los aislados evaluados (m11, me99 y ca80) poseen más de un mecanismo de acción, los cuales contribuyen en el biocontrol de *B. cinerea* en uva de mesa.

## SUMMARY

*Botrytis cinerea* Pers., the causal agent of gray mold, is the main phytosanitary problem for table grapes in Chile, has traditionally controlled by applying fungicides. However, the growing consumer demand for pesticide-free food, necessary to reduce the use of fungicides, being the biological control with yeast a promising alternative. In this study, 125 yeasts isolated from table grapes and apples were evaluated to control *B. cinerea* *in vitro* and *in vivo*. Ten strains were selected for their ability to inhibit mycelial growth of *B. cinerea* *in vitro*. In the *in vivo* assays, these yeasts were tested at 20 °C on 'Thompson Seedless' berries for 7 days; selecting three strains (m11, me99, and ca80) because they significantly reduced the incidence of gray mold. These three yeast strains were then evaluated at two colonization times on the fruit (2 and 24 h), at different concentrations ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ , and  $1 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup>) and temperatures (0 and 20 °C) on grape berries 'Thompson Seedless'. The strains m11, me99, and ca80 reduced the incidence of *B. cinerea* between 11.9 and 32.1%, when the berries were submerged in a yeast suspension at a concentration of  $1 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> 24 h before applying suspensions of *B. cinerea* and stored at 20 °C for 7 days. The evaluated modes of action in the yeast strains were hydrolytic enzyme production, ability to produce biofilm, oxidative stress tolerance, antifungal activity at different pH (4.2, 4.6, 5.0, and 5.4), and siderophore production. The three yeast strains