



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

Impacte ecològic i efectivitat de l'aplicació de l'antagonista *Candida sake* CPA-1 al camp per al control biològic de la podridura blava en postcollita de mançanes "Golden Delicious"

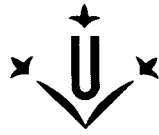


Neus Teixidó i Espasa
TESI DOCTORAL

Desembre 1997

(043) '1997' Tei

1600136032 -



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària



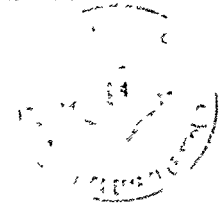
Universitat de Lleida
Registre General

10 NOV. 1997

E: 6792

S:

**IMPACTE ECOLÒGIC I EFECTIVITAT DE
L'APLICACIÓ DE L'ANTAGONISTA
Candida sake CPA-1 AL CAMP, PER AL CONTROL
BIOLÒGIC DE LA PODRIDURA BLAVA EN
POSTCOLLITA DE MANÇANES
"GOLDEN DELICIOUS"**



Memòria presentada per:
Maria Neus Teixidó i Espasa
per optar al grau de Doctora

Directora: Dra. Inmaculada Viñas Almenar

Desembre de 1997

0118-2051

*Al Sisco,
als meus pares,
a l'Anna, la Neus, l'Adrià
i a l'Imma*

CADA DIA

*No conquerim cap mot debades,
Tot,
s'inscriu en l'ordre clar d'aquell projecte
que va creixent poc a poc dins nostre
si sabem tenaçment per fer-lo sempre.*

*Així, el gran risc de viure se'ns proposa
com un repte constant, com una fita
que allunyem amb el gest i la mirada
tan bon punt l'assolim, no per refús
del que hem aconseguit, sinó pel goig
de posar-nos a prova cada dia.*

Miquel Martí i Pol

AGRAÏMENTS

Aquest treball no hagués estat possible sense l'ajut, dedicació i encoratjament ofert per moltes persones i institucions. Tot i que la llista és llarga no voldria perdre l'oportunitat de manifestar-los a tots el meu més sincer agraïment:

En primer lloc a la Immaculada Viñas, que m'ha introduït en aquest món fascinant de la recerca i el control biològic, pel seu recolzament, optimisme i la seva ajuda. I per què ha estat en tot moment més que una bona amiga. Mai no li ho podré agrair prou.

Al Naresh Magan, pel seu acolliment durant la meva estada a Anglaterra, pel seu incalculable ajut en la redacció dels articles i per ensenyar-me tantíssimes coses de la vida en general: "Thank you Naresh, I will never have enough words to thank your help".

Al Josep Usall, company de fatigues i amic, per la seva inestimable ajuda i pels seus consells.

Al Vicent Sanchis, pels seus comentaris i les seves crítiques constructives, i per tenir sempre una paraula d'encoratjament en les hores baixes.

A l'Estanislau Fons que ha fet possible la portada d'aquesta tesi amb paciència i il·lusió inacabables.

A la Laura Castellnou, pel seu assessorament en els sempre sorprenents temes informàtics.

Al Xavier Goñi, per haver posat tant d'interès en què les fotografies d'aquest treball sortíssin bé.

Al Pere Calzada, que m'ha ofert desinteressadament els seus camps i la seva experiència en la pagesia, necessaris per dur a terme aquest treball.

A l'Anna Tarradelles que m'ha demostrat un cop més la seva amistat amb ajuda i recolzament en tot moment.

Al Xavier, per la seva ajuda tècnica i el seu bon humor. A l'Àngels, per tenir sempre les paraules adequades per aixecar-me l'ànim. A la Maribel, la Carla i la Charo que han sabut estar al meu costat i ajudar-me quan més ho necessitava. Al Lluís, l'Elena, la Sònia, la Silvia i tants altres amb qui hem compartit tantes experiències al laboratori. Tots ells són com la meva segona família.

A l'Olga, la Montse i el Joan Antoni, per tantes bones estones viscudes a l'empar d'una cabina de fluxe laminar.

Al centre UdL-IRTA pel seu suport en la realització d'aquesta tesi.

A la CICYT i La Paeria pels seus ajuts econòmics.

A la CIRIT que ha confiat en mi durant aquests quatre anys de tesi permetent la seva realització.

A l'empresa SIPCAM-INAGRA SA que han confiat en nosaltres i han permès posar a la pràctica les nostres recerques.

I finalment al Sisco, els meus pares, la meva germana Anna i la resta de la meva família, els quals han suportat amb paciència i comprensió els meus neguits i cabòries durant la realització d'aquesta tesi, i han fet pinya sempre al meu costat. Ells fan que tot l'esforç del món valgui la pena.

Aquest treball ha estat realitzat al laboratori de Patologia de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA, i ha rebut suport econòmic de la CIRIT, CICYT i La Paeria.

ABREVIATURES

a_w	Activitat d'aigua
CECT	“Colección Española de Cultivos Tipo”
CEE	Comunitat Econòmica Europea
cfu	Unitats formadores de colònies (en anglès)
CICYT	“Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología”
CIRIT	Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia
CPA	Col·lecció d'antagonistes de la Unitat de Patologia
DL ₅₀	Dosi Letal 50
EAP	Agència de protecció mediambiental dels EUA
EUA	Estats Units d'Amèrica
IOBC	Organització Internacional per a la Lluita Biològica i Integrada contra els animals i plantes nocius (en francès)
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
HR	Humitat relativa
LRM	Límit màxim de residus
OD	Densitat òptica
OILB	Organització Internacional per a la Lluita Biològica i Integrada contra els animals i plantes nocius (en francès)
PEG	Polietilenglicol
SICH	Societat Internacional de Ciències Hortofructícoles
UE	Unió Europea
ufc	Unitats formadores de colònies (en català)

ÍNDIX

CAPÍTOL 1

Introducció general	1
1. Trets bàsics de la postcollita de mançana	2
1.1. Principals malalties en postcollita de mançanes	2
1.1.1. Descripció de les principals malalties.....	2
1.1.2. <i>Penicillium expansum</i> . La “Podridura blava”	4
1.2. Control de les malalties en postcollita	6
1.2.1. Aparició de soques resistents als fungicides	6
1.2.2. Desenvolupament de malalties iatrogèniques	7
1.2.3. Problemàtica dels residus en la fruita	8
2. El control biològic	9
2.1. Definició i antecedents.....	9
2.2. Avantatges del control biològic.....	11
2.3. Característiques desitjables d'un agent de biocontrol.	12
2.4. Situació actual.....	13
2.4.1. <i>Candida sake</i> CPA-1.....	15
3. La microflora de la fruita	17
3.1. Factors que influeixen a la microflora de la fruita.....	18
3.1.1. Vectors de contaminació	19
3.1.2. Propietats intrínseques de la fruita.....	19
3.1.2.1. L'activitat d'aigua	19
3.1.2.2. Disponibilitat de nutrients.....	19
3.1.2.3. L'acidesa.....	20
3.1.3. Factors extrínsecs.....	20
3.1.3.1. Variació estacional	20

3.1.3.2. Variació geogràfica.....	21
3.1.3.3. Posició del fruit dins l'arbre.....	22
3.1.3.4. Acció de l'home.....	22
3.1.4. Propietats implícites dels microorganismes.....	22
3.1.4.1. Característiques fisiològiques.....	22
3.1.4.2. Interacció entre poblacions.....	23
3.2. La microflora de la mançana.....	23
4. Tractaments en precollita per combatre malalties de postcollita...	24
4.1. Avantatges de l'enfoc.....	24
4.2. Limitacions dels agents de biocontrol a camp.....	27
4.2.1. Activitat d'aigua.....	28
4.2.2. Adaptació dels microorganismes per créixer a baixa a_w	29
4.2.2.1. Els polihidroxialcohols.....	29
4.2.2.2. La trealosa.....	30
4.2.3. Millora d'antagonistes enfront l'estrès.....	31
Objectius.....	32
Referències.....	33
CAPÍTOL 2	
Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications.....	47
CAPÍTOL 3	
Impact of the antagonist <i>Candida sake</i> on apple surface microflora during cold and ambient (shelf life) storage.....	69
CAPÍTOL 4	
Efficacy of pre and postharvest <i>Candida sake</i> biocontrol treatments to prevent blue mold on apples during cold storage.....	89

CAPÍTOL 5

Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress 103

CAPÍTOL 6

Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* (strain CPA-1) by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content 123

CAPÍTOL 7

Preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity for control of blue mold of apples in storage 141

CAPÍTOL 8

- Discussió general 159**
1. Microflora pròpia de la mançana “Golden Delicious” tant a camp com a cambra 160
 2. Efecte de l’antagonista *C. sake* CPA-1 sobre la microflora pròpia de la mançana 162
 3. Evolució de *C. sake* CPA-1 sobre mançanes “Golden Delicious” 163
 4. Eficàcia de l’aplicació de *C. sake* CPA-1 en precollita sobre el control en postcollita de *P. expansum* inoculat artificialment 164
 5. Caracterització de l’agent de biocontrol *C. sake* CPA-1 enfront a condicions d’estrès hídric, temperatura i pH..... 165
 6. Caracterització de les reserves endògenes (sucres i polihidroxiàlcools) acumulades pel llevat *C. sake* i efecte de la temperatura i l’ a_w sobre aquestes 166
 7. Millora del microorganisme *C. sake* CPA-1 enfront a condicions d’estrès hídric..... 167
 8. Comprovació del manteniment de l’activitat antagònica de *C. sake* per a controlar la podridura blava en mançanes 169

9. Estudi de l'eficàcia de l'aplicació en precollita de les soques adaptades a l'estrès en el control de <i>P. expansum</i> en postcollita.....	169
Conclusions	173
Perspectives de futur	177
Referències	178
Annex fotogràfic	183
Resum	189
Resumen	192
Summary	195

Capítol 1

Introducció General

INTRODUCCIÓ GENERAL

1. TRETS BÀSICS DE LA POSTCOLLITA DE MANÇANA

Les comarques de Lleida són conegudes arreu per la seva importància dins el sector fructícola, essent la mançana la principal fruita cultivada en aquestes terres. Així cal esmentar que el 44% de la producció de mançanes de tot l'Estat espanyol es concentra en les anomenades Terres de Ponent (García de Otazo, 1996), essent la varietat "Golden Delicious" la més cultivada. Gran part però d'aquesta producció no és consumida en fresc, sinó que s'emmagatzema en cambra frigorífica permetent la conservació d'aquesta fruita i la seva comercialització escalonada al llarg de l'any. Actualment, la capacitat frigorífica total a Lleida es xifra en 2.400.000 m³ (García de Otazo, 1996).

Malauradament, durant el procés de frigoconservació es produeixen una sèrie de pèrdues de l'ordre del 8-12 % anual de la fruita dolça (Palazón *et al.*, 1984), i poden ésser atribuïbles a diverses causes agrupades en tres apartats:

1. Pèrdues per deshidratació 3-7%
2. Pèrdues per fisiopaties 2-3%
3. Pèrdues per malalties 2-3%

Per tot això, es pot considerar que en finalitzar el procés de frigoconservació s'ha perdut aproximadament el 10% del total de la fruita emmagatzemada. Considerant els preus vigents fan estimar unes pèrdues de fruita a nivell estatal que poden oscil·lar entre els 3.000 i 3.500 milions de pessetes, dels quals prop de 1.000 milions corresponen a les podridures o malalties de postcollita.

1.1. Principals malalties en postcollita de mançanes

1.1.1. Descripció de les principals malalties

Degut al baix nivell de pH del teixit de la majoria dels fruits, les formes microbiològiques predominants que poden causar malalties són fúngiques, principalment floridures (Viñas, 1990).

El moment d'infecció de la fruita és molt variable, hi ha patògens que infecten la fruita quan encara està a l'arbre, mentre que altres necessiten ferides per penetrar-hi (Cook i Baker, 1983).

Les ferides mecàniques són les principals vies de penetració dels fongs causants de podridura en postcollita, ja que els teixits frescos queden totalment desprotegits, facilitant la invasió de les espores que es troben a l'atmosfera de les cambres i en les solucions aquoses que s'utilitzen per a banyar la fruita abans d'emmagatzemar-la (Spotts i Cervantes, 1986). Les colònies fúngiques desenvolupades en les caixes o paloxs on es recol·lecta la fruita, són una altra font d'inòcul que afectarà posteriorment el fruit a causa del contacte que es pot donar entre la caixa i el fruit o entre el fruit sa i el fruit infectat.

Segons estudis realitzats per Palazón *et al.* (1984), a les cambres frigorífiques de fruita de llavor de la Vall de l'Ebre, 14 espècies són les responsables del 99% de les pèrdues en fruita de llavor. D'aquestes l'espècie *Penicillium expansum* és l'única generalitzada i constant en el temps, i que arriba a ésser la responsable del 70-80% de les pèrdues degudes a malalties.

Existeix un segon grup constituït per patògens generalitzats però d'aparició irregular com ara *Rhizopus nigricans*, *Gloeosporium album*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp. etc, que són responsables del 10-15% de les pèrdues i poden tenir ocasionalment més importància que el mateix *Penicillium expansum*. També s'aprecien problemes d'*Alternaria tenuis*, principal gènere contaminant de la superfície de les mançanes abans de la seva recol·lecció (Usall i Viñas, 1989).

Finalment cal anomenar un tercer grup de patògens d'aparició esporàdica com ara són *Phytophthora* spp., *Stemphylium* spp., *Trichothecium* spp. etc. que en determinades circumstàncies poden produir danys greus, essent els responsables del 3-5% de les pèrdues.

En estudis duts a terme en un conjunt de centrals frigorífiques de Lleida durant les campanyes 1985-86 i 1986-87 es va determinar la contaminació fúngica ambiental i es va observar que del total de soques fúngiques aïllades, el 95.9% pertanyien al gènere *Penicillium*, localitzant-se majoritàriament aquest a l'interior de les cambres (Vallverdú, 1988; Vendrell, 1988).

La contaminació ambiental, de la superfície dels embalatges i de les cambres, va ésser estudiada per Sus i Viñas (1990). D'un total de 20 cambres frigorífiques examinades al final de la campanya, s'aïllaren 13397 unitats formadores de colònies fúngiques, de les quals el 63.7% pertanyien al gènere *Penicillium*. Els gèneres *Alternaria* i *Rhizopus* es van presentar en menor percentatge (10.8% i 1.7% respectivament).

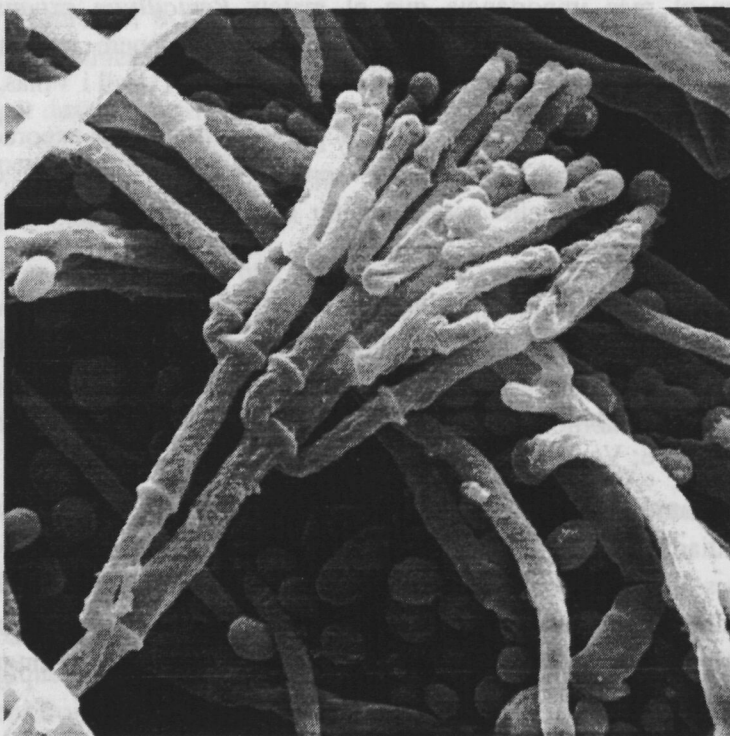
1.1.2. *Penicillium expansum*. La "Podridura blava"

Actualment, a les nostres contrades, el *Penicillium expansum* és el principal agent causant de podridures en fruita de llavor conservada en cambra frigorífica.

TAXONOMIA

Espècie que pertany a la família Moniliaceae.

En general, les colònies d'aquest fong gaudeixen d'una gran extensió, variant en profunditat segons la soca i el substrat (Raper i Thom, 1949). Així, si el medi de creixement és patata dextrosa agar (PDA), la colònia presenta tons groc-verdosos, gris-verdosos o gris fosc, amb abundant producció de conidis el·líptics, de parets llises i formant cadenes molt llargues, de vegades també en forma de crosta. Els conidiòfors es desenvolupen directament sobre el substrat i són variables en longitud d'unes 750 micres o més. El conidiòfor és l'estructura en la qual es produeixen les espores asexuals o conidis, que es generen per escissió. La dimensió dels conidis és molt petita, variant entre 3 i 6 micres (Fotografia 1).



Fotografia 1. Conidiòfor de *P. expansum* després de 72 hores d'incubació sobre mançana "Golden Delicious" (x 2640).

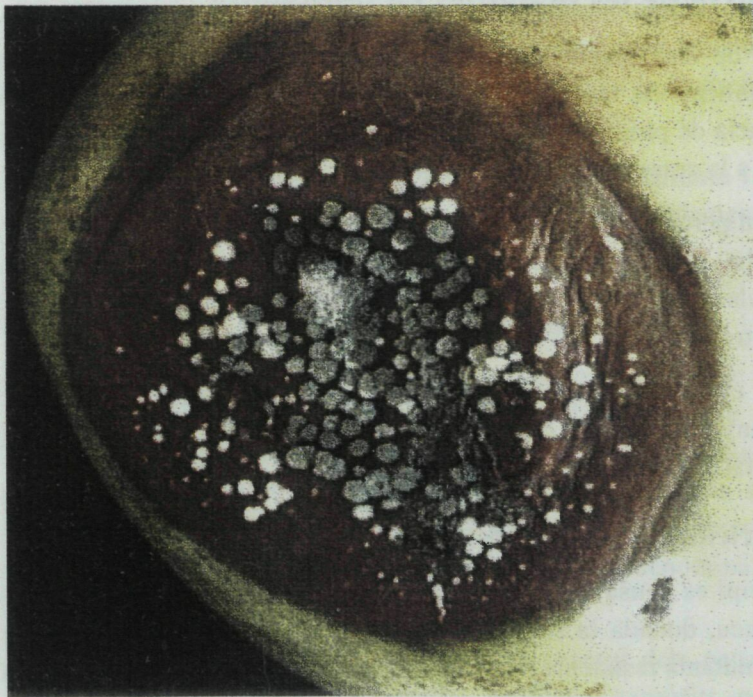
BIOLOGIA

Fong sapròfit, capaç d'introduir-se en els teixits vegetals a través de ferides i lesions, es desenvolupa mitjançant una hidròlisi pectinolítica generada pel propi fong. També pot infestar les lenticel·les de les mançanes i un simple cop pot ésser suficient per facilitar l'inici del desenvolupament de la malaltia (Eckert, 1978).

La temperatura òptima per al seu creixement gira a l'entorn dels 20 °C, encara que té un interval de creixement ampli que arriba fins i tot per sota dels 0 °C (Raper i Thom, 1949).

SIMPTOMATOLOGIA

El desenvolupament de *Penicillium expansum* provoca la podridura coneguda com a "Podridura blava", causa principal de les elevades pèrdues estimades durant la frigoconservació i distribució de la fruita de llavor (Anderson 1956). (Fotografia 2).



Fotografia 2. Podridura blava causada per *Penicillium expansum* en mançanes "Golden Delicious".

La podridura blava es presenta en forma de taques difuminades de color marró clar, de ràpid desenvolupament i que origina una podridura tova en el fruit. En la part superficial de la zona afectada apareixen unes masses denses aïllades, al principi creix un miceli blanquinós que va prenent progressivament una coloració verd-blavosa i que en els estats finals cobreix totalment la part afectada. Si el patogen penetra per la cavitat ocular pot generar una podridura interna, que al principi no es detecta exteriorment, però en partir el fruit apareix una podridura tova, de color marró clar amb cavernes recobertes per un polset verdós (Murga i Palazón, 1984). Cal també destacar la podridura peduncular que s'origina en "Blanquilla", varietat de pera més sensible, que s'inicia amb l'ennegriment del peduncle i que avança cap al fruit amb la formació d'un miceli blanquinós que va prenent progressivament una coloració verd-blavosa.

1.2. Control de les malalties en postcollita

En l'intent de controlar les malalties de la fruita destinada a frigoconservació, s'han generalitzat els tractaments antifúngics en postcollita, especialment a causa de l'existència de productes químics amb un alt nivell d'eficàcia, a la seva relativa economia i a la comoditat en la seva aplicació (Eckert i Ogawa, 1985).

Darrerament però, la utilització massiva, i en alguns cops poc controlada, d'aquests pesticides ha generat un seguit de problemes, com ara l'aparició de soques resistents als fungicides, l'increment de residus en els fruits i l'aparició de malalties iatrogèniques.

Tanmateix, en el cas concret de les malalties de postcollita de fruita de llavor a l'Estat espanyol hi ha pocs fungicides autoritzats i cap d'ells ha resolt el problema de forma total i duradora.

1.2.1. Aparició de soques resistents als fungicides

En un principi es pensava que l'aparició de resistències als fungicides no seria un problema greu, donada la seva naturalesa no específica i la baixa probabilitat de produir-se mutants resistents (Georgopoulos, 1969). Però en els anys següents van començar a presentar-se nombrosos casos de resistències arreu del món. Existeix bibliografia abundant en aquests temes (Hardin, 1972; Gutter, 1973; Muirhead, 1974; Kuramoto, 1976).

En cítrics la utilització continuada als EUA de bifenil, sodi o-fenilfenat, tiabendazol, benomilo i sec-butilamina ha generat un seriós problema d'aparició de soques resistents de *P. italicum* i *P. digitatum*. Així mateix, les soques que

presenten resistència a un fungicida, generalment tenen resistència creuada amb els altres compostos químics d'estructura semblant (Eckert, 1982; Eckert i Wild, 1983). Aquest mateix fet també ha causat greus problemes en la fruita de llavor, amb l'aparició de moltes soques resistents al tiabendazol, fungicida que s'havia emprat de forma generalitzada (Prusky i Ben-Aire, 1983; Viñas *et al.*, 1991). Aquests fets han provocat la substitució, principalment dels benzimidazols, per l'imazalil, fungicida molt més específic i amb un altre mecanisme d'acció (actua inhibint la síntesi de l'ergosterol).

Malgrat tot, darrerament s'ha observat l'existència de soques de *Penicillium* spp. resistents a l'imazalil en fruita de llavor (Prusky i Ben-Aire, 1985; Viñas *et al.*, 1991, 1993), i en cítrics (De Waard *et al.*, 1982). Algunes d'aquestes soques presenten capacitat de produir podridures en mançanes (Monllao, 1990) i en cítrics (Díaz i Vila, 1987). Eckert (1990) indicava que en 19 centrals hortofructícoles de Califòrnia s'havien aïllat soques de *P. digitatum* resistents a l'imazalil. A més a més, algunes d'aquestes soques eren simultàniament resistents al tiabendazol. Estudis posteriors demostren que les dosis màximes permeses d'imazalil en cítrics redueixen molt poc la infecció de les soques de *P. digitatum* resistents a aquest fungicida i no tenen cap efecte sobre la seva esporulació en la fruita (Eckert *et al.*, 1994).

Aquests fets han generat un increment en les pèrdues per podridura i la necessitat d'emprar dosis més altes dels fungicides, amb els problemes econòmics, ambientals i de salut humana que comporten.

1.2.2. Desenvolupament de malalties iatrogèniques

Les malalties iatrogèniques (Griffiths, 1981), són malalties que apareixen o incrementen la seva severitat degut a la utilització d'un producte químic en la protecció d'un conreu. El terme "iatrogènic", prèviament s'utilitzava en medicina humana, però Horsfall (1979) va indicar que es podia emprar igualment en patologia de plantes. Un dels exemples clàssics d'aquest fenomen és el de la cendrosa als EUA (Yarwood, 1970), al que aquest autor denominava "malalties fetes per l'home".

Els fungicides sistèmics, tenen especificitat en el control dels patògens, però al mateix temps eliminen una àmplia varietat de fongs sapròfits no patogènics, afavorint l'aparició de malalties iatrogèniques (Vyas, 1988). Els benzimidazols són un cas clar de fungicides que han afavorit l'aparició de noves malalties amb importància econòmica. Un exemple és l'aplicació de benzimidazols en el control del *Penicillium expansum* en peres conservades en condicions de fred, que ha produït l'increment de pèrdues per *Alternaria* spp. (Spalding, 1970). L'aplicació de

benzimidazols en el control de *Gloeosporium album* en mançanes i de *Botrytis cinerea* en maduixes, ve seguida per l'increment en el mercat de la incidència de podridures causades per *Phytophthora syringae* en mançanes (Upstone, 1977) i de *Mucor* i *Rhizopus* spp. en maduixes (Dennis i Davis, 1977), degut a què aquests fongs són resistents als benzimidazols i probablement es beneficien de la reducció dels competidors sensibles a aquests fungicides.

1.2.3. Problemàtica dels residus en la fruita

Segons les directrius de la UE, s'entén com a residus d'un plaguicida les principals restes del plaguicida, així com els seus metabòlits i productes de degradació o de reacció, presents en el vegetal. Cal esmentar que en cap legislació, en definir residus, es fa referència al seu origen potencial, ja que analíticament aquest no pot determinar-se. El que importa quan es parla de residus és la seva existència, i si es supera el límit màxim de residus establert (LMR).

El fet de què la majoria dels fungicides s'apliquin sobre fruits i vegetals que l'home consumeix en fresc fa que aquest estigui directament exposat a la seva acció, a diferència d'altres pesticides emprats en la protecció del fullam (Wilson *et al.*, 1991).

Un estudi de la National Academy of Sciences (NAS) al 1987 va provocar una particular inquietud sobre els riscos per a la salut humana associats a l'ús de fungicides, ja que es va veure que el 90% dels fungicides comercialitzats presentaven components cancerígens (Wisniewski i Wilson, 1992).

Degut al problema que representen els residus per a la salut humana, els diferents estats, i en especial els més desenvolupats, han establert un seguit de LMRs bastant restrictius (Taula 1), en molts casos per sota dels aconsellats pel Codex Alimentarius (FAO/OMS).

L'existència de diferències entre els estats membres de la UE, pel que respecta als continguts màxims permesos per aquests residus de plaguicides, representa en alguns casos una barrera per al comerç, i en especial per a les nostres exportacions de fruita a la resta de països de la UE. Per eliminar aquests obstacles i afavorir la lliure circulació de mercaderies, el Consell de la UE, en la directriu 76/895/CEE, modificada en la 89/186/CEE, va intentar homogenitzar les legislacions dels diferents estats, objectiu no assolit encara, ja que queda per regular la majoria dels plaguicides.

Taula 1. Residus en mançanes LMR màxims admesos (Reial Decret 280/1994, BOE 8 febrer).

MATÈRIA ACTIVA	ESPANYA	UNIÓ EUROPEA	CODEX ALIMENTARIUS
imazalil	5	5	5
ortofenilfenol	10	-	25
metil-tiofanat	2	2	25
folpet	3	3	10
difenilamina	3	5	5
etoxiquina	3	-	3
tiabendazol	3	-	-
iprodiona	10	10	-
dicloran	2	0.01	0.01
captan	3	-	25

De tot el que s'ha anat comentant fins ara es desprèn que la societat actual es troba davant un dilema; d'una banda hi ha una demanda creixent de productes de qualitat, amb bon aspecte físic i estat sanitari adequat, el que suposa intentar obtenir la fruita el més neta possible i per tant lliure de podridures. D'altra banda, la majoria dels mètodes emprats normalment per a controlar plagues i malalties resulten altament indesitjables per tots els problemes ambientals i de salut que comporten.

El control biològic apareix com la més prometedora de les alternatives a aquesta problemàtica, ja sigui per ella mateixa o com a part d'una estratègia de control integrat per a reduir l'ús de pesticides.

2. EL CONTROL BIOLÒGIC

2.1. Definició i antecedents

Baker i Cook al 1974 definien el control biològic com la reducció de la densitat d'inòcul o de la producció de malaltia per part del patogen o de la seva activitat com a paràsit mitjançant un o més organismes, per acció natural o a través de la manipulació de l'ambient, l'hoste o l'antagonista.

Al 1988, Nigam i Mukerji indicaven que el control biològic és la manipulació directa o indirecta per part de l'home, dels agents vius que de forma natural tenen capacitat de control, aquesta manipulació provoca un augment del seu atac sobre les malalties. També apuntaven que la relació biològica entre els agents de control i els patògens és bastant específica, de manera que s'ha de buscar un mètode de control per a cada malaltia.

El concepte de control biològic és difícil de definir, però agafant el sentit més ampli, podríem indicar que són tots aquells sistemes de control de plagues i malalties de les plantes diferents als productes químics de síntesi. De totes maneres, per conveniència les estratègies de control mitjançant mètodes culturals i de varietats resistents es discuteixen separatament (Parry, 1990).

La idea de la lluita microbiològica no és una cosa nova. Leben (1965), ja parlava extensament de la relació existent entre els microorganismes epifítics de les plantes, i les seves malalties, i indica que la superfície de les parts aèries de les plantes, són un bon hàbitat per a multitud de microorganismes, alguns dels quals són capaços d'interferir en el creixement dels patògens.

En els darrers anys uns dels agents microbians més utilitzats en lluita microbiològica han estat algunes soques del gènere *Trichoderma*, ja que és un microorganisme de creixement molt ràpid, i amb unes necessitats nutricionals molt senzilles (Tronsmo, 1986). Molts dels aïllats de *Trichoderma*, presenten un o més mecanismes d'actuació contra els patògens: la producció d'algun antibiòtic (Webster i Lomas, 1964), bon competidor pels nutrients (Hulme i Shields, 1970) i una interacció amb les hifes (Dennis i Webster, 1971).

Hi ha molts exemples de la utilització del gènere *Trichoderma* com a antagonista, com ara el de soques de *T. harzianum* en el control dels atacs de *B. cinerea* en flors de mançanera (Tronsmo, 1983). També s'ha estudiat la possibilitat d'emprar-lo en el control de malalties de postcollita però amb disparitat de resultats, per una banda es va aconseguir reduir del 35% al 8% la podridura de *Penicillium digitatum* en llimones, mitjançant l'aplicació de *T. viridiae* (De Matos, 1983), en canvi, Tronsmo i Raa (1977), si bé controlaren la podridura de *B. cinerea* en mançanes emmagatzemades a 20 °C mitjançant la inoculació de *T. pseudokoningii*, no obtingueren control en mançanes emmagatzemades a 4 °C ja que les soques d'aquest antagonista no creixen per sota dels 9 °C.

Cal esmentar que la fruita emmagatzemada en cambres frigorífiques representa una bona oportunitat per a intentar utilitzar sistemes de lluita biològica, pel control de les malalties de postcollita, ja que la fruita es troba sota condicions ambientals controlades, tant pel que fa a la humitat relativa, com a la temperatura i a la concentració de gasos (Droby i Chalutz, 1992).

Darrerament s'ha intensificat la recerca en el camp de la lluita biològica de les malalties de postcollita en fruita; podem destacar en mançana i pera (Janisiewicz, 1987, 1988a, 1991; Janisiewicz i Roitman, 1988; Janisiewicz i Marchi, 1992), en fruita d'os (Pusey i Wilson, 1984; Pusey *et al.*, 1988), en cítrics (Chalutz *et al.*, 1988; Smilanick i Denis-Arrue, 1992), en fruits subtropicals i tropicals (Kanapathipilla i Jantan, 1985; Koomen i Jeffries, 1993; Korsten *et al.*, 1993) i sobre fruites petites com ara les maduixes (Janisiewicz, 1988b).

Tots coincideixen en afirmar que la supervivència de l'antagonista i la seva efectivitat després d'exposar-lo als tractaments normals de postcollita i sota les condicions ambientals de frigoconservació, són els factors que determinen majoritàriament la seva utilització. També és molt important la seva capacitat de colonitzar la superfície de la ferida.

2.2. Avantatges del control biològic

Els principals avantatges del control microbiològic en relació a altres sistemes de lluita, es poden resumir en els següents (Deacon, 1983):

1. Són **més segurs**, en comparació als principals productes químics utilitzats actualment; una característica important, és que els microorganismes no s'acumulen en els aliments. De totes maneres, l'estudi de la inofensivitat d'alguns organismes és molt car i les consideracions de seguretat han estat recentment una important limitació en la utilització d'alguns agents en la lluita biològica, especialment els virus.
2. Els microorganismes emprats com a agents de control poden ésser **persistents al llarg del temps**. Això no es pot aplicar en tots els casos, però hi ha exemples en els quals un cop introduït l'agent microbià, aquest redueix els nivells de malaltia a nivells acceptables econòmicament. Aquest és un argument molt usual a l'hora d'afirmar que els mètodes de control biològic o la utilització de plantes resistents són més persistents que els productes químics, ja que no alteren de manera substancial els principals aspectes del patògen.
3. Els agents microbians **produeixen un efecte insignificant en el balanç ecològic**. Particularment per no destruir els enemics naturals de les espècies patògenes, cosa que sí fan alguns pesticides, amb el perill d'afavorir l'aparició de noves malalties (Griffiths, 1981). Els pesticides també poden produir l'efecte bumerang, en el qual els patògens resorgeixen amb més força que abans d'utilitzar-los.

4. Els agents de biocontrol són freqüentment **compatibles amb altres sistemes de control**, inclosos els productes químics de síntesi, per la qual cosa es poden aplicar conjuntament.

2.3. Característiques desitjables d'un agent de biocontrol

A l'hora d'establir la selecció dels agents de biocontrol que aplicarem per controlar una determinada malaltia, haurem de considerar les següents característiques (Wisniewski i Wilson, 1992):

- Estabilitat genètica.
- Efectivitat a baixes concentracions.
- Poca exigència pel que fa a requeriments nutritius.
- Efectivitat per a un gran nombre de patògens i per diversos fruits i vegetals.
- Capacitat de reproduir-se en medis de creixement econòmics.
- Facilitat d'aplicació.
- No productor de metabòlits secundaris que siguin tòxics per les persones o animals.
- Resistència als insecticides i fungicides amb què pot arribar a estar en contacte.
- Compatibilitat amb altres tractaments químics o físics.
- No patogènic sobre l'hoste.
- Capacitat de sobreviure sota condicions adverses (incloses baixes temperatures i l'emmagatzematge en atmosferes controlades).

La majoria dels patògens de la fruita en postcollita són sapròfits i depenen dels nutrients exògens per a germinar i iniciar el procés d'infestació. Els antagonistes que poden utilitzar ràpidament aquests nutrients base, seran capaços d'aturar aquest procés infestiu (Janisiewicz, 1991).

La supervivència de l'antagonista en l'hàbitat i a les condicions ambientals a les que ha de protegir al material vegetal, serà un dels principals factors que determinin la seva utilitat com a agent de biocontrol. En el cas de la postcollita l'antagonista ha de sobreviure i conservar la seva efectivitat després d'exposar-lo a tractaments de postcollita i a condicions d'emmagatzematge, tant humitat relativa, com baixes temperatures, com a diverses relacions d'O₂/CO₂ (Janisiewicz, 1991). Alguns microorganismes, sobretot els llevats, poden créixer i sobreviure sense aigua lliure si tenen humitat relativa alta en l'atmosfera. D'altra banda, les baixes temperatures poden permetre una bona supervivència dels antagonistes però disminuir-ne l'efectivitat.

Totes aquestes característiques desitjables per un agent de biocontrol, són molt difícils de reunir en un únic organisme, per aquest fet ja s'està treballant en incorporar en un mateix organisme aptituds d'altres mitjançant enginyeria genètica (Panopoulos, 1986).

Un darrer factor important per a la lluita contra el patògen és la relació entre la concentració d'inòcul d'antagonista i l'agent causant de podridura, així com el temps transcorregut entre l'aplicació de l'antagonista i l'inòcul del patògen (Jijakli i Lepoivre, 1992; Jijakli *et al.*, 1993).

2.4. Situació actual

La utilització de microorganismes antagònics presents de forma natural en la superfície dels fruits o del material vegetal està esdevenint una alternativa prometedora, en la protecció de les fruites contra les malalties de postcollita.

En la taula 2, estan descrits alguns exemples d'èxits obtinguts en la recerca d'agents de biocontrol de patògens en mançanes.

Taula 2. Antagonistes en el control dels principals patògens de postcollita de mançanes.

MALALTIA	PATOGEN	AGENT DE BIOCONTROL	REFERÈNCIA
Podridura blava	<i>P. expansum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Janisiewicz, 1987
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz i Roitman, 1988
		<i>Cryptococcus</i> spp.	Roberts, 1991 Wilson <i>et al.</i> , 1993
		<i>Pichia guilliermondii</i>	McLaughlin <i>et al.</i> , 1990
		<i>Candida sake</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1993
		<i>Sporobolomyces roseus</i>	Janisiewicz i Bors, 1995
		<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas <i>et al.</i> , 1997
Podridura grisa	<i>B. cinerea</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	Wisniewski <i>et al.</i> , 1988 McLaughlin <i>et al.</i> , 1990
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz i Roitman, 1988
		<i>Cryptococcus laurentii</i>	Roberts, 1990
		<i>Acremonium breve</i>	Janisiewicz, 1988b
		<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas <i>et al.</i> , 1997
Podridura per <i>Rhizopus</i>	<i>R. nigricans</i>	<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas <i>et al.</i> , 1997

La majoria dels agents de biocontrol han estat assajats solament contra un petit nombre de patògens i en conreus molt concrets. Actualment es comença a dedicar més esforços per identificar antagonistes amb un ampli espectre d'acció contra vàries malalties i en diferents conreus (Arul, 1994).

Una assignatura pendent que queda en la majoria dels agents de biocontrol recentment descoberts, és la determinació del seu mode d'actuació, tot i que en molts dels casos s'ha assenyalat quin podria ser. La complexitat que els envolta fa que els pocs estudis que hi ha siguin poc concloents (Wilson *et al.*, 1991; Smilanick i Denis-Arrue, 1992).

Els sistemes de control biològic que es vulguin desenvolupar com una alternativa real, s'han de comparar amb els fungicides sintètics, en termes d'efectivitat i de confiança (Hofstein *et al.*, 1994). Un cop determinada l'efectivitat dels antagonistes a temperatura ambient, és molt important estudiar el seu comportament a baixes temperatures i a les condicions d'atmosfera controlada (Falconi i Mendgen, 1991)

Actualment també s'estan realitzant molts estudis per a la millora de la capacitat antagonista dels agents de biocontrol ja descoberts, com ara l'addició de nutrients (Janisiewicz *et al.*, 1992) o la combinació amb altres sistemes de lluita (El Ghaouth i Wilson, 1995). També s'estan dedicant molts esforços en començar a treballar en la seva manipulació genètica (Pusey, 1994).

Molts analistes sobre indústries i negocis de pesticides estan d'acord en què la transició des del control químic al biològic, tot i presentar-se de forma gradual és inevitable. Alguns estudis indiquen que des del 1990 fins a finals de segle, el volum anual de vendes de pesticides biològics als països més rics, creixerà des dels 33-45 milions de dolars als 8 bilions de dolars (Woodhead *et al.*, 1990).

Un fet molt important que està afavorint l'aparició d'agents de biocontrol als mercats, és que el desenvolupament d'un producte químic de síntesi, amb les legislacions mediambientals actuals als EUA, tarda entre 8-12 anys amb un cost aproximat que va entre els 40-80 milions de dolars. En canvi solament es necessiten al voltant de 3 anys i un cost d'uns 5 milions de dolars, per poder treure al mercat un agent de biocontrol, sense tenir en compte el temps que tarda en descobrir-se (Woodhead *et al.*, 1990).

Tot i que ja fa temps que s'està investigant sobre el tema del control biològic, encara és força nou de cara a la patentabilitat, registre i comercialització. Malgrat tot hi ha prou exemples de patents concedides per al control de malalties en postcollita. La majoria són als EUA, cal però destacar a Europa la patent de *Candida sake* CPA-1 en el control de malalties en postcollita de fruita (Viñas *et al.*, 1997).

Un cop obtinguda la patent s'ha de procedir al registre del producte. Actualment al nostre país, i a la resta de països de la UE, aquest pas representa un obstacle important per a la comercialització dels agents de biocontrol en postcollita. La directiva que regeix el registre d'agents de biocontrol és la 91/414/CEE, en la qual es defineixen tots els assaigs a dur a terme. Per als agents de biocontrol no és necessari fer la toxicologia crònica a diferència del que passa amb els productes químics. De totes formes hi ha un gran nombre d'estudis a realitzar que encareixen el procés i el dificulten, alguns dels quals són propis de productes químics.

En el cas dels EUA ja existeix una normativa específica de registre dels agents de biocontrol. El cost dels assaigs de toxicologia venen a costar entre 80.000 i 150.000 dolars i es poden realitzar en 6 mesos. En canvi un estudi toxicològic per un producte químic de síntesi pot costar entre 2.5 i 3 milions de dolars i es necessiten de 4.5 a 6 anys per a realitzar-los (Woodhead *et al.*, 1990). Aquesta gran diferència de costos i temps és principalment deguda al gran interès per part de l'EAP (Agència de Protecció Mediambiental dels EUA), en facilitar l'aparició de pesticides biològics. Aquest fet ha comportat que apareguessin al mercat alguns productes biològics en el control de malalties de postcollita de fruita: el Bio-save 10 i 11, (*Pseudomonas syringae* soques ESC30 i ESC11, Ecoscience Corp., Worcester, MA) i l'Aspire (*Candida oleophila* soca 182, Ecogen Inc., Langhorne, PA) (Koch, 1996).

2.4.1. *Candida sake* CPA-1

La soca CPA-1 del llevat *Candida sake* (Saito i Ota) van Uden i Buckley va ser aïllada de la superfície de mançanes procedents de frigoconservació en el laboratori de Patologia de l'àrea de Postcollita del centre UdL-IRTA de Lleida, i presenta una efectivitat molt elevada com antagonista dels principals fongs causants de podridura en postcollita de fruita (Viñas *et al.*, 1997) (Fotografia 3).

L'esmentada soca va ser identificada pel "Centraalbureau voor Schimmelcultures" d'Holanda i es troba dipositada a la "Colección Española de Cultivos Tipo" (CECT) de València. Les seves colònies són de color blanc-cremós, rodones, ben definides, amb la vora llisa i una lleugera elevació central. A més a més presenta pseudohifes en els cultius.

La morfologia de les cèl·lules d'aquest llevat és d'el·líptica a el·líptica allargada i presenta reproducció vegetativa per gemmació multilateral (Fotografia 4).

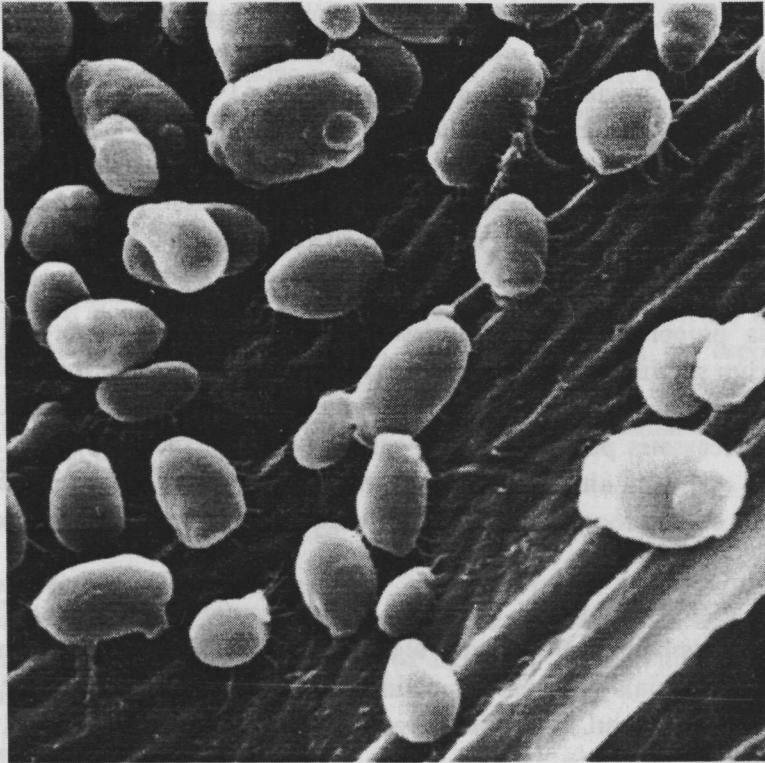
Aquesta espècie es pot trobar en el sake, la cervesa, el vi, el suc de raïm i l'aigua, entre altres productes naturals (Barnett *et al.*, 1990).



Fotografia 3. Efectivitat de l'aplicació de la soca *Candida sake* CPA-1 enfront al fong causant de la podridura blava (*Penicillium expansum*) en mançanes "Golden Delicious".

És important destacar que l'espècie *C. sake* no s'ha trobat mai associada a animals de sang calenta (Hurley *et al.*, 1987). A més a més, la ingestió de les dosis aplicades en biocontrol de l'esmentada soca no representen cap perill toxicològic per a l'ésser humà, ja que no pot desenvolupar-se a la temperatura de 37 °C (temperatura corporal) i és ràpidament destruïda en contacte amb el suc gàstric simulat. La seva DL₅₀ és superior a 1.7×10^{10} ufc kg⁻¹, quan s'administra per via oral a rates Wistar (Usall, 1995).

La soca CPA-1 està molt ben adaptada a les baixes temperatures, obtenint-se un bon desenvolupament de la seva població a 1°C. I presentant una bona efectivitat de control de *P. expansum*, *B. cinerea* i *R. nigricans* a les condicions de frigoconservació habituals (Viñas *et al.*, 1996).



Fotografia 4. Vista general del llevat *C. sake* després de 24 hores de creixement sobre mançanes “Golden Delicious” (x7500).

Finalment esmentar que la soca en qüestió actualment està patentada a l'Estat Espanyol (Viñas *et al.*, 1997) i pendent d'una extensió de patent a 21 països més de tot el món.

3. LA MICROFLORA DE LA FRUITA

La superfície aèria de les plantes està colonitzada per una microflora característica que consisteix en bacteries, llevats i fongs filamentosos. Encara que alguns microorganismes representants de cadascun d'aquests grans grups els podem trobar en qualsevol època de l'any, existeix fonamentalment una successió estacional (Blakeman, 1985). L'interès pel desenvolupament de poblacions microbianes a les parts aèries de les plantes va augmentar considerablement des del moment en què Leben (1965) va demostrar que existia una relació important entre la microflora epifítica dels vegetals i les seves malalties.

D'aleshores ençà, s'han dut a terme un gran nombre d'estudis per tal de conèixer les comunitats microbianes associades a diferents superfícies vegetals. La majoria dels treballs però, s'han centrat en les fulles (Preece i Dickinson, 1971; Dickinson i Preece, 1976; Blakeman, 1981; Pennycook i Newhook, 1981). En canvi, són pocs els estudis que trobem referits a altres òrgans vegetals, com ara els borrons (Leben, 1971, 1972; Andrews i Kenerley, 1980), els brots i les flors (Melgarejo *et al.*, 1985, 1986) o els fruits (Davenport, 1976; Bizeau *et al.*, 1990).

Les fruites són un medi ric en nutrients i tenen un elevat contingut en aigua, per la qual cosa proporcionen un bon desenvolupament dels microorganismes, tant paràsits com sapròfits. A més a més, la superfície de la fruita pot contenir dipòsits de pol·len, restes orgàniques o sucs, que supleixen significativament la quantitat de nutrients necessaris per als microorganismes (Blakeman, 1985). Per tant, no és sorprenent que quan altres factors ambientals com la temperatura i la humitat són favorables, els microorganismes es multipliquin ràpidament a la superfície de la fruita.

Amb l'aparició del control biològic, ha augmentat encara més l'interès pel coneixement de la microflora ja que alguns dels microorganismes que la componen poden ser potencials antagonistes naturals (Neal *et al.*, 1973; Bird *et al.*, 1979; Spurr, 1981; Blakeman, 1982; Blakeman i Fokkema, 1982; Blakeman, 1985).

Així doncs, veiem que a la superfície dels fruits té lloc una interacció entre els microorganismes, el que suggereix l'existència d'alguna mena de control biològic en els fruits a camp. Alguns d'aquests organismes poden ésser possibles agents de biocontrol dels patògens de la fruita (Janisiewicz, 1991).

Els organismes colonitzadors de la fruita poden classificar-se en beneficiosos, neutres o perjudicials, similar a la flora colonitzadora de la superfície de les fulles (Fokkema *et al.*, 1975; Blakeman i Fokkema, 1982; Cullen i Andrews, 1984; Schroth *et al.*, 1984).

3.1. Factors que influeixen a la microflora de la fruita

Els factors que influeixen en el desenvolupament quantitatiu i qualitatiu de la microflora epifítica dels fruits poden agrupar-se en els següents grups (Déak, 1991):

1. Vectors de contaminació
2. Propietats intrínseques de la fruita
3. Factors extrínsecs
4. Propietats implícites dels microorganismes

3.1.1. Vectors de contaminació

Existeix una deposició de substàncies sobre la superfície dels fruits procedents del medi ambient (partícules del sòl, grans de pol·len, microorganismes, insectes) (Last i Price, 1969).

Segons Blakeman (1985) les principals fonts d'inòcul de microorganismes són les llavors, el sòl, l'aire i en el cas d'arbres l'inòcul latent que sobreviu l'hivern en brots i borrons. Les bacteries utilitzen les quatre vies per colonitzar les plantes, mentre que els llevats aprofiten les esquitxades de pluja, l'aire i els insectes per entrar en contacte amb les superfícies vegetals. Finalment les espores de les floridures són transportades per l'aire i dipositades sobre la superfície de les plantes on resten latents fins que es donen les condicions adequades per a la seva germinació (Blakeman, 1985).

3.1.2. Propietats intrínseques de la fruita

El tipus de substrat, així com les característiques intrínseques d'aquest, condicionen la microflora que podem trobar-hi. En el cas de les fruites tenen una importància rellevant, la seva activitat d'aigua, la disponibilitat de nutrients i l'acidesa.

3.1.2.1. L'activitat d'aigua

Molts anys enrera ja es va veure que la disponibilitat d'aigua en l'aliment era un factor important i marcava el tipus de microflora associada al mateix (Clayson i Blood, 1957). La resposta dels diferents grups de microorganismes a l' a_w difereix molt depenent de la seva posició taxonòmica. Així a grans trets, pot dir-se que les bacteries Gram-negatives són generalment més sensibles a les baixes a_w que els organismes Gram-positius. La majoria de bacteries no poden créixer per sota d'activitats aigua de 0.90, mentre que els llevats i les floridures no creixen normalment per sota de 0.87 i 0.80 respectivament (Mossel *et al.*, 1991).

Aquest tema de l'activitat d'aigua serà estudiat amb més profunditat en l'apartat 4.2.1.

3.1.2.2. Disponibilitat de nutrients

Els nutrients són essencials per al desenvolupament de qualsevol ésser viu, i la disponibilitat i composició d'aquests condicionarà la presència i tipus de microflora en qualsevol fruit. Així doncs, una mançana que presenti algun tipus de dany o ferida i per tant ofereixi una major font de nutrients, presentarà una població microbiana més elevada, sobretot de llevats, que una fruita sana (Marshall i Walkley, 1951).

Els canvis en l'estat nutricional de la fruita a mesura que l'estació avança, determinen els canvis en la composició microbiana de la seva superfície (Williams *et al.*, 1956; Davenport, 1976; Singh i Kainsa, 1983).

D'una banda cal esmentar que les bactèries poden multiplicar-se en solucions amb baix nivell d'aminoàcids i carbohidrats (Brodie i Blakeman, 1976) i és per això que són els microorganismes predominants en estadis de desenvolupament amb nivells de nutrients baixos, com ara els borrons o el moment d'emergència de les fulles (Blakeman, 1985). En canvi la presència de llevats en aquests estadis inicials de les fulles és molt baixa perquè aquests necessiten per al seu desenvolupament un subministrament adequat de sucres senzills. A mesura que les fulles es desenvolupen, hi ha un augment de sucres en la superfície que procedeixen dels teixits interns o dels dipòsits rics en carbohidrats com ara el pol·len o les melasses dels àfids, provocant un augment de les poblacions de llevats (Blakeman, 1985).

La disponibilitat de compostos nitrogenats, particularment aminoàcids, esdevé un factor limitant quan les poblacions de llevats són elevades (Rodger i Blakeman, 1984). La competència pels aminoàcids entre llevats i altres microorganismes, pot explicar en part la disminució en les poblacions de bactèries a mesura que avança el desenvolupament de les plantes (Blakeman, 1985).

3.1.2.3. L'acidosa

La majoria de bactèries creixen sobre un rang de valors de pH amb un òptim prop del neutre (pH=7) o més aviat bàsic, mentre que l'òptim per a llevats i floridures tendeix a ser més àcid, creixent a pH 2-3, mentre que les bactèries no poden desenvolupar-se per sota de pH 4.5-5 (Mossel *et al.*, 1991). Així doncs, no resulta estrany que substrats àcids com ara els fruits afavoreixin la presència de llevats i floridures i en canvi les hortalisses (o les parts vegetatives) siguin més susceptibles a l'atac bacterià, donat el seu pH més elevat.

3.1.3. Factors extrínsecs

3.1.3.1. Variació estacional

La microflora associada a les plantes varia durant les diferents èpoques de l'any (Blakeman, 1985). Les variacions de temperatura, humitat relativa i la duració i intensitat de la llum solar, fan que les condicions ambientals no siguin sempre les més adequades per a tots els tipus de microorganismes. Durant les primeres etapes del desenvolupament de les fulles, a l'inici de l'estació, quan la humitat és elevada i la temperatura moderada, predominen les bactèries. Els llevats dominen durant la meitat de l'estació de creixement i finalment passen a fer-ho les floridures (Blakeman, 1991) (Figura 1).

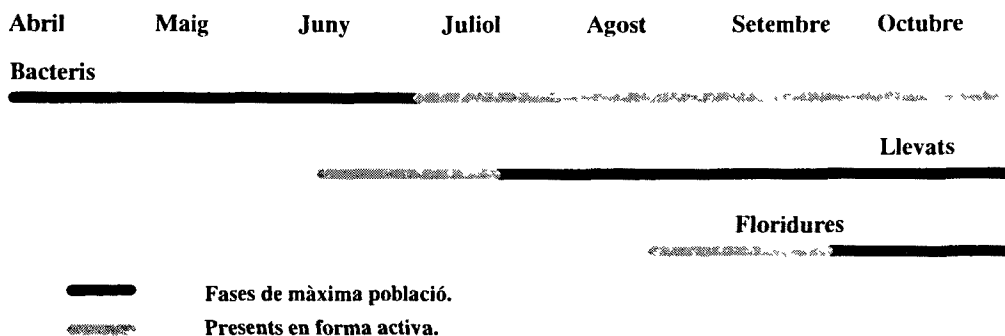


Figura 1. Fases dominants dels principals grups de microorganismes en fulles de plantes herbàcies i llenyoses caducifòlies, en un clima temperat d'una zona de l'hemisferi nord (Blakeman, 1985)

La humitat relativa en la superfície de les plantes, és el factor que més influència té en el creixement i la supervivència dels microorganismes en aquest hàbitat (Blakeman, 1985).

Un paràmetre important en el desenvolupament de les malalties en condicions emmagatzematge són les pel·lícules d'aigua que es poden formar en la superfície de la fruita per condensació, aquestes són un excel·lent hàbitat pels bacteris sapròfits, alguns dels quals poden ésser agents de biocontrol.

3.1.3.2. Variació geogràfica

Aquest factor està molt lligat a l'anterior, ja que les diferents condicions ambientals que es donen en camps amb localització geogràfica diferent influiran sobre la microflora present.

Bowen i Beech (1967) van estudiar els canvis en els llevats residents en la superfície de les mançanes de camps pertanyents a contrades diferents, observant que *Candida pulcherrima* era l'única espècie de llevats present de forma invariable i com a component predominant de la microflora, podent arribar a representar fins el 80% dels llevats aïllats en mançaneres. En els indrets on no predominava aquesta espècie, el seu lloc era normalment ocupat per *Rhodotorula* spp.. La presència de *Saccharomyces delbrueckii* era força important en un camp però poc usual en els altres. I finalment per altra banda *Torulopsis* spp. va ser trobada solament en dues zones. Tots aquests fets suggereixen l'existència d'associacions d'alguns llevats a zones concretes.

3.1.3.3. Posició del fruit dins l'arbre

Els estudis duts a terme per Andrews *et al.* (1980) posen de manifest les diferències en el tipus i quantitats de microflora que presenten les diferents parts d'un arbre. Aquestes diferències dins l'arbre estan influenciades per l'accessibilitat als microorganismes de l'aire, pel microclima que es crea dins el propi arbre i també per la presència i/o mobilitat dels insectes pol·linitzadors. S'ha observat que les concentracions més grans de microorganismes són a les parts més properes al sòl i disminueixen en anar pujant per l'arbre.

3.1.3.4. Acció de l'home

Generalment durant el procés de collita, manipulació i processat fins que arriba al consumidor, la fruita sofreix aportacions de diferents microorganismes que no són propis de la seva naturalesa.

Una font important de contaminació dels aliments són altres aliments fets malbé, les màquines de processat i els embalatges de transport que poden actuar com a fonts d'inòcul quan les mesures higièniques no són les correctes (Déak, 1991). Això, s'observa freqüentment en la fruita. Bowen i Beech (1967) mostraren que un gran nombre d'espècies de llevats estan presents a la mançana i s'incrementen progressivament un cop la fruita és collida i emmagatzemada. Això pot ser atribuït a una posterior contaminació durant la recollida i l'emmagatzemament.

Els tractaments amb pesticides tenen un efecte considerable en les poblacions microbianes de la superfície de les plantes, particularment s'ha estudiat el tema en cereals i en plantes llenyoses com ara les fulles de mançanera i els brots de presseguer, i s'han observat canvis significatius (Dickinson i Wallace, 1976; Hislop, 1976; Fokkema i De Nooij, 1981; Magan i Lacey, 1986; De Cal i Melgarejo, 1992).

L'efecte dels fungicides sobre els components de la microflora, depèn del tipus de microorganismes, així Blakeman (1985) va suggerir que el creixement de fongs sapròfits era inhibït per un ampli espectre de fungicides, però que aquests tenien poc efecte sobre les poblacions bacterianes.

3.1.4. Propietats implícites dels microorganismes

3.1.4.1. Característiques fisiològiques

La sensibilitat o resistència per mantenir una capacitat i velocitat de creixement determinada sota unes condicions ambientals o unes altres, són factors propis del microorganisme que condicionaran sempre el seu desenvolupament allà on es trobi.

3.1.4.2. Interacció entre poblacions

La presència de microorganismes amb característiques similars i per tant necessitats semblants quant a requeriments nutritius i condicions per a poder viure, pot modificar la microflora natural de la fruita, ja que podran donar-se fenòmens de competència per l'espai i/o nutrients.

Un altre tipus d'interacció entre poblacions, és la producció d'antibiòtics o bacteriocines per part d'un microorganisme que inhibeixen o dificulten el creixement d'altres (Blakeman, 1991).

En mançanes "Grenadier", les poblacions de bacteries acètiques i làctiques disminueixen amb l'increment de les poblacions de llevats durant el desenvolupament, atribuint-se la causa de la inhibició a la secreció d'àcids grassos insaturats (Last i Price, 1969).

Es donen també efectes antagònics de la microflora sapròfita en els patògens de la fruita de postcollita, els quals poden ser demostrats per l'aparició de les malalties iatrogèniques (Griffiths, 1981).

3.2. La microflora de la mançana

La microflora de la mançana al igual que la de la resta de fruits ha estat poc estudiada i així ho han esmentat diferents autors (Wilson i Chalutz, 1989; Droby i Chalutz, 1992; Spurr, 1994). Fins i tot alguns destaquen el fet que en molts casos els investigadors han hagut de treballar amb els estudis de poblacions de fulles, que són molt numerosos i detallats, i assumir que comportaments similars tindran lloc en els fruits (Droby i Chalutz, 1992).

Els primers estudis en microflora de la mançana van ésser adreçats al coneixement dels llevats presents en mançanes destinades a la producció de sidra. Bowen i Beech (1967) van estudiar els canvis en els llevats residents en la superfície de les mançanes, observant que *Candida pulcherrima* era l'única espècie de llevats present de forma invariable i com a component predominant de la flora, podent arribar a representar fins el 80% dels llevats aïllats en mançaneres. Mentre que *Rhodotorula* spp. i *Saccharomyces delbrueckii* eren força importants en algun dels camps. En canvi Déak (1991) va observar en els seus estudis que les principals espècies de llevats presents de forma permanent en mançana són: *Hanseniospora uvarum*, *Debaryomyces hansenii*, *Sporobolomyces roseus*, *Metschnikowia pulcherrima* i *Cryptococcus albidus*, junt amb fases de llevat de *Cladosporium herbarum* i *Aureobasidium pullulans*. Per contra, va trobar un gran nombre d'espècies que poden esdevenir membres transitoris de la microflora.

Un estudi dut a terme a França sobre la micoflora de mançanes per a sidra va suggerir que *Aureobasidium pullulans* i *Epicoccum nigrum* eren les principals espècies presents en la superfície de les mançanes, seguides pels gèneres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* i *Penicillium* en molta menys quantitat (Bizeau *et al.*, 1990).

La microflora en postcollita de mançana encara és menys coneguda, ja que els únics estudis duts a terme són per tal de conèixer la presència de fongs relacionats amb les podridures de postcollita. Així Palazón *et al.* (1984) van fer un inventari de les floridures causants de podridures en postcollita en cambres frigorífiques de la Vall de l'Ebre, veient que l'espècie *P. expansum* era la responsable del 70-80% de les pèrdues degudes a malalties en postcollita de mançana.

En canvi, els estudis d'Usall i Viñas, 1989, van demostrar que la presència dels gèneres *Penicillium* i *Botrytis*, principals causants de podridures en postcollita, en camps de mançanes just abans de collita era insignificant a les comarques de Lleida.

Es necessita més informació sobre la microflora de la mançana a l'hora de fer control biològic i establir una població de l'agent de biocontrol sobre aquesta. Spurr (1994) esmentava que per tal d'aconseguir èxit en el control biològic era necessari conèixer els microorganismes propis del substracte a protegir, ja que amb ells s'establiran una sèrie de relacions de competència, sinergisme etc. que hauran de tenir-se en compte.

4. TRACTAMENTS EN PRECOLLITA PER COMBATRE MALALTIES DE POSTCOLLITA

4.1. Avantatges de l'enfoc

Fins ara l'aplicació d'agents antagonistes per al control biològic de les principals podridures de fruita en postcollita ha estat estudiada principalment sota condicions ambientals controlades (Wisniewski i Wilson, 1992). Els tractaments amb els microorganismes antagònics es duen a terme just abans d'entrar la fruita en cambra frigorífica, més o menys amb les mateixes tecnologies i equipaments que s'utilitza amb els productes fungicides.

Malgrat tot, alguns autors han suggerit que degut a què la infecció del fruit per part dels fongs patògens de postcollita sovint es dona al camp en precollita (Roberts, 1994; Biggs, 1995), podria ésser avantatjosa l'aplicació dels antagonistes ja en el camp (Leibinger *et al.*, 1997).

D'altra banda cal esmentar que l'aparició freqüent de soques resistents als tractaments fungicides aplicats en postcollita (Bertrand i Saulie-Carter, 1978; Rosenberger i Meyer, 1979; Dekker i Georgopoulos, 1982; Prusky i Ben-Aire, 1983; Spotts i Cervantes, 1986; Viñas *et al.*, 1991, 1993) ha motivat l'existència de floridures que sobreviuen en el bany o dutxa, convertint aquest tractament en una font d'inòcul i dispersió d'aquest a les fruites sanes. Així doncs està àmpliament acceptada la presència dels principals patògens de postcollita en els "drenchers" comercials, havent observat en aquests concentracions entre 10^3 i 10^4 conidis ml^{-1} de *P. expansum* i *B. cinerea*, i en menor concentració altres floridures com ara *Mucor* spp., *G. perennans* i *Phialophora malorum* (Spotts i Cervantes, 1986). Uns estudis recents duts a terme la campanya 1996/97 en instal·lacions hortofructícoles de les comarques de Lleida corroboren la presència del gènere *Penicillium* en les solucions fungicides amb què es banya la fruita (Planes, 1997). Aquest aspecte es veu agreujat quan es parla de floridures tipus *R. nigricans* per a la qual fins ara no es coneix cap fungicida químic específic que el controli. I que es presenta com una espècie molt agressiva en termes patològics, ja que posseeix enzims pectinolítics que li permeten degradar el teixit del fruit sense necessitat de ferides o lesions per a iniciar-se.

Cal tenir en compte també que les fruites són altament susceptibles a les ferides i lesions, donada la seva textura tova i l'alt contingut en substàncies líquides. Com més pròxima a la maduresa es troba aquesta existeix un increment de la susceptibilitat als danys mecànics i a les infeccions per part dels patògens (Eckert i Ratnayake, 1981). Les ferides mecàniques són les principals vies de penetració dels fongs causants de podridura en postcollita, ja que els teixits frescos queden totalment desprotegits, i es facilita la invasió de les espores que es troben a l'atmosfera de les cambres i en les solucions aquoses que s'utilitzen per banyar la fruita abans d'emmagatzemar-la (Spotts i Cervantes, 1986).

En molts estudis s'ha demostrat que l'activitat antagònica dels agents de biocontrol és dependent del temps d'incubació abans de dur a terme la inoculació del patogen, això suggereix que la colonització de la superfície a protegir per part de l'antagonista és un requisit per a la protecció dels teixits (Jijakli *et al.*, 1993). Aquest comportament s'observa fonamentalment en els antagonistes el mode d'actuació dels quals es basa en la competència pels nutrients i/o l'espai. En aquests casos, l'antagonista ha de mostrar un ràpid creixement a les ferides, ha de ser capaç d'emprar nutrients a baixes concentracions i sobreviure i desenvolupar-se en la superfície del fruit o el lloc d'infecció a temperatures i pH extrems o condicions osmòtiques que no són beneficioses pel creixement del patogen. Normalment, en aquest tipus d'antagonisme s'inhibeix el desenvolupament del patogen però no se'l destrueix (Droby i Chalutz, 1994). En aquest tipus de mode

d'acció el tractament de l'antagonista a camp li donaria la capacitat d'establir-se i desenvolupar-se de forma anticipada, de manera que el patògen no tindria alternativa enfront el seu competidor.

Finalment, un altre aspecte a tenir en compte és que la fruita mullada després del bany i deixada en condicions de temperatura ambiental, encara que sigui durant poca estona, presenta unes condicions òptimes per al creixement de qualsevol microorganisme i per tant també dels anomenats patògens (Viñas, 1990), que podien estar a la superfície de la fruita abans de passar-la pel "drencher" o tenir l'origen en les solucions fungicides utilitzades en ell.

Si tenim en compte tot el que s'ha esmentat, la possibilitat d'aplicar els agents antagonistes per al control de les podridures de postcollita directament a camp, substituint el tractament de postcollita a la central, ens ofereix una sèrie d'avantatges com ara són:

1. Una menor manipulació de la fruita amb la conseqüent disminució de danys i ferides.
2. Escurçament del període que transcorre des de la collita fins l'entrada en cambra frigorífica.
3. S'evita la contaminació addicional per fongs existents en les solucions dels "drenchers" i bany emprats en els tractaments en postcollita.
4. S'aconsegueix una protecció de la fruita enfront els patògens que tenen el seu origen a camp.
5. Permet un establiment previ de l'antagonista en la superfície a protegir.

Davant tots aquests avantatges pot semblar estrany que no sigui més difosa i estudiada aquesta idea. El motiu cal buscar-lo principalment en dos aspectes: d'una banda, donat que generalment el sector productiu és independent del sector de la conservació (exceptuant les associacions de productors, com ara les cooperatives), el primer, difícilment acceptaria efectuar tractaments que no li representessin cap avantatge personal, sinó més aviat li complicarien la recollida i li posarien un cost afegit a la producció. I d'una altra banda, fins el moment actual està molt estesa la utilització d'antiescaldants o antioxidants per tal de prevenir problemes de fisiopaties en la fruita conservada, i aquests tractaments es fan en postcollita.

Malgrat tot, aquests no són problemes difícils de solucionar, en alguns cultius com ara els cítrics està àmpliament acceptat que siguin les empreses compradores de la fruita les que s'encarreguin dels tractaments a camp, i arribar a un enteniment en aquest aspecte no hauria de representar massa dificultats.

D'altra banda, les normatives sobre l'ús de tractaments en postcollita són cada dia més restrictives i així cal esmentar un article publicat al "Postharvest News and Information" (Rendall-Dunn, 1991) que indicava que el Parlament Europeu havia votat a favor de la total supressió dels tractaments amb pesticides en postcollita tan aviat com aquesta pràctica fos possible.

A més a més, les tendències de l'agricultura actual són cada vegada més encaminades cap a una Producció Integrada, i en aquest cas les normatives són encara més estrictes. Al respecte, esmentar només que les directrius proposades per l'OILB o IOBC (Organització Internacional per a la Lluita Biològica i Integrada contra els animals i plantes nocius) conjuntament amb la SICH (Societat internacional de Ciències Hortofructícoles), per als tractaments químics de postcollita poden resumir-se en (Cross i Dickler, 1994):

1. Per al control de l'escaldat superficial i altres alteracions no es permet el tractament en postcollita amb antioxidants sintètics que no es trobin de forma natural a les plantes.
2. Es permeten els tractaments fungicides en postcollita, només quan es compleixin una sèrie de condicions específiques:
 - En aquells cultivars que tinguin susceptibilitat moderada o alta enfront les podridures de conservació.
 - Abans de la collita ha de determinar-se el risc de podridura en conservació i solament poden tractar-se aquells fruits que presentin risc alt i que hagin de conservar-se més enllà del 31 de desembre.
 - Es recomana no tractar en postcollita quan ja s'han fet tractaments en precollita contra malalties de conservació.
 - Han d'ajustar-se les dosis de forma que els residus (i els LMR) no siguin més grans que si el tractament s'hagués fet en precollita.
 - Utilització d'un mètode segur i legalment acceptable per a l'eliminació de les solucions fungicides sobrants.

A la llarga però, la idea seria eliminar totalment els tractaments en postcollita.

Davant aquestes perspectives sembla doncs interessant anar endavant en aquesta línia que podria ser una possibilitat en el futur de la fructicultura.

4.2. Limitacions dels agents de biocontrol a camp

Malgrat tot el que s'ha esmentat, per poder dur a terme aquest nou enfoc i poder controlar les podridures de postcollita mitjançant aplicacions d'agents de

biocontrol en precollita es necessita que l'antagonista posseeixi una sèrie de característiques claus que inclouen la tolerància als estressos ambientals, tant de temperatura com d'activitat d'aigua, tolerància a la baixa disponibilitat de nutrients, a les radiacions ultraviolades i als canvis climàtics en general (Deacon, 1991).

Fins ara, el control biològic a camp ha estat sovint limitat per l'estret marge de condicions ambientals sota les quals els agents de biocontrol poden establir-se i controlar de forma efectiva les plagues i malalties (Wilson *et al.*, 1991)

Així Andrews (1992) suggeria que el control biològic en les parts aèries de les plantes havia obtingut menys èxits que en la rizosfera per les següents raons: d'una banda la topografia de les arrels és llisa comparada amb els òrgans aeris i per tant més fàcil de colonitzar i protegir. D'altra banda, les arrels es troben en un ambient més estable que la part aèria de la planta. La superfície aèria de les plantes és un medi dinàmic amb variables ambientals cícliques i no cícliques, incloent la temperatura, la humitat relativa, la pluja, el vent i les radiacions. Finalment, els nutrients en la part aèria, a diferència del que passa a les arrels, procedeixen de fonts externes a la pròpia planta i en moltes ocasions són limitants.

Molts microorganismes, com ara *Sporobolomyces roseus* o *Pseudomonas fluorescens* no han funcionat en el control biològic de patògens foliars degut a una baixa tolerància a la llum ultraviolada i a la dessecació, que fan que el manteniment d'una població activa sobre el nou teixit sigui difícil (Powell i Jutsum, 1993).

Alguns autors també han assenyalat que el control de plagues mitjançant fongs entomopatògens presenta deficiències degut a què el requeriment d'aigua per a la seva germinació és molt elevat i no es dona en molts casos en condicions de camp (Walstad *et al.*, 1970; Moore, 1972; Doberski, 1981; Gillespie i Crawford, 1986).

La disponibilitat d'aigua és el factor limitant més important per al creixement microbià a la superfície de les plantes. La provisió irregular d'aigua a la superfície vegetal resulta en un creixement intermitent dels microorganismes, i provoca problemes de supervivència durant els períodes secs (Blakeman i Fokkema, 1982). Les poblacions bacterianes estan menys adaptades als canvis d'humitat diaris que els llevats o les floridures (Fokkema i Schippers, 1986).

4.2.1. Activitat d'aigua

El contingut total d'aigua d'un substrat no dona una mesura de l'aigua disponible per als microorganismes. Una proporció important de molècules d'aigua poden estar enèrgicament atretes als components del substrat o a altres molècules d'aigua.

És la força d'aquesta atracció la que determina la disponibilitat de l'aigua per al creixement dels microorganismes.

L'activitat d'aigua és el paràmetre que normalment s'utilitza com a mesura de la quantitat d'aigua disponible en un substrate per al creixement microbià.

La capacitat de retenció de l'aigua pels components dels aliments disminueix en el següent ordre: components iònics > sucres, polihidroxiàlcohols, aminoàcids i altres compostos de baix pes molecular > compostos d'alt pes molecular (Mossel *et al.*, 1991). Quan s'estudia els efectes de l' a_w en els microorganismes en aliments, es veu que productes amb valors d' a_w iguals afecten als microorganismes de forma diferent. Això depèn clarament dels soluts presents en aquests aliments (Mossel *et al.*, 1991).

La resposta dels microorganismes a l'activitat d'aigua varia segons la seva posició taxonòmica.

Generalment quan els microorganismes creixen en a_w per sota de l'òptima, la seva tolerància a altres factors limitants es veu reduïda. Així per exemple, a baixes a_w els rangs de nivell de pH en el qual poden créixer els microorganismes esdevé més petit. El mateix passa amb la temperatura, de forma que a valors baixos d' a_w el mínim de temperatura al que pot créixer un microorganisme augmenta. En resum, a a_w per sota de l'òptima els organismes són incapaços de créixer sota condicions en les quals ho farien si aquesta fos l'òptima (Mossel *et al.*, 1991)

4.2.2. Adaptació dels microorganismes per créixer a baixa a_w

4.2.2.1. Els polihidroxiàlcohols

Quan sotmetem un microorganisme a condicions de baixa a_w (pressió osmòtica alta) l'efecte immediat és la pèrdua d'aigua per osmosi i com a conseqüència les cèl.lules s'encongeixen i finalment sofreixen plasmòlisi. Les cèl.lules microbianes només poden absorbir aigua quan el potencial d'aigua del seu interior és inferior al de l'ambient que les envolta. Per evitar la plasmòlisi de les cèl.lules en condicions extremes de baixa a_w , els microorganismes redueixen el potencial d'aigua intern mitjançant l'acumulació de soluts intracitoplasmàtics, d'aquesta manera s'aconsegueix un equilibri osmòtic entre l'interior de les cèl.lules i l'ambient exterior restrictiu, i l'aigua no es perd i queda retinguda. Mitjançant aquest sistema s'aconsegueixen superar períodes de dessecació (Brown, 1978).

L'habilitat dels diferents microorganismes per superar condicions d' a_w reduïda depèn de (1) la seva capacitat de sintetitzar i/o acumular aquests soluts citoplasmàtics (André *et al.*, 1988), (2) la concentració de soluts que poden aconseguir, que depèn de la solubilitat dels mateixos i de l'habilitat de la cèl.lula

per evitar que marxïn cap a l'exterior, i (3) l'habilitat de què els sistemes bioquímics normals de la cèl.lula funcionin en presència d'aquests soluts (Vaamonde *et al.*, 1986; Gould i Christian, 1988; Mackenzie *et al.*, 1988). Aquests compostos s'anomenen soluts compatibles i inclouen carbohidrats i aminoàcids, que poden substituir l'aigua en un sistema bioquímic sense afectar seriosament la seva funció (Brown, 1978).

El nombre de molècules que poden actuar com a soluts compatibles és relativament reduït i són els mateixos per a tipus de microorganismes filogenèticament molt separats i diferents (Yancey *et al.*, 1982).

En estudis duts a terme amb llevats i floridures ha pogut observar-se que generalment els soluts compatibles són polihidroxiàlcohols, essent el glicerol i l'arabitol els que són sintetitzats més normalment com a resposta a baixes a_w (Griffin, 1981). La sacarosa, la glucosa i el sorbitol són acumulats quan estan presents en el medi (Corry, 1987). També s'ha observat que la prolina i altres aminoàcids poden tenir un paper important en fongs com ara *Fusarium solani* o *Sclerotium rolfisii*, naturals de sòls salins (El-Abyad *et al.*, 1994).

Aquest tema ha estat àmpliament estudiat i són molts els autors que han referenciat que polihidroxiàlcohols de baix i alt pes molecular (poliols) com ara el glicerol, l'eritritol i l'arabitol i el manitol respectivament, són acumulats en les cèl.lules fúngiques sota condicions de baixa disponibilitat d'aigua (Beever i Laracy, 1986; Hocking, 1986; Ellis *et al.*, 1991; Kelly i Budd, 1991; Van Eck *et al.*, 1993).

Així doncs, en conclusió pot dir-se que altes concentracions de soluts compatibles fan possible que els sistemes enzimàtics funcionin sota condicions d'estrès hídric i de vegades fins i tot d'estrès de temperatura (Brown, 1978).

4.2.2.2. La Trealosa

Així mateix, en condicions de baixa disponibilitat d'aigua, les cèl.lules vives corren el risc de sofrir deshidratació i com a conseqüència les membranes poden resultar danyades (Leslie *et al.*, 1994). El disacàrid trealosa pot ajudar a prevenir aquest dany substituint l'aigua perduda per deshidratació en les membranes fosfolípides. Aquest reemplaçament de l'aigua amb trealosa protegeix la membrana i l'estructura de les proteïnes durant la deshidratació i la rehidratació (Crowe *et al.*, 1984; Carpenter i Crowe, 1988; Colaco *et al.*, 1992; Leslie *et al.*, 1994).

Encara que la trealosa no actua en l'ajust osmòtic, és metabòlicament compatible amb la cèl.lula fúngica i per tant ha estat referenciada com un solut compatible (Rudolph *et al.*, 1993).

Van Dijck *et al.* (1995) van observar que manipulant les condicions de creixement del llevat *Saccharomyces cerevisiae* augmentava la concentració intracel·lular de trealosa per sobre del 10% (en pes sec). Aquest percentatge és el llindar per sobre del qual la resistència del microorganisme a la congelació i a la liofilització és òptima.

Així doncs, la trealosa és un compost que pot ésser ràpidament metabolitzat i ser un protector eficient, millorant la resistència dels components cel·lulars envers condicions adverses, com ara temperatures extremes, deshidratació o estrès osmòtic (Van Laere, 1989; Mickle *et al.*, 1991; Piper, 1993).

4.2.3. Millora d'antagonistes enfront l'estrès

Segons el que s'ha explicat en l'apartat anterior quan fem créixer un microorganisme en condicions d'estrès acumula una sèrie de substàncies, ja siguin poliols o trealosa, que el fan més resistent a les esmentades condicions adverses. Aquest enfoc s'ha intentat utilitzar en agents de biocontrol per tal de fer-los més resistents a les condicions extremes de camp.

Així, estudis ecofisiològics recents en fongs entomopatògens utilitzats en control biològic de plagues, han demostrat que és possible manipular fisiològicament les condicions de creixement, les fonts de carboni, i les relacions carboni:nitrogen per aconseguir l'acumulació de poliols de baix pes molecular, com ara el glicerol i l'eritritol a l'interior del miceli i els propàguls dels fongs filamentosos. Aquesta síntesi de poliols dona lloc a una millor i més ràpida germinació sota condicions d'estrès hídric (Hallsworth i Magan, 1994a, 1995, 1996). Els conidis modificats d'aquesta manera poden ser més patogènics per a controlar plagues en condicions de baixa humitat relativa que aquells que no han estat modificats i per tant contenen petites traces de poliols de baix pes molecular (Hallsworth i Magan, 1994b, 1994c)

Recentment, també s'han iniciat estudis amb l'inòcul modificat de l'agent de biocontrol *Epicoccum nigrum* amb altes concentracions de glicerol i eritritol, i també ha presentat un millor control de la podridura causada per *Monilinia laxa* en préssecs a camp, que l'inòcul sense modificar (Pascual *et al.*, 1996).

Altres autors han suggerit que la trealosa millora la tolerància a la dessecació dels conidis de l'agent de biocontrol *Trichoderma harzianum* (Harman *et al.*, 1991) i d'*Aspergillus japonicus* (Gornova *et al.*, 1992). Malgrat tot, Hallsworth i Magan (1995) van demostrar que elevades concentracions de trealosa en els conidis dels fongs entomopatògens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* i *Paecilomyces farinosus* no millorava la tolerància a baixes a_w .

OBJECTIUS

El control biològic de fongs causants de podridura en postcollita de mançanes, és ja una realitat tal i com es desprèn de tot el que s'ha esmentat. Aquesta tesi neix davant el repte de donar un pas més endavant, tractant de fer possible l'aplicació dels agents de biocontrol directament a camp.

- 1. Estudi de la microflora natural de la mançana "Golden Delicious" a camp al llarg del seu desenvolupament, abarçant des de l'estadi de borró fins el moment de recol.lecció. I efecte dels fungicides sobre aquestes poblacions naturals.**
- 2. Avaluació de la microflora en postcollita de la mançana "Golden Delicious" durant el procés de conservació en cambra frigorífica.**
- 3. Avaluació de l'efecte de l'aplicació en precollita de l'agent de biocontrol *C. sake* CPA-1 sobre la microflora pròpia de la mançana "Golden Delicious" en postcollita.**
- 4. Estudi de l'evolució a camp i a cambra de l'antagonista *C. sake* CPA-1 aplicat en precollita sobre mançana "Golden Delicious".**
- 5. Eficàcia comparativa de l'agent de biocontrol *C. sake* CPA-1 quan s'aplica en precollita o en postcollita per al control de *P. expansum* en mançanes "Golden Delicious" durant l'emmagatzematge en fred.**
- 6. Caracterització de l'agent de biocontrol *C. sake* CPA-1 enfront a condicions d'estrès hídric, temperatura i pH.**
- 7. Millora de la resistència de l'antagonista *C. sake* CPA-1 enfront a condicions de baixa a_w , a fi i efecte de poder aplicar-lo a camp amb una major seguretat d'èxit.**
- 8. Comprovació del manteniment de l'eficàcia de les soques adaptades a l'estrès hídric, en el control biològic de *P. expansum*.**
- 9. Estudi de l'eficàcia de l'aplicació en precollita de les soques adaptades a l'estrès en el control de *P. expansum* en postcollita.**

Referències

- ANDERSON, H.W. 1956. *Diseases of fruit crops*. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York.
- ANDRÉ , L., NILSSON, A. i ADLER, L. 1988. The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Gen. Microbiol.*, 34: 669-667.
- ANDREWS, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30: 603-635.
- ANDREWS, J.H. i KENERLEY, C.M. 1980. Microbial populations associated with buds and young leaves of apple. *Can. J. Bot.*, 58: 847-855.
- ANDREWS, J.H., KENERLEY, C.M. i NORDHEIM, E.V. 1980. Positional variation in phylloplane microbial populations within an apple tree canopy. *Microbial Ecol.*, 6: 71-84.
- ARUL, J. 1994. Emerging technologies for the control of postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. A *Biological Control of Diseases and vegetables*. Wilson, C.L. i Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida. p. 10.
- BAKER, K.F. i COOK, R.J. 1974. *Biological control of Plant Pathogen*. Freeman, W.H. & Co., San Francisco, CA.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. i YARROW, D. 1990. *Yeast: Characteristics and identification*. Cambridge University Press. Cambridge.
- BEEVER, R.E. i LARACY, E.P. 1986. Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*, 168: 1358-1365.
- BERTRAND, P.F. i SAULIE-CARTER, J.L. 1978. The occurrence of benomyl-tolerant strains of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in mid-Columbia region of Oregon and Washington. *Plant Dis. Rep.*, 62: 305-320.
- BIGGS, A.R. 1995. Detection of latent infections in apple fruit with paraquat. *Plant Dis.*, 79: 1062-1067.
- BIRD, L.S., LIBERMAN, C., PERCY, R.G. i BUSH, D.L. 1979. The mechanism of multi-adversity resistance in cotton: theory and results. *Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., Cotton Dis. Council.*, 39: 226-228.
- BIZEAU, C., MOREAU, C., MICHEL, P. i PONCHANT, D. 1990. Microflore fongique de la carposphère de pommes à cidre. *Cryptogamie Micol.*, 11: 1-12.
- BLAKEMAN, J.P. 1981. *Microbial Ecology of the phylloplane*. Academic Press. London.
- BLAKEMAN, J.P. 1982. Phylloplane interactions. A *Phytopathogenic Prokaryotes, Vol. I*. M.S. Mount i Lacy, G.H. (Eds.). Academic Press, New York. p. 307-333.

- BLAKEMAN, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. A *Biological control of the phylloplane*. Windels, C.E. i Lindow, S.E. (Eds.) Annual Phytopathology. Society, St. Paul, Minnesota. p. 6-30.
- BLAKEMAN, J.P. 1991. Foliar bacterial pathogenic epiphytic growth and interactions on leaves. *J. Appl. Bacteriol. Symposium*: 49-59.
- BLAKEMAN, J.P. i FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 20: 167-192.
- BOWEN, J.F. i BEECH, F.W. 1967. Yeast flora of cider factories. *J. Appl. Bacteriol.*, 30: 475-483.
- BRODIE, I.D.S. i BLAKEMAN, J.P. 1976. Competition for exogenous substrates *in vitro* by leaf surface micro-organisms and germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.*, 9: 227-239.
- BROWN, A.D. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 17: 181-242.
- CARPENTER, J.F. i CROWE, J.H. 1988. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. *Cryology*, 25: 459-470.
- CHALUTZ, E., COHEN, L., WEISS, B. i WILSON, C.L. 1988. Biological control of diseases of citrus fruits by microbial antagonists, A *Proc. Int. Citrus Congr. 6th*. Goren, R. i Mendel, K. (Eds.). Margraf Scientific Books, Weikersheim, Germany. p. 15-16.
- CLAYSON, D.H.F. i BLOOD, R.M. 1957. Food perishability: The determination of the vulnerability of food surfaces to bacterial infection. *J. Sci. Food Agric.*, 8: 404-414.
- COLACO, C., SEN, S., THANGAVELU, M., PINDER, S. i ROSER, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/Technology*, 10: 1007-1011.
- COOK, R.J. i BAKER, K.F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota.
- CORRY, J.E.L. 1987. Relationships between water activity and fungal growth. A *Food Beverage Mycology*, Beuchat, L.R. (Ed.). AVI, Philadelphia. p. 51-99.
- CROSS, J.V. i DICKLER, E. 1994. Guidelines for Integrated Production of Pome Fruits in Europe. Technical Guideline III. IOBC wprs Bulletin, 17: 33-40.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M. i CHAPMAN, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobyotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223: 701-703.
- CULLEN, D. i ANDREWS, J.H. 1984. Epiphytic microbes as biological control agents. A *Plant Microbes Interactions*. Kosuge, T. i Nester, E.W. (Eds.). McMillan Publishing, Co., New York. p. 381-399.

- DAVENPORT, R.R. 1976. Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. *A Microbiology of aerial plant surfaces*. Dickinson, C.H. i Preece, T.F. (Eds.). Academic Press. London. p. 325-349.
- DEACON, J.W. 1983. *Microbial control of plant pest and diseases*. Van Nostrand Reinhold. UK. Co. Ltd.
- DEACON, J.W. 1991. Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-borne plant pathogens. *Biocontrol Sci. Techn.*, 1: 5-20.
- DÉAK, T. 1991. Foodborne Yeasts. *A Advances in Applied Microbiology*. Neidleman, S.L. i Lsakin, A.I. (Eds.). Academic Press, Inc. San Diego, California. p. 79-278.
- DE CAL, A. i MELGAREJO, P. 1992. Interactions of pesticides and mycoflora of peach twigs. *Mycol. Res.*, 96: 1105-1113.
- DEKKER, J. i GEORGOPOULOS, S.G. 1982. *Fungicide resistance in crop protection*. Center of Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen.
- DE MATOS, A.P. 1983. *Chemical and microbiological factors influencing the infection of lemons by Geotrichum candidum and Penicillium digitatum*. PhD. Thesis, University of California. Riverside.
- DENNIS, D. i DAVIS, R.P. 1977. The selective effect of fungicides on postharvest spoilage fungi on strawberries. *Proc. 1977 Br. Crop. Prot. Conf. Pests and Diseases*, 1: 203.
- DENNIS, C. i WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 57: 41-48.
- DE WAARD, M.A., GROENWEG, H. i NISTELROOY, J.G.M. 1982. Laboratory resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. *Neth. J. Plant Pathol.*, 88: 99-112.
- DÍAZ, M.A. i VILA, R. 1987. Estudio de la flora fúngica presente en cámaras frigoríficas de conservación de frutos cítricos. *Alimentaria*, 183: 77-82.
- DICKINSON, C.H. i PREECE, T.F. 1976. *Microbiology of aerial plant surfaces*. Academic Press. New York.
- DICKINSON, C.H. i WALLACE, B. 1976. Effects of late application of foliar fungicides on activity of microorganisms on winter wheat flag leaves. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 76: 103-112.
- DOBERSKI, J.W. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus*: effect of temperature and humidity on infection of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J. Invert. Pathol.*, 37: 195-200.
- DROBY, S. i CHALUTZ, E. 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica Suppl.*, 20: 149-153.

- DROBY, S. i CHALUTZ, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. A *Biological control of postharvest diseases: Theory and practice*. Wilson, C.L. i Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida. p. 63-75.
- ECKERT, J.W. 1978. Pathological diseases of fresh fruits and vegetables. A *Postharvest Biology and Biotechnology*. Hultin, H.G. i Milner, N. (Eds.). Food and Nut Press. Wesport, CT. p. 161-209.
- ECKERT, J.W. 1982. Case study 5: *Penicillium* decay of citrus fruits. A *Fungicide resistance in crop protection*. Dekker, J. i Georgopoulos, S.G. (Eds.). PUDOC, Wageningen.
- ECKERT, J.W. 1990. Impact of fungicide resistance on citrus fruit decay control. A *Managing resistance to agrochemical*. Green, M., Lebaron, H. i Moberg, W. (Eds.). Am. Chem. Soc. Symp. Sre. p. 286-302.
- ECKERT, J.W. i OGAWA, J.M. 1985. The chemical control of post-harvest diseases: Subtropical and tropical fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23: 421-454.
- ECKERT, J.W. i RATNAYAKE, M. 1981. Host pathogen interactions in postharvest diseases. A *Postharvest physiology and crop preservation*. Lieberman, M. (Ed.). Plenum Press, New York. p. 247-264.
- ECKERT, J.W., SIEVERT, J.R. i RATNAYAKE, M. 1994. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.*, 78: 971-974.
- ECKERT, J.W. i WILD, B.L. 1983. Problems of fungicide resistance in *Penicillium* rot of citrus fruits. A *Pest resistance to pesticides*. Georghiou, C.P. i Saito, T. (Eds.). Plenum Press, New York. p. 525-556.
- EL-ABYAD, M.S., ATTABY, H. i ABU-TALEB, A.M. 1994. Impact of salinity stress on the free amino acid pools of some phytopathogenic fungi. *Microbiol. Res.*, 149: 309-315.
- EL-GHAOUTH, A. i WILSON, C.L. 1995. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. *Postharvest News and Information*, 6: 5-11.
- ELLIS, S.W., GRINDLE, M. i LEWIS, D.H. 1991. Effect of osmotic stress on yield and polyol content of dicarboximide-sensitive and -resistant strains of *Neurospora crassa*. *Mycol. Res.*, 95: 457-464.
- FALCONI, C. i MENDGEN, K. 1991. Inhibition of postharvest pathogens by epiphytic bacteria isolated from *Malus communis* cultivar Golden Delicious. A *Communications from the Federal biological Institute for Agriculture and Forestry*. Berlina-Danken 266. Germany Plant Protection Convention. Berlin.
- FOKKEMA, N.J. i DE NOOIJ, M.P. 1981. The effect of fungicides on the microbial balance in the phylloplane. *European Plant Protection Organization Bulletin*, 11: 303-310.

- FOKKEMA, N.J., LAAR, J.A. VAN DER, NELIS-BLOMBERG, A.L. i SCHIPPERS, B. 1975. The buffering capacity of the natural mycoflora of rye leaves to infection by *Cochliobolus sativus*, and its susceptibility to benomyl. *Neth. J. Plant Pathol.*, 81: 176.
- FOKKEMA, N.J. i SCHIPPERS, B. 1986. Phyllosphere versus rhizosphere as environments for saprophytic colonization. A *Microbiology of the phyllosphere*. Fokkema, N.J. i van den Heuvel, J. Cambridge University Press. Cambridge.
- GARCÍA DE OTAZO, J. 1996. Jornada: Les mermes en postcollita de fruita. Solucions avançades. Presentació de la jornada. 42 Fira de Sant Miquel. Lleida.
- GEORGOPOULOS, S.G. 1969. The problem of fungicide resistance. *BioScience*, 19: 971-973.
- GILLESPIE, A.T. i CRAWFORD, E. 1986. Effects of water activity on conidial germination and mycelial growth of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* spp. and *Verticillium lecanii*. A *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. Samson, R.A., Vlak, J.M. i Peters, D. (Eds.). Society of Invertebrate Pathology, Wageningen. p. 254.
- GORNOVA, I.B., FEOFILOVA, E.P., TERESHINA, V.M., GOLOVINA, E.A., KROTKOVA, N.B. i KHOLODOVA, V.P. 1992. Effect of carbohydrate content of *Aspergillus japonicus* spores on their survival in storage and subsequent germination. *Mikrobiologiya*, 61: 549-554.
- GOULD, G.W. i CHRISTIAN, J.H.B. 1988. Characterization of the state of water in foods-biological aspects. A *Food Preservation by Moisture Control*. Slow, C.C. (Ed.). Elsevier, London. p. 43-56.
- GRIFFIN, D.H. 1981. *Fungal physiology*. John Willey & Sons, Inc. New York.
- GRIFFITHS, E. 1981. Iatrogenic plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 19: 69-82.
- GUTTER, Y. 1973. Benzimidazole-resistant strains of citrus fruit pathogens. *Summaries 971/73. Div. of Fruit and Veg. Storage Research*. The Volcani Center. Israel. p. 56-57.
- HALLSWORTH, J.E. i MAGAN, N. 1994a. Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18: 8-11.
- HALLSWORTH, J.E. i MAGAN, N. 1994b. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, 140: 2705-2713.
- HALLSWORTH, J.E. i MAGAN, N. 1994c. Improved biological control by changing polyols/Trehalose in conidia of entomopathogens. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference -Pests and Diseases*, 8D: 1091-1096.
- HALLSWORTH, J.E. i MAGAN, N. 1995. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiol.-UK*, 141: 1109-1115.

- HALLSWORTH, J.E. i MAGAN, N. 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microb.*, 62: 2435-2442.
- HARDIN, P.R. JR. 1972. Differential sensitivity to thiabendazole by strain of *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Plant. Dis. Rep.*, 56: 256-260.
- HARMAN, G.E., JIN, X., STASZ, T.E., PERUZOTTI, G., LEOPOLD, A.C. i TAYLOR, A.G. 1991. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biol. Control*, 1: 23-28.
- HISLOP, E.C. 1976. Some effects of fungicides and other agrochemicals on the microbiology of the aerial surfaces of plant. A *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Dickinson, C.H. i Preece, T.F. (Eds.). Academic Press Inc. New York. p. 41-74.
- HOCKING, A.D. 1986. Effects of water activity and culture age on the glycerol accumulation patterns of five fungi. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 269-275.
- HOFSTEIN, R.S., FRIEDLENDER, T., CHALUTZ, E. i DROBY, S. 1994. Large-scale production and pilot testing of biological control agents for postharvest diseases. A *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Theory and practice*. Wilson, C.L. i Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. p. 89-100.
- HORSFALL, J.G. 1979. Iatrogenic disease: mechanism of action. A *Plant Disease: And Advance Treatise, Vol 2*. Horsfall, J.G. i Cobling, E.B. (Eds.), Academic Press, New York.
- HULME, M.A. i SHIELDS, J.K. 1970. Biological control of decay fungi in wood by competition for non-structural carbohydrates. *Nature*, 227: 300-301.
- HURLEY, R., DE LOVVOIS, J. i MULHALL, A. 1987. Yeast and human and animal pathogens. A *The yeast. I*. Rose, A.H. i Harrison, J.S. (Eds.). Academic Press, New York. p. 207-281.
- JANISIEWICZ, W.J. 1987. Postharvest biological control of blue-mold on apples. *Phytopathology*. 77: 481-485.
- JANISIEWICZ, W.J. 1988a. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. *Phytopathology*, 78: 194-198.
- JANISIEWICZ, W.J. 1988b. Biological control of diseases of fruit. A *Biocontrol of Plant Diseases. Vol II*. Mukerji K.G. i Garg K.L. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. p. 153-165.
- JANISIEWICZ, W.J. 1991. Biological control of postharvest fruit diseases. A *Handbook of Applied Mycology. Vol. 1: Soils and Plants*. Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G. and Knudsen, G.R. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York. p. 301-326.
- JANISIEWICZ, W.J. i BORS, B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Appl. Environ. Microb.*, 61: 3261-3267.

- JANISIEWICZ, W.J. i MARCHI, A. 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain on *Pseudomonas syringae*. *Plant. Dis.*, 76: 555-560.
- JANISIEWICZ, W.J. i ROITMAN, J. 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, 78: 1697-1700.
- JANISIEWICZ, W.J., USALL, J. i BORS, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology*, 82: 1364-1370.
- JIAKLI, M.H. i LEPOIVRE, P. 1992. Biological control of postharvest *Botrytis cinerea* and *Penicillium* on apples. *Proceeding of second IOBC/EFPP Workshop. Biological control of foliar and postharvest diseases*. Wageningen.
- JIAKLI, M.H., LEPOIVRE, P., TOSSUT, P. i THORNARD, P. 1993. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on post-harvest apples by two antagonistic yeasts. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 58: 1349-1358.
- KANAPATHIPILLA, V.S. i JANTAN, R. 1985. Approach to biological control of anthracnose fruit rot of bananas. *A Proceeding of the First Regional Symposium on Biological Control: Biological Control in the Tropics*. University Pertanian Malasia. p. 387-398.
- KELLY, D.J. i BUDD, K. 1991. Polyol metabolism and osmotic adjustment in the mycelial ascomycete *Neucosmospora vasinfecta*. *Exp. Mycol.*, 15: 55-64.
- KOCH, E. 1996. Mode of action and potential use of microbial antagonists of plant diseases. *Gesunde Pflanzen*, 48: 11-19.
- KOOMEN, I. i JEFFRIES, P. 1993. Effects of antagonistic organisms on the postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. *Plant Pathol.*, 42: 230-237.
- KORSTEN, L., DE VILLIERS, E.E., ROWELL, A. i KOTZE, J.M. 1993. Postharvest biological control of avocado fruit diseases. *SouthAfrican Avocado Growers' Association Yearb.*, 16: 65-69.
- KURAMOTO, T. 1976. Resistance to benomyl and thiphanatemethyl in strains of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in Japan. *Plant Dis. Rep.*, 60: 168-172.
- LAST, F.T. i PRICE, D. 1969. Yeast associated with living plants and their environs. *A The Yeast. Vol. 1*. Rose, A.H. i Harrison, J.S. (Eds.). Academic Press. London. p. 183-218.
- LEBEN, C. 1965. Epiphytic micro-organisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 3: 209-230.
- LEBEN, C. 1971. The bud in relation to the epiphytic microflora. *A Ecology of leaf surface micro-organisms*. Preece, T.F. i Dickinson, C.H. (Eds.). Academic Press Inc. New York. p. 117-127.
- LEBEN, C. 1972. Micro-organisms associated with plant buds. *J. Gen. Microbiol.*, 71: 327-331.

- LEIBINGER, W., BREUKER, B., HAHN, M. i MENDGEN, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, 87. *In Press*.
- LESLIE, S.B., TETER, S.A., CROWE, L.M. i CROWE, J.H. 1994. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1192: 7-13.
- MAGAN, N. i LACEY, J. 1986. The phylloplane microflora of ripening wheat and effect of late fungicide applications. *Ann. Appl. Biol.*, 109: 117-128.
- MARSHALL, C.R. i WALKLEY, V.T. 1951. Some aspects of microbiology applied to commercial apple juice production. I. Distribution of microorganisms on the fruit. *Food Res.*, 16: 448-456.
- MCLAUGHLIN, R.J., WISNIEWSKI, M.E., WILSON, C., i CHALUTZ, E. 1990. Effects of inoculum concentration and salts solutions on biological control of postharvest diseases of apples with *Candida* sp. *Phytopathology*, 80: 456-461.
- MACKENZIE, K.F., SINGH, K.K. i BROWN, A.D. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1661-1666.
- MELGAREJO, P., CARRILLO, R. i SAGASTA, E.M. 1985. Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 85: 313-317.
- MELGAREJO, P., CARRILLO, R. i SAGASTA, E.M. 1986. Study on the epiphytic mycoflora of peach twigs and flowers. *Phytopathologia Mediterranea*, 25: 68-72.
- MIEKLE, A.J., CHUDEK, J.A., REED, R.H. i GADD, G.M. 1991. Natural abundance ¹³C-nuclear magnetic resonance analysis of acyclic polyol and trehalose accumulation by several yeast species in response to salt stress. *FEMS Microbiol Lett.*, 82: 163-168.
- MONLLAO, S. 1990. *Estudi de soques de Penicillium spp. resistents a l'imazalil, aïllades de centrals hortofructícoles de la província de Lleida*. TFC. Universitat de Lleida.
- MOORE, G.E. 1972. Pathogenicity of three entomogenous fungi to the southern pine beetle at various temperatures and humidities. *Environ. Entomol.*, 2: 54-57.
- MOSSEL, D.A.A., CORRY, J.E.L., STRUIJK, C.B. i BAIRD, R. 1991. *Essentials of the microbiology of foods*. John Wiley & Sons, New York.
- MUIRHEAD, I.F. 1974. Resistance to benzimidazole fungicides in blue mold of citrus in Queensland. *Agric. Anim. Husb.*, 14: 689-701.
- MURGA, J. i PALAZON, I. 1984. Cuadernos INIA. *Manual de inspección de peras y manzanas*. SOIVRE. Zaragoza.
- NEAL, J.L., LARSON, R.I. i ATKINSON, T.G. 1973. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant Soil*, 39: 209-212.

- NIGAM, N. i MUKERJI, K.G. 1988. Biological control. Concepts and practices. A *Biocontrol of Plant Diseases. Vol 1*. Mukerji, K.G. i Garg, K.L. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. p. 2-9.
- PALAZÓN, I., PALAZÓN, C., ROBERT, P., ESCUDERO, I., MUÑOZ, M., i PALAZON, M. 1984. *Estudio de los problemas de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza*. Diputación provincial de Zaragoza. Institución Fernando El Católico.
- PANOPOULOS, N.J. 1986. Tactics and sensibility of genetics engineering of biocontrol agents. A *Microbiology of the phyllosphere*. Fokkema N.J. i Van del Heuvel J. (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge. p. 312-332.
- PARRY, D.W. 1990. *Plant pathology in agriculture*. Cambridge University Press. Cambridge.
- PASCUAL, S., MAGAN, N. i MELGAREJO, P. 1996. Improved biocontrol of peach twig blight by physiological manipulation of *Epicoccum nigrum*. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference -Pests and Diseases*, 4D: 411-412.
- PENNYCOOK, S.R. i NEWHOOK, F.J. 1981. Seasonal changes in the phylloplane microflora. *New Zeal. J. Bot.*, 19: 273-283.
- PIPER, P.W. 1993. Molecular events associated with aquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 11: 339-356.
- PLANES, M. 1997. *Caracterització de les peres "Blanquilla" i pomes "Golden Delicious" rebudes a la central hortofructícola Nufri, S.A. de Mollerussa en la campanya 96-97*. TFC. Universitat de Lleida.
- POWEL, K.A. i JUTSUM, A.R. 1993. Thecnical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.*, 37: 509-513.
- PREECE, T.F. i DICKINSON, C.H. 1971. *Ecology of leaf surface micro-organisms*. Academic Press. London.
- PRUSKY, D. i BEN-AIRE, R. 1983. Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest benzimidazole treatments. A *4th Proc. Int. Congr. of Plant Pathology*. Melbourne. Australia. p. 427.
- PRUSKY, D. i BEN-AIRE, R. 1985. Effect of imazalil on pathogenicity of *Penicillium* spp. causing storage rots of pomes fruits. *Plant Dis.*, 69: 416-418.
- PUSEY, L. 1994. Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. A *Biological control of Postharvest diseases. Theory and practice*. Wilson C.L. i Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. p. 77-89.
- PUSEY, P.L., HOTCHKISS, M.W., DULMAGE, H.T., BAUMGARDUER, R.A., ZEHR, E.I., REILLY, C.C. i WILSON, C.L. 1988. Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant Dis.*, 72: 622-626.

- PUSEY, P.L. i WILSON, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.*, 68: 753-756.
- RAPER, J.D. i THOM, C. 1949. A manual of the *Penicillia*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA.
- RENDALL-DUNN, A.J. 1991. General News. *Postharvest News and Information*: 2-3.
- ROBERTS, R.G. 1990. Postharvest biological control of grey mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 80: 526-530.
- ROBERTS, R.G. 1991. Characterization of postharvest biological control of deciduous fruit diseases by *Cryptococcus* spp. A *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables Workshop*. Wilson, C.L. i Chalutz, E. (Eds.) U.S. Dep. Agric. Res. Serv. ARS-92. p. 37-48.
- ROBERTS, R.G. 1994. Integrating biological control into postharvest disease management strategies. *HortScience*, 29: 758-762.
- RODGER, G. i BLAKEMAN, J.P. 1984. Microbial colonization and uptake of ^{14}C label on leaves of sycamore. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 82: 45-50.
- ROSENBERGER, D.A. i MEYER, F.W. 1979. Benomyl-tolerant *Penicillium expansum* in apple packinghouses in eastern New York. *Plant Dis. Rep.*, 63: 37-40.
- RUDOLPH, A.S., CLIFF, R.O. i IRASTORZA, A. 1993. The use of compatible solutes in the long-term preservation of lipid microstructures. *Cryobiology*, 30: 236-237.
- SCHROTH, M.N., LOPER, J.E. i HILDERBRAND, D.C. 1984. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. A *Current Perspectives in Microbial Ecology*, Klug, M.J. i Reedy, C.A. (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- SINGH, V. i KAINSA, R.L. 1983. Microbial flora of grapes in relation to storage and spoilage. *Indian Phytopathol.*, 36: 72.
- SMILANICK, J.L. i DENIS-ARRUE, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant. Dis.*, 76: 481-482.
- SPALDING, D.H. 1970. Postharvest use of benomyl and thiabendazole to control blue mold rot development in pears. *Plant Dis. Rep.*, 54: 655.
- SPOTTS, R.A. i CERVANTES, L.A. 1986. Population pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis.*, 70: 106-108.
- SPURR, H.W. 1981. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonists. A *Microbial Ecology of the Phylloplane*. Blakeman, J.P. (Ed.). Academic Press. London. p. 369-381.

- SPURR, H.W. 1994. The microbial ecology of fruit and vegetable surfaces. its relationship to postharvest biocontrol. A *Biological control of postharvest diseases Theory and practice*. Wilson, C.L. i Wisniewski, M.E. (Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida p. 11-23
- SUS, V. i VINAS, I. 1990. Effect of desinfection of the fungal contamination of apple fruits stone-rooms. Evaluation of desinfectants in *Penicillium expansum* control *Microbiol.Alim. Nutr.*, 8. 95-102.
- TRONSMO, A. 1983. *Trichoderma harzianum* used as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on apple. *Les Colloques de l'INRA*, 18: 109-113.
- TRONSMO, A. 1986. Used of *Trichoderma* spp in biological control of necrotrophic pathogens. A *Microbiology of the Phyllosphere*. Fokkema N.J. i Van del Heuvel J. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. p. 348-362.
- TRONSMO, A. i RAA, J. 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii*, against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 89. 216-220.
- UPSTONE, M. 1977. Evaluation of chemicals for control of *Phytophthora* fruit rot in stored apples. *Proc. 1977 Br. Crop. Prot. Conf. Pest and Diseases.*, 1: 565.
- USALL, J. 1995. *Control biològic de Penicillium expansum en postcollita de fruita de llavor*. PhD Thesis. Universitat de Lleida.
- USALL, J. i VINAS, I. 1989. Contaminació fúngica en pre-recol.lecció en pomes destinades a frigoconservació de la comarca del Segrià. *Fruit*, 6: 250-253.
- VAAMONDE, G., SCARMATO, G. i CHIRIFE, J. 1986 Inhibition of *Staphylococcus aureus* C-243 growth in laboratory media with water activity adjusted using less usual solutes. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 19: 403-404.
- VALLVERDU, N. 1988. *Estudi micològic i toxicogènic de les soques del gènere Penicillium resistents als imidazols*. TFC. Universitat de Lleida.
- VAN DUICK, P., COLAVIZZA, D., SMET, P. i THIEVELEIN, J.M. 1995 Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 109-115.
- VAN ECK, J.H., PRIOR, B.A. i BRANDT, E.V. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 139. 1047-1054.
- VAN LAERE, A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol. Rev.*, 63: 201-210.
- VENDRELL, M. 1988. *Estudi micològic-toxicogènic de soques de Penicillium expansum resistents als benzimidazols aïllats de cambres frigorífiques de comarques lleidatanes*. TFC. Universitat de Lleida.
- VINAS, I. 1990. Principios básicos de la patología de post-cosecha. *Fruit*, 5: 285-292.

- VINAS, I., USALL, J. i SANCHIS, V. 1991. Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest fungicide treatment in apple packinghouses in Lleida (Spain). *Mycopathologia*, 113: 15-18.
- VIÑAS, I., USALL, J., TEIXIDO, N., FONTS, E. i OCHOA DE ERIBE, J. 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases of apples and pears with a new strain of *Candida sake*. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference -Pests and Diseases*, 6C: 603-608.
- VIÑAS, I., USALL, J., TEIXIDO, N. i SANCHIS, V. 1997. Nueva cepa de levadura *Candida sake* (Saito and Ota) Van Uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de postcosecha en frutas. Patente española 2089981. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- VIÑAS, I., VALLVERDÚ, N., MONLLAO, S., USALL, J. i SANCHIS, V. 1993. Imazalil resistant *Penicillium* isolated from Spanish apples packinghouses. *Mycopathologia*, 123: 27-33.
- VYAS, C. 1988. Iatrogenic diseases. *A Nontarget Effects of Agricultural Fungicides*. Vyas, C. (Ed.). CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida. p. 87-96.
- WALSTAD, J.D., ANDERSON R.F i STAMBAUGH, W.J. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Invert. Pathol.*, 16: 221-226.
- WEBSTER, J. i LOMAS, N. 1964. Does *Trichoderma viridae* produce gliotocin and viridin?. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 47: 535-540.
- WILLIAMS, A.J., WALLACE, R.H. i CLARK, D.S. 1956. Changes in the yeast population on Quebec apples during ripening. *Can. J. Microbiol.*, 2: 645-648.
- WILSON, C.L. i CHALUTZ, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rot of citrus with antagonistic yeast and bacteria. *Sci. Hortic.*, 40: 105-112.
- WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., BILES, C.L., McLAUGHLIN, R., CHALUTZ, E. i DROBY, S. 1991. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot.*, 10: 172-177.
- WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., DROBY, S. i CHALUTZ, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 53: 183-189.
- WISNIEWSKI, M.E. i WILSON, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience*, 27: 94-98.
- WISNIEWSKI, M.E., WILSON, C.L., CHALUTZ, E. i HERSHBERGER, W. 1988. Biological control of postharvest diseases of fruit: inhibition of *Botrytis* rot on apples by an antagonistic yeast. *Proc. Elec. Microsc. Soc. Am.*, 46: 290.

WOODHEAD, S.H., O'LEARY, A.L., O'LEARY, D.J. i RABATIN, S.C. 1990. Discovery, development and registration of a biocontrol agent from an industrial perspective. *Can. J. Plant Pathol.*, 12: 328-331.

YANCEY, P.H., CLARK, M.E., HAND, S.C., BOWLUS, R.D. i SOMERO, G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217: 1214-1222.

YARWOOD, C.E. 1970. Man made diseases. *Science*, 168: 218.

Capítol 2

Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications

N. Teixidó, J. Usall, N. Magan* and I. Viñas

Postharvest Unit, CeRTA, Centre UdL-IRTA, 177 Rovira Roure Ave., 25198, Lleida,
Spain and * Applied Mycology Group, Biotechnology Centre, Cranfield University,
Cranfield, Bedford MK43 0AL, UK

Enviat a: Annals of Applied Biology

Summary

The microbial population dynamics on apples cv. Golden Delicious were analysed every 15 days between bud and harvest in a fully replicated experiment in northern Spain in 1994 and 1995. The total microbial populations varied with developmental stage, and with prevailing climatic conditions. The predominant mycoflora were the filamentous fungi *Cladosporium* and *Alternaria* spp. and white and pink yeasts. Other genera isolated included mainly species of *Epicoccum*, *Fusarium* and *Acremonium*. However, the most important post-harvest pathogens *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* were seldom isolated from ripening apples. Maximum total filamentous fungal populations occurred after fruit set and during early ripening (2×10^4 cfu g⁻¹ approximately) while those of bacteria were maximum at bud stage (3.5×10^5 and 3.0×10^4 cfu g⁻¹ in 1994 and 1995 respectively). Always white yeasts were far more numerous than pigmented yeasts. Endophytic infection of apple buds by *Alternaria* spp., responsible for core rot, was found in almost all bud tissue. In contrast, *Cladosporium* spp. were initially isolated later from 12.5-50% of tissue samples during blooming and fruit set. The impact of a four fungicide spray regime during apple development significantly decreased the total filamentous fungal populations in both years, and that of *Cladosporium* spp. in 1994. However, bacterial populations were often higher on apples from fungicide-treated plots. Fungicide sprays decreased populations of *Cladosporium*, *Alternaria* and white yeasts for a maximum of up to 15-30 days after application. Fungicide application had little effect on endophytic infection of apples by *Alternaria* spp. between bud and harvest.

Key words. Microbial populations, apples, bud, blooming, development stage, *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., yeasts, fungicides, endophytic infection

Introduction

The interest in microbial population development on aerial parts of plants has increased since Leben (1965) demonstrated the important relationship between epiphytic microorganisms and plant diseases. Subsequently, Fokkema (1976) recognized that the impact of fungicides on such non-pathogenic microflora could be significant, as some component microorganisms were potential natural biological control agents of plant pathogens (Blakeman and Fokkema, 1982; Blakeman, 1985).

A large body of work exists on the understanding of the microbial communities on a variety of phylloplane surfaces, particularly of leaves (Preece and Dickinson, 1971; Dickinson and Preece, 1976; Blakeman, 1981; Pennycook and Newhook, 1981). By contrast, very few studies have been carried out on the microflora of other plant organs such as buds (Keener, 1945; Leben, 1971, 1972; Andrews and Kenerley, 1980), twigs and flowers (Melgarejo *et al.*, 1985, 1986) and fruits (Williams *et al.*, 1956; Davenport, 1976).

Developing fruits represent a rich environment in terms of both nutrients and water, which should support significant development of microbial activity. Most probably, as nutrients fluctuate markedly on ripening fruit surfaces there is an ecological succession of bacteria, yeasts and filamentous fungi as seen previously on leaf surfaces (Blakeman, 1985). However, detailed studies of the succession on fruit surfaces have been scarce.

Pesticide applications has been demonstrated to have a profound effect on the non-pathogenic phylloplane microbial populations, particularly on cereal and apple leaves where significant changes have been observed (Dickinson and Wallace, 1976; Hislop, 1976; Fokkema and De Nooij, 1981; Magan and Lacey, 1986; De Cal and Melgarejo, 1992).

Excellent detailed studies have been carried out on the efficacy of pesticide applications on fungal populations of apple leaves (Andrews and Kenerley, 1980, 1981). However, information on the dynamics of the microflora associated with the different development stages of apples from bud to harvest have not been examined previously. An understanding of this phylloplane environment is critical as many attempts are being made to control plant pathogens by the application of yeasts to apple surfaces for the development of biocontrol systems.

Phylloplane colonisers such as *Alternaria* spp. are also known to be responsible for core-rot of apples (Combrick and Ginsburg, 1973; Ellis and Barrat, 1983; Combrick *et al.*, 1985a, 1985b; De Kock *et al.*, 1991), a postharvest disease which is difficult to detect because of the lack of external symptoms and the fact that apparently healthy fruit can be infected and internally rotted (Spotts, 1988). This is indicative that *Alternaria* spp., which are common colonisers of foliar plant surfaces, may behave as endophytes remaining undetected in ripening fruits until after harvest. However, no information is available on the time at which such endophytic infections may become established and the incidence of internal colonisation during development of apple fruits.

The objectives of this work were to (a) determine the microbial population dynamics and succession from bud to maturity and harvest of Golden Delicious apples, (b) the effect of fungicides on these populations, (c) quantification of the level of internal colonisation and infection by the dominant fungi in apple orchards in Catalonia, Spain in 1994 and 1995.

Materials and Methods

Experimental apple orchards used in this study

This study was conducted during two growing seasons (1994 and 1995) in a 6-year-old apple orchard cv. Golden Delicious grown under standard cultural practices in Aitona (Lleida), Catalonia, Spain. Forty-eight trees were used; twenty four were sprayed according to standard apple pest control recommendations for the area and the rest were left unsprayed.

Chemical treatments were sprayed uniformly with a hand gun operating at a pressure of 10 atm. Treatments and dates are shown in Table 1.

Table 1. Summary of the timings and types of fungicide applications used in this study in 1994 and 1995.

CHEMICAL	Concentration (%)	Date of application	
		1994	1995
Summer oil 66% + Paration 3%	2	2 March	4 March
Sulphur 80% + Captan 50%	1 / 0.25	18 March	—
Flusilazol 40% + (Aluminates 10.5% + Borax 1.8% + Sulphur 56%)	0.12 / 1	15 April	18 April
Captan 50%	0.25	—	3 May
Flusilazol 40%	0.05	6 June	5 July

Three trees were used as the sample unit, and the experiments were carried out with eight replicate units per treatment and sampling procedure. In all cases guard trees were used to separate randomized treatments and replicates.

Temperature and rainfall were measured during the experiments, in order to show the influence of climatic factors on the behaviour of the microflora and to characterize the studied area. Mean, maximum and minimum air temperatures and rainfall during the years of microbial assessment are shown in Figure 1.

Sampling procedure

Samples from the apple trees were taken every 15 days from the last week of February (bud stage) until harvest in early September. All the different

stages of apple were included (bud, pink bud, blooming, fruitset and fruits in different growing stages) and are detailed in Table 2. Samples were picked at random, carefully placed in polyethylene bags and removed to the laboratory.

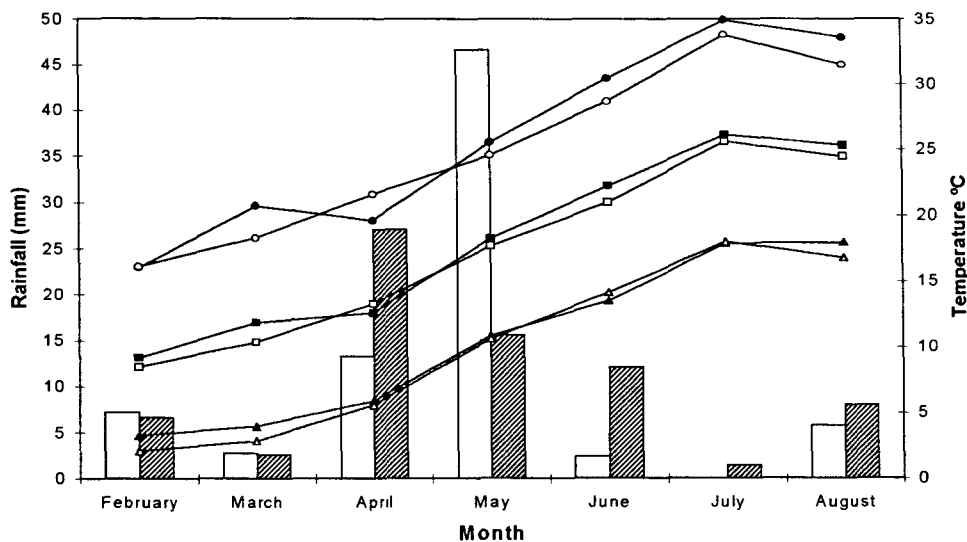
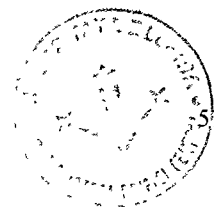


Figure 1. Monthly data over the experimental period for total rainfall (□ 1994 and ▨ 1995) and mean maximum (● ; ○), mean (■ ; □) and mean minimum (▲ ; △) temperatures for 1994 (closed symbols) and 1995 (open symbols).

Microflora assessment

Serial dilution of surface washings: Two buds, flowers or fruits were aseptically weighed, dissected and shaken in sterile phosphate buffer pH 7 (volume used depended on the development stage of apple analysed) using a rotatory shaker for 20 min at 150 rpm, and then sonication for 10 min in an ultrasound bath. This final step was used to improve the detachment of microorganisms from the fruit surface. Serial dilutions of the washings were made with four replicates per dilution, and 0.1 ml aliquots were spread-plated onto both Potato dextrose agar (PDA)+streptomycin sulphate and Plate count agar (PCA)+imazalil media in separate Petri dishes (Andrews and Kenerley, 1978). After incubation at 25 °C in the dark the filamentous fungi, yeasts and bacterial colonies were counted. The number of colony forming units (cfu) g⁻¹ of fresh weight tissue were calculated for each sample.



In all cases microscopic examination of individual colonies was carried out and sub-cultured, purified and stored at 4 °C on PDA or PCA if they were fungi or bacteria, respectively. Fungi were identified to genus level. Populations of bacteria were counted after 48-72 h and those of fungi after 7-10 days.

Sterile plating method: This method was used to isolate internal mycoflora of the apple material. Buds, flowers or fruits were surface-sterilized with 1% NaOCl for 5 min, 70% ethanol for 2 min and then rinsed in sterile water (Royse and Ries, 1978; Melgarejo *et al.*, 1985). Afterwards, they were aseptically dissected and direct plated on to PDA+streptomycin sulphate. After one week of incubation at 25 °C in the dark, presence or absence of the genera of filamentous fungus in each sample was estimated.

Table 2. Summary of sampling dates and developmental stages of Golden Delicious apples to evaluated microbial populations in 1994 and 1995.

SAMPLING NUMBER	Sampling dates		PHENOLOGICAL STAGE
	1994	1995	
1	February 25	February 27	Dormant bud
2	March 14	March 13	Pink bud
3	March 28	March 27	Blooming
4	April 11	April 10	Fruit set
5	April 25	April 24	Growing fruit
6	May 10	May 8	Growing fruit
7	May 26	May 22	Growing fruit
8	June 6	June 5	Growing fruit
9	June 20	June 19	Growing fruit
10	July 4	July 3	Growing fruit
11	July 18	July 17	Growing fruit
12	August 1	July 31	Growing fruit
13	August 16	August 14	Growing fruit
14	August 31	August 24	Harvest

Humidity chamber: Two buds, flowers or fruits were placed in sterile 15 cm glass Petri dishes containing sterile, moistened filter paper attached to the bottom and upper surfaces. After incubation for 3 days at 25 °C in the dark, the apple tissue was dissected and direct plated on the agar surface of PDA supplemented with 0.5 g l⁻¹ streptomycin sulphate in 9 cm Petri dishes, which were incubated at 25 °C for 4-5 days in the dark (De Cal and Melgarejo, 1992). Single colony isolates of the different fungi were removed, identified and stored at 4 °C.

Treatment of results

Data of cfu g⁻¹ fresh weight were transformed to logarithms to improve homogeneity of variances (Parbery *et al.*, 1981). An analysis of variance with SAS software was used. Statistical significance was judged at the $P < 0.05$ level. When the analysis was statistically significant the Duncan's Multiple Range Test for separation of means was used.

RESULTS

Weather data and dominance of microflora

Figure 1 summarises the temperature and rainfall patterns in 1994 and 1995. These were very consistent with the mean average temperature increasing from 12.5 °C in February to an optimum of 26 °C in July. Maximum rainfall occurred in April and May, with a much higher amount in May, 1994 than 1995.

The frequency of isolation of bacteria, yeasts and filamentous fungi in 1994 and 1995 at each different development stage is shown in Figure 2. This shows clearly that the isolation of populations of yeasts and filamentous fungi were in most cases greater than that of bacteria in both years. In general, the dominant filamentous fungal species isolated from the ripening Golden Delicious apples were from the *Cladosporium* genus (*C. herbarum* and *C. cladosporioides*) which represented 70.80% of the total fungal populations. Other important colonisers were *Alternaria* spp. (mainly *A. alternata*), followed by *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* and *Acremonium* spp., and occasionally by *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* and *Rhizopus* spp..

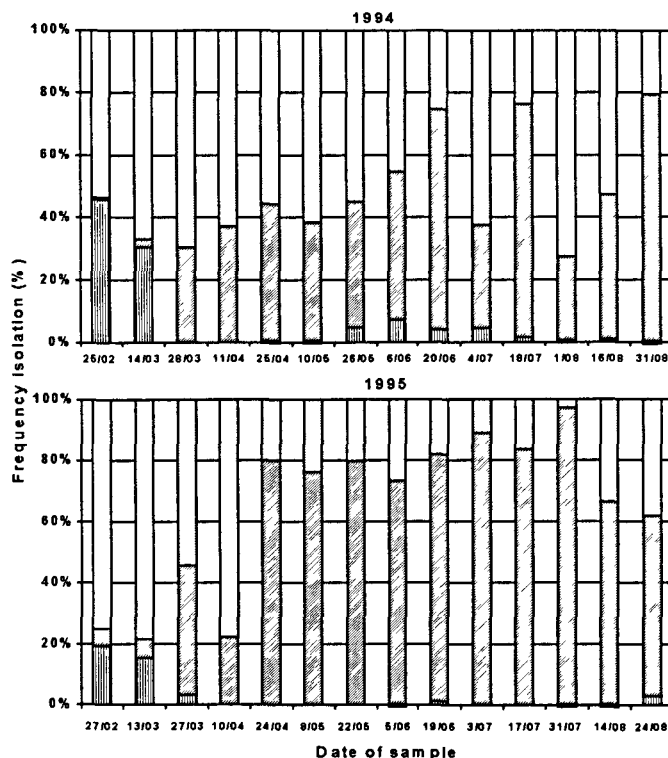


Figure 2. Frequency (%) of isolation of bacteria (▨), yeasts (▧) and filamentous fungi (□) from untreated ripening apples cv Golden Delicious from bud to harvest in 1994 and 1995. Mean data of 8 replicates.

Temporal changes in bacteria populations and effect of fungicides

Bacteria populations during two years study and fungicide effect on them is shown in Figure 3. Maximum populations were observed at bud stage (3.5×10^5 and 3.0×10^4 cfu g⁻¹ in 1994 and 1995 respectively). Afterwards, at third and fourth sampling populations decreased markedly until not being detectable with our method. At the end of June we could see another maximum point smaller than the first one, but at harvest moment bacteria populations were both years lower than 10^2 cfu g⁻¹.

Fungicide treatments do not decrease bacterial populations. Generally untreated apples have lower populations than fungicide-treated ones.

Temporal changes in yeast populations and effect of fungicides

The component yeast populations could be divided into white and pink yeasts. Maximum populations were reached at bud and pink bud development stages (give sizes of 3.5×10^5 and 1.0×10^5 cfu g⁻¹ in 1994 and 1995 respectively).

The populations of white yeasts isolated were always greater than that of pink yeasts during this study. The main white yeasts isolated were *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula* and *Pichia* spp.. Pigmented yeasts isolated mainly included *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* spp..

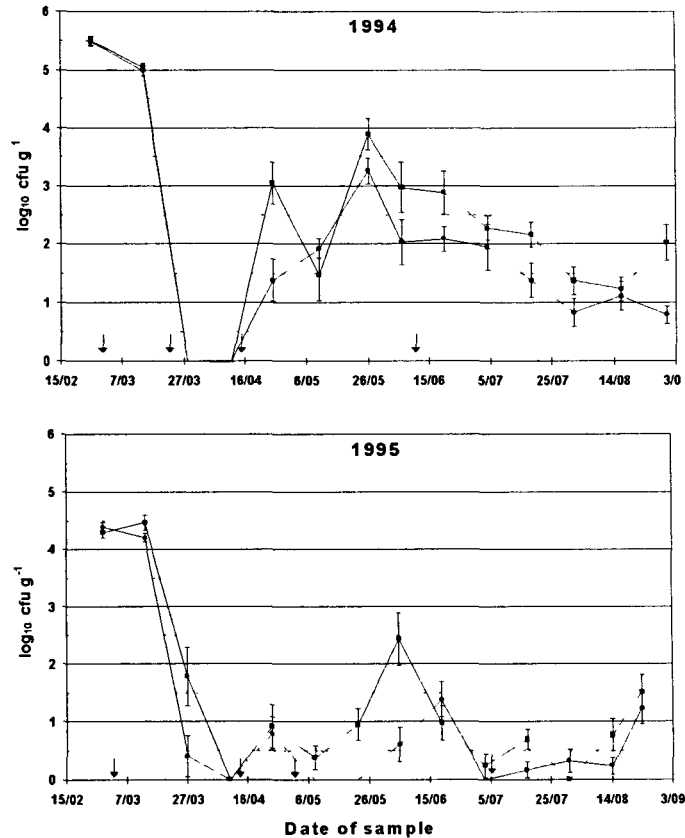


Figure 3. Populations of bacteria (\log_{10} of colony-forming units (cfu g⁻¹ fresh weight) isolated from different development stages of Golden Delicious apples treated with fungicides (■) or untreated (●), using the dilution plating technique, during two growing seasons study (1994 and 1995). Points represent the means of eight replications on each sampling date and treatment and vertical bars are standard errors. Arrows indicate date of fungicide applications.

The effect of fungicides on pink yeasts were different from that on white yeasts (Figure 4). With white yeasts, immediately after fungicide application the populations were almost always markedly decreased for 15-30 days. However, the pink yeast populations often increased to greater mean populations than on the untreated controls, particularly after the fungicide applications on 15th April and 6th June sprays in 1994, and during July in 1995.

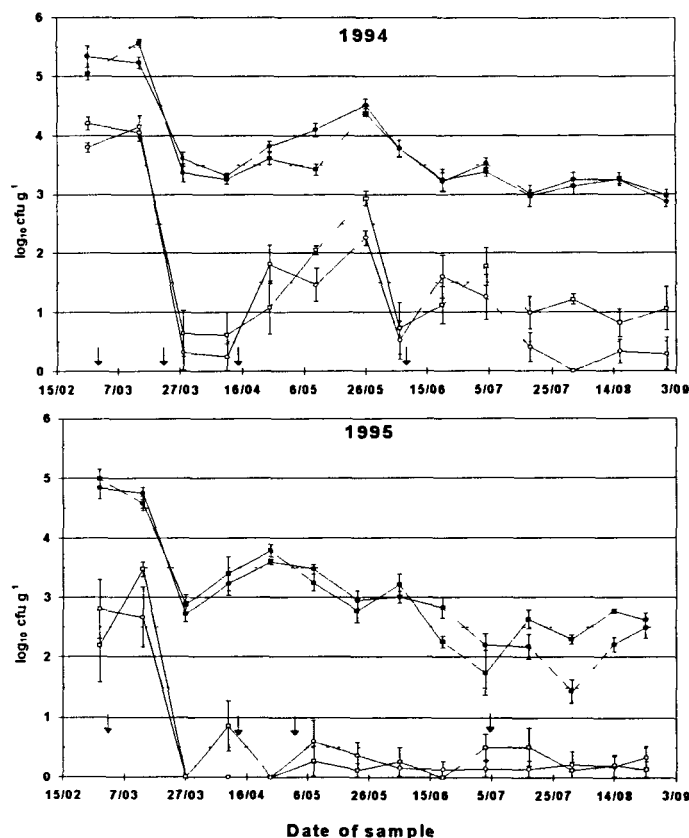


Figure 4. Populations of white yeasts (closed symbols) and pink yeasts (open symbols) (\log_{10} of colony-forming units (cfu g^{-1} fresh weight) isolated from different development stages of Golden Delicious apples treated with fungicides (\blacksquare ; \square) or untreated (\bullet ; \circ), using the dilution plating technique in 1994 and 1995. Points represent the means of eight replicates on each sampling date and for each treatment, and the vertical bars are standard errors. Arrows indicate the dates of fungicide application.

Temporal changes in predominant filamentous fungal colonisers isolated from washings and effect of fungicides on populations

In both growing seasons, high populations of moulds, yeasts and bacteria were isolated from developing buds, but the densities of these populations decreased rapidly as the buds burst and the blooming stage was reached. The total population of filamentous fungi, and the relative abundance of the main fungal genera found (*Cladosporium* spp. and *Alternaria* spp.) and their temporal patterns of colonization during fruit development until harvest in both 1994 and 1995 are shown in Figure 5 and 6, respectively. These show that the populations of filamentous fungi were initially similar during the dormant bud stage in 1994 and 1995. Maximum populations of the filamentous fungi occurred during spring time and reached

2.5×10^4 cfu g⁻¹ fresh weight (seventh sampling) in 1994 and 1.7×10^4 cfu g⁻¹ in 1995 (fifth sampling).

Four fungicide applications were made and the dates of application are indicated by arrows on Figure 5 and 6. This shows that total filamentous fungal populations were markedly reduced, particularly after application in June and July, 1994 and 1995 respectively (Figure 5). Figure 6 shows that in both years fungicide applications often reduced populations of *Cladosporium* and *Alternaria* genera present on maturing apples.

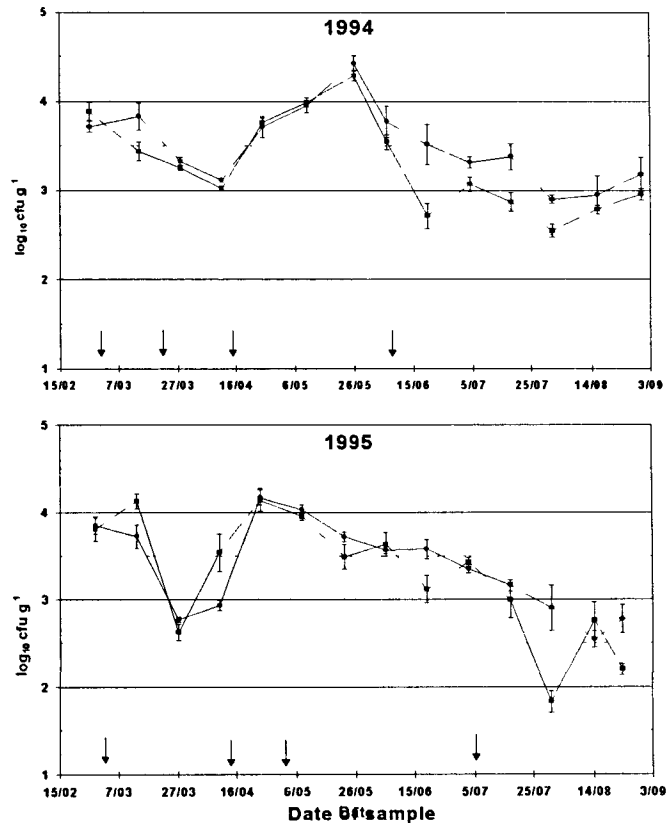


Figure 5. Populations of total filamentous fungi (log₁₀ of colony-forming units (cfu g⁻¹ fresh weight) isolated from different developmental stages of cv. Golden Delicious apples treated with fungicides (■) or untreated (●), using the dilution plating technique, during two growing seasons (1994 and 1995). Points represent the means of eight replicates on each sampling date and treatment, and vertical bars indicate standard errors of the mean. Arrows indicate the dates on which fungicides were applied.

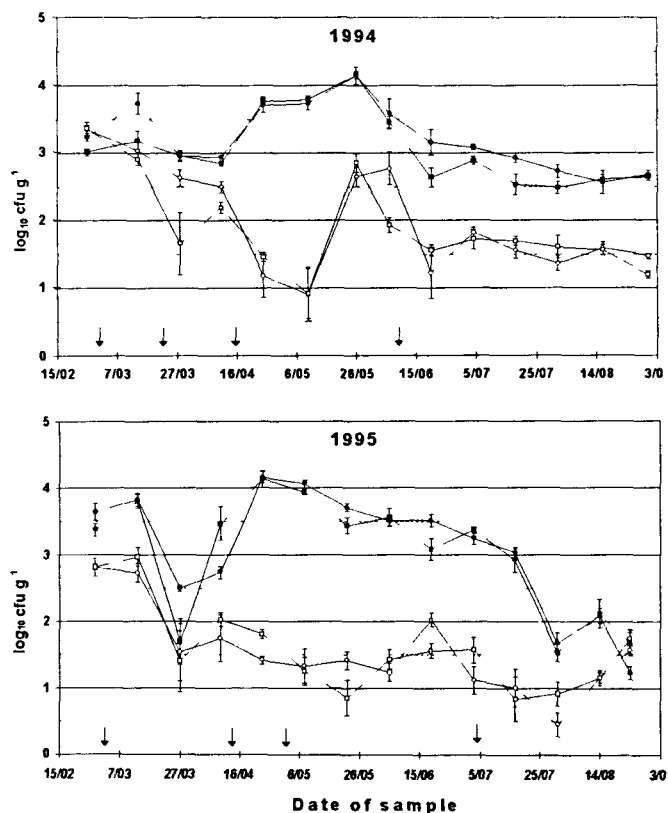


Figure 6. Populations of the dominant filamentous fungal genera, *Cladosporium* spp. (closed symbols) and *Alternaria* spp. (open symbols) (\log_{10} of colony-forming units (cfu g^{-1} fresh weight) isolated from different developmental stages of cv. Golden Delicious apples treated with fungicides (■ ; □) or untreated (● ; ○), using the dilution plating technique in 1994 and 1995. Points represent the means of eight replicates on each sampling date and for each treatment, and vertical bars are standard errors. Arrows indicate date of fungicide applications.

Table 3 compares the overall effect of fungicide treatments on total filamentous fungal populations and dominant component genera, yeasts and bacteria. This shows that there were statistically significant differences between untreated and fungicide-treated apples in filamentous fungi in both 1994 and 1995, with the former having significantly larger populations than the treated plots. There were also differences in *Cladosporium* spp. populations in 1994, but no effect on *Alternaria* spp. in both years. There was also no overall significant effect of fungicide application on yeasts. Untreated ripening apples had lower bacterial populations than fungicide-treated ones.

Table 3. Comparison of total mean microbial populations and the major components on ripening apples cv. Golden Delicious in untreated (-F) and fungicide-treated (+F) plots in 1994 and 1995. Data are mean \log_{10} cfu g⁻¹ fresh weight material. In each year means with different letters are significantly different at $P=0.05$.

	1994		1995	
	-F	+F	-F	+F
Total Filamentous fungi	3.53 a	3.29 b	3.38 a	3.27 b
<i>Alternaria</i> spp.	1.97 a	1.89 a	1.56 a	1.57 a
<i>Cladosporium</i> spp.	3.20 a	2.94 b	3.06 a	3.04 a
Total Yeasts	3.79 a	3.70 a	3.05 a	3.12 a
Bacteria	1.93 b	2.38 a	0.99 b	1.34 a

Isolation of endophytic fungi from apple tissue

Endophytic fungi were isolated at all development stages of maturing apples. The predominant fungi isolated with this method were *Alternaria* and *Cladosporium* spp. (Table 4 and 5). Occasionally other genera, including *Epicoccum*, *Fusarium* and *Acremonium* spp., were isolated from internal apple tissue.

Table 4. Frequency of isolation (%) of *Cladosporium* spp. after surface sterilization of apple tissue. Percentages shown represent the number of replicates (n = 8; +F, fungicide; -F, untreated control) from which *Cladosporium* spp. outgrowth was observed.

Number of sampling	1994		1995	
	-F	+F	-F	+F
1	0	0	0	0
2	25	0	12.5	0
3	50	12.5	25	12.5
4	50	25	25	25
5	87.5	87.5	62.5	62.5
6	62.5	75	50	50
7	100	100	50	62.5
8	100	100	62.5	50
9	25	62.5	75	50
10	37.5	12.5	25	0
11	50	12.5	50	50
12	50	50	37.5	25
13	62.5	25	25	37.5
14	62.5	25	62.5	25

Table 5. Frequency of isolation (%) of *Alternaria* spp. from sterilized apple tissue. Percentages shown represent the number of replicates (n=8; +F, fungicide; -F, untreated control) from which *Alternaria* spp. outgrowth was observed.

Number of sampling	1994		1995	
	-F	+F	-F	+F
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	25	37.5	25	37.5
4	50	25	25	25
5	100	100	100	100
6	75	100	100	100
7	100	100	75	100
8	100	100	100	100
9	100	100	100	100
10	100	100	100	100
11	100	100	100	75
12	100	100	87.5	62.5
13	100	100	100	100
14	100	100	100	100

Isolation of filamentous fungi from tissue incubated in humidity chambers

Dominant filamentous fungi isolated with this method were *Cladosporium* and *Alternaria* spp.. Other genus isolated were *Epicoccum*, *Fusarium*, *Botrytis* and *Nigrospora* spp..

Table 6 summarises the frequency of isolation of *Cladosporium* and *Alternaria* spp. from maturing apple tissue incubated under high humidity conditions. This shows that *Alternaria* were present in all samples even at the initial bud stage, while *Cladosporium* spp. started appearing later at the pink bud and blooming stages.

Table 6. Frequency of isolation (%) of *Cladosporium* and *Alternaria* spp. from tissue incubated in humid chambers. The percentages show the mean number of replicates from which the two genera were isolated (n=8; +F, fungicide; -F, untreated control).

Number of sampling	<i>Cladosporium</i> spp.				<i>Alternaria</i> spp.			
	1994		1995		1994		1995	
	-F	+F	-F	+F	-F	+F	-F	+F
1	0	0	0	0	100	100	100	87.5
2	62.5	62.5	25	12.5	100	100	100	100
3	50	87.5	62.5	62.5	100	100	100	87.5
4	100	62.5	100	87.5	100	100	100	100
5	100	100	87.5	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100
8	100	100	100	100	100	100	100	100
9	87.5	75	100	100	100	100	100	100
10	100	100	100	100	100	100	100	100
11	100	75	100	100	100	100	100	100
12	100	100	100	100	100	87.5	100	100
13	100	100	100	100	100	100	100	100
14	100	100	100	100	100	100	100	100

Discussion

This is the first detailed investigation of the population dynamics of both the external and internal microflora associated with apple development from bud through to harvest. Buds were colonised by a range of bacteria, yeasts and filamentous fungi. However, in the blooming stage a decrease in the populations was observed in all microorganisms. During the blooming stage there is a loss of external structures which could be heavily colonised by microflora. This could partially explain this marked decrease in microfloral populations. The main filamentous fungal genera isolated from different developmental stages of the Golden Delicious apples were *Cladosporium* and *Alternaria*. Pink and white yeasts were the next most important component groups of fungi. Filamentous fungal populations reached a maximum threshold at the 7th sampling in 1994 (May) and at the 5th sampling in 1995 (April). This parallels periods of highest rainfall and periods when the microclimate in the apple orchards had a high relative humidity

in these same months in 1994 and 1995. The observation that bacterial populations were more frequent in the bud stage than during subsequent developmental stages was of interest. The pH of each development stage may vary and therefore play an important role in microbial establishment on the developing apples. Buds have a less acidic pH than the ripening fruits and could thus be a better niche for bacteria than yeasts and filamentous fungi.

Previously, Pennycook and Newhook (1981) found that 60-80 % of colonies isolated from buds and apple leaves were *Cladosporium* spp.. However, studies of the mycoflora of cider apples suggested that *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum* were the main species present on the apple surface (Bizeau *et al.*, 1990) with *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium* spp. less represented. The isolation technique of this last experience was direct plating of epidermal samples on to the media.

The present study showed that the preharvest fungicide applications depressed the total fungal populations significantly, but for variable lengths of time. The effect of fungicides between dormant bud and the fruit set stage (mid-February to mid-April) was not as pronounced as later on the maturing fruit. However, over the whole growing season the overall filamentous fungal populations were significantly lower on fungicide-treated apple trees than on untreated ones. This contrasts with the effect on bacteria where greater populations were isolated from fungicide-treated apples than untreated ones. It is possible that reduction in filamentous fungal populations enabled better colonisation and occupation of the apple surface niche by bacteria which may be less affected by fungicide applications. Interestingly white yeasts were always more numerous than pink yeasts. Hislop and Cox (1969), Warren (1976) and Pennycook and Newhook (1981) have reported the same pattern from buds of several deciduous tree species. Generally populations of white yeasts were depressed for approx. 15-30 days after an individual fungicide spray. This compares favourably with the effects of fungicide applications on yeasts and filamentous fungal populations on flag leaves and ripening ears of cereals (Magan and Lacey, 1986; Magan and Mcleod, 1991). However, in the comprehensive study on the impact of a full pesticide programme (21 treatments of insecticides, bactericides and fungicides) on apple leaves of cv. McIntosh, Andrews and Kenerley (1978) found that bacteria, yeasts and filamentous fungi were consistently reduced by the extensive pesticide programme employed over the period May through to October. *A. pullulans*, a dominant coloniser of apple leaves in their study in Wisconsin, USA was relatively unaffected by the pesticide applications. The range of microflora found was also very wide when compared to that observed on ripening apples in the present study.

However, *A. pullulans* was not very common on ripening apples in northern Spain as in the USA.

The differential effects of fungicides on constituents of the phyllosphere microflora has been discussed by Blakeman (1985), who suggested that the growth of saprophytic fungi was inhibited by broad spectrum fungicides but that these have little effect on bacteria. In the present study white yeasts were more sensitive to fungicide treatment than pink yeasts. The populations of pink yeasts often recovered rapidly (within 15 days), often reaching populations sizes markedly greater than those of the untreated controls. This difference was not observed in studies of fungicide effects on yeast colonisation of leaves and ripening ears of cereals (Fokkema and De Nooij, 1981; Magan and Lacey, 1986).

In the present study, the first sampling date for endophytes occurred at the dormant bud stage, with developing buds extensively colonised by fungi (predominantly *Alternaria* spp.). Previous studies suggested that infection occurred 3 or 6 weeks before harvesting (Taylor, 1955; Raina *et al.*, 1971) or during and shortly after full blooming (Marshall and Walkley, 1951; Ellis and Barrat, 1983; Combrick *et al.*, 1985a). Results of our study however, prove that buds are infected at a stage much earlier than previously believed. Presence of *Alternaria* spp. at the bud stage suggest that this pathogen is in fact dormant inside the apple tissue, perhaps protected from the fungicides and under suitable conditions cause disease. This finding may need further investigation to understand the mechanisms involved in endophytic colonisation of apple tissue perhaps by using electron microscopy and immunogold labelling to identify the specific tissues colonised. Although, previously Andrews and Kenerley (1980) suggested that surface sterilization was not the most adequate method to discriminate between external and internal bud microflora, specially with apple buds, where overlapping bud scales may trap fluid which can serve as a suitable nutrient source for infecting apple tissue.

Most apple cultivars susceptible to core rot have an open calyx tube (Spotts, 1988), and some authors have speculated that pathogens and microorganisms in general enter the core cavity in this way (Beech and Davenport, 1970; Pierson *et al.*, 1971). However, cv. Golden Delicious apples which were examined in the present study, has a closed calyx tube which is still colonised by fungi. This suggests that other factors may also be involved in determining the presence of endophytes including microclimatic conditions, resistance of the tissue and perhaps cultivar.

Use of humid chambers to incubate washed tissue segments has been described as a good method to isolate fungi which are predominantly mycelial in form or do not sporulate profusely (Andrews and Kenerley, 1980; De Cal and Melgarejo, 1992).

This method provided qualitative data showing that fungi such as *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Nigrospora* and *Alternaria* spp. were also present

It was surprising that *Penicillium* spp., particularly *P. expansum*, the major cause of postharvest diseases of apples in Spain was seldom isolated pre-harvest in both 1994 and 1995. Neither *Botrytis cinerea* which is an important pathogen in postharvest apples has appeared significantly during this study. This confirms earlier studies by Usall and Viñas (1989), who found that the presence of *Penicillium* spp. in apple orchards just prior to harvest was insignificant in northern Spain.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Government (CICYT Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología grant ALI96-0567) and the Catalanian Government (CIRIT Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia) for their financial support.

References

- ANDREWS, J H and KENERLEY, C M 1978 The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations on apple leaves *Can J Microbiol*, 24 1058-1072
- ANDREWS, J H and KENERLEY, C M 1980 Microbial populations associated with buds and young leaves of apple *Can J Bot*, 58 847-855
- ANDREWS, J H and KENERLEY, C M 1981 Direct observation and enumeration of microbes on plant surfaces by light microscopy. In *Microbial Ecology of the Phylloplane* Blakeman, J P (Ed) Academic Press, London p 3-14
- BEECH, F W and DAVENPORT, R R 1970 The role of yeasts in cider making. In *The yeasts* Rose, A H and Harrison, J S (Eds) Academic Press, London p 73-146
- BIZEAU, C, MOREAU, C, MICHEL, P and PONCHANT, D 1990 Microflore fongique de la carposphere de pommes a cidre *Cryptogamie Micol*, 11 1-12
- BLAKEMAN, J P 1981 *Microbial Ecology of the phylloplane* Academic Press London
- BLAKEMAN, J P 1985 Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In *Biological control of the phylloplane* Windels, C E and Lindow, S E (Eds) Annual Phytopathology Society, St Paul Minnesota p 6-30

- BLAKEMAN, J.P. and FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annu Rev. Phytopathol*, 20: 167-192.
- COMBRINK, J.C. and GINSBURG, L. 1973. Core rot in Starking apples- a preliminary investigation into the origin and control. *Deciduous Fruit Grower*, 23: 16-19.
- COMBRINK, J. C., KOTZE, J.M. and VISAGIE, T.R. 1985a. Colonization of apples by fungi causing core rot. *Hortic. Science*, 2: 9-13.
- COMBRINK, J.C., KOTZE, J.M., WEHNER, F.C. and GROBBELAAR, C.J 1985b Fungi associated with core rot of Starking apples in South Africa. *Phytophylactica*, 17: 81-83.
- DAVENPORT, R.R. 1976. Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. Dickinson, C.H. and Preece, T.F. (Eds.). Academic Press. London. p. 325-349.
- DE CAL, A. and MELGAREJO, P. 1992. Interactions of pesticides and mycoflora of peach twigs. *Mycol. Res.*, 96: 1105-1113.
- DE KOCK, S.L., VISAGIE, T.R. and COMBRINK, J.C. 1991. Control of core rot in Starking apples *Deciduous Fruit Grower*, 41: 20-22.
- DICKINSON, C.H. and PREECE, T.F. 1976. *Microbiology of aerial plant surfaces*. Academic Press. New York.
- DICKINSON, C.H. and WALLACE, B. 1976. Effects of late application of foliar fungicides on activity of microorganisms on winter wheat flag leaves. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 76: 103-112.
- ELLIS, M.A. and BARRAT, J.G. 1983. Colonization of Delicious apple fruits by *Alternaria* spp. and effect of fungicide sprays on moldy-core. *Plant Dis.*, 67: 150-152.
- FOKKEMA, N.J. 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. In *Microbiology of aerial plant surfaces*. Dickinson, C.H. and Preece, T.F. (Eds.) Academic Press. London. p. 487-506.
- FOKKEMA, N.J. and DE NOOIJ, M.P. 1981. The effect of fungicides on the microbial balance in the phylloplane. *European Plant Protection Organization Bulletin*, 11: 303-310
- HISLOP, E.C. 1976. Some effects of fungicides and other agrochemicals on the microbiology of the aerial surfaces of plant. In *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Dickinson, C.H. and Preece, T.F. (Eds.). Academic Press Inc. New York. p. 41-74.
- HISLOP, E.C. and COX, T.W. 1969. Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 52: 223-235.
- KLEENER, P.D 1945. Microflora of buds. *Science (N.S.)*, 102: 383-384.

- LEBEN, C. 1965. Epiphytic micro-organisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 3: 209-230.
- LEBEN, C. 1971. The bud in relation to the epiphytic microflora. In *Ecology of leaf surface micro-organisms*. Preece, T.F. and Dickinson, C.H. (Eds.). Academic Press Inc. New York. p. 117-127.
- LEBEN, C. 1972. Micro-organisms associated with plant buds. *J. Gen. Microbiol.*, 71: 327-331.
- MAGAN, N. and LACEY, J. 1986. The phylloplane microflora of ripening wheat and effect of late fungicide applications. *Ann. Appl. Biol.*, 109: 117-128.
- MAGAN, N. and MCLEOD, A.R. 1991. Effect of open-air fumigation with sulphur dioxide on the occurrence of phylloplane fungi on winter barley. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 33: 245-261.
- MARSHALL, C.R. and WALKLEY, V.T. 1951. Some aspects of microbiology applied to commercial apple juice production. I. Distribution of microorganisms on the fruit. *Food Res.*, 16: 448-456.
- MELGAREJO, P., CARRILLO, R. and SAGASTA, E.M. 1985. Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 85: 313-317.
- MELGAREJO, P., CARRILLO, R. and SAGASTA, E.M. 1986. Study on the epiphytic mycoflora of peach twigs and flowers. *Phytopathologia Mediterranea*, 25: 68-72.
- PARBERY, I.H., BROWN, J.F. and BOFINGER, V.J. 1981. Statistical methods in the analysis of phylloplane populations. In *Microbial Ecology of the Phylloplane*. Blakeman, J.P. (Ed.) Academic Press. Inc. London. p. 47-65.
- PENNYCOOK, S.R. and NEWHOOK, F.J. 1981. Seasonal changes in the phylloplane microflora. *New Zeal. J. Bot.*, 19: 273-283.
- PIERSON, C.F., CEPONIS, M.J. and MCCOLLOCH, L.P. 1971. *Market diseases of apples, pears and quinces*. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook 376. United States Government Printing Office, Washington.
- PREECE, T.F. and DICKINSON, C.H. 1971. *Ecology of leaf surface micro-organisms*. Academic Press. London.
- RAINA, G.L., BEDI, P.S. and DUTT, S. 1971. Occurrence of core rot of apple in nature in the Kulu valley of Himachal Pradesh, India. *Plant Dis. Rep.*, 55: 283-284.
- ROYSE, D.J. and RIES, S.M. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68: 603-607.
- SPOTTS, R.A. 1988. Moldy core and core rote. In *Compendium of apple and pear diseases*. Jones, A.L. and Aldwinckle, H.S. (Eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota. p. 29-30.
- TAYLOR, J. 1955. Apple black rot in Georgia and its control. *Phytopathology*, 45: 392-398.

USALL, J. and VINAS, I. 1989. Contaminació fúngica en pre-recol·lecció en pomes destinades a frigoconservació de la comarca del Segrià. *Frut*, 6: 250-253.

WARREN, R.C. 1976. Microbes associated with buds and leaves: some recent investigations on deciduous trees. In *Microbiology of aereal plant surfaces*. Dickinson, C.H. and Preece, T.F. (Eds.) Academic Press. London. p. 361-374.

WILLIAMS, A.J., WALLACE, R.H. and CLARK, D.S. 1956. Changes in the yeast population on Quebec apples during ripening. *Can. J. Microbiol.*, 2: 645-648.

