



**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

## ANNEX FOTOGRÀFIC

A vegades realment és cert que "una imatge val més que mil paraules", és per aquest motiu que a continuació es posen una sèrie de fotografies per tal de descriure algunes de les metodologies utilitzades en el present treball



**Fotografia 1.** Vista general d'alguns dels passos seguits en els mètodes de rentat i dilució i d'esterilització per tal d'aïllar la microflora present en les mançanes durant els seus diferents estats fenològics. (Capítols 2 i 3)



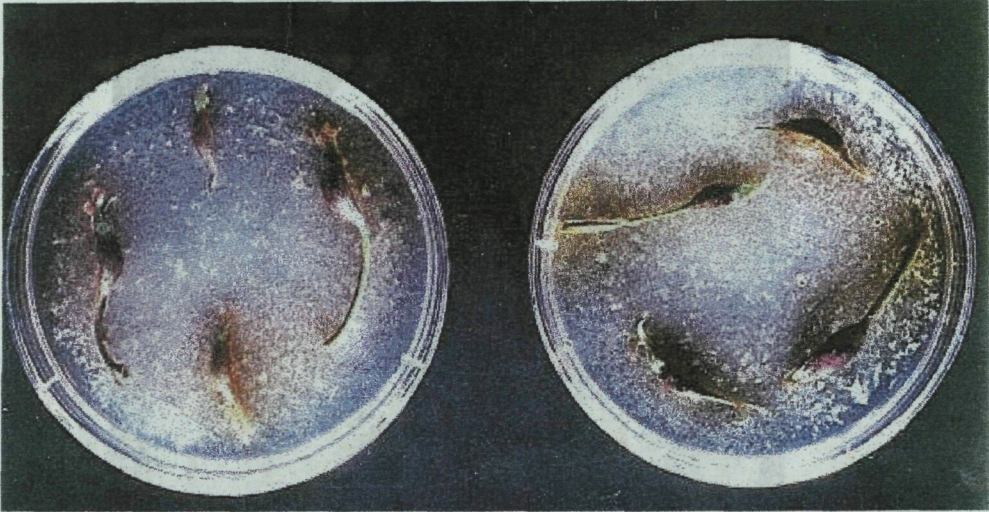
Fotografia 2. Placa pertanyent al mètode de rentat i dilució en medi PDA per tal d'aïllar la flora fúngica (floridures i llevats) pròpia de la mançana "Golden Delicious" en els diferents estats fenològics.



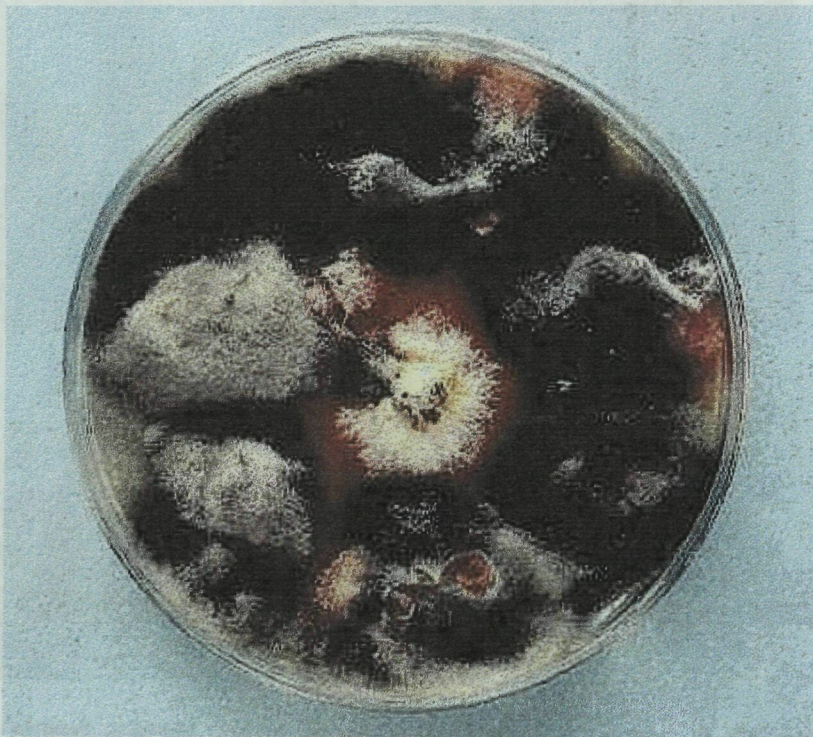
**Fotografia 3.** Imatge corresponent al mètode de cambres humides. Sembra de les diferents parts de flors de mançanes sobre medi PDA just després de la sembra i abans de la incubació.



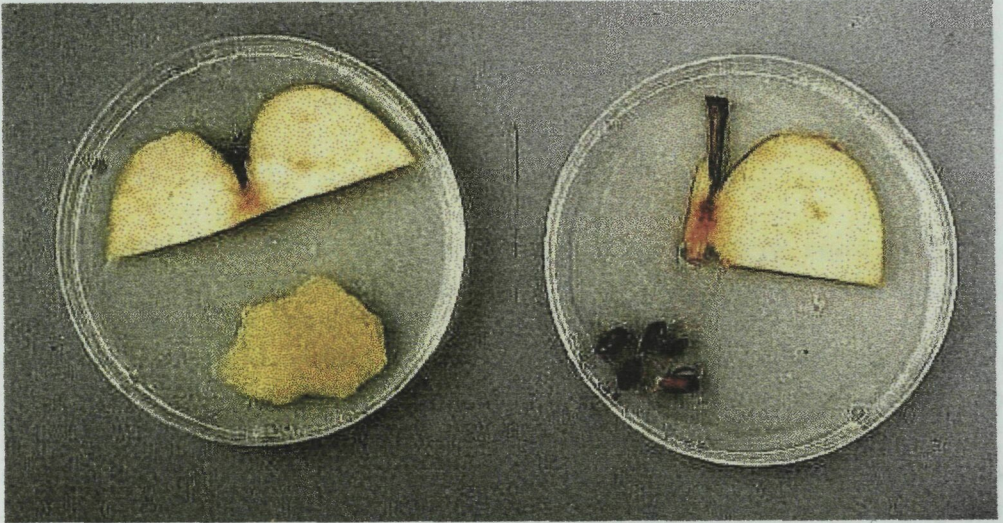
**Fotografia 4.** Imatge corresponent al mètode de cambres humides. Sembra de les diferents parts de flors de mançanes sobre medi PDA després del període d'incubació. Destacar la presència del gènere *Alternaria*.



**Fotografia 5.** Imatge corresponent al mètode d'esterilització. Sembrada dels diferents trossos de mançanes en estadi de creixement del fruit sobre medi PDA just després de la sembra i abans de la incubació



**Fotografia 6** Imatge corresponent al mètode de cambres humides. Sembrada de diferents trossos de mançanes en estadi de creixement del fruit sobre medi PDA després del període d'incubació.



**Fotografia 7.** Imatge corresponent al mètode d'esterilització. Sembrada dels diferents trossos de mançanes en estadi de maduració del fruit (proper a la collita) sobre medi PDA just després de la sembra i abans de la incubació



**Fotografia 8.** Imatge corresponent al mètode d'esterilització. Sembrada dels diferents trossos de mançanes en estadi de maduració del fruit (proper a la collita) sobre medi PDA just després del període d'incubació



## RESUM

El desenvolupament de resistència als fungicides per part de molts patògens en postcollita de fruita i vegetals, una manca d'adequats substituïts pels fungicides i una preocupació creixent de la societat respecte als perills sanitaris i mediambientals que comporten els pesticides i els seus residus, han generat un gran interès pel desenvolupament de mètodes alternatius, efectius però més respectuosos amb el medi ambient. El control biològic mitjançant la utilització de microorganismes ha sorgit com una de les alternatives més prometedores. La soca CPA-1 del llevat *Candida sake*, el qual s'ha aïllat de la superfície de mançanes al nostre laboratori, ha demostrat tenir una bona capacitat antagonica enfront els principals fongs patògens en postcollita de fruita de llavor. L'aplicació d'antagonistes en precollita per controlar les malalties de la fruita de llavor en postcollita podria ser un mètode avantatjós ja que podria prevenir infeccions latents, permetria una menor manipulació de la fruita i disminuiria potencialment els danys i ferides que es donen durant qualsevol dels tractaments de postcollita. Així mateix, es reduiria el període entre la collita i l'emmagatzemament en fred i s'evitaria la contaminació addicional per patògens que suposa el tractament químic de la fruita en el "drencher". No obstant, fins ara l'aplicació d'agents de biocontrol en el camp s'ha vist limitada per la sensibilitat que aquests tenen a l'estrès mediambiental, ja que els microorganismes tenen uns intervals de creixement molt limitats tant pel que fa a la temperatura com a la humitat.

Els objectius del present estudi han estat la determinació de la dinàmica poblacional de la microflora natural de les mançanes "Golden Delicious" durant diferents estadis de desenvolupament (Capítol 2), durant la conservació en fred i durant el període de simulació de la comercialització o "shelf life" de la fruita, i avaluar l'efecte que té el tractament amb *C. sake* en la microflora pròpia de les mançanes (Capítol 3). D'altra banda, volia avaluar-se el potencial pràctic de la utilització de l'antagonista al camp per aconseguir un bon control de l'agent causant de la principal malaltia en postcollita de mançanes, *Penicillium expansum* (Capítol 4). Tantmateix, els estudis detallats sobre l'ecofisiologia de *C. sake* han permès identificar mètodes per millorar la tolerància de les cèl·lules a l'estrès mediambiental, la seva viabilitat i adaptació (Capítols 5 i 6); i, mitjançant la manipulació del contingut de les reserves endògenes acumulades, millorar el creixement en el camp i aconseguir un bon nivell de biocontrol de la podridura causada per *Penicillium* mitjançant el tractament a camp (Capítol 6).



La població microbiana total va variar segons l'estat de desenvolupament del fruit, així com també amb les condicions climàtiques. La microflora predominant en les mançanes durant el seu desenvolupament van ser les floridures *Cladosporium*, *Alternaria* spp. i els llevats blancs. D'altra banda, les floridures patògenes més importants en postcollita, *P. expansum* i *Botrytis cinerea*, rarament es van aïllar durant el desenvolupament del fruit. En canvi, la presència del gènere *Penicillium* en les mançanes va esdevenir important durant la seva conservació en fred i durant el període de "shelf life" després de la conservació. La població bacteriana va ser màxima a l'estadi de borró i va disminuir durant el període de desenvolupament del fruit, éssent rarament aïllades durant la collita i la conservació en fred. L'aplicació de *C. sake* en mançanes, dos dies abans de la collita, va reduir significativament la població de *Cladosporium* i *Penicillium* spp. al final de la conservació en fred i durant el període de simulació de la comercialització. No obstant, l'aplicació del llevat antagonista en precollita, en mançanes foradades i inoculades artificialment va resultar menys efectiva contra la podridura per *P. expansum* que el tractament en postcollita amb *C. sake*. La població de l'antagonista aplicada en precollita sobre mançanes "Golden Delicious" i amb danys artificials, disminueix abans i més ràpidament que quan es tracta en postcollita. Es fa necessària doncs, més recerca per entendre la raó per la qual es dona aquesta supervivència més baixa de *C. sake* quan s'aplica en precollita i després s'emmagatzema en fred.

Es van dur a terme estudis detallats d'ecologia i fisiologia de *C. sake* per a identificar l'efecte de l'activitat d'aigua ( $a_w$ ), temperatura, pH i la seva interacció en el seu creixement per així identificar els seus límits de creixement mediambientals. Es va trobar que les condicions mediambientals en les que l'agent de biocontrol pot desenvolupar-se estan limitades per una  $a_w$  mínima entre 0.90 i 0.92. *C. sake* va resultar tolerant a un ampli rang de pH (entre 3 i 7), independentment de l' $a_w$  i la temperatura.

Els polihidroxialcohols i els sucres que es van acumular en major proporció en les cèl.lules de *C. sake* crescudes en medi basal no modificat (NYDB) van ser arabitol, trealosa i glucosa, amb petites quantitats de glicerol i eritritol. En experiments *in vitro*, el creixement de *C. sake* en medi amb  $a_w$  reduïda (0.96) va resultar en una modificació d'aquestes reserves endògenes i una millora de la viabilitat a baixa  $a_w$  quan es compara amb cèl.lules no modificades. En assaigs de laboratori, les cèl.lules de *C. sake* modificades van mantenir la seva efectivitat i fins i tot la van millorar enfront la podridura causada per *P. expansum* en mançanes "Golden Delicious". En assaigs de camp, però, no es van observar millores significatives en el control de la podridura per *P. expansum* en postcollita de mançanes foradades artificialment i infectades quan comparem cèl.lules no modificades i cèl.lules

tolerants a  $a_w$  baixes. Immediatament després de l'aplicació de l'antagonista en precollita, es va observar que les cèl.lules no modificades es van adherir millor a la superfície de la poma que no pas les modificades. No obstant, després d'unes hores sota condicions de camp, la població de cèl.lules  $a_w$ -tolerants va augmentar significativament, mentre que la població de cèl.lules no modificades va romandre constant. És possible que els requeriments energètics per a la producció d'elevades concentracions de reserves endògenes puguin resultar en una modificació de la concentració o característiques de la matriu extracel.lular del llevat. Probablement una millora de l'adherència de les cèl.lules modificades podria donar lloc a millores en l'efectivitat.

Així doncs, aquest enfoc es presenta com una via interessant per a poder aconseguir alguns avantatges en la formulació dels antagonistes, intentant fer-los més tolerants a baixes  $a_w$  permetent-los-hi així, un establiment més efectiu al camp, conservant l'eficàcia com a agents de biocontrol. En aquest aspecte, l'estudi va demostrar que existeix un gran potencial per a la utilització de mitjans ecofisiològics que millorin l'adaptació ecològica dels agents de biocontrol aplicats al camp.

## RESUMEN

El desarrollo de resistencia a los fungicidas por parte de muchos patógenos de postcosecha de frutas y vegetales, la falta de substitutos adecuados a los fungicidas, y el creciente interés social sobre los peligros ambientales y de salud que tienen estos pesticidas, han generado un gran interés en el desarrollo de métodos de control alternativos que sean ambientalmente más favorables. El control biológico empleando microorganismos ha surgido como una de las alternativas más prometedoras. La levadura *Candida sake* (cepa CPA-1), aislada en nuestro laboratorio a partir de manzanas, ha demostrado tener actividad antagonica frente a los principales patógenos de postcosecha en fruta de pepita. Su aplicación en precosecha para el control de las enfermedades presentes en fruta de pepita en postcosecha sería beneficiosa por varias razones. En primer lugar conseguiríamos una prevención de infecciones latentes, además se requeriría una menor manipulación de la fruta y disminuiría la posibilidad de daños y heridas durante los tratamientos de postcosecha. Los periodos de tiempo entre la cosecha y la conservación en frío se reducirían y finalmente se evitaría la contaminación adicional debida a patógenos fúngicos procedentes de los tratamientos químicos de la fruta en el “drencher”. Sin embargo, la aplicación de agentes de biocontrol en campo se ve limitada por la sensibilidad de los microorganismos al estrés ambiental, especialmente a la humedad relativa y a la temperatura.

Los objetivos del presente estudio han sido, la determinación de la dinámica de población microbiana propia de las manzanas “Golden Delicious” a lo largo de las diferentes fases de su crecimiento (Capítulo 2), durante la conservación en frío y el período de vida útil o “shelf life”, y la evaluación del efecto del tratamiento de *C. sake* sobre la microflora natural (Capítulo 3). También se han llevado a cabo estudios de la aplicabilidad del agente de biocontrol en precosecha; para ello se realizaron inoculaciones en campo del antagonista con el fin de lograr un control adecuado del agente causal de la principal enfermedad de postcosecha de manzanas, *P. expansum* (Capítulo 4). Los estudios detallados de la ecofisiología de *C. sake* han fijado los métodos para mejorar la tolerancia de las células al estrés ambiental, su viabilidad y adaptación ecológica (Capítulos 5, 6) y, mediante manipulación del contenido de azúcares y polialcoholes intracelulares, el aumento de su crecimiento en campo y el mantenimiento del biocontrol de la podredumbre de *Penicillium* en el tratamiento en precosecha (Capítulo 7).

Se ha encontrado que la población microbiana total varía con el estado de desarrollo de la fruta y con las condiciones climáticas. La flora predominante durante el desarrollo de las manzanas fueron los mohos filamentosos *Cladosporium* y *Alternaria* spp. y las levaduras blancas. Sin embargo, los

patógenos más importantes en postcosecha, *P. expansum* y *Botrytis cinerea*, raramente fueron aislados de manzanas durante los diferentes estadios de desarrollo. Por el contrario, la presencia del género *Penicillium* llegó a ser importante en las manzanas durante las etapas finales de la conservación en frío y en el período de “shelf life”. La población bacteriana fue máxima en el estadio de yema y disminuyó durante el período de desarrollo de las manzanas, aislándose raramente en el momento de la cosecha y durante la conservación en frío. La aplicación en precosecha de *C. sake* a las manzanas dos días antes de su recolección disminuyó significativamente las poblaciones de *Cladosporium* y *Penicillium* spp. al final de las condiciones de conservación en frío y durante el período de vida útil ambiental. Sin embargo, la aplicación en precosecha de la levadura antagonista fue menos efectiva contra la podredumbre de *Penicillium* en manzanas artificialmente heridas e inoculadas que el tratamiento de postcosecha con *C. sake*. Las poblaciones de *C. sake* aplicada en precosecha sobre manzanas “Golden Delicious” y con daños artificiales, disminuyen antes y más rápidamente que cuando el tratamiento es en postcosecha. Por esta razón se necesita una investigación adicional que permita entender por qué *C. sake* presenta una menor supervivencia cuando la aplicación se realiza en precosecha y posterior conservación en frío. Para ello, se llevaron a cabo estudios de la ecología y fisiología de *C. sake* con el fin de determinar el efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura, pH y su interacción en el crecimiento del microorganismo, y poder así fijar los límites ambientales del antagonista. Se encontró que las condiciones ambientales en las cuales este agente de biocontrol crece efectivamente estaban limitadas por una  $a_w$  entre 0.90 - 0.92. *C. sake* fue tolerante a un amplio intervalo de pH (3-7), independientemente de la temperatura y de la  $a_w$ .

Los principales polihidroalcoholes y los azúcares intracelulares acumulados en *C. sake* crecida en un medio base no modificado (NYDB) fueron el arabitol, la trealosa y la glucosa junto con pequeñas cantidades de glicerol y eritritol. En experiencias *in vitro* la producción de *C. sake* en un medio con  $a_w$  reducida (0.96) dió como resultado una modificación significativa de estas reservas endógenas y una mejora en la viabilidad a baja  $a_w$ , comparada con células no modificadas. El biocontrol de *P. expansum* en manzanas “Golden Delicious” se mantuvo con este inóculo modificado tolerante a baja  $a_w$ , y en algunos casos, incluso fue mejor en ensayos de laboratorio. Sin embargo, no se observaron mejoras significativas en el biocontrol en postcosecha de la podredumbre de *P. expansum* en manzanas artificialmente heridas e inoculadas en ensayos de campo con células de *C. sake*  $a_w$ -tolerantes y no modificadas. Inmediatamente después de la aplicación en precosecha del antagonista se observó una mejor adherencia a la superficie de la manzana de las células de levadura no modificadas frente a las del inóculo

modificado. No obstante, después de unas pocas horas en condiciones de campo las poblaciones del inóculo  $a_w$ -tolerantes aumentaron significativamente, mientras que las poblaciones del tratamiento no modificado permanecieron sin cambios. Estos resultados nos hacen pensar que la energía necesaria para la producción de altas concentraciones de reservas endógenas pueda producir una modificación de la concentración o características de la matriz extracelular de la levadura. Probablemente una mejora en la adherencia de las células modificadas podría traducirse en una mayor efectividad.

Así pues, algunas de estas ventajas ecológicas deberían ser aprovechadas en la formulación del inóculo tolerante a  $a_w$  bajas para de esta forma lograr una estabilidad más efectiva en el campo, conservando su eficacia en el biocontrol. Este aspecto del estudio demostró que el empleo de medios ecofisiológicos para mejorar la adaptación ecológica de los agentes de biocontrol y para su aplicación en campo es altamente prometedora, y que ésto podría tener un profundo impacto en el desarrollo de agentes de control biológico efectivos en precosecha.

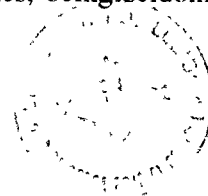
---

## SUMMARY

The development of resistance to fungicides by many postharvest pathogens of fruits and vegetables, a lack of adequate fungicide replacements, and growing public concern over health and environmental hazards from pesticides, have together generated new interest in the development of alternative more environmentally friendly control methods. Biological control using microorganisms has emerged as one of the most promising alternatives. The yeast *Candida sake* (strain CPA-1), which was isolated from the apple surface in our laboratory, has been demonstrated to have antagonistic activity against the major postharvest pathogens of pome fruits. Preharvest antagonist application for postharvest control of pome fruit diseases would be advantageous as latent infections may be prevented, less fruit manipulation would be required, and it would decrease the potential for damage and injuries during any postharvest treatments. The time periods between harvest and cold storage would be reduced and additional contamination by pathogenic fungi from drenching solutions used during chemical treatments would be avoided. However, application of biocontrol agents in the field has been limited by sensitivity to environmental stresses including a narrow relative humidity and temperature range.

The aims of the present study were to determine the microbial population dynamics on Golden Delicious apples during different developmental stages (Chapter 2), during cold storage and the ambient shelf-life period, and evaluate the effect of *C. sake* treatment on the resident microflora (Chapter 3). Studies of the practical potential of using field inoculation of the antagonist to achieve good control the responsible agent of the major postharvest disease of apples in Spain, *Penicillium expansum*, was investigated (Chapter 4). Detailed studies of the ecophysiology of *C. sake* identified methods for improving the environmental stress tolerance of cells, their viability and ecological fitness (Chapters 5, 6); and by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content, to enhance growth in the field and conserve biocontrol of *Penicillium* rot by field treatment (Chapter 7).

Total microbial populations were found to vary with development stage, and with prevailing climatic conditions. The predominant mycoflora on apples during development were the filamentous fungi *Cladosporium* and *Alternaria* spp. and white yeasts. However, the most important postharvest pathogens *P. expansum* and *Botrytis cinerea* were seldom isolated from ripening apples. On the contrary, the presence of the *Penicillium* genus became important on apples during later cold storage and ambient shelf-life period. Bacterial populations were maximum at the bud stage and decreased during the development period of apples, being seldom



isolated at harvest and during cold storage. Preharvest application of *C. sake* to apples two days before harvest significantly decreased populations of *Cladosporium* and *Penicillium* spp. by the end of cold storage conditions and during ambient shelf-life period. However, preharvest application of the antagonistic yeast was less effective against *Penicillium* rot in artificially inoculated and wounded apples than postharvest treatment with *C. sake*. *C. sake* populations decreased faster after preharvest application than when applied postharvest during subsequent cold storage. Further research was thus needed to understand the reason for the lower survival of *C. sake*, when applied preharvest during subsequent cold storage. Detailed studies were carried out on the ecology and physiology of *C. sake* to identify the effect water activity ( $a_w$ ), temperature, pH and their interaction on growth and identify environmental limits of the antagonist. The environmental niche within which this biocontrol agent will effectively grow was found to be limited by about 0.90-0.92  $a_w$ . *C. sake* was tolerant of a wide range of pH levels (3-7) regardless of  $a_w$  and temperature. The major intracellular polyols/sugars accumulated in *C. sake* cells grown on unmodified basal medium (NYDB) were arabitol, trehalose and glucose with small amounts of glycerol and erythritol. Production of *C. sake* in reduced  $a_w$  media (0.96) resulted in a significant modification of these endogenous reserves and an improvement in viability at lowered  $a_w$  when compared to unmodified cells in *in vitro* experiments. Biocontrol of *P. expansum* on Golden Delicious apples by these modified low  $a_w$ -tolerant inocula was maintained, and in some cases improved in laboratory assays. However, no significant improvements were observed in postharvest biocontrol of *P. expansum* rot in apples artificially wounded and infected in field trials with to compare unmodified and  $a_w$ -tolerant cells of *C. sake*. Immediately after preharvest application of the antagonist it was notable that unmodified yeast cells adhered better to the apple surfaces than the modified inocula. However, after a few hours under field conditions populations of the  $a_w$ -tolerant inocula increased significantly, while those of unmodified treatment populations remained unchanged. It is also possible that the energy requirements for the production of high concentrations of endogenous reserves could result in a modification of the concentration or characteristics of the matrix. Some ecological advantages may be gained in formulating low- $a_w$  tolerant inocula for more effective establishment in the field, while conserving biocontrol efficacy. This aspect of the study demonstrated that great potential exists for using ecophysiological means for improving the ecological fitness of biocontrol agents applied in the field, and this could have a profound impact on the development of effective preharvest biological control agents for use in the field.

















