

29. Ciencia, tecnología e innovación

Comportamiento de *Clavispora lusitaniae* 146 contra *Penicillium digitatum*, agente causal del moho verde en limón

Pereyra Martina María^a; Díaz, Mariana Andrea^a; Córdoba, Josefina María^a; Sepúlveda Tusek

Milena^b

martinapereyra30@gmail.com;

^aPlanta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

^bCitrícola San Miguel S. A.

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

Universidad Nacional de Tucumán

Director: Julián Rafael Dib

jdib@fbqf.unt.edu.ar

Resumen

Clavispora lusitaniae 146, fue aislada previamente de la superficie de limones y ha demostrado ser un potente antagonista contra *Penicillium digitatum*, principal patógeno postcosecha causante del moho verde, el cual afecta considerablemente la producción global de limones. Actualmente, esta enfermedad es combatida con fungicidas químicos como el imazalil y el tiabendazol, que a pesar de su eficiencia, han demostrado ser nocivos tanto para el medio ambiente como para la salud humana. El objetivo de este trabajo fue estudiar aspectos del efecto biocontrolador de *C. lusitaniae* 146 contra *P. digitatum*. Se pudo observar mediante microscopía electrónica que *C. lusitaniae* tiene la capacidad de colonizar heridas. Además se demostró que las células de la levadura inactivadas por calor pierden su eficacia biocontroladora. Mediante estudios de la actividad antagonista relacionados a la fase de crecimiento de la levadura, se observó que la máxima actividad antagonista se alcanza después de la fase exponencial de crecimiento. Los resultados de esta investigación proponen a *C. lusitaniae* como un posible antagonista en el control biológico postcosecha de *P. digitatum*, agente causal de una de las principales enfermedades postcosecha de limones.

Palabras clave: Biocontrol, levaduras *killer*, *Penicillium digitatum*

Introducción

A nivel mundial, nuestro país tiene una posición destacada en la producción de

cítricos, especialmente en la de limón, donde Argentina produce el 15,42% de esta fruta a nivel mundial. Tucumán está posicionado como el centro productor más importante de limón del NOA y de Argentina, con una producción anual de 1.3 millones de toneladas de fruta fresca, cifra que representa el 88% del total del limón nacional, y concentra el 77% (38.020 ha) de la superficie total de la Argentina destinada al cultivo de este cítrico (Federacitrus, 2017). La provincia destina el 70% del total de limón producido a la industria, y el 30% restante se comercializa como fruta fresca, para cubrir la demanda del mercado externo e interno. Tanto en lo que hace a la producción primaria como industrial, la actividad limonera de Tucumán es estructuralmente exportadora.

Los destinos de la fruta son los Países Bajos, España, Rusia, Italia y Grecia, sumados al recientemente abierto mercado de los Estados Unidos (Reporte agroindustrial, 2017).

Después de la cosecha, los cítricos son susceptibles al ataque de patógenos saprófitos o parásitos, principalmente hongos, debido a su alto contenido en agua y nutrientes, y porque han perdido la mayor parte de la resistencia intrínseca que los protege durante su desarrollo en el árbol (Wilson y Wisniewski, 1989; Arras y Arru, 1999). Durante el período de postcosecha los limones pueden ser atacados por distintas especies de hongos, siendo *Penicillium digitatum*, el hongo predominante y causante del “moho verde” en la fruta, una podredumbre blanda y húmeda que deteriora rápidamente el fruto (Garrán, 1996). Para controlar esta enfermedad, el uso de fungicidas de síntesis es el método más utilizado debido al bajo costo, facilidad de aplicación y efectividad. Entre los principales fungicidas autorizados se menciona el tiabendazol y el imazalil. Sin embargo, al tratarse de poblaciones

fúngicas biológicamente dinámicas, con frecuencia ocurre la aparición de cepas resistentes a estos fungicidas, limitando su eficacia (Sánchez-Torres y Tuset, 2011). Además, su uso se está volviendo cada vez más restringido debido a su alta toxicidad residual, sus efectos carcinógenos, sus largos períodos de degradación y a la polución ambiental que generan. Por este motivo es necesario la implementación de métodos alternativos de bajo impacto ambiental y riesgo mínimo para la salud humana (Tripathi y Dubey 2004; Palou y col., 2008). En los últimos años el uso de levaduras, hongos y bacterias como control biológico viene siendo una prometedora alternativa para el control de enfermedades postcosecha (Eckert y Ogawa, 1988; Droby y col., 1991; Wisniewski y Wilson, 1992; Zhang y col., 2005; Droby, 2006; Korsten, 2006; Droby y col., 2009). Entre éstas, las levaduras, especialmente aquellas con fenotipo *killer* han mostrado tener un gran potencial (Coelho y col., 2007; Santos y Marquina, 2004; El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

El fenotipo *killer* fue identificado por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* (Bevan y Makower, 1963) y luego descrito en varios géneros diferentes de levaduras (Magliani y col., 1997; Wang y col., 2007). Estas toxinas son capaces de inducir la muerte de otras levaduras, hongos filamentosos e incluso bacterias (Hashem, 2009; Goretti, 2009). Pero además, existen otros mecanismos involucrados en el efecto bioprotector de estas levaduras, entre los cuales la capacidad para colonizar heridas (Mercier y Wilson, 1994) y la competencia por nutrientes son, probablemente, los más importantes (Lima y col., 1997; Spadaro y col, 2002; Ippolito y col., 2011).

En estudios preliminares llevados a cabo por Pérez y col. (2016), una cepa de levadura nativa *killer* fue aislada e identificada como *Clavispora lusitanae*

146, la cual mostró tener una elevada actividad antagonista contra *P. digitatum* en ensayos *in vitro* e *in vivo* usando limones. Sin embargo, resta conocer si la acción biocontroladora de *C. lusitaniae* está relacionada con mecanismos involucrados en sus funciones vitales o si ésta levadura en su estado inactivo puede ejercer el mismo efecto. Además, es de gran interés conocer el comportamiento de la levadura contra cepas resistentes de *P. digitatum* a fungicidas sintéticos, pudiendo ser considerada como una potencial alternativa en el control biológico de este fitopatógeno en el limón.

Objetivos

Estudiar el comportamiento de *C. lusitaniae* en los efectos de biocontrol en el limón contra *P. digitatum*.

Materiales y Métodos

Microorganismos, condiciones de cultivo y fruta

La cepa de levadura *Clavispora lusitaniae* 146 (número de acceso KY442860) fue previamente aislada y caracterizada como lo describe Pérez y col. (2016). La elección de esta cepa estuvo basada en su elevada actividad biocontroladora *in vivo* contra *P. digitatum*, de acuerdo a estudios preliminares realizados en limones (Pérez y col., 2016; 2017). Se utilizó medio YEPD (extracto de levadura 5 g/L, peptona 5 g/L y dextrosa 40 g/L, pH 4.5–5.0) para hacer crecer la levadura. Las cepas de *P. digitatum* utilizadas, pertenecen a la colección de patógenos cítricos del Laboratorio de Fitopatología de la Citrícola San Miguel SA (Tucumán, Argentina). Los limones Eureka [*Citrus limon* (L.) Burm] utilizados en este estudio, corresponden a fruta fresca cosechada de campos locales de la provincia de Tucumán, los cuales no recibieron ningún

tratamiento postcosecha y fueron utilizados inmediatamente después de la cosecha o almacenados a 8 °C por no más de 4 días.

Colonización de herida

Para evaluar la capacidad de *C. lusitaniae* 146 en colonizar heridas, se llevó a cabo la técnica descrita por Parafati y col. (2015) con algunas modificaciones. En primer lugar, se desinfectó la fruta con alcohol 70% y se les realizó una herida en la zona ecuatorial. Posteriormente, los limones fueron sumergidos en la suspensión de levadura y, después de 24 hs de incubación a 25 °C y 90% de humedad, se los sumergió en una suspensión de esporos de *P. digitatum* (1×10^6 esporas/mL) y se los incubó durante 7 días en bolsas de plástico en las mismas condiciones anteriormente descritas. Con ayuda de un bisturí estéril, se tomaron muestras de tejido conteniendo la herida a los 0,5 y 7 días de incubación y se las colocaron en microtubos con 1 mL de una solución salina de Tween80 (0.85% NaCl y 0.01% Tween 80). Luego de una agitación de 20 min, se realizaron diluciones sucesivas de cada muestra, las que fueron sembradas posteriormente en placas conteniendo medio YEPD agarizado, adicionado con ampicilina (100 mg/L) y cloranfenicol (50 mg/L) para evitar el crecimiento de bacterias. Las colonias de levadura fueron contadas después de un período de incubación de 48 hs a 25 °C y se calculó el log UFC. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento.

Microscopía electrónica de la herida colonizada

Se evaluó la capacidad de *C. lusitaniae* 146 en colonizar heridas basándose en lo propuesto por Mekbib y col. (2011). Las muestras que se habían tomado a los 0, 5 y 7 días de incubación, fueron fijadas por inmersión con el fijador de Karnovsky

(buffer fosfato pH 7.2, 1.7% glutaraldehído, 2.7% paraformaldehído) por 24 hs (Karnovsky, 1965). Luego, se deshidrataron las muestras utilizando una serie de concentraciones de etanol y se pasaron por acetona al 100% dos veces antes del secado en puntos críticos con CO₂ (Denton Vacuum). Los tejidos secos se montaron en talones de aluminio, se recubrieron con oro (JEOL Ion Sputter JFC 1100, EE. UU.) y se observaron usando un microscopio electrónico de barrido Zeiss SUPRA 55VP (SEM) (Oberkochen, Alemania).

Actividad antagonista de *C. lusitaniae* inactivada por calentamiento contra *P. digitatum*

Los frutos fueron desinfectados y heridos como se describió anteriormente. Se prepararon dos suspensiones de la levadura en concentraciones adecuadas. Una de ellas se inactivó por tratamiento térmico, lo cual se logró manteniendo las células de levadura a 70 °C durante 30 minutos. La suspensión que no fue calentada se utilizó como control. Luego, se sumergieron los limones en las suspensiones y se los colocaron en bolsas plásticas. Después de las 24 hrs de incubación a 25 °C y 90% de humedad, se inocularon los limones con la suspensión de esporos de *P. digitatum* y se incubaron en las mismas condiciones por 5 días. Además, se utilizaron 20 frutos como testigos, los cuales fueron heridos y sumergidos sólo en la suspensión del patógeno. Se realizaron 4 repeticiones de 15 frutos, evaluándose así un total de 60 limones por cada tratamiento.

Efecto biocontrolador de *C. lusitaniae* contra una cepa de *P. digitatum* resistente a imazalil

Para evaluar el efecto biocontrolador de la cepa *C. lusitaniae* 146 contra un aislado de *P. digitatum* previamente reportado como resistente al imazalil, se procedió a

desinfectar y herir los limones tal como se describió anteriormente. Luego, se los sumergió en la suspensión de levadura y se incubó a 25 °C durante 24 hrs. Al cabo de dicho tiempo, los limones fueron sumergidos en la suspensión de esporos de *P. digitatum* resistente a imazalil, e incubados en condiciones de elevada humedad durante 5 días. Como control se utilizó la misma cantidad de limones inoculados primero con la levadura y luego con la cepa de *P. digitatum* sensible. Se realizaron 4 repeticiones de 15 frutos, evaluándose así un total de 60 limones por cada tratamiento.

Eficiencia de *C. lusitaniae* 146 en la protección de heridas en sus distintas fases de crecimiento

Se evaluó la eficiencia en la protección de heridas de *C. lusitaniae* en sus distintas fases de crecimiento. Para esto, se dejó crecer la levadura en YEPD durante y se estudió su actividad antagonista *in vivo* a distintos tiempos de incubación: 12, 24, 48 y 72 hs. Para cada tiempo se procedió de igual manera que los ensayos anteriores.

Resultados y Discusión

Observación en el Microscopio Electrónico de la herida colonizada

La microscopía electrónica de barrido mostró el comportamiento de *C. lusitaniae* 146 en las heridas de limón inoculados con *P. digitatum*. Estas imágenes revelaron que la levadura colonizó la herida, pudiéndose observar que en el día 5 la superficie de la herida se encontraba completamente cubierta por células de la levadura. Los conidios de *P. digitatum* se observaron tanto en la piel como en la herida, pero ninguno había germinado. Por otro lado, en los frutos inoculados únicamente con *P. digitatum*, se pudo observar en el día 7 de incubación, una

gran cantidad de esporos germinados con abundante micelio aéreo (Fig. 1).

Resultados similares fueron expuestos por Mekbib y col. (2011), quienes sostienen que el rápido crecimiento de *Cryptococcus laurentii* y *Candida sake* en la herida de una naranja resulta importante para la supresión de la germinación de *P. digitatum*. Asimismo, Parafati y col., (2015) encontraron que el principal mecanismo de acción de las especies *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans* y *Wickerhamomyces anomalus* en el control de *Botrytis cinerea* en uva, es la capacidad de éstas cepas para colonizar las heridas.

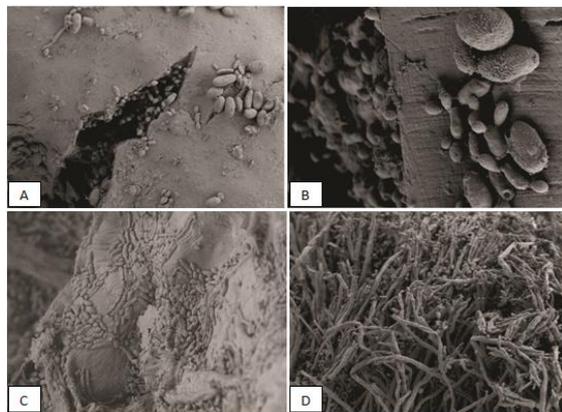


Fig. 1. Microscopía electrónica de barrido de heridas de fruto de limón tratadas con *C. lusitanae* y *P. digitatum* a los 7 días de incubación (A, B y C) a 25 °C. (D) Herida inoculada solo con *P. digitatum* después de 7 días de incubación.

Actividad antagonista de *C. lusitanae* inactivada por calentamiento contra *P. digitatum*

La actividad antagonista de la cepa de *C. lusitanae* tanto viable como inactivada por calor, se muestran en la Fig. 2. Se observó que la cepa inactivada pierde su actividad antifúngica contra *P. digitatum* en limón comparada con la levadura viable, observándose diferencias significativas en los porcentajes de inhibición de la enfermedad. Estos resultados difieren de los obtenidos por

Sun y col. (2018), quienes observaron que las cepas *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodosporidium paludigenum* autoclavadas a 121 °C durante 20 min inhiben significativamente la incidencia de moho azul en peras, causada por el patógeno *Penicillium expansum*.

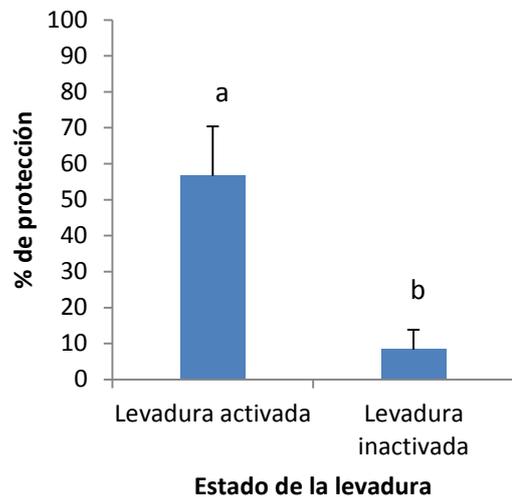


Fig 2. Eficiencia porcentual de *C. lusitanae* viable e inactivada por calor en el control de *P. digitatum* en limón.

Efecto biocontrolador de *C. lusitanae* contra una cepa de *P. digitatum* resistente a imazalil.

Para este ensayo se utilizó una cepa de *P. digitatum* resistente a fungicidas y se tomó como control una cepa sensible. En la Figura 3 se puede observar que *C. lusitanae* tiene una eficiencia de protección superior al 90%, ya sea tanto frente a la cepa sensible como a la resistente a fungicidas químicos. En sus estudios, Fogliata y col. (2000) mostraron que la levadura *Candida oleophila*, no resultó eficiente en el control de una cepa de *P. digitatum* resistente a imazalil encontrada en un empaque cítrico de la provincia de Tucumán.

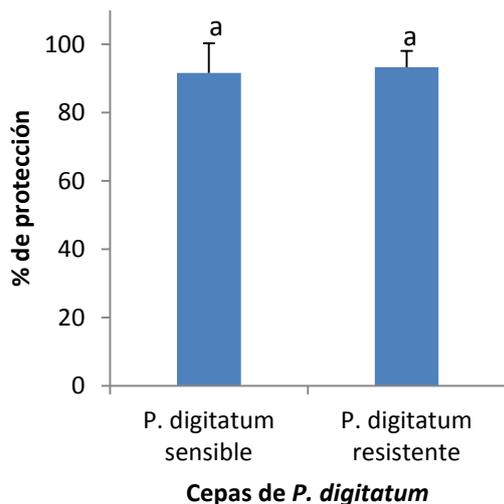


Fig. 3. Efecto biocontrolador de *C. lusitaniae* contra una cepa de *P. digitatum* sensible y otra resistente a imazalil.

Evaluación de la eficiencia de *C. lusitaniae* 146 en sus distintas fases de crecimiento

C. lusitaniae se dejó crecer durante 12, 24, 48 y 72 hs. Los resultados mostraron diferencias significativas en la acción biocontroladora de la levadura cuando se encuentra en su fase exponencial de crecimiento (12 hs). Al entrar en fase estacionaria (24, 48 y 72 hs), la eficiencia en el control de la enfermedad no mostró diferencias significativas (Fig. 4).

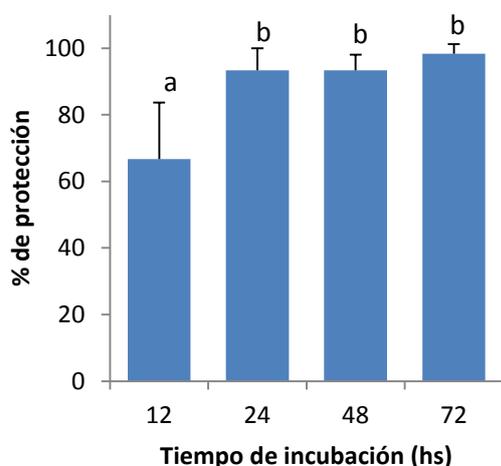


Fig 4. Evaluación de la eficiencia de *C. lusitaniae* 146 en sus distintas fases de crecimiento

Conclusiones

La comprensión del modo de acción es importante para desarrollar una formulación apropiada de un producto para control biológico y un prerrequisito para su registro. En este sentido, a lo largo del presente trabajo pudimos demostrar mediante microscopia electrónica de barrido que *C. lusitaniae* 146 crece y coloniza heridas en limones previniendo la infección de *P. digitatum*. Asimismo, se determinó que la viabilidad de la levadura es esencial para el efecto biocontrolador de la misma, observándose una disminución significativa del nivel de protección de herida por parte de las células no viables, permitiéndonos acentuar aún más la teoría de competencia por espacio y nutrientes como un posible mecanismo de acción. Por otro lado, se observó que la levadura alcanza su máximo nivel de eficiencia en protección de heridas cuando se encuentra en fase estacionaria de crecimiento.

Como sabemos, en la actualidad las enfermedades producidas por distintos tipos de patógenos postcosecha en limones se controlan con diversos productos químicos, los cuales entre otros efectos negativos causan problemas en la salud alimentaria de las personas, polución del medio ambiente y resistencia en patógenos. Una forma de sobrellevar estos problemas ha sido encontrar microorganismos antagonistas que puedan ser usados efectivamente como agentes de control biológico aplicados en este caso, durante el período postcosecha.

En este sentido se ensayó la cepa 146 frente a diferentes tipos de fitopatógenos, sensible y resistente. Pudimos observar que la levadura se mostró igualmente eficiente contra ambos, lo que denota una gran ventaja con respecto a los fungicidas

químicos, posicionando a *C. lusitanae* como una potencial alternativa al uso de los mismos.

Es así, que en base a los resultados obtenidos, podemos sugerir a *C. lusitanae* 146 como un prometedor agente biocontrolador de enfermedades fúngicas postcosecha de limón.

Bibliografía

- Arras, G., Arru, S., (1999). Integrated control of postharvest citrus decay and induction of phytoalexins by *Debaryomyceshansenii*. *Adv. Hort. Sci.* 13, 76–81.
- Bevan, E. A., & Makower, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. In *Proc. Int. Congr. Genet* 1:202-203.
- Coelho, A. R., Celli, M. G., Ono, E. Y. S., Wosiacki, G. (2007). *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts with perspectives of application in biocontrol and patulin degradation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 725-733.
- Droby, S., 2006. Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *ActaHorticulturae* 709, 45–51.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., (1991). Antagonistic microorganisms as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Postharvest News Information* 2, 169–173.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E., Porat, R. (2002). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92: 393-399
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest biology and technology*, 52(2), 137-145.
- Eckert, J.W., Ogawa, J.M., 1988. The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. *Annual Review of Phytopathology* 26, 433–469.
- El-Tarabily, K.A., &Sivasithamparam, K. (2006).Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47(1): 25-35.
- Federcitrus (Federación Argentina del Citrus) (2017). La actividad cítrica Argentina 2016. URL: <http://www.federcitrus.org/wp-content/uploads/2017/10/Act-Citricola-17.pdf>
- Fogliata, G. M., Torres, L., &Ploper, L. D. (2000). Detection of imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* Sacc. in citrus packinghouses of Tucumán Province (Argentina) and their behavior against currently employed and alternative fungicides. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 77(2), 71-75.

- Garrán, S.M. (1996). Enfermedades durante la postcosecha. En: Manual para productores de naranjas y mandarinas de la región del río Uruguay. INTA. Cap. 12: 173-240.
- Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E. (2009). In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. International Journal of Food Microbiology, 131: 178-182.
- Hashem, M., & Alamri, S. (2009). The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. Postharvest Biology and Technology, 53: 123-130.
- Ippolito, A., El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M., 2011. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. Postharvest Biol. Technol. 19, 265-272.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. Journal of Cell Biology 27, 137-138A.
- Korsten, L. (2006). Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. International Journal of Postharvest Technology and Innovation, 1(1), 48-61.
- Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F., Salerno, M., 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. Postharvest Biol. Technol. 10, 169-178.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997). Yeast killer system. Clinical Microbiology Reviews, 10: 369-400.
- Mekbib, S.B., Regnier, T.J., Korsten, L., 2011. Efficacy and mode of action of yeast antagonists for control of *Penicillium digitatum* in oranges. Tropical Plant Pathology 36(4), 233-240.
- Mercier, J., Wilson, C.L., 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biol. Control 4, 138-144.
- Palou, L., Smilanick, J. L., Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. Stewart Postharvest Review, 4(2), 1-16.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. Food microbiology 47, 85-92
- Pérez, M.F., Contreras, L., Garnica, N.M., Fernández-Zenoff, M.V., Farías, M.E., Sepulveda, M., Dib, J.R. (2016). Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. PloS one 11(10):e0165590
- Sánchez-Torres, P., Tuset, J.J. Molecular insights into fungicide resistance in

sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, vol. 59(2), 159-165.

- Santos, A., & Marquina, D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, 150(8), 2527-2534.
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M.L., 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 123-134.
- Sun, C., Fu, D., Lu, H., Zhang, J., Zheng, X., & Yu, T. (2018). Autoclaved yeast enhances the resistance against *Penicillium expansum* in postharvest pear fruit and its possible mechanisms of action. *Biological Control*, 119, 51-58.
- Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*, 32(3), 235-245.
- Wang, H., Grzywacz, B., Sukovich, D., McCullar, V., Cao, Q., Lee, A. B., Verneris, M. R. (2007). The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+ CD16- and CD56+ CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood*, 110(5), 1530-1539.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: an emerging

technology. *Annual Review of Phytopathology* 27, 425-441.

- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: recent advances. *HortScience* 27, 94-98.
- Zhang, H.Y., Zheng, X.D., Xi, Y.F. (2005). Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. *BioControl*, 50(2): 331-342.

Agradecimientos

A Miguel y Luciano por su colaboración en los estudios de Microscopía Electrónica.

Financiamiento

Programa Agregando Valor (Ministerio de Educación de la Nación).

Proyecto de cooperación Internacional Argentina-Malasia (CONICET).