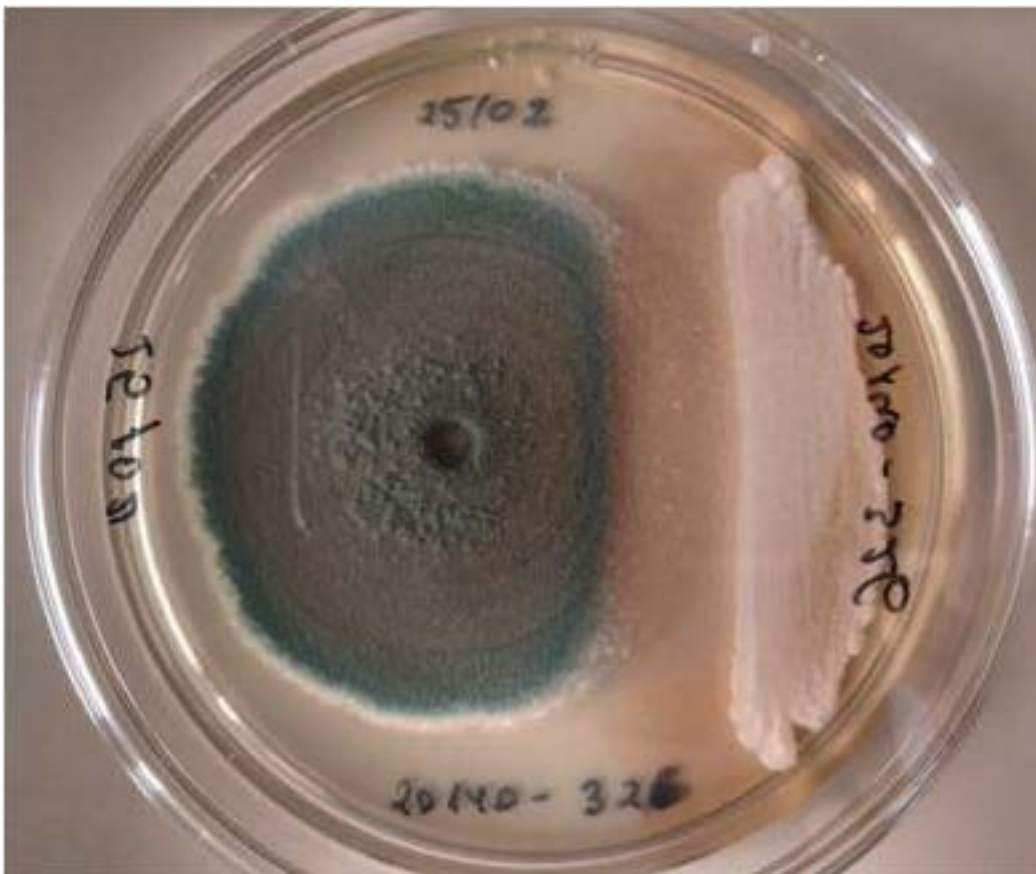


Cepas autóctonas de *Metschnikowia pulcherrima* como posibles Agentes de Control Biológico

ROSA PANDO BEDRIÑANA. Área de Tecnología de los Alimentos, rpando@serida.org
 M^a DOLORES LOUREIRO RODRÍGUEZ. Área de Tecnología de los Alimentos, mdolorlr@serida.org
 BELÉN SUÁREZ VALLES. Jefa del Área de Tecnología de los Alimentos, mbsuarez@serida.org



←
 Crecimiento de las cepas de *Penicillium expansum* (CECT 20140) y *Metschnikowia pulcherrima* (216) en medio de cultivo PDA después de 12 días de incubación a 24 °C en oscuridad. Se observa la inhibición de crecimiento del micelio del patógeno en la dirección que está presente la cepa *M. pulcherrima*.

Las levaduras son un grupo heterogéneo de hongos unicelulares que usualmente interactúan con otros microorganismos en los ecosistemas. Dichas interacciones pueden variar desde formas mutuamente beneficiosas hasta formas antagónicas. En este sentido, la acti-

vidad antagonista que presentan algunas levaduras frente a patógenos vegetales y microorganismos causantes del deterioro de alimentos puede permitir su utilización como Agentes de Control Biológico (BCA por sus siglas en inglés) y resultar una alternativa a los fungicidas convencionales

↓
Figura 1.-Esquema de la disposición del hongo (H) y la levadura/BCA en la placa y distancias de crecimiento del hongo medidas a ambos lados del punto de siembra (A, B).

de síntesis. Los hongos fitopatógenos *Monilinia fructigena*, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* son causantes de cuantiosas pérdidas económicas en viticultura y hortofruticultura al producir podredumbre de frutos en campo y en los períodos de almacenamiento postcosecha en cámaras de conservación.

El SERIDA conserva en su Colección de Cultivos Autóctonos (CCAS) una amplia diversidad de cepas de la levadura *Metschnikowia pulcherrima*, aisladas en las etapas iniciales de la elaboración de sidra natural y sidra de hielo. Esta especie, descrita en bibliografía como común en flores, superficies de frutos y mostos en los primeros estadios de la fermentación, produce un pigmento rojizo llamado pulquerrimina, y presenta la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos tales como hongos filamentosos y levaduras. La capacidad de cepas de esta especie de actuar como BCA se ha relacionado con la reducción del hierro del medio como consecuencia de la unión irreversible de este elemento al ácido pulquerrimico (precursor de la pulquerrimina), la secreción de enzimas extracelulares y/o la formación de compuestos volátiles.

En este artículo se expone la evaluación, mediante ensayos *in vitro*, de la capacidad de cepas de *M. pulcherrima* como BCA contra los hongos *Monilinia fructigena*, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*.

Microorganismos y condiciones de crecimiento

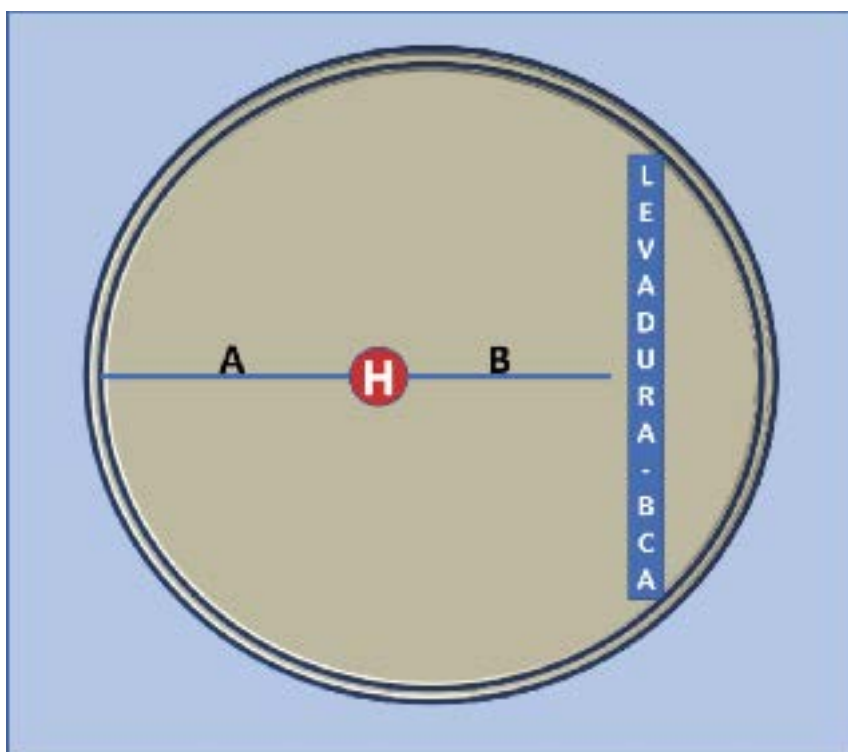
Veintiocho cepas de *M. pulcherrima* pertenecientes a la CCAS, conservadas a -80°C , fueron recuperadas mediante siembra en el medio de cultivo YPD. Tras comprobar su pureza, se estandarizaron sus concentraciones celulares en cámara de Neubauer.

Se utilizaron tres cepas de hongos fitopatógenos adquiridos en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *M. fructigena* (CECT 20115), *P. expansum* (CECT 20140) y *B. cinerea* (CECT 20518). Las cepas fueron cultivadas para la obtención de micelio en los medios de cultivo Malt Agar y PDA (Biokar, Francia) siguiendo las instrucciones de la CECT.

Como control positivo en todas las evaluaciones se utilizó un BCA comercial a base de *Bacillus subtilis* cepa QST 713 (Serenade[®] ASO) con una concentración celular de $1,03\text{E}+09$ ufc/mL.

Evaluación de la actividad antagonista

Se sembraron Placas Petri de 90 mm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA a 20 mm del borde con 8 μL de suspensión celular ($6,50\text{E}+08$ células/mL) de cada cepa de levadura o del BCA comercial mediante extensión formando una línea, tal como se esquematiza en la Figura 1. A continuación, se colocaron discos de 6 mm de micelio de cada uno de los hongos a 55 mm del mismo borde de la placa (Spadaro et al., 2002). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron a 24°C y en oscuridad. Se realizaron medidas periódicas del crecimiento radial del hongo. El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) de los hongos se calculó en el momento en que el crecimiento o desarrollo





PIC (%)	M. fructigena (CECT 20115)	P. expansum (CECT 20140)	B. cinerea (CECT 20518)
<10	6	0	6
10-20	15	0	13
20-30	6	4	9
30-40	1	22	1*
40-50	0	2	0
50-60	1*	1*	0*

* BCA comercial

←
Tabla 1.-Número de cepas agrupadas en función del porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) de las cepas de hongos fitopatógenos.

micelial alcanzaba el borde izquierdo de las placas, mediante la fórmula:

$$PIC = [(A-B/A)] * 100, \text{ donde}$$

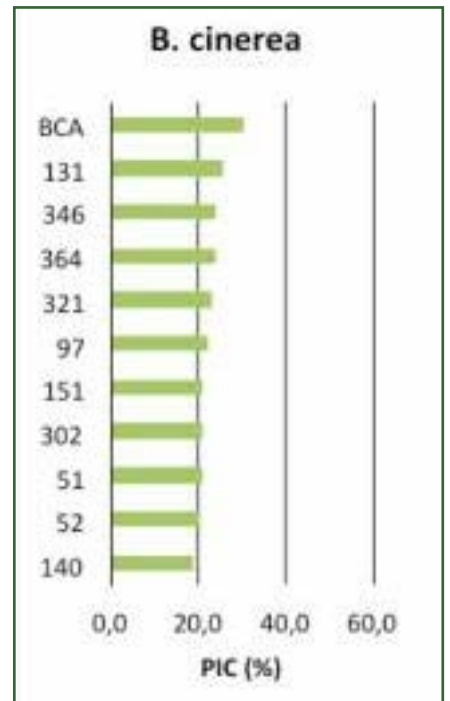
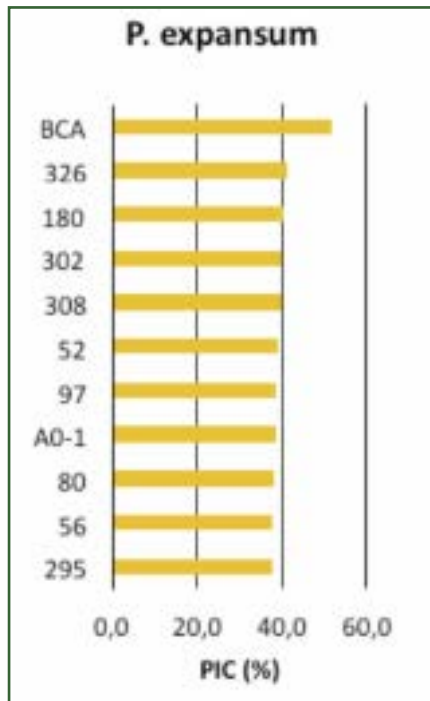
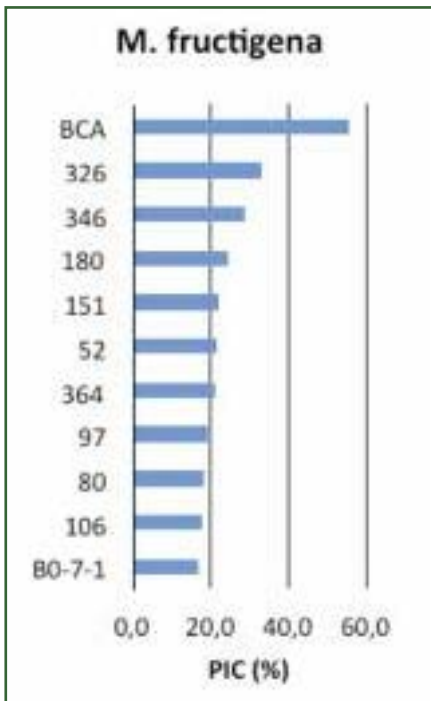
A= Promedio radio de crecimiento del hongo (mm) hacia el borde izquierdo de la placa.

B= Promedio radio de crecimiento del hongo (mm) hacia la cepa de levadura o el BCA comercial.

La cepa de *B. cinerea* mostró la velocidad de crecimiento más rápida, siendo evaluados los PICs a los 3 días de incubación, mientras que la inhibición del crecimiento de los hongos *M. fructigena* y *P. expansum* se calculó a los 12 días.

En las condiciones del experimento, el BCA comercial presentó, para los hongos ensayados, porcentajes de inhibición del crecimiento que oscilaron entre el 30-55%. Este producto contiene endosporas de *B. subtilis* QST 713, así como compuestos naturales excretados por dicha bacteria, entre ellos lipopéptidos con acción fungicida y otros compuestos con actividad antibacteriana. En el caso de las cepas de levaduras autóctonas, si bien los porcentajes de inhibición fueron menores que los del BCA comercial, se observó un PIC>30% frente al hongo *P. expansum* en el 86% de las cepas y una menor actividad frente a los otros dos hongos (Tabla 1).

↓
Figura 2.-Porcentajes de inhibición del crecimiento (PIC) de las cepas CECT 20115 (*M. fructigena*), CECT 20140 (*P. expansum*) y CECT 20518 (*B. cinerea*) por la actividad de 10 cepas de *M. pulcherrima* autóctonas y del BCA comercial.



↓
Figura 3.-Crecimiento de *B. cinerea* en placas control (4 días de incubación).

En la Figura 2 se representan las 10 cepas de *M. pulcherrima* que presentaron mayor capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos. Destacaron por su actividad antagonista las cepas referenciadas como 131, 180, 326 y 346 que fueron aisladas durante la elaboración de sidra natural.

Efecto de la concentración de hierro en la actividad antagonista de las levaduras

En segundo lugar, se evaluó el efecto que el hierro ejerce sobre la capacidad de las levaduras para inhibir el desarrollo de los hongos fitopatógenos.

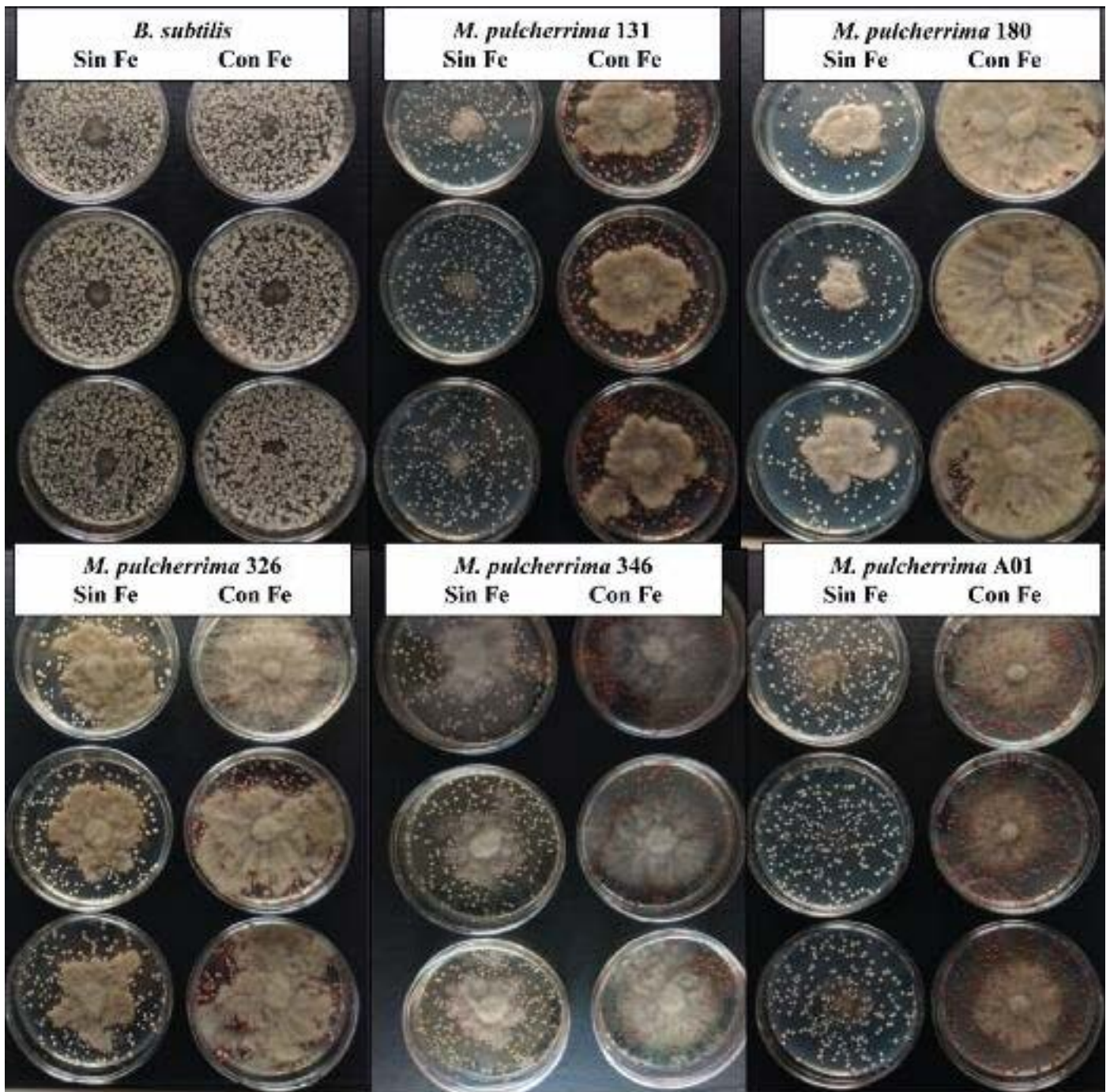
Se seleccionaron las cepas de *M. pulcherrima* que mostraron las mayores actividades antagonistas (131, 180, 326 y 346). La cepa A01, aislada durante la elaboración de sidra de hielo, fue incluida en el estudio con vistas a su posible utilización como BCA en cámaras de conservación postcosecha.

Para ello, se sembraron en superficie placas Petri con medio de cultivo PDA con y sin suplementación de hierro (0,1 mM de FeCl_3) con 30 μL de cada levadura o del BCA comercial (5,00E+04 células/mL). Posteriormente, en el centro de estas placas se sembraron, en forma de gota, 20 μL de una suspensión conidial (3,00E+05 conidios/ mL) de cada hongo (Gore-Lloyd et al., 2019). Como testigo, se sembraron únicamente con la suspensión conidial indicada placas de PDA con y suplementación de hierro (placas control). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La incubación se efectuó en las condiciones descritas (24°C y oscuridad), realizando medidas periódicas, en este caso, del diámetro de crecimiento de los hongos fitopatógenos en las placas control (A) y en presencia de levadura/BCA comercial (B). El PIC se calculó realizando la medición al cabo de 4, 14 y 21 días para las cepas de *B. cinerea*, *P. expansum* y *M. fructigena*, respectivamente.

Las Figuras 3 y 4 muestran, respectivamente, el crecimiento de *B. cinerea* en las placas control y el efecto sobre el crecimiento de dicho hongo de las cepas de *M. pulcherrima* ensayadas y del BCA comercial.

Los resultados obtenidos indican que la suplementación del medio de cultivo con hierro no afecta al crecimiento de los hongos en las placas control ni a la actividad antagonista del BCA comercial. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 5, la actividad de las cepas de *M. pulcherrima* se muestra hierro-dependiente, principalmente en su acción frente a *M. fructigena* y *B. cinerea*. La adición de hierro al medio disminuye su capacidad antagonista contra estos dos hongos, lo que indica que la reducción del crecimiento micelial está ligada con la capacidad que tienen estas





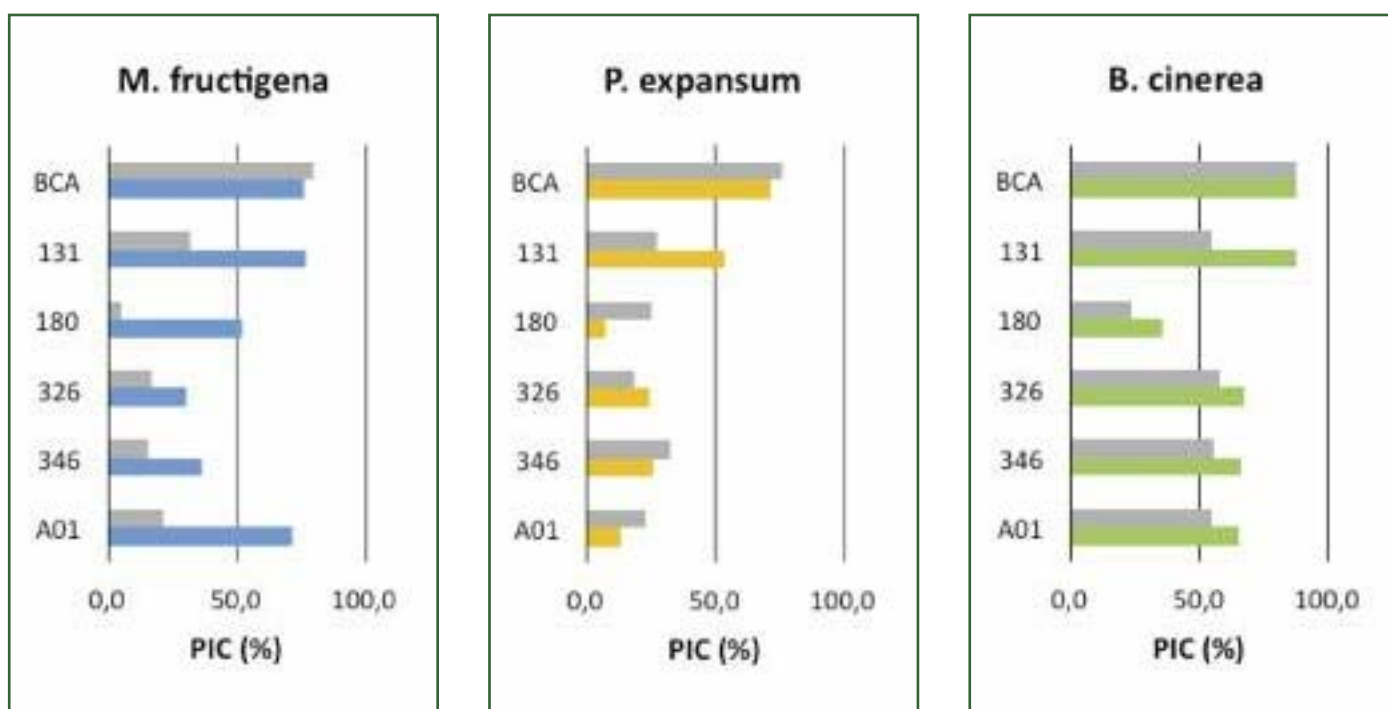
levaduras de unir irreversiblemente el hierro al ácido pulquerrímico. La captación de este nutriente disminuye su contenido en el medio, ralentizando de esta manera el crecimiento de los hongos. Destaca la cepa 131 por los valores de inhibición del crecimiento detectados para los tres hongos en el medio PDA sin suplementación de hierro. En dicho ensayo, esta cepa exhibió valores de

PIC similares al BCA comercial para *M. fructigena* y *B. cinerea*.

En la actualidad, con vistas a su posible aplicación como agente de biocontrol durante la conservación postcosecha de frutas, se está evaluando *in vitro* la capacidad de estas cinco cepas de *M. pulcherrima* para inhibir el crecimiento de estos hongos fitopatógenos a baja temperatura (4°C).

↑
Figura 4.-Efecto de cepas de *M. pulcherrima* sobre el crecimiento de *B. cinerea* (4 días de incubación).





↑
Figura 5.-Porcentajes de inhibición del crecimiento de las cepas CECT 20115 (*M. fructigena*), CECT 20140 (*P. expansum*) y CECT 20518 (*B. cinerea*) en medio PDA sin suplementación (azul/amarillo/verde) y con suplementación de hierro (gris).

Investigaciones futuras requerirán la evaluación del efecto protector de las mejores cepas de *M. pulcherrima* en campo y en la conservación postcosecha de fruta para confirmar su potencial como agentes de biocontrol.

Agradecimientos

La conservación y caracterización de las cepas evaluadas de la CCAS se ha realizado con ayuda de proyectos de investigación financiados por el INIA y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RM2006-00008, RM2009-00005 y RTA2012-00075).

Referencias bibliográficas

GORE-LLOYD, D.; SUMANN, I.; BRACHMANN, A. O.; SCHNEEBERGER, K.; ORTIZ-MERINO, R. A.; MORENO-BELTRÁN, M.; SCHLÄFLI, M.; KIRNER, P.; SANTOS KRON, A.; RUDEA-MEJIA, M. P.; SOMERVILLE, V.; WOLFE, K. H.; PIEL, J.; AHRENS, C. H.; HENK, D.; FREIMOSER, F. M., (2019). Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Molecular microbiology* 112: 317-332.

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 Biology and Technology* 24: 123-134. ■