

ARTÍCULO ORIGINAL

Empleo de levaduras nativas como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos en uva (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera* L.)

Use of native yeasts as biocontrol agents for phytopathogenic fungi in grapes (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera* L.)

Mariano Giralda-Arellano^a y Domingo Barrios-Acosta^{a*}

^a Instituto Tecnológico de La Paz, Boulevard Forjadores de Baja California Sur No.4720 Apdo. Postal 43-B, C.P. 23080. La Paz, B.C.S., México.

Información del artículo:

Recibido el 21 de octubre de 2021

Recibido el revisado el 18 de noviembre de 2021

Aceptado el 19 de noviembre de 2021

Disponible on-line el 15 de diciembre de 2021

* Autor de correspondencia:

Domingo Barrios Acosta

Teléfono: (612) 121-0424.

Correo electrónico:

d.barrios@gmail.com

RESUMEN

La vid es susceptible de ataque por enfermedades fúngicas ocasionadas por diversas especies de hongos filamentosos, levaduras y algunas bacterias. En Baja California Sur, México, la incidencia y la severidad de las infecciones fúngicas en la vid se incrementaron en los dos últimos ciclos vegetativos. El control biológico mediante el uso de microorganismos encontrados naturalmente que antagonizan los patógenos poscosecha ha sido desarrollado como una alternativa al uso de fungicidas químicos. Objetivo de este estudio fue estudiar los efectos antagónicos de aislamientos de levadura nativas sobre hongos filamentosos de interés agronómico y económico. Se aislaron hongos filamentosos y levaduras de granos de uva. Se determinó la actividad antagónica de las levaduras aisladas, contra los hongos filamentosos aislados. El ensayo se realizó primero *in vitro* a 25°C y luego *in vivo* a 25°C y a 2°C (solamente *Botrytis cinerea*, debido a su capacidad de crecer a bajas temperaturas). En total se aislaron 16 levaduras y 6 hongos filamentosos: *Botrytis cinerea*, *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium commune*, *Rhizopus stolonifer* y *Plasmopara viticola*. Los ensayos de antagonismo *in vitro* e *in vivo* a 25°C mostraron que los mostos en fermentación fueron el principal ambiente vitivinícola a partir del cual se aislaron levaduras antagonistas (en su mayoría especies *S. cerevisiae*) capaces de suprimir a los hongos fitopatógenos aislados. En el caso de *B. cinerea*, el ensayo *in vivo* también se realizó a 2°C, pero ningún aislamiento antagonista redujo el porcentaje de incidencia de la pudrición gris más del 50%. *B. cinerea*, *A. carbonarius* y *R. stolonifer* presentaron sensibilidad a la acción de 8 aislamientos de levaduras antagonistas (5 pertenecientes al género *Saccharomyces* y 3 a no-*Saccharomyces*). Los aislamientos de la especie *S. cerevisiae* (aisladas principalmente de mostos en fermentación) mostraron una alta capacidad antagónica para suprimir los distintos hongos filamentosos en condiciones *in vitro*, como *in vivo*. Algunas levaduras biosupresoras fueron capaces de presentar un amplio espectro antagónico contra hongos filamentosos.

Palabras clave: *Vitis vinifera*, Enfermedades fúngicas, Biocontrol, Levaduras nativas

ABSTRACT

The vine plant is susceptible to attack by fungal diseases caused by various species of filamentous fungi, yeasts and some bacteria. In Baja California Sur, Mexico, the incidence and severity of fungal infections in grapevines increased in the last two vegetative cycles. Biological control through the use of naturally found microorganisms that antagonize postharvest pathogens has been developed as an alternative to the use of chemical fungicides. Objective of this study was to study the antagonistic

effects of native yeast isolates on filamentous fungi of agronomic and economic interest. Filamentous fungi and yeasts were isolated from grape grains. The antagonistic activity of isolated yeasts against isolated filamentous fungi was determined. The test was performed first *in vitro* at 25 ° C and then *in vivo* at 25 ° C and 2 ° C (only *Botrytis cinerea*, due to its ability to grow at low temperatures). In total, 16 yeasts and 6 filamentary fungi were isolated: *Botrytis cinerea*, *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium commune*, *Rhizopus stolonifer* and *Plasmopara viticola*. *In vitro* and *in vivo* antagonism tests at 25 ° C showed that fermenting musts were the main viticultural environment from which antagonist yeasts (mostly *S. cerevisiae* species) capable of suppressing isolated phytopathogenic fungi were isolated. In the case of *B. cinerea*, the *in vivo* test was also carried out at 2 ° C, but no antagonist isolation reduced the percentage of incidence of gray rot by more than 50%. *B. cinerea*, *A. carbonarius* and *R. stolonifer* showed sensitivity to the action of 8 antagonist yeast isolates (5 belonging to the genus *Saccharomyces* and 3 to non-*Saccharomyces*). The isolates of the species *S. cerevisiae* (isolated mainly from fermentation musts) showed a high antagonistic capacity to suppress the different filamentous fungi under *in vitro* and *in vivo* conditions. Some biosuppressive yeasts were able to present a broad antagonistic spectrum against filamentous fungi.

Keywords: *Vitis vinifera*, Fungal diseases, Biocontrol, Native yeasts

INTRODUCCIÓN

La vid es susceptible de ataque por enfermedades fúngicas ocasionadas por diversas especies de hongos filamentosos, levaduras y algunas bacterias. En los campos agrícolas de la zona costa de Baja California Sur, México (BCS) existen una superficie de 11 mil 500 hectáreas de cultivo perennes, los cuales permanecen sembrados todo el año, 9 mil 899 hectáreas trabajan bajo la modalidad de riego; mientras que las restantes mil 601 son de riego de temporal, según informó el encargado del Despacho de la Representación Estatal de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2019) (1). El cultivo de vid encabeza la lista de perennes, con 4 mil 46 hectáreas tanto de uva de mesa como para vino. Las principales zonas de cultivo se encuentran en Valle de Guadalupe, San Antonio de las Minas, Real del Castillo, Santo Tomás y San Vicente (1).

En BCS, así como en diferentes zonas de cultivo de la vid en México, la incidencia y la severidad de las infecciones fúngicas en la vid se incrementaron en los dos últimos ciclos vegetativos (2).

Las enfermedades fúngicas son una de las principales causas de la pérdida de productividad en cultivos perennes. Las pérdidas ocasionadas por las enfermedades causadas por hongos y virus son muy limitantes en el cultivo de la vid, porque disminuye hasta un 80% de cada cosecha, reducen la calidad, incrementan los costos de producción y reducen el vigor y longevidad de los viñedos, existiendo enfermedades causadas por hongos que son endémicas, esto es, son prevalentes y están bien establecidas (3,4). Para su control, una de las líneas a seguir es la utilización de métodos predictivos, que a través de la observación de distintas variables ambientales pueden pronosticar la aparición de enfermedades, permitiendo la aplicación de los fungicidas antes de que aquellas se establezcan. La observación directa de los cultivos también es un

método eficaz para determinar los agentes fitopatógenos debido a que cada uno de ellos presentan ciertas características distintivas sobre el tallo y el fruto de la vid (ver Figura 1), sin embargo, entre otros casos la aparición de los síntomas obedece a un asentamiento avanzado y de difícil regresión, o aparece después de haber causado daños. De entre las patologías más comunes de origen fúngico se encuentran: El mildium causado por *Plasmopara viticola*, es el principal problema de la producción de la vid, especialmente en las variedades que pertenecen a *Vitis vinifera*. Es el principal limitante de la producción de uva para vino a nivel mundial, debido a que ataca todas las partes verdes de la planta, principalmente las hojas, donde se presentan manchas amarillentas de apariencia aceitosa. El oidium, conocido también como “cenicilla”, causado por el hongo *Uncinula necator*, es otra micosis importante en los cultivos de vid. Ataca todos los tejidos verdes y penetra sólo las células epidermales, pero afecta también las células vecinas, dando una apariencia polvosa de color gris blanquecino a los órganos atacados. El haz y el envés son igualmente susceptibles a la infección en cualquier edad de la hoja, las que se deforman y detienen su crecimiento. Por otro lado, la causada por el hongo *Botrytis cinerea*, la llamada “pudrición gris” ocasiona una considerable pérdida en la calidad y rendimiento de la cosecha. El hongo invade la inflorescencia antes de la caída de las cubiertas florales. Desde estos tejidos ataca el pedicelo y el raquis del racimo, formando pequeñas lesiones de color café, que luego se tornan oscuras, casi negras. Hacia la época de cosecha estas lesiones rodean el pedicelo y el raquis y las porciones del racimo por debajo de la lesión se secan. Y finalmente, la roya, causada por el hongo *Phakopsora uva*, también aparece entre las enfermedades más comunes de la vid. Es muy destructiva cuando no se controla oportunamente.

Hongo patógeno encontrado	Infección en fruto	Infección en tallos y hojas
<i>Botrytis cinerea</i> (pudrición gris)		
<i>Aspergillus caelatus</i>		
<i>Aspergillus carbonarius</i>		
<i>Plasmopara viticola</i>		
<i>Rhizopus</i> spp.		
<i>Penicillium</i> spp.		

Figura 1. Características de la infección fúngica en la vid.

Fuente: Adaptado de Giralt *et al.*, 2005 y Pancher *et al.*, 2012

Figure 1. Characteristics of fungal infection in the vine plant.

Source: Adapted from Giralt *et al.*, 2005 and Pancher *et al.*, 2012

Los primeros síntomas aparecen en forma de pequeñas manchas esparcidas o densamente distribuidas de color amarillo en el envés de las hojas y ocasionalmente aparece en los peciolos, brotes jóvenes y raquis. Más tarde, en el haz aparecen manchas de tejido muerto. Generalmente, las primeras lesiones aparecen sobre las hojas maduras, aproximadamente, unos 60-70 días después de la poda. Las infecciones severas de roya causan una defoliación prematura de la planta que ocasionan deficiencias en el llenado y madurez de los frutos. La defoliación prematura, también ocasiona la brotación de las yemas durante el periodo de descanso, que es muy detrimental para la cosecha siguiente, al utilizar la planta las reservas que utilizarán 5, 6, 7 y 3). El control biológico mediante el uso de microorganismos encontrados naturalmente que antagonizan los patógenos poscosecha ha sido desarrollado como una alternativa al uso de fungicidas químicos. Objetivo de este estudio fue estudiar los efectos antagónicos de aislamientos de levadura nativas sobre hongos filamentosos de interés agronómico y económico.

MATERIALES Y METODOS

Recuento y aislamiento de hongos y levaduras

Diez gramos (peso seco) de semillas de uva recuperados de la maceración del fruto de mala calidad (desperdicio) se suspendieron en 90 mL de diluyente de peptona al 1 % estéril en bolsas plásticas. Posteriormente se procedió a una homogenización a 10 rpm por 5 minutos, en un equipo agitador (Stomacher® 400 Circulator®). Por triplicado, empleando diluciones decimales seriadas se realizó el recuento y aislamiento de hongos filamentosos y levaduras en agar extracto de malta al 2 % (AEM) adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina.

Se aislaron hongos filamentosos y levaduras de granos de uva. Se determinó la actividad antagónica de las levaduras aisladas, contra los hongos filamentosos aislados. El ensayo se realizó primero *in vitro* a 25°C y luego *in vivo* a 25°C y a 2°C (solamente *Botrytis cinerea*, debido a su capacidad de crecer a bajas temperaturas).

Preparación de levaduras para el test de antagonismo *in vitro*

Para el ensayo del antagonismo se partió de un inóculo inicial de levaduras de 10^8 cel/mL. Para esto se realizó un pre inóculo que contenía 20 mL de YEPD líquido, con agitación constante a 100 rpm a 25 °C durante 24 h.

Luego de la incubación, las células se separan del medio por centrifugación a 400 g durante 15 min.

El pellet resultante de las levaduras se resuspendió en suero fisiológico y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, para asegurar que no quedaran restos del medio YEPD. El segundo pellet obtenido se resuspendió por segunda ocasión en suero fisiológico y se hicieron los recuentos en camada de Neubauer. En función del recuento microbiológico obtenido, se realizaron diluciones necesarias para obtener un inóculo de 10^8 cel/mL para la realización del ensayo (Carrau Magariños, 2005).

Preparación del inóculo de esporas fúngicas para el test de antagonismo *in vitro*

Se partió de un inóculo fúngico de 7 días en medio PDA. Se separaron las esporas y se emplearon en el ensayo de antagonismo. Para desagregar las esporas del micelio del hongo se trató el inóculo con agua destilada estéril con el agregado de 0.1 % de Tween 80, y se raspo suavemente el cultivo con una asa estéril. Luego se filtró la suspensión de conidios a través de 2 capas de gasa estéril. Lo obtenido del filtrado se centrifugó en suero fisiológico estéril a 400 g, durante 15 minutos para eliminar los restos del medio donde estaba. Finalmente se resuspendió en agua destilada estéril y se ajustó la concentración a 10^6 conidios/mL mediante diluciones (Carrau Magariños, 2005).

Determinación de la capacidad antagónica *in vitro*

Se analizaron un total de 30 cepas de levaduras, Para la realización de esta determinación se prepararon las suspensiones de esporas y levaduras de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se realizaron perforaciones de 7 mm de diámetro por 5 mm de profundidad en el centro de las placas con medio similar jugo de uva con agregado de agar (50 g/L de glucosa, 60 g/L de fructosa, 2.5 g/L de ácido tartárico de potasio, 3.0 g/L de ácido L-Málico, 0.2 g/L de ácido cítrico, 0.5 g/L de fosfato de amonio y 10 mg/L de ergosterol) (Carrau Magariños, 2005).

El fondo de la perforación se cello con agar agua, con el objetivo de asegurar que los inóculos no se fueran hacia la parte de abajo del medio y crecieran hacia afuera de la perforación. Luego se inocularon en la perforación 50 μ L de suspensión de levaduras a partir de una población de 10^8 CFU/mL del microorganismo a probar potencialmente antagónico. Luego transcurridos 30 min, se inocularon 50 μ L de la suspensión de esporas de los hongos a probar en una concentración de 10^6 conidios/mL.

Se incluyeron 3 controles: a) placas sembradas con la levadura, b) placas sembradas con las esporas del patógeno y c) placa con una levadura control M26 (*M. pulcherrima*). Cada ensayo, incluidos los controles se realizaron por duplicado.

Las placas con los inóculos se incubaron por 7 días a una temperatura de 20-24 °C. Los resultados del antagonismo de las levaduras frente al hongo se expresaron como índice de efectividad (IE) del crecimiento del hongo. Dicho índice se calcula de la siguiente manera:

$$\%IE = \frac{DCF - DCE}{DCF} \times 100$$

Donde;

DCF: Diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en placa control.

DCE: Diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en placa del ensayo.

Determinación de la capacidad antagónica *in vivo*

El ensayo se realizó en un lote de cultivo al aire libre de uva (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera* L.), se reservó un área de cultivo particular que no tenía contacto directo con el resto de vid para producción comercial, cuyo cultivo presenta una temperatura media de 24.6 °C. Así mismo, en el laboratorio de biotecnología se trabajó con un lote de vid a 2 °C.

Los ensayos se realizaron mediante exposición del inóculo fúngico y de levaduras en la planta y fruto. Se incluyeron controles negativos. Se comparó la presencia/ausencia del hongo en las plantas y frutos inoculados con la levadura y los controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y diferenciación de los microorganismos

En total se aislaron 16 levaduras que luego del análisis microscópico y de los crecimientos sucesivos en el medio Agar Lisina, se confirmó que pertenecían al género *Saccharomyces*, sin embargo, también desarrollaron algunos no-*Saccharomyces*. Fue posible también aislar a 6 hongos filamentosos: *Botrytis cinerea*, *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium commune*, *Rhizopus stolonifer* y *Plasmopara viticola* (ver Figura 1).

Los ensayos de antagonismo *in vitro* e *in vivo* a 25°C mostraron que los mostos en fermentación fueron el principal ambiente vitivinícola a partir del cual se aislaron levaduras antagonistas (en su mayoría especies

S. cerevisiae) capaces de suprimir a los hongos fitopatógenos aislados.

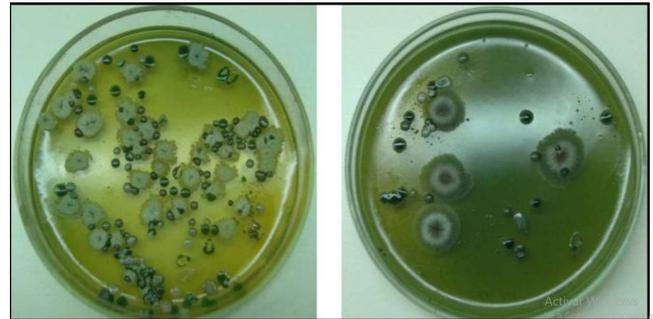


Figura 1. Microorganismos aislados de las muestras de la vid (de uva *Vitis vinifera* subsp. *Vinifera* L.).

Figure 1. Microorganisms isolated from grapevine samples (*Vitis vinifera* subsp. *Vinifera* L.).

En el caso de *B. cinerea*, el ensayo *in vivo* también se realizó a 2°C, pero ningún aislamiento antagonista redujo el porcentaje de incidencia de la pudrición gris más del 50%. *B. cinerea*, *A. carbonarius* y *R. stolonifer* presentaron sensibilidad a la acción de 8 aislamientos de levaduras antagonistas (5 pertenecientes al género *Saccharomyces* y 3 a no-*Saccharomyces*)

Se clasificaron tres grupos de levaduras, según el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de patógenos expresado como el IE:

1. Las que tienen un IE entre 0 – 10 % y comprende a las levaduras con acción nula o casi nula frente al aptoeno. En este grupo se encuentran las identificadas como CHW09, AR09, CS09, CS09/11, CS09/18, ME09/14 y representan el 23% del total de las levaduras.
2. Las que tienen un IE de 11 – 50 %. Estas levaduras tienen acción frente al patógeno que va de baja a moderada. En este grupo se encuentran las levaduras CS09/08 y ME09/15 y representan el 7 % de las levaduras totales.
3. Las que tienen un IE de 51 – 100 %, que tienen un franco efecto antagónico contra los fitopatógenos, consideran a las levaduras identificadas como 02/19^a, 02/25^a, 02/5^a, 00/09, 00/19, 000/23, 00/8 y MED09/17, todas del género *Saccharomyces*. Las cuales representan el 70 % del total de las levaduras aisladas.

En la Figura 2 se muestran algunos resultados del ensayo de inhibición *in vitro*.



Figura 2. Ensayo de inhibición *in vitro*.

Figure 2. *In vitro* inhibition assay.

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de levaduras, con actividad antagonista contra fitopatógenos de la vid. A partir de estos resultados se puede inferir como en los trabajos de Carrau Magariños (2005) y Rabosto *et al.*, (2006) que los racimos de uvas constituyen un nicho muy interesante para el aislamiento de microorganismos con actividad biocontroladora frente a los fitopatógenos. Es necesario seleccionar e incrementar la población de estos microorganismos flora normal en la vid para que su número contrarreste los efectos colonizantes de los fitopatógenos.

Estos resultados también coinciden con lo expuesto por Chalutz y Wilson (1900) los cuales encontraron que al sembrar placas en un concentrado del lavado de la superficie de las frutas cítricas, solo crecían levaduras y bacterias, no hongos. Sin embargo, al diluir el concentrado y sembrándolo en placas se pudo apreciar la aparición del crecimiento fúngico. Esto sugiere que las bacterias y las levaduras que se encontraban como flora normal en la fruta podían suprimir o impedir el crecimiento del fitopatógeno que estaba presente solo pudo crecer cuando baja la carga de bacterias y levaduras nativas de la fruta mediante la dilución del agua de lavado. Este resultado estaría indicando que cuando frutas y vegetales son lavados previo a su almacenamiento son más susceptibles a desarrollar enfermedades. Debido a que se eliminan los antagonistas frente a patógenos que naturalmente se encuentran en frutas y vegetales.

CONCLUSIÓN

Algunas levaduras biosupresoras fueron capaces de presentar un amplio espectro antagonista contra hongos filamentosos. En el viñedo se encuentra un buen ecosistema para el aislamiento de microorganismos levaduriformes con espectro antagonista frente a los fitopatógenos. Al concentrar el número de las levaduras antagonistas en la superficie de la planta y el racimo de uvas se faculta una protección pre y pos cosecha contra

los fitopatógenos. El empleo del biocontrol con microorganismos del mismo ecosistema regula y mantiene el flujo de poblaciones microbianas a nivel de campo

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Carrau Magariños, M. J. 2005. Evaluación de la capacidad antagonista de microorganismos aislados de la uva frente a hongos patógenos: *Botrytis* spp., *Plasmopara viticola*, *Penicillium* spp. y *Monilinia* spp. (No. 579.67 CAR). <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=FCT.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=001190>
2. Chalutz, E., & Wilson, C. L. 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant disease*, 74(2), 134-137 <https://ci.nii.ac.jp/naid/80005145452/>
3. Del Moral, J. 2006. La sanidad de los vegetales cultivados. Caja Rural de Extremadura. España. https://www.researchgate.net/profile/Margarita-Lopez-Corrales/publication/305995917_Plagas_y_enfermedades_del_cultivo_de_la_higuera/links/57a97ce708aed1b226245814/Plagas-y-enfermedades-del-cultivo-de-la-higuera.pdf
4. De La Torre. B. 1990. Enfermedades de las plantas cultivadas. 5ta. ed. *Alfa Omega*. Chile.
5. Editotrial El Vigía. (2019). Domina las uvas cultivos perenes en BCS. Recuperado el: 11/02/2019. Disponible en: <https://www.elvigia.net/general/2020/5/15/dominan-las-uvas-cultivos-perennes-348198.html>
6. Giralt, L., Carrasco, C. D., Barrios, G., Catalina, O., & Aybar, J. R. (2005). Guía básica de buenas prácticas vitícolas para minimizar la presencia de ocratoxina A en los productos vitivinícolas. ACE: Revista de enología, (59), 15. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1237926>
7. Krugg, J. W., & Valdivieso, H. R. 2012. Aislamiento de hongos fitopatógenos en lesiones de hoja y tallo de cultivos de vid, *Vitis viticola*, de Cascas, La Libertad (Perú).

- https://www.academia.edu/download/33102790/Aislamiento_de_hongos_fitopatogenos_en_lesiones.pdf
8. Ortiz Cubells, B. (2020). Evaluación del potencial antifúngico de *Aloe vera* frente a hongos fitopatógenos y de postcosecha (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València). <https://riunet.upv.es/handle/10251/157556>
 9. Ortiz Cubells, B. (2020). Evaluación del potencial antifúngico de *Aloe vera* frente a hongos fitopatógenos y de postcosecha (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València). <https://riunet.upv.es/handle/10251/157556>
 10. Rebosto X., Carrau Magariños, Paz A., Boido E., Dellacassa E., y Carrau F. M. 2006. Grapes and Vineyard Soils as Sources of Microorganisms for Biological Control of *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57(3), 332-338. <https://www.ajevonline.org/content/57/3/332.short>
 11. Representación Estatal de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (RE-SADER). 2019. Alcanzan cultivos perennes una superficie de 11,500 hectáreas en la zona costa de Baja California. Recuperado el: 19/05/2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/%7Cbajacalifornia/articulos/alcanzan-cultivos-perennes-una-superficie-de-11-500-hectareas-en-la-zona-costa-de-baja-california>
 12. Vidhayasekaran, P. 2004. Concise Encyclopedia of Plant Pathology. *The Haworth Press Inc.* USA. <https://api.taylorfrancis.com/content/books/mo/no/download?identifierName=doi&identifierValue=10.1201/9781482277951&type=googlepdf>
 13. Waller, J. M., Lenné, J. M., & Waller, S. J. (Eds.). 2002. Plant pathologist's pocketbook. *Cabi*. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=d_aqiD73NUAC&oi=fnd&pg=PR8&ots=NdlTGRtD2N&sig=Z8DfmpU2--cAN6AyUYi3EtFdN_4