

## ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LEVADURAS KILLER CONTRA *Alternaria* spp. *IN VITRO*

I. Marquina-Luévano<sup>a\*</sup>, M.P. Sangorrín<sup>b</sup>, M. Elizondo-Zertuche<sup>c</sup>, R. Treviño-Rangel<sup>c</sup>,  
G.M. González<sup>c</sup>, E.R. Robledo-Leal<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Nuevo León. <sup>b</sup> Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ingeniería, Neuquén, Argentina. <sup>c</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. \*ilenia.luevano@gmail.com

### RESUMEN:

Un total de 24 cepas de levaduras con el fenotipo killer (varias especies) fueron analizadas *in vitro* para detectar su actividad antagónica contra seis cepas diferentes de *Alternaria* spp. aisladas de muestras vegetales infectadas con este patógeno considerado como el agente causal de la enfermedad del "punto negro" en solanáceas y del "tizón temprano" en cultivos de la papa y el tomate. Seis cepas de levaduras produjeron una reducción significativa del micelio de *Alternaria* spp.; cuatro de ellas pertenecientes al género *Pichia guilliermondii* y una a *Pichia kluyveri* (dos cepas aún no se han identificado). Especialmente *P. kluyveri* mostró una reducción del crecimiento micelial del hongo en un porcentaje mayor al 50% en todas las cepas del hongo y la cepa VG032 mostró un buen poder de inhibición al tener un porcentaje de reducción  $\geq 45$  en cuatro cepas de *Alternaria* spp., estos resultados indican que algunas cepas de levaduras poseen toxinas que se pueden utilizar como agentes de biocontrol contra *Alternaria* spp. y así evitar la contaminación producida por fungicidas y agentes químicos.

### ABSTRACT:

A total of 24 strains of yeast with killer phenotype (several species) were analyzed *in vitro* to detect antagonistic activity against six different strains of *Alternaria* spp. isolated from plant samples infected with this pathogen considered as the causative agent of "black spot" disease in solanaceous and "early blight" in potato and tomato crops. Six yeast strains produced a significant mycelial growth reduction of *Alternaria* spp.; four of them belonging to the genus *Pichia guilliermondii* and *Pichia kluyveri* (two strains have not been identified). Especially *P. kluyveri* showed a reduction of mycelial growth of the fungus in a percentage higher than 50% on solid medium (PDA) in all strains of the fungus and the strain VG032 demonstrated inhibition activity by produced  $\geq 45$  percent of reduction in four strains of *Alternaria* spp., these results indicate that some yeast strains have toxins that can be used as biocontrol agents against *Alternaria* spp. and prevent pollution caused by fungicides and chemical agents.

**Palabras clave:** *Alternaria* spp., biocontrol, levaduras killer.

**Keywords:** *Alternaria* spp., biocontrol, killer yeasts.

**Área:** Microbiología y Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las especies de *Alternaria* son unas de las principales causas de las enfermedades necrotróficas en las plantas. Existen algunos ejemplos de *Alternaria spp.* como principales patógenos de plantas incluyendo a las especies: *A. brassicicola* y *A. solani*. *A. brassicicola* causa la enfermedad del “punto negro”, que produce una devastación foliar y se ha convertido en una de las principales enfermedades transmitidas por las semillas en cultivos de col, brócoli, canola y colza, mientras que *A. solani* es el principal agente causal del “tizón temprano” una enfermedad que afecta a los cultivos de las solanáceas incluyendo papa y tomate y que es considerada como una de las enfermedades más destructivas en el mundo [3]. Por otra parte la concurrencia de metabolitos producidos por *Alternaria* potencialmente dañinos (como las micotoxinas) presentes en alimentos y diversos productos alimenticios se está convirtiendo también en un problema ambiental [2].

Las especies de *Alternaria* pueden afectar a los campos de cultivo así como a los productos post-cosecha. Las pérdidas económicas producidas por las enfermedades fúngicas han influenciado en la decisión de utilizar agentes químicos para su control [10], sin embargo se ha generado cierta inquietud acerca de la seguridad para la salud de los agentes químicos y la aparición de fitopatógenos resistentes [17]. Se ha demostrado que el uso de microorganismos antagónicos incluyendo levaduras, levaduras parecidas a hongos y bacterias como agentes de biocontrol representa una de las alternativas más viables [14-20]. Las levaduras poseen características que las hacen efectivas en el biocontrol contra hongos filamentosos: crecen rápidamente en sustratos baratos, fermentadores y en biorreactores, no producen esporas alérgicas y poseen la capacidad de colonizar superficies secas por largos periodos de tiempo [11-1-6]. Por este motivo se ha prestado especial atención a las levaduras que exhiben el fenotipo killer. La actividad killer se define como la habilidad de algunas especies de levaduras para secretar proteínas o glicoproteínas que generalmente pueden matar a células susceptibles [8] (incluyendo a los hongos filamentosos).

La mayoría de los reportes hasta el momento se centran en el uso de levaduras killer para el biocontrol de hongos filamentosos que afectan a frutas tropicales como los son *Colletotrichum sp.* y *Botrytis sp.*, por lo tanto el objetivo de este estudio fue evaluar la disminución en el crecimiento radial de 6 cepas diferentes de *Alternaria* provocado por el antagonismo de 24 cepas de levaduras killer e identificar aquellas que posean un mayor poder antagónico contra este hongo filamentoso, en donde cinco cepas de levaduras killer fueron capaces de inhibir su crecimiento en un porcentaje  $\geq 45$  en más de una cepa de *Alternaria*, mientras que una cepa de levadura killer fue capaz de inhibir en un porcentaje  $> 50$  el crecimiento de las seis cepas de *Alternaria* utilizadas, demostrando que el uso de levaduras killer podría ser una alternativa viable para el biocontrol de este hongo filamentoso en el área agrícola y alimentaria.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Microorganismos y condiciones de las cepas**

Las levaduras utilizadas en este estudio pertenecen al cepario del laboratorio de Fitopatología (Departamento de Microbiología e Inmunología) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, aisladas de ambientes naturales y fermentos frutales. Las cepas se identificaron como *W. anomalus* (1027, 1025, 1026), *P. membranifaciens* (1250), *C. weringae* (1268), *M. pulcherrima* (1153, 1127, 1144, 1023) y *P. kluyveri* (1153) utilizando el análisis ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> rDNA PCR-RFLP descrito por Esteve-Zarzoso et al. (1999) y confirmado secuenciando los dominios D1/D2 en el gen 26S del RNA (Kurtzman and Robnett 1998). *P. gilliermondii* (FCB10AM, FCB5, FCB10, FCB9, FCBB6, RT3) se identificó por API 20 C aux., *Rhodotorula sp.* (G8), *S. cerevisiae* (LALVIN) se obtuvo de la industria cervecera, y seis cepas aún no se han identificado (VG010, VG021, VG032, VG036, M4, AT3). Las seis cepas de *Alternaria spp.* fueron aisladas de muestras vegetales (frutos y hojas). En el caso de frutos se colocaron en una cámara húmeda hasta observar crecimiento de micelio y el aislamiento se llevó a cabo utilizando el método de picadura directamente en placas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA). En las hojas se realizaron diluciones en solución salina (.85%) y se colocó 1ml en placas de petri con PDA (adicionado con rosa de bengala), las placas fueron incubadas a 30°C hasta observar el crecimiento fúngico. Los cultivos puros se almacenaron en tubos de ensayo con PDA a 4°C.

### Ensayos in vitro

Las cepas de levaduras y hongos utilizadas crecieron respectivamente en PDA por 48 h a 25-27°C y 5-6 días a 30°C. Para evaluar la actividad antagónica contra *Alternaria spp.*, se inoculó el hongo por picadura en el centro de la placa de Petri con PDA acidificado (pH 4), posteriormente se inocularon dos líneas paralelas de la levadura killer utilizando aplicadores de madera (una levadura por placa de Petri). Se utilizaron dos placas por cepa de levadura y una placa control para cada cepa de *Alternaria sp.* inoculada con el hongo también por el método de picadura. El periodo de incubación fue de 8 días a 28°C. Pasado el tiempo de incubación la reducción en el crecimiento radial fue calculado en relación con el crecimiento de la placa control: %R= 100-(PL/PC\*100), en donde %R representa la reducción radial del crecimiento fúngico, PC es el crecimiento radial en el control y PL es el crecimiento radial del hongo en presencia de las levaduras killer.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 24 cepas de levaduras con fenotipo killer utilizadas en este ensayo, seis demostraron tener un alto poder de antagonismo contra las cepas aisladas de *Alternaria spp.*, las cepas FCB10AM, VG032, AT3, FCB9 y FCB10 fueron capaces de inhibir el crecimiento radial de más de una cepa de *Alternaria* en un porcentaje  $\geq 45$ , mientras que la cepa 1153 fue capaz de inhibir el crecimiento radial en un porcentaje  $>50$  en las seis cepas del hongo filamentoso. Actualmente muchos microorganismos han sido reportados como agentes de biocontrol contra patógenos que afectan a las plantas, sin embargo en este estudio nos enfocamos en el análisis de levaduras con el fenotipo killer teniendo como hipótesis que algunas de estas cepas serían efectivas contra el hongo filamentoso del género *Alternaria* mediante la reducción de su crecimiento en placas de Petri.

Las cepas FCB10AM (*P. guilliermondii*) y AT3 mostraron buenos valores de %R (50,56-47,47), efecto antagónico sólo fue efectivo en las cepas As-06-255 y As-09-258 de *Alternaria* en ambos casos. Las cepas FCB9 y FCB10 pertenecientes a la misma especie de levadura (*P. guilliermondii*) mostraron valores en el porcentaje de reducción radial (50%,46%,45%-46%,47%,49%) en las cepas As-07-256, As-08-257, As-09-258 y As-05-254, As-06-255, As-07-256 respectivamente (Tabla I y II). *P. guilliermondii* ha sido ampliamente reportado como un buen agente de biocontrol contra hongos patógenos, incluyendo la pudrición azul y verde de los cítricos causada por hongos del género *Penicillium* [5-12], la pudrición del fruto del tomate causado por *R. nigricans* [19-21], contra *C. capsici* en el chile [16] y también se demostró su efectividad de biocontrol contra la pudrición gris de las manzanas producida por *B. cinérea* [4], por lo que se puede deducir que este género de levaduras posee un amplio espectro de inhibición contra algunos hongos fitopatógenos.

Sin embargo los estudios sobre el efecto antagónico de esta levadura contra *Alternaria spp.* son prácticamente nulos. En el caso de la cepa VG032 se observó un aumento en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial producido en comparación con los resultados de las levaduras killer antes descritas, así como en el número de cepas de *Alternaria* en las que produjo un efecto antagónico, obteniendo valores de 48% (As-05-254), 58%( As-06-255), 68%(As-07-256) y 52%(As-08-257), por lo que se recomienda su identificación para estudios posteriores.

Por último, la cepa 1153 (*P. kluyveri*) produjo una inhibición del crecimiento fúngico significativamente mayor a los ya mencionados y resultó ser la única cepa de levadura cuya actividad antagónica fue efectiva en las seis cepas de *Alternaria* utilizadas en este ensayo con valores de %R de 56, 65, 64, 64, 78 y 68 en las cepas As-05-254, As-06-255, As-07-256, As-08-257, As-09-258 y As-10-259 respectivamente (Tabla I). *P. kluyveri* ha sido descrita como una de las levaduras killer más frecuentemente aislada de comunidades de levaduras tropicales [9] y la toxina producida por esta levadura es una glicoproteína que es más activa entre los valores de pH de 2.5 y 4.7 y a temperaturas de hasta 40°C [15].

Se ha logrado evaluar la actividad antagónica in vitro de *P. kluyveri* contra los mohos patógenos *P. crustosum* y *M. circinelloides*, en donde la eficacia de biocontrol in vitro era dependiente de la concentración de las células de levadura [18], esta información es importante ya que en este bioensayo la cantidad de inóculo del hongo y la concentración de las células de la levadura no fueron cuantificados y quizá con esto se pueda incluso optimizar el poder antagónico producido contra *Alternaria spp.*, pero es importante recalcar que el uso y el estudio de *P. kluyveri* se ha centrado principalmente en la investigación de la toxina killer pero no como su potencial uso como biocontrolador de hongos fitopatógenos.

En conclusión, se logró demostrar que las cepas de *Alternaria spp.* pueden ser susceptibles a cepas de levaduras killer y puesto que ya existen en el mercado formulaciones (cuyo principio activo son levaduras) para el biocontrol se presenta como una buena alternativa al uso de químicos y fungicidas en los campos de cultivo.

**Tabla I.-** Reducción en el crecimiento radial (%) de *Alternaria spp.* producido por el antagonismo de las levaduras killer. \*Levaduras con mayor poder antagónico

Hongo aislados	Cepas de levaduras											
	FCB10*	FCB9*	FCBB6	RT3	VG036	VG032*	LALVIN	AT3*	1026	1144	1153*	1023
As-05-254	46	32	34	10	5	48	29	13	14	16	56	-3
As-06-255	47	44	47	37	50	58	48	47	32	31	65	11
As-07-256	49	50	43	36	41	68	27	9	32	28	64	24
As-08-257	38	46	37	34	20	52	39	31	40	48	64	26
As-09-258	34	45	36	26	35	39	32	47	32	32	78	12
As-10-259	30	39	29	14	36	35	20	38	25	15	68	15

**Tabla II.-** Reducción en el crecimiento radial (%) de *Alternaria spp.* producido por el antagonismo de las levaduras killer. \*Levaduras con mayor poder antagónico

Hongos aislados	Cepas de levaduras											
	1027	FCB10A M*	1250	1268	VG010	VG021	1123	1025	M4	1127	FCB5	G8
As-05-254	16	37	17	17	23	36	31	14	17	14	24	18
As-06-255	36	50	37	35	19	36	31	31	34	31	36	61
As-07-256	42	34	35	39	43	35	38	35	32	36	38	40
As-08-257	33	38	33	21	30	25	26	45	24	28	30	45
As-09-258	31	56	38	30	29	29	23	27	34	36	45	27
As-10-259	10	24	9	18	38	25	29	26	30	30	28	14

## BIBLIOGRAFÍA

- Adebanjo, A., Bankole, S.A., 2004. Evaluation of some fungi and bacteria for biocontrol of anthracnose disease of cowpea. *J. Basic Microbiol.*, 44, 3–9.
- Bottalico A, Logrieco A. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. *Mycotoxins Agric Food Saf.* 1998;65:108.

- Dang H, Pryor B, Peever P and Lawrence C, 2015. The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species, 16:239.
- Dianpeng Zhang a, Davide Spadaro a,b, Angelo Garibaldi a, Maria Lodovica Gullino a, 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action, *Biological Control* 57, 193–201.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Timar, D., Chalutz, E., 1993. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control* 3, 47–52.
- Druvefors, U. Å., 2004. Yeast biocontrol of grain spoilage moulds – Mode of action of *Pichia anomala*. Doctor's dissertation. ISSN 1401-6249, IBSN 91-576-6493-5. Retrieved January 11, 2011, from Epsilon dissertations and graduate.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 58S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal Systematic Bacteriology* 49, 329-337.
- Fan, Q., Tian, S.P., 2000. Postharvest biological control of rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Dis.*, 84, 1212–1216.
- acqueline Abranches, Paula B. Morais, Carlos A. Rosa, Leda C. Mendonça-Hagler, and Allen N. Hagler, 1997. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities, *Can. J. Microbiol.* Vol. 43.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H.R., Aminian, H., Alizadeh, A., 2008. Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1). *Phytoparasitica* 36, 23–29.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, 411–441.
- Kinay, P., Yildiz, M., 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control* 45, 433–440.
- Kurtzman CP, Robnett CJ, 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:331–371.
- Lima, G., Castoria, R., De Curtis, F., Raiola, A., Ritieni, A., De Cicco, V., 2011. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. *Postharvest Biol. Technol.* 60, 164–172.
- Middelbeek E.J., Hermans J.M.H. and Stumm C. 1979. Production, Department. The research reported is mostly from purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek* 45: 437–450.
- Nantawanit, N., Chanchaichaovivat, A., Panijpan, B., Ruenwongsa, P., 2010. Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biological Control* 52, 145–152.

- Pimenta, R.S., Silva, J.F.M., Coelho, C.M., Morais, P.B., Rosa, C.A., 2010. Integrated control of *Penicillium digitatum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. *Braz. J. Microbiol.* 41, 404–410.
- Restuccia C, Giusino F, Licciardello F, Randazzo C, Caggia C, Muratore G, 2006. Biological control of peach fungal pathogens by commercial products and indigenous yeasts. *J Food Prot* 69(10):2465–2470.
- Saligkarias, D., Gravanis, F.T., Epton, H.A.S., 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies I. *Biological Control* 25, 143–150.
- Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biol. Technol.* 33, 141–151.