

Selección e identificación de levaduras para el control biológico de *Alternaria* en uva Malbec

Selection and identification of yeasts for the biological control of *Alternaria* in Malbec wine grapes

Luciana Paola Prendes^{1,2}, María Gabriela Merín^{1,2}, Mario Alberto Andreoni³, Vilma Inés Morata^{1,2}.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2.CONICET. 3.INTA-Rama Caída.
lpprendes@fcai.uncu.edu.ar

Resumen

La presencia del género fúngico *Alternaria* con capacidad de producir micotoxinas en uva para vinificar podría significar un gran riesgo para la salud de los consumidores de vino. En pos de seleccionar un posible agente de control biológico del mismo en uva para vinificar, se evaluaron levaduras aisladas del mismo ecosistema. El 22,1% del total de levaduras y organismos tipo levadura aislados de uvas Malbec evaluados presentaron actividad antagonista de *Alternaria alternata* en ensayos en uva y la mayoría de ellas (14/15) mostraron una gran capacidad antagonista logrando un efecto preventivo. Todas las cepas de levadura con mayores requerimientos nutricionales, como *Metschnikowia* spp., *Candida zemplinina* y la mayoría de *Hanseniaspora uvarum* probadas mostraron capacidad antagonista frente a *A. alternata*, no así las cepas de menores requerimientos, como el organismo tipo levadura *Aureobasidium pullulans*, o las levaduras *Cryptococcus laurentii* II y *Rhodotorula* spp., sugiriendo una correlación positiva entre estos factores. La identificación de las levaduras antagonistas mediante la metodología de secuenciación del 26S, permitió corroborar la identidad asignada por el método de PCR-RFLP. Estos hallazgos resultan prometedores para el control biológico de *Alternaria* en uva para vinificar.

Palabras clave: *Alternaria*, control biológico, levaduras antagonistas, Malbec.

Abstract

The presence of *Alternaria* fungal genus, which is able to produce mycotoxin in wine grapes, could mean a health risk for wine consumers. With the aim to select a possible biological control agent in wine grapes, yeasts from the same ecosystem were evaluated. The 22.1% from total yeasts and yeast-like organisms evaluated showed antagonistic activity against *Alternaria alternata* in wine grape assays and most of them (14/15) showed a great antagonistic ability achieving a preventive effect. All *Metschnikowia* spp., *Candida zemplinina* and almost all *Hanseniaspora uvarum* evaluated strains, with higher nutritional requirements, showed antagonist capability against *A. alternata*. Meanwhile, none of the lesser nutritional requirement strains belonging to *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus laurentii* II and *Rhodotorula* spp. did, suggesting a positive correlation between these factors. Molecular identification through 26S sequencing allows confirming the assigned identity by PCR-RFLP method. These findings result promising for the biological control of *Alternaria* in wine grapes.

Keywords: *Alternaria*, biological control, antagonist yeasts, Malbec.

1. Introducción

El género *Alternaria* es un componente principal de la microbiota en uvas para vinificar en diversas regiones vitivinícolas de Argentina y del mundo (Rouseaux *et al.*, 2014; Tancinova *et al.*, 2015; Prendes *et al.*, 2015). La existencia de cepas de la especie *Alternaria alternata* aisladas de uva Malbec con habilidad de producir ácido tenuazónico (ATE), alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME) (Prendes *et al.*, 2015; Vargas Trinidad *et al.*, 2015) así como la incidencia natural de estas micotoxinas en jugo de uva y vino (Lau *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2006; Broggi *et al.*, 2013; Pizzutti *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2016), indican que la presencia de este género en uvas para vinificar podría significar un riesgo para la salud de los consumidores de vino.

La prevención del crecimiento de hongos productores de micotoxinas es la estrategia más efectiva para controlar la presencia de micotoxinas

en los alimentos (Hocking *et al.*, 2007). En los últimos 25 años, debido al aumento de las regulaciones y las demandas de los consumidores por productos más saludables, se ha incrementado el interés por el control biológico como método alternativo a la aplicación de fungicidas orgánicos y/o químicos para el control del crecimiento fúngico en frutos (Liu *et al.*, 2013). En este sentido, las levaduras epífitas de uva para vinificar resultan prometedoras para el control biológico de *Alternaria*, debido a que como componentes mayoritarios adaptados fenotípicamente a este nicho, son capaces de colonizar más efectivamente y competir por los nutrientes y el espacio además de poder permanecer en las superficies de planta o heridas durante largos periodos y condiciones secas (Suzzi *et al.*, 1995).

El control biológico con levaduras epífitas de bayas de uva ya ha sido propuesto como una herramienta útil para reducir el impacto de especies de

Aspergillus productoras de ocratoxina en los viñedos. Cepas de *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* y *Candida incommunis*, fueron capaces de disminuir la colonización de las uvas por *A. carbonarius* y *A. niger* (Bleve *et al*, 2006). Así también, dos cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* mostraron capacidad de controlar el crecimiento de *A. carbonarius* y de especies de *Aspergillus* del agregado *A. niger* y la acumulación de OTA (Ponsone *et al.*, 2011).

También se han realizado estudios con levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas, para el control de diversos patógenos fúngicos de planta o uva de mesa. Suzzi *et al* (1995) observaron que levaduras naturales del vino aisladas de baya de uva poseían actividad biocontroladora contra hongos patógenos de planta (*A. niger*, *A. alternata*, *Botrytis squamosa*, *Cladosporium variable*, *Colleotrichum acutatum*, *Fusarium oxy sporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium digitatum*, *Phomopsis longicola*, *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotium* y *Trichoderma viride*). Dos cepas de *S. cerevisiae* y una de *Zygosaccharomyces* resultaron los antagonistas más prometedores. Asimismo, entre levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas en Argentina, se encontraron 16 levaduras antagonistas de *B. cinerea* (15 *S. cerevisiae* y 1 *Sch. pombe*) en uvas de mesa (Nally y *col.*, 2012) y 43 levaduras antagonistas (16 *Saccharomyces*, 9 *Candida*, 4 *Dekkera*, 1 *Issatchenkia orientalis*, 2 *K. marxianus*, 2 *P. membranifaciens*, 1 *S. roseus*, 8 *T. delbrueckii*) de alguno de los hongos componentes del complejo de podredumbre ácida en uvas de mesa (*Aspergillus caelatus*, *A. carbonarius*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *F. oxysporum*, *Penicillium comune*, *Rhizopus stolonifer* y *Ulocladium* sp.) (Nally *et al*, 2013).

Por otra parte, el biocontrol puede visualizarse como un sistema, en donde existe una relación cuantitativa entre la concentración de las células del antagonista, concentración de organismo a controlar y el resultante biocontrol (Schisler *et al*, 2011). En este sistema, resulta importante conocer la concentración del patógeno a la cual se lo puede controlar así como definir la concentración del antagonista necesario para tal fin.

Es importante destacar que en el mercado, ya se han desarrollado varios productos basados en levaduras antagonistas para el control de enfermedades post-cosecha de uvas, frutos de pepito y cítricos como Aspire (Ecogen, Inc., Langhore, PA) con la levadura antagonista *C. oleophila* (Droby *et al*, 1993,1998), Yieldplus (Anchor yeast, Cape town) basado en *Cryptococcus albidus* (De Koch, 1998) hecho y registrado en el sur de África y Shemer (Agrogreen, Asgdod) basado en *M. fructicola* (Kurtzman y Droby 2001; Karabulut *et al*, 2002 y 2003) hecho y registrado en Israel.

Por todo lo expuesto, son objetivos del presente trabajo: i) seleccionar levaduras y organismos tipo levadura con capacidad de biocontrol de *Alternaria*

alternata en uva Malbec y ii) confirmar la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S.

2. Metodología

2.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva

2.1.1 Preparación del inóculo de levadura y organismos tipo levadura

Se realizaron siembras de cada una de las cepas de levadura a evaluar en medio MYGP y se incubaron a 28 °C durante 48-72 hs. Se tomaron varias colonias aisladas por cepa y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril contenida en un microtubos de 1,5 mL. Estas suspensiones fueron centrifugadas a 6200 g por 5 minutos a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes y los pellets fueron resuspendidos nuevamente en agua destilada estéril para repetir el procedimiento, para eliminar cualquier nutriente remanente del medio inicial. Finalmente los pellets fueron resuspendidos en agua destilada estéril y se ajustó la concentración de levadura a 10⁶ UFC/mL mediante recuento en cámara de Neubauer.

2.1.2 Cepas e inóculo fúngico

Se utilizaron 3 cepas de *A. alternata* (5.5, 7.5 y 25.1) seleccionadas por su capacidad toxicogénica en medio AMLM (*in vitro*) y actividad patogénica y toxicogénica demostrada en uva (Prendes *et al*, 2015; Prendes, 2016). Para la preparación del inóculo fúngico, se sembraron cada una de las cepas de *A. alternata* en medio APZ y se incubaron a 20-25 °C durante 7-10 días bajo ciclos alternativos de luz blanca: oscuridad (8: 16 hs). Finalizado el período de incubación, se adicionaron 4 mL de agua destilada- 0.05 % Tween 20 (v/v) estéril a cada una de las placas, para remover las esporas del micelio. Cada suspensión fue recolectada en microtubos de 1,5 mL estériles que se centrifugaron a 13.000 g por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el precipitado de esporas fue resuspendido en 1 mL de una solución 0,01 % de Tween 20 (v/v) estéril. La concentración de esporas fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer y las concentraciones a utilizar fueron ajustadas por dilución en solución 0.01 % Tween 20 (v/v).

2.1.3 Determinación de la concentración mínima infectiva (CMI) de *Alternaria alternata* en uva

Previamente a la selección de las levaduras y organismos tipo levadura con capacidad antagonista frente a *A. alternata* en uva, se procedió a determinar la concentración mínima infectiva de

cada una de las 3 cepas de *A. alternata* utilizadas. La metodología se basó en el ensayo de fitopatogenicidad descrito por Nally *et al* (2013). Brevemente se tomaron bayas de uva Malbec sanas (recolectadas en tiempo de cosecha) con sus pedicelos remanentes y se las desinfectó superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (1 %, v/v) seguido de 3 lavados con agua destilada estéril. Las uvas fueron inoculadas mediante el uso de micropipeta con un volumen de 20 µl de una suspensión de esporas en solución 0.01 % Tween 20 (v/v) a una concentración dentro del rango de $1,75 \cdot 10^2$ a $1,9 \cdot 10^5$ esporas/mL, generando una herida ecuatorial con el mismo tipo estéril que contenía la suspensión. El control negativo consistió en uvas inoculadas sólo con 20 µl de la solución 0.01 % Tween 20 (v/v). Las uvas inoculadas se incubaron en placas de Petri (90 mm) a 25°C en estufa, a humedad relativa de 100 % por 5 días. Se utilizaron 3 placas con 8 uvas por placa por cada cepa y condición a evaluar. El experimento se repitió 2 veces.

Al final del experimento, se determinó para cada cepa y concentración de esporas evaluadas, el porcentaje de infección o la incidencia de la enfermedad ocasionada por *Alternaria* en uvas (%), calculada como el número de heridas infectadas/ número de heridas totales x 100. La mínima concentración de esporas capaz de producir un porcentaje de infección del 100 % para cada cepa de *Alternaria*, fue definida como la CMI.

2.1.4 Evaluación del efecto preventivo de las levaduras y organismos tipo levadura frente a la infección de *Alternaria alternata* en uva

Se utilizaron 67 cepas de levadura y organismos tipo levadura aisladas durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael, previamente identificadas mediante el método de RFLP-ITS (Prendes, 2016). En pos de generar una presión de selección durante el aislamiento, las colonias con características de levadura se aislaron al cabo de 7 días de incubación de bayas de uvas Malbec colocadas directamente sobre el medio DRBC, para someterlas a una convivencia obligada con hongos. Se evaluó el posible efecto preventivo de las mismas frente a la infección ocasionada en uva por cepas de *A. alternata*, utilizando la metodología descrita previamente (punto 2.1.3) con algunas modificaciones. Se desinfectaron superficialmente bayas de uva Malbec sanas (recolectadas en tiempo de cosecha) con sus pedicelos remanentes y se inocularon mediante el uso de micropipeta con un volumen de 20 µl de una suspensión de 10^6 UFC/mL de la cepa de levadura u organismos tipo levadura a evaluar, generando una herida ecuatorial con el mismo tipo que contenía la suspensión. Una

vez cumplido el período de 2 horas se inoculó, en la misma herida y mediante micropipeta, 20 µl de la cepa de *Alternaria* a enfrentar a su CMI. Los controles negativos consistieron en uvas inoculadas sólo con 20 µl de agua destilada estéril y uvas inoculadas con 20 µl de la suspensión de cada levadura y organismo tipo levadura a evaluar sin post-inoculación del patógeno. Los controles positivos consistieron en uvas inoculadas sólo con 20 µl del patógeno (*A. alternata*) a su CMI. Las uvas inoculadas se incubaron en placas de Petri (90 mm), a razón de 8 uvas por placa, a 25 °C en estufa y humedad relativa de 100 % durante 5 días. Se utilizaron 8 uvas por réplica (placa) y 3 réplicas por tratamiento en un diseño de bloques completos al azar. Al final del experimento se determinó el porcentaje de infección o la incidencia de la enfermedad ocasionada en uva (%) por tratamiento, como el número de heridas infectadas/ número de heridas totales x 100.

Con los datos del primer experimento se realizó la preselección de levaduras y organismos tipo levadura con capacidad preventiva, utilizando como criterio una reducción mayor o igual a 60 % del porcentaje de infección provocado por cada una de las 3 cepas de *A. alternata* a su CMI. El experimento fue repetido sólo para aquellas cepas que resultaron preseleccionadas.

2.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S

2.2.1 Extracción del ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico total de las levaduras que resultaron seleccionadas por su capacidad preventiva frente a la infección de las 3 cepas de *A. alternata* en uva (punto 2.1.4), siguiendo la técnica descrita por Querol *et al* (1992). Los aislamientos de las levaduras se inocularon en caldo YPD y se incubaron a 28 °C durante 24-48 h. Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min. El sedimento celular se lavó con 1 mL de agua estéril y se resuspendió en 500 µl de solución 1 (sorbitol 0,9 M; EDTA 0,1M). Se agregó 30 µl de una solución de zimoliasa (25 mg/ml) y 30 µl de glucanasa (25 mg/ml), se homogeneizó e incubó a 37 °C durante 1 h. A posteriori se centrifugó a 7.000 g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 500 µl de solución 2 (Tris-HCl 50 Mm, EDTA 20Mm), se añadió 13 µl de SDS 10% y se incubó a 65 °C durante 5 min. Se agregó 200 µl de acetato de potasio (5M/3M), se agitó por inversión y se dejó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 4 °C durante 15 min y se pasaron los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios. Para precipitar el ADN de los sobrenadantes se agregó isopropanol en una relación 1:1, se agitó por inversión, se incubó a -20°C durante 30-60 min y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El

ADN precipitado se lavó dos veces con etanol 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua miliQ estéril. Para eliminar el RNA, se agregó a cada tubo 1 μ l de RNasa 2mg/ml y se incubó a 37 °C durante 1 h.

2.2.2 Reacciones de PCR y análisis de las secuencias

Se amplificó, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, un fragmento de de aproximadamente 500-600 nucleótidos que corresponde al extremo 5' del gen que codifica el ARNr 26S (subunidad grande), conteniendo los dominios D1 y D2. Para ello, se utilizaron los cebadores descritos previamente por Kurtzman y Robnett (1998): NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Fig. 10). Para la amplificación exitosa en una de las cepas se requirió la dupla ITS1-NL4. La amplificación se realizó en un termociclador TC-312 (TECHNE). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 μ L y contuvo 1 μ L de ADN templado (12-60 ng/ μ L), 5 μ L de tampón de PCR 10 \times , 3 μ L de MgCl₂ (50mM), 4 μ L de dNTPs 1 mM, 1 μ L de cada cebador 10 μ M, 0,25 μ L de enzima Taq polimerasa (5 U/ μ L) y 34,75 μ L de agua miliQ. La mezcla de reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 2 min 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C. Seguidamente, los productos amplificados del gen 26S del ADNr se purificaron con el kit de purificación QIAquick PCR Purification (Qiagen) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

La secuenciación de los fragmentos amplificados de ADNr se realizó por electroforesis capilar usando los cebadores NL1 y NL4, en uno de los casos se requirió ITS1, haciendo uso de la prestación de servicios externos de la Unidad de Genómica del INTA Castelar (Hurlingham, Buenos Aires, Argentina). Las secuencias obtenidas se editaron con el software MEGA6 versión 2013 y las comparaciones se realizaron con las secuencias presentes en las bases de datos de acceso público con la herramienta de búsqueda de alineamientos locales básica (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) provista por GenBank, disponible en el servidor del NCBI (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir de las secuencias parciales de ADNr se construyó el árbol filogenético de las cepas aplicando el método de "Neighbor-joining" (Tamura y col., 2004) mediante el software MEGA6.

2.3 Análisis estadístico

Para la selección de cepas de levadura y organismos tipo levadura con capacidad preventiva frente a la infección de *A. alternata* en uva, se utilizaron los datos de porcentaje de infección correspondientes a los 2 experimentos, se obtuvo promedio y desviación estándar para cada una de las cepas y se seleccionaron aquellas que lograron una reducción del porcentaje de infección igual o mayor al 60 % (p de 0,05) para cada una de las 3 cepas fúngicas en su CMI.

Para el análisis de las levaduras seleccionadas se aplicó el análisis multivariado de varianza (MANOVA), seguido de test de Hotelling-Bonferroni para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013) y STATGRAPHICS Plus 5.1.

3. Resultados y Discusión

3.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva

La determinación de la concentración mínima infectiva (CMI) de *A. alternata* en uvas Malbec a 25 °C durante 5 días, mostró diferencias entre las distintas cepas evaluadas. Para las cepas de *A. alternata* 5.5 y 25.1 la CMI resultó de $1,75 \times 10^4$ esporas/ mL y para la cepa 7.5 fue de 5×10^4 esporas/ mL, ocasionando porcentajes de infección de 97 ± 21 %, 97 ± 17 % y 98 ± 18 %, respectivamente.

En un primer experimento de selección, el 48 % (32) de las cepas de levadura y organismos tipo levadura evaluados (67) disminuyeron el porcentaje de uvas infectadas en un 60 % para cada una de las 3 cepas de *A. alternata* ensayadas, resultando preseleccionadas para un segundo experimento. Finalmente, el 22,4 % (15) del total de levaduras y organismos tipo levadura evaluados lograron controlar a las 3 cepas de *A. alternata* en los 2 experimentos independientes llevados a cabo ($p < 0,05$) y si se excluye la población del organismo tipo levadura *A. pullulans*, el porcentaje de levaduras con capacidad antagonista asciende a 75 % (15/20) (Tabla 1). Estos porcentajes resultan elevados cuando se comparan con el 0,4 a 4 % obtenido por Nally *et al.* (2013) y el 19 % obtenido por Zahavi *et al.* (2000) de levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas antagonistas de diversos agentes fúngicos causantes de podredumbres de uva de mesa o uva para vinificar. Es posible que la búsqueda de levaduras antagonistas en el mismo nicho ecológico al de los organismos a controlar, sumado a una metodología de pre-selección como la aplicada en el presente trabajo, hayan contribuido al alto porcentaje de antagonistas obtenido entre los aislados.

Como se puede observar en la tabla 1, todas las cepas de levadura identificadas como *M. pulcherrima* (6), *C. zemplinina* (3) y la mayoría (6 de 7) de *H. uvarum* evaluadas mostraron capacidad de disminuir la infección en uva provocada por las tres cepas de *A. alternata* empleadas. Por otro lado, ninguna de las cepas del organismo tipo levadura *A. pullulans* (47) y las cepas de levadura identificadas como *Cr. laurentii II* (3) y *Rhodotorula* spp. (1) mostraron esa capacidad. El trabajo realizado en la presente tesis resulta el primer informe acerca del uso de cepas de *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* como antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar y particularmente, el primer informe de la levadura *C. zemplinina* con capacidad biocontroladora.

Tabla 1. Cepas de levadura y organismos tipo levadura aisladas durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael con capacidad antagonista frente a *Alternaria alternata*.

Especie	Evaluadas	Antagonistas ¹
<i>A. pullulans</i>	47	0
<i>H. uvarum</i>	7	6
<i>M. pulcherrima</i>	6	6
<i>Cr. laurentii II</i>	3	0
<i>C. zemplinina</i>	3	3
<i>Rhodotorula</i> spp.	1	0
Total	67	15

¹ Capaces de reducir el porcentaje de uvas infectadas en un 60 % para cada una de las 3 cepas de *A. alternata* ensayadas (5.5, 7.5 y 25.1) en su CMI, en 2 experimentos independientes ($p < 0,05$).

Es llamativo que ninguna de las cepas pertenecientes al organismo *A. pullulans* evaluadas haya resultado antagonista de *A. alternata* en uva para vinificar. *Aureobasidium pullulans* es integrante mayoritario de la microbiota de uvas para vinificar (Barata *et al.*, 2012) y ha demostrado actividad antagónica frente a distintos patógenos de frutos (Scheda *et al.*, 1999; Castoria *et al.*, 2001) así como frente a *A. carbonarius* (causante de la pudrición ácida) en uvas tintas de Grecia (Dimakopoulou *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista fisiológico, *A. pullulans* es un organismo con requerimientos mínimos para su supervivencia en uva (Barata *et al.*, 2012) y es probable que esta poca exigencia para sobrevivir constituya una presión selectiva negativa para el desarrollo de mecanismos para la competencia por nutrientes, uno de los más utilizados por los organismos antagonistas (Liu *et al.*, 2013). Esta idea se vería reforzada con la evidencia de que las cepas de levadura pertenecientes a las especies *Cr. laurentii II* y *Rhodotorula* spp. evaluadas tampoco resultaron antagonistas durante el presente estudio. Estas especies están incluidas dentro de las levaduras basidiomicetes oxidativas, y también integran junto con *A. pullulans*, el grupo de las “oligotróficas” o aquellas con requerimientos mínimos para su desarrollo (Barata *et al.*, 2012). Por otro lado, la mayoría de las cepas evaluadas pertenecientes al grupo de las copiotróficas -las apiculadas débilmente fermentativas como *H. uvarum* y las fermentativas como *C. zemplinina* y *M. pulcherrima* o *fructicola*- (Barata *et al.*, 2012) sí resultaron antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar. Se ha discutido reiteradamente acerca del biocontrol como una característica dependiente de la cepa y no de la especie (Suzzi *et al.*, 1995), pero no se han hecho análisis a la luz de los requerimientos fisiológicos de las levaduras evaluadas. En este trabajo, aquellas levaduras con mayores requerimientos nutricionales, resultaron antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar, sugiriendo una correlación positiva entre estos factores.

Las levaduras con capacidad antagonista fueron agrupadas en dos categorías según el test de Hotelling–Bonferroni (MANAVA; $p < 0,05$). El grupo integrado por la mayoría de las levaduras (14) logró reducir el porcentaje de infección a 0.0 % de cada una de las 3 cepas fúngicas a su CMI, mientras que sólo una cepa (LP123.2) mostró una menor eficiencia (Tabla 2). La capacidad antagonista de las levaduras evaluadas durante el presente trabajo resultó elevada en comparación con otros estudios. Nally y *col.* (2013), encontraron dos levaduras, inoculadas bajo las mismas condiciones que nuestro trabajo, capaces de evitar la infección producida por *A. terreus* y una de ellas además capaz de evitar la infección por *P. commune*, la concentración de los hongos empleados en este estudio fue de 10^4 esporas/mL, sin tener en cuenta su CMI. Por otra parte, Zahavi *et al.* (2000) también encontraron sólo una levadura, de la que se aplicó 10 µl de 10^8 - 10^9 cel/mL 1-2 horas previas a la inoculación del patógeno, capaz de evitar la infección producida por *B. cinerea*, siendo este último inoculado a razón de 10 µl de una concentración de 5×10^4 conidios/mL, independientemente de su CMI. Es probable que la utilización de la concentración mínima infectiva del organismo a controlar (CMI), utilizada en el presente trabajo, evite el exceso del mismo resultando en una detección más sensible de la

capacidad antagonista de los organismos evaluados. Por otra parte, el nivel de control logrado por las levaduras antagonistas en el presente trabajo es el recomendado para seleccionar un antagonista con

buenas perspectivas de ser efectivo a campo (Chalutz y Droby, 1998).

Tabla 2. Capacidad antagonista de levaduras seleccionadas de uvas Malbec vendimias 2011, 2012 y 2013 DOC San Rafael frente a cepas de *A. alternata*.

Cepa	Especie	Origen	% de infección ¹			*
			cepa 5.5	cepa 7.5	cepa 25.1	
LP123.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	4,4 ± 0,7	2,0 ± 2,8	0,0 ± 0,0	A
LP6.4.1	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP132.1	<i>M. pulcherrima</i>	2011	1,9 ± 2,6	0,0 ± 0,0	2,1 ± 2,9	B
LP8.1.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.5.2	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.5.1	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.2.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP131.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP124	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP122.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	0,0 ± 0,0	2,2 ± 3,1	0,0 ± 0,0	B
LP10.2.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP125.1	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP128.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP126	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP125.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	1,9 ± 2,7	0,0 ± 0,0	2,0 ± 2,8	B

¹ Promedio y desviación estándar correspondiente al porcentaje de uvas infectadas para cada una de las cepas de *A. alternata* evaluadas, en su concentración mínima infectiva (CMI) con el efecto antagonista de cada levadura seleccionada en 2 experimentos independientes.

* Letras distintas representan una diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo al test de Hotelling-Bonferroni.

3.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S

Con el fin de confirmar de forma efectiva la identidad de las cepas de levadura seleccionadas por su potencial biocontrol de *A. alternata* en uva, se realizó la secuenciación de regiones conservadas del ARNr de las mismas. En términos generales, esta identificación mediante la metodología de secuenciación del 26S, permitió corroborar la identidad asignada a las levaduras por el método de PCR-RFLP.

El análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del gen 26S del ARNr (aproximadamente 600 pb) de las cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.1.1, LP 126, LP 8.2.1 y LP 10.2.1 reveló que poseen una estrecha relación filogenética con cepas pertenecientes al

género *Hanseniaspora*. Las secuencias de los fragmentos amplificados de las cepas estudiadas mostraron una similitud entre 98-100 % con secuencias disponibles en la base de datos GenBank de la misma región de cepas de referencia de *H. uvarum*. El análisis filogenético, basado en el alineamiento de las secuencias parciales del ADNr de las levaduras seleccionadas con las secuencias de cepas de referencia (Fig. 1A), indicó que las cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.1.1, LP 126 y LP 8.2.1 son conespecíficas con *H. uvarum* A2 26S (GenBank EU441909).

Para las cepas LP 131.2, LP 132.1, LP 128.2, LP 125.2, LP 122.2 y LP 123.2 el análisis mostró una estrecha relación filogenética de las mismas con cepas pertenecientes al género *Metschnikowia*. Las secuencias de las cepas LP 131.2, LP 132.1 y LP 128.2 mostraron un 98-99 % de similitud con secuencias de cepas de referencia de *M. pulcherrima*

mientras las secuencias de las cepas LP 125.2 y LP 122.2, mostraron un 99 % y 98 %, respectivamente, de similitud con secuencias de cepas de referencia de *M. fructicola*. La cepa LP 123.2 mostró una similitud de 97 % con secuencias de cepas de referencia de *M. pulcherrima* y *M. fructicola*. El análisis filogenético (Fig. 1B) indicó que todas las cepas pertenecerían al grupo que incluye tanto *M. pulcherrima* (GenBankU45736) como *M. fructicola* (GenBankAF360542). La ampliación de ese grupo (Fig. 1C), permite ver que la cepa LP 132.1 sería conespecífica con *M. pulcherrima*. Como el resto de las cepas resultaron filogenéticamente cercanas tanto a *M. pulcherrima* como a *M. fructicola*, no es

posible afirmar a cuál de estas dos especies pertenecerían. Es importante resaltar que la técnica de PCR-RFLP no tiene la sensibilidad adecuada para discernir entre las especies *M. pulcherrima* y *Metschnikowia fructicola*, ya que sólo un 2,2 % de sustituciones (11 de 499 posiciones de nucleótidos compartidas) separa a una especie de otra (Kurtzman y Droby, 2001). Esta sutil diferencia hace que inclusive, mediante la técnica de 26S, resulte compleja la asignación de especie a las cepas pertenecientes al género *Metschnikowia*.

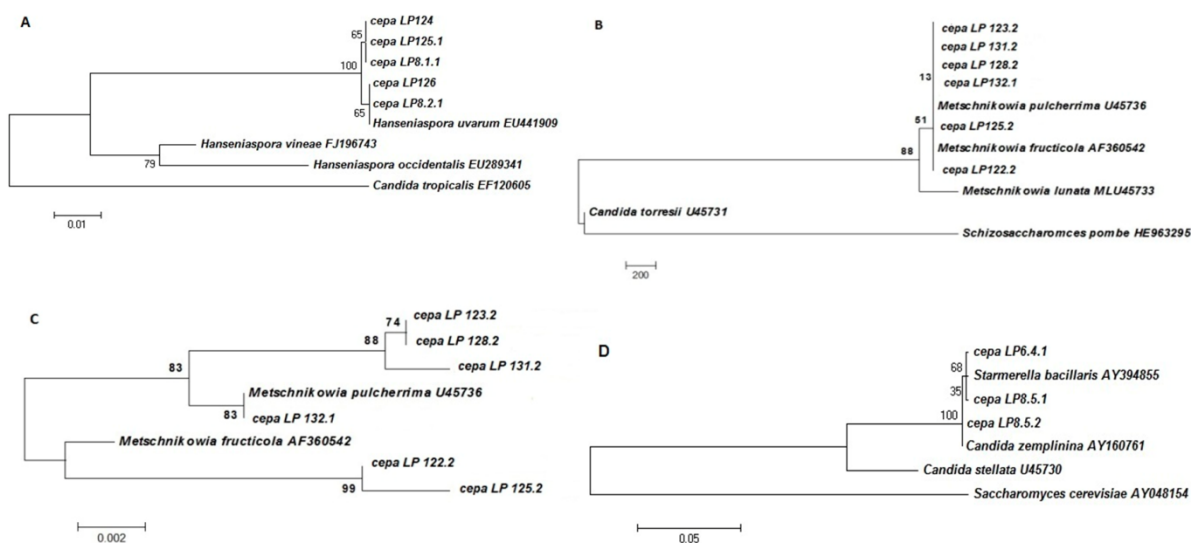


Figura 1: Árboles filogenéticos de cepas de levadura seleccionadas por su capacidad de reducir la infección de *Alternaria alternata* en uva, basados en la secuenciación parcial del ADNr. (A) Cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.8.8, LP 126 y LP 8.2.1 pertenecientes a *Hanseniaspora uvarum*, (B) y (C) cepas LP 122.2, LP 123.2, LP 125.2, LP 128.2, LP 131.2 y LP 132.1 pertenecientes a *Metschnikowia* spp. y (D) cepas LP 8.5.1, LP 8.5.2 y LP 6.4.1 pertenecientes a *Starmerella bacillaris*. Los números representan el nivel de confianza obtenidos a partir de 1000 repeticiones (se indican las frecuencias mayores al 50 %). Las barras inferiores en A, B, C y D representan la distancia correspondiente a un cambio de 1; 200; 0,2 y 5 pares de bases en 100 nucleótidos, respectivamente. En A, *Candida tropicalis* (GenBank EF120605) se usa como cepa no relacionada o “outgroup”, en B, *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank HE963295) y en D, *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank AY048154).

Finalmente, el análisis de las secuencias de las cepas LP 6.4.1, LP 8.5.1 y LP 8.5.2 reveló una estrecha relación filogenética (100 % de similitud) de estas levaduras con cepas de referencia de *C. zemplinina* o *S. bacillaris*. La asignación de *S. bacillaris* como sinónimo obligado de *C. zemplinina* es relativamente reciente (Duarte *et al.*, 2012). Asimismo, el análisis filogenético (Fig. 1 D) indicó que estas cepas son conespecíficas tanto con *C. zemplinina* (GenBankAY048154) como con *S. bacillaris* (GenBank AY394855).

4. Conclusiones

Se lograron aislar e identificar levaduras del mismo ecosistema, capaces de ejercer un control biológico de *A. alternata* en uva para vinificar.

Con la metodología de selección empleada, se obtuvo un gran porcentaje (22,1 %) del total de

levaduras y organismos tipo levadura aislados de uvas Malbec evaluados que presentaron actividad antagonista de *A. alternata* en uva.

La mayoría de las levaduras seleccionadas mostraron una gran capacidad antagonista logrando un efecto preventivo de la infección de *A. alternata* en uva.

Todas las cepas de levadura identificadas como *Metschnikowia* spp., *C. zemplinina* y la mayoría de *H. uvarum* probadas mostraron capacidad antagonista frente a *A. alternata*, no así las cepas del organismo tipo levadura *A. pullulans* y las cepas de levadura identificadas como *Cr. laurentii II* y *Rhodotorula* spp., sugiriendo una correlación positiva entre la capacidad antagonista y los mayores requerimientos nutricionales de los organismos evaluados.

La identificación de las levaduras antagonistas mediante la metodología de secuenciación del 26S, permitió corroborar la identidad asignada por el método de PCR-RFLP.

5. Referencias

- Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2012). *The microbial ecology of wine grape berries*. International Journal of Food Microbiology, 153(3), 243-259.
- Bleve, G.; Grieco, F.; Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). *Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of Aspergillus carbonarius and A. niger on grape*. International Journal of Food Microbiology, 108: 204-209.
- Broggi, L.; Reynoso, C.; Resnik, S.; Martinez, F.; Drunday, V.; Romero Bernal, A. (2013). *Occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages from the Entre Rios Province market, Argentina*. Mycotoxin Research, 29: 17-22.
- Castoria, R.; De Curtis F., Lima G.; Caputo L.; Pacifico S.; De Cicco V. (2001) *Aureobasidium pullulans (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action*. Postharvest Biological Technology, 22: 7-17
- Chalutz, E.; Droby, S. (1998). *Biological control of postharvest disease. Plant-Microbe interactions and Biological Control*. Dekker, New York, 157-170.
- De Koch, S. (1998). *Control of post-harvest decay of fruit by means of antagonistic microorganisms*. Ph.D. dissertation. University of Stellenbosch, Stellenbosch.
- Dimakopoulou, M.; Tjamos, S.E., Antoniou, P.P.; Pietri, A.; Battilani, P.; Avramidis, N.; Markakis, E.A.; Tjamos, E.C., 2008. *Phyllosphere grapevine yeast Aureobasidium pullulans reduces Aspergillus carbonarius (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece*. Biological Control, 46: 158-165.
- 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.
- Droby, S.; Cohen, L.; Daus, A., Weiss, B., Horev, E.; Chalutz, E.; Katz, H.; Keren-Tzour, M.; Shachnai, A. (1998). *Commercial testing of Aspire: a biocontrol preparation for the control of postharvest decay of citrus*. Biological Control, 12: 97-101.
- Duarte, F. L.; Pimentel, N.H.; Teixeira, A.; Fonseca, A. (2012). *Saccharomyces bacillaris not a synonym of Candida stellata: reinstatement as Starmerella bacillaris comb. nov.* Antonie van Leeuwenhoek, 102: 653-658
- Fan, C.; Cao, X.; Liu, M.; Wang, W. (2016). *Determination of Alternaria mycotoxins in wine and juice using ionic liquid modified countercurrent chromatography as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1436: 133-140.
- Hocking, A.; Leong, S.; Kazi, B.; Emmett, R.; Scott, E. (2007). *Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products*. Food Microbiology, 119: 84-88.
- Karabulut, O. A.; Cohen, L.; Wiess, B.; Daus, A.; Lurie, S.; Droby, S. (2002). *Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists*. Postharvest Biology and Technology, 24(2): 103-111.
- Karabulut, O.A.; Smilanick, J.L.; Gabler, F.M.; Mansour, M.; Droby, S. (2003). *Near-harvest applications of Metschnikowia fructicola, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California*. Plant Disease, 87: 1384-1389.
- Kurtzman, C.P.; Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola, a new ascospore yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots*. System of Applied Microbiology, 24: 393-399.
- Lau, B. P. Y.; Scott, P. M.; Lewis, D. A.; Kanhere, S. R.; Cléroux, C.; Roscoe, V. A. (2003). *Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the Alternaria mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages*. Journal of Chromatography A, 998(1), 119-131.
- Liu, J.; Sui, J.; Wisniewski, M.; Droby, S.; Liu, Y. (2013). *Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit*. International Journal of Food Microbiology, 167: 153-160.
- López, P.; Venema, D.; de Rijk, T.; de Kok, A.; Scholten, J. M.; Mol, H. G.; de Nijs, M. (2016). *Occurrence of Alternaria toxins in food products in The Netherlands*. Food Control, 60: 196-204.
- Nally, M.C.; Pesce, V., M.; Maturano, Y. P.; Munoz, C.J.; Combina, M.; Toro, M. E.; Castellanos de Figueroa; L.I., Vazquez, F. (2012). *Biocontrol of Botrytis cinerea in table grapes by non-pathogenic indigenous Saccharomyces cerevisiae yeasts isolated from viticultural environments in Argentina*. Postharvest Biology and Technology, 64: 40-48.
- Nally, M. C.; Pesce, V. M.; Maturano, Y. P.; Toro, M. E.; Combina, M.; Castellanos de Figueroa L. I.; Vazquez, F. (2013). *Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by Saccharomyces and other yeast species*. Postharvest Biology and Technology, 86: 456-462.
- Pizzutti, I.; Kok, A.; Scholten, J.; Righi, L.; Cardoso, C.; Rohers, G.; Da Silva, R. C. (2014). *Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Talanta, 129: 352-363.
- Ponsone, M. L.; Chiotta, M. L.; Combina, M.; Dalcerro, A.; Chluzé, S. (2011). *Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and Aspergillus section Nigri in grapes*. International Journal of Food Microbiology, 151: 70-77.
- Prendes, L.P.; Merín, M.G.; Andreoni, M.A.; Ramírez, M.L.; Morata de Ambrosini, V.I. (2015).

Mycobiota and toxicogenic Alternaria spp. strains in Malbec wine grapes from DOC San Rafael, Mendoza, Argentina. Food Control, 57: 122-128.

Prendes, L.P. (2016). *Hongos filamentosos de uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial biocontrol de los productores de micotoxinas con levaduras del mismo ecosistema.* Tesis doctoral, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. (1992). *A comparative study of different methods of yeast strain characterization.* Systematic and Applied Microbiology, 15 (3): 439-446.

Rousseaux, S.; Diguta, C. F.; Radoï-Matei, F.; Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. (2014). *Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off flavors and mycotoxins.* Food Microbiology, 38: 104-121.

Schena, L.; Ippolito, A.; Zahavi, T.; Cohen, L.; Nigro, F.; Droby, S. (1999). *Genetic diversity and biocontrol activity of Aureobasidium pullulans isolates against postharvest rots.* Postharvest Biology and Technology, 17(3): 189-199.

Schisler, D.; Janisiewicz, W.; Boekhout, T.; Kurtzman, C. (2011). *Agriculturally Important Yeasts: Biological Control of Field and Postharvest Diseases Using Yeast Antagonists, and Yeasts as Pathogens of Plants.* In The Yeast, a Taxonomic Study pp 45-52. Eds. Elsevier B.V.

Scott, P.; Lawrence, B.; Lau, B. (2006). *Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for Alternaria toxins.* Mycotoxin Research, 22: 142-147.

Suzzi, G.; Romano, P.; Ponti, I.; Montuschi, C. (1995). *Natural wine yeasts as biocontrol agents.* Journal of Applied Bacteriology, 78: 304-308.

Tančinová, D.; Rybárik, L.; Masková, Z.; Felsöciová, S.; Císarová, M. (2015). *Endogenous colonization of grapes berries.* The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 4: 69-73.

Vargas Trinidad; A.S., Ganoza, F.Q.; Pinto, V.F.; Patriarca, A. (2015). *Determination of mycotoxin profiles characteristic of Alternaria strains isolated from Malbec grapes.* En BIO Web of Conferences. Vol. 5, p. 02004. EDP Sciences.

Zahavi, T.; Cohen, L.; Weiss, B.; Schena, L.; Daus, A.; Kaplunov, T.; Zutkhi, J.; Ben-Arie, R.; Droby, S. (2000). *Biological control of Botrytis Aspergillus and Rhizopus rots on table and wine grapes in Israel.* Postharvest Biology and Technology, 20: 115-124.