



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**800 AÑOS**

**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

1218 - 2018

# **LEVADURAS CONTRA HONGOS PATÓGENOS DE TRIGO**



**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**SOLEDAD VEGA FERNÁNDEZ**

**TESIS DOCTORAL**

**2019**

**La Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Santos**, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

**AUTORIZA:**

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Levaduras contra hongos patógenos de trigo” realizada por Doña Soledad Vega Fernández bajo mi dirección, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del Grado de Doctora en Microbiología y Genética Molecular

Y para que así conste, firmo la presente autorización en Salamanca, a 6 de julio 2019.

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Santos García



*A mis padres Alejandro y Carmen*

*A mis hermanas Carmen, Antonia y Alejandra*

*A mis sobrinitas Carmen y Alejandra*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Santos García por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, y que ha supuesto para mí una experiencia muy enriquecedora tanto personal como profesional.

Este trabajo ha sido posible gracias a un contrato predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León cofinanciado por el Fondo Social Europeo (Orden EDU/310/2015, de 10 abril).

Agradecer a la Dra. Paula B. Andrade del Departamento de Farmacognosia, de la Facultad de Farmacia (Universidad de Oporto) por acogerme en su laboratorio para los análisis cuantitativos de Cromatografía de Gases, a la Dra Patrícia Valentão por dirigir mi trabajo allí de forma tan cordial y a Andreia P. Oliveira por haberme enseñado una técnica nueva que me ha resultado tan útil en el trabajo.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr, Rubén Martínez Buey del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología (Universidad de Salamanca) y al Dr. Fernando Sánchez Juanes del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca por su gran ayuda en la purificación (Dr. Rubén Martínez) e identificación de proteínas (Dr. Fernando Sánchez).

A las personas que trabajaron en el aislamiento e identificación de las cepas de levadura PROPAN, usadas en este trabajo. Así como a los compañeros de laboratorio que he tenido durante estos años, en especial a aquellos que me proporcionaron muestras para el trabajo.

A todas las personas que he conocido a lo largo de estos cuatro años y que de una forma u otra han aportado su granito de arena.

A mi familia por su comprensión, su empuje, por estar ahí, sin ellos este trabajo de tesis tampoco hubiese sido posible.



## **1. INTRODUCCIÓN**

## 11. LOS CEREALES

### 11.1. SITUACIÓN EN EL MUNDO

La producción de cereal es una de las actividades de mayor relevancia en la industria agroalimentaria, siendo la base de la alimentación diaria. Los granos de cereales son una fuente excelente de energía, proteínas y compuestos biológicamente activos tales como fibra dietética (arabinoxilanos,  $\beta$ -glucanos, celulosa, lignina y lignanos), esteroides, tocoferoles, tocotrienos, alquilresorcinoles, ácidos fenólicos, vitaminas y microelementos con efectos positivos en la salud humana (Siurek *et al.*, 2011).

Se estima que para el año 2050 la población mundial superará los 9000 millones de habitantes (Tyczewska *et al.*, 2018). Los principales cereales de la alimentación humana son trigo, maíz y arroz, entre los tres suponen el 70% de los granos alimenticios (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, FAO). Para cubrir las necesidades de una población de esas proporciones, se requiere un incremento del 2,4% anual de la productividad hasta el 2050. Pero los actuales incrementos son inferiores, 1,6% en el maíz, 1,3% la soja, 1,0% en el arroz, y un 0,9% en el trigo siendo el menor. Entre las dificultades para este incremento se encuentra la erosión, 1/3 de las tierras cultivables se han perdido por la erosión que conlleva, pérdida de la materia orgánica, nutrientes, capacidad de retención de agua y cambios en la estructura del suelo. Las pérdidas por plagas, enfermedades, animales y malezas suponen el 20-40% de la producción mundial. Además, los tratamientos de enfermedades y plagas, cuya incidencia va en aumento, con agroquímicos contribuyen al deterioro de las tierras agrícolas. Finalmente, el cambio climático: sequía, inundaciones, temperaturas extremas, cambios en las características del suelo (acidez, salinidad), empobrecimiento en nutrientes, que afecta a la productividad y calidad del grano (Tyczewska *et al.*, 2018).

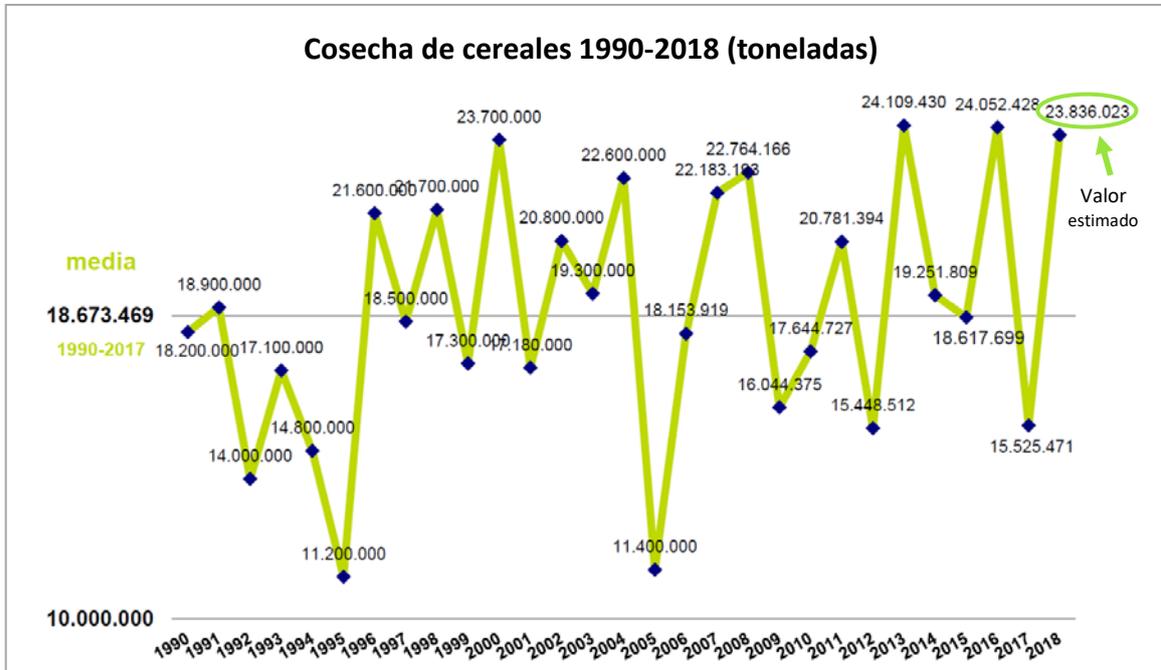
Aumentar la superficie de cultivo no es una opción, en las zonas en las que sería posible (África y Centro y Sur América) las condiciones climáticas no son favorables (FAO). Por todo ello una agricultura sostenible y una reducción del impacto negativo sobre el medio ambiente son pilares fundamentales para tratar de alcanzar el objetivo de alimentar una población creciente.

### 11.2. SITUACIÓN EN ESPAÑA

En España se cultivan las especies trigo blando (*Triticum aestivum*), trigo duro (*Triticum durum*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), centeno (*Secale cereale*), triticale (híbrido trigo

x centeno), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare*), alforfón (*Fagopyrum esculentum*), mijo (*Panicum miliaceum*) y alpiste (*Phalaris canariensis*).

Las precipitaciones en España presentan una gran variabilidad que se refleja en una productividad nada constante, como se muestra en la figura siguiente.



**Figura 11.** Evolución de las cosechas de cereales en el periodo de tiempo 1990-2018. Fuente: [www.agroalimentarias.coop](http://www.agroalimentarias.coop).

En la campaña 2017/2018 se obtuvo una productividad ligeramente inferior a los 16 millones de toneladas, esto supuso un 31,24% menos que la campaña anterior, 2016/2017, esto fue debido a la fuerte sequía que se padeció en ese periodo. En la campaña 2018 los valores se recuperaron y la productividad incluso superó las expectativas, llegando a los 24 millones de toneladas, pero esta productividad de cereal en España no es suficiente para cubrir la demanda del país, ni siquiera en los mejores años, en 2018 se necesitó importar alrededor de 11 millones de toneladas ([www.agroinformación.com](http://www.agroinformación.com)).

Los más de 24 millones de toneladas se reparten principalmente entre los cereales de otoño-invierno (trigo blando, trigo duro, cebada, avena, centeno y triticale) y sólo el 15,6% a los cereales de primavera (maíz y sorgo). Dentro de los primeros: cebada (9,32) trigo blando (6,79), trigo duro (1,35) y avena (1,17), engloban la mayor parte de la productividad (<https://agroinformacion.com>). La distribución de la producción de cereales en España por regiones se ilustra en la figura siguiente.

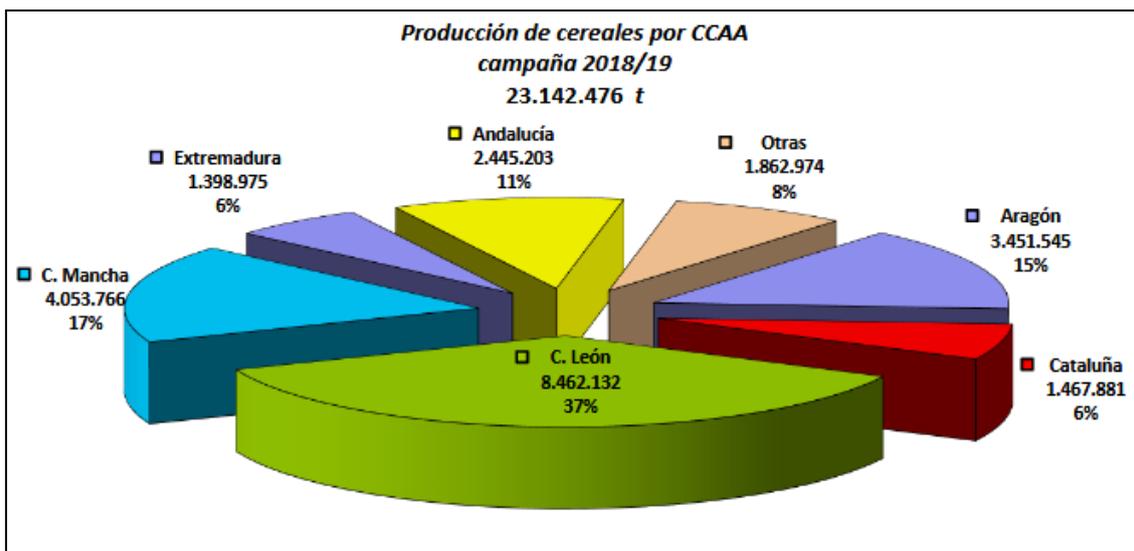


Figura 12. Distribución de la producción de cereales (tomado de [www.mapa.gob.es](http://www.mapa.gob.es)).

Como puede observarse, Castilla y León es la principal región cerealista de España aportando casi un 40% de la producción nacional. Esto supone un 20% más que la región situada en segundo lugar, Castilla la Mancha. La superficie total dedicada al cereal es superior a 1.900.000 hectáreas, siendo la principal productora de trigo blando de todo el país con casi 900.000 hectáreas y una producción en 2018 de 3.511.000 toneladas representando aproximadamente el 50% del total del cereal de invierno (<https://agriculturaganaderia.jcyl.es>).

## 12. EL TRIGO

Las principales variedades de trigo que se cultivan en España son trigo blando, trigo duro y triticale. Se trata de plantas monocotiledóneas de ciclo vegetativo anual pertenecientes a la familia de las gramíneas.

Los granos de trigo están constituidos por carbohidratos que almacena en forma de almidón, fibra, agua, proteínas, lípidos y minerales. También son fuente de vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, ácido fólico, ácido pantoténico y nicotinamida. El almidón es el componente mayoritario, se encuentra en el endospermo siendo el reservorio de energía para la futura planta. Está compuesta por amilosa (25-28%) y amilopectina (72-75%), la primera formada por unidades de  $\alpha$ -1,4-D-glucopiranosil con algunas ramificaciones  $\alpha$ -1,6, mientras que la amilopectina es similar, pero con un número muy superior de ramificaciones haciendo que esta proteína tenga una masa muy superior y sea la responsable de la naturaleza granular del almidón (Koehler *et al.*, 2013).

En cuanto al contenido en proteínas, basados en el procedimiento de fraccionamiento de Osborne (Osborne 1907), se distinguen: albúminas globulinas, prolinas (gliadinas) y glutelinas (gluteninas), las dos últimas constituyen el gluten. Las gliadinas son monoméricas, mientras que las gluteninas son poliméricas que se unen entre sí por puentes disulfuro formando enormes agregados, siendo las proteínas más grandes que se conocen. En las gluteninas se distinguen dos fracciones en función de su separación electroforética en SDS-PAGE, gluteninas de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW), mientras que las gliadinas se clasifican en  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas según su movilidad en geles de poliarilamida a pH ácido (Gimenez *et al.*, 2013). El gluten de trigo se utiliza ampliamente, como aditivo en salsas, sopas y dulces (Salentijn *et al.*, 2009). Pero el gluten es de gran importancia desde el punto de vista médico ya que se asocia a tres patologías, enfermedad celíaca, alergia al gluten y sensibilidad al gluten.

### 12.1. TRIGO BLANDO (*TRITICUM AESTIVUM*)



Es un cereal alohexaploide (genoma AABBDD) con 42 cromosomas ( $2n=6x$ ) que se formó mediante hibridación y duplicación sucesiva de cromosomas de tres especies diploides de *Triticum/Aegilops*. Los ancestros diploides del genoma D y el A son *A. squarrosa* (DD) y *T. urartu* (AA). El ancestro del genoma B no está claro, y el progenitor diploide exacto se desconoce. *T. aestivum* se usa para la fabricación de pan, por ello se llama también trigo harinero o trigo pan (Koehler 2013).

En la figura 13 podemos ver la típica espiga, espiguilla, grano y sección transversal del grano (Hughes *et al.*, 2017).

El almidón presenta propiedades texturales en la elaboración del pan, siendo responsable de la textura semi-sólida de la masa resultante del amasado. El otro componente importante desde el punto de vista de la elaboración del pan son las proteínas y más concretamente el gluten. El gluten es el responsable de proporcionar a la masa de trigo propiedades biomecánicas únicas. Las gliadinas confieren extensibilidad y viscosidad, mientras que las gluteninas aportan elasticidad (Vaquero *et al.*, 2017).

### 12.2. TRIGO DURO (*TRITICUM DURUM*)

La variedad tetraploide (AABB) en España es el tercer cereal más utilizado para la elaboración de pienso. Los granos son de color ámbar, y su endospermo amarillo. Se caracteriza por tener un contenido celular más compacto debido a una fuerte interacción proteína almidón, siendo más débiles en el trigo blando. Tiene un mayor contenido en proteínas y gluten. En alimentación se utiliza en la obtención de sémola para la elaboración de pasta (Salentijn et al., 2009) y en los últimos tiempos ha despertado interés en el sector galletero, donde se ha incrementado la demanda por este cereal.

### **12.3. TRITICALE (×TRITICOSECALE)**

El cereal Triticale surge de la mano del hombre a partir del cruce entre el trigo y el centeno. Se utiliza principalmente como alimento para animales, dada su capacidad de rebote es aprovechado en verde con el ganado en el invierno y principio de primavera y se obtiene cosecha de grano en verano. En los últimos años ha despertado el interés para la producción de alimentos. Se han desarrollado varios productos como pan, galletas, pasta y bebidas. La composición química está más próxima al trigo que al centeno. Algunas variedades tienen concentraciones relativamente altas de lisina, aminoácido que se encuentra en cantidades límites en los cereales en general (McGoverinet al., 2011). Otros efectos saludables son las actividades antioxidantes *in vitro* y la actividad anticolinesterasa (Senol et al., 2012) por lo que resulta interesante desde el punto de vista de los alimentos funcionales. Contiene gluten, por tanto, no es adecuado para personas con enfermedad celíaca (Zhu 2018).

## **13. FACTORES QUE LIMITAN LA PRODUCCIÓN DE TRIGO**

Los cultivos de cereales se ven afectados tanto por factores abióticos y como bióticos. Cierto es que el trigo duro es más resistente a la sequía que el trigo blando, y que el Triticale es un cereal más robusto que se muestra más resistente a las enfermedades, pero aún así, en algún momento pueden verse afectados por las inclemencias del tiempo, un periodo de sequía excesiva o un periodo de lluvia prolongado, que afectan no sólo al desarrollo de la planta y el grano, sino que pueden favorecer el desarrollo de los patógenos, sobre todo hongos, que mermen considerable el cultivo.

### **13.1. FACTORES ABIÓTICOS**

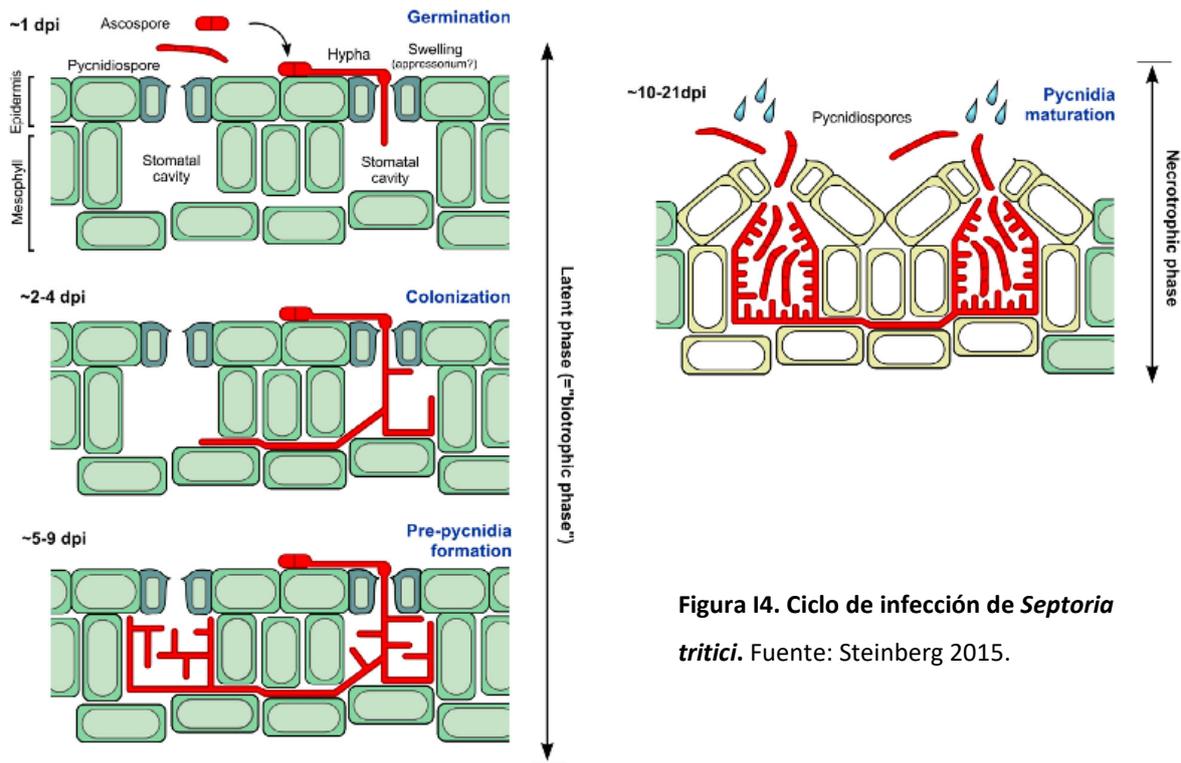
Entre los factores abióticos la escasez de lluvias a lo largo del año da lugar a espigas mal desarrolladas. La ausencia de heladas hace que la raíz no profundice, la escasez de heladas unido al exceso de lluvia provoca el desarrollo aéreo de la planta en lugar del desarrollo en profundidad, por lo que las plantas son más sensibles a las temperaturas, tanto bajas en invierno como altas en primavera, dificultando la maduración y favoreciendo la sensibilidad a enfermedades como septoria y roya (Encuesta de calidad de los trigos españoles 2014).

### **13.2. FACTORES BIÓTICOS**

Entre los factores bióticos las enfermedades fúngicas son los mayores responsables de las pérdidas en las cosechas. Las condiciones climáticas de los últimos tiempos han influido considerablemente, en 2014 las pérdidas asociadas a las micosis se estimaron en el 25% según el informe publicado por la Asociación Española de Técnicos Cerealistas y la Fundación Española de Cereales. La guía publicada en febrero del 2015 por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente recoge como las enfermedades de mayor incidencia en los cereales de invierno: septoriosis, royas, oídio, helmintosporiosis y fusariosis.

#### **13.2.1. SEPTORIOSIS**

La septoriosis o mancha foliar del trigo (*Septoria tritici blotch*, STB) está causada por *Septoria tritici*, también llamado *Zymoseptoria tritici* (forma asexual o anamorfo) y *Mycosphaerella graminicola* (forma sexual o telemorfo). La primera forma picnidiosporas en el interior de los picnidios y la segunda ascosporas en el interior de los pseutotecios. El ciclo de infección se muestra en la figura siguiente.



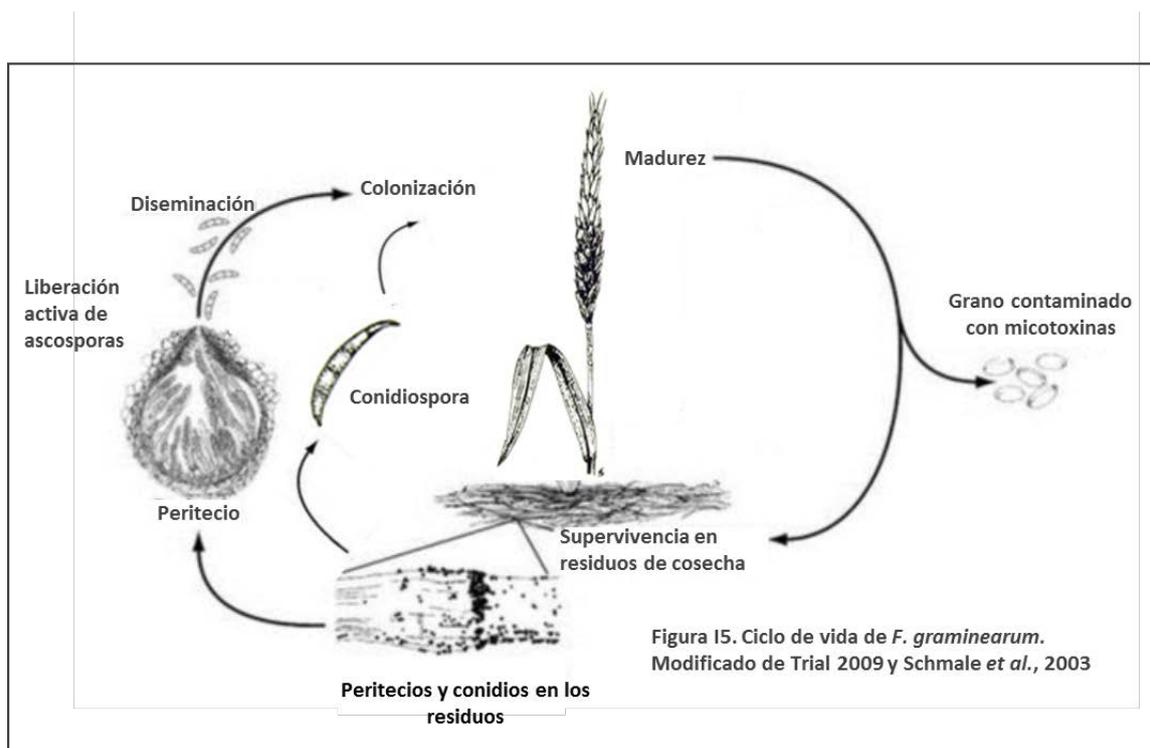
**Figura I4. Ciclo de infección de *Septoria tritici*.** Fuente: Steinberg 2015.

La infección comienza con la germinación de las picnidiosporas o ascosporas ambas patogénicas cuando contacta con el tejido del hospedador. La penetración tiene lugar a través de los estomas. Se trata de un hongo hemibiotrófo, es decir, en su ciclo de vida se distinguen dos fases, una fase biotrófica y una fase necrotrófica. Tras la penetración, comienza la colonización de la cavidad sub-estomática e invasión del apoplasto del tejido circundante. Le sigue la formación de los pre-picnidios en dicha cavidad. Hasta ese momento estamos en la fase biotrófica latente, asintomática, el patógeno es capaz de suprimir o evitar los mecanismos de defensa de la planta mediado por proteínas con motivos lisina (Kettles *et al.*, 2016). A continuación, se inicia la fase necrótica, aparecen las manchas amarillas en la hoja. El hongo induce muerte celular programada de las células del tejido hospedador, mediante la liberación de proteínas tóxicas que activan las defensas del hospedador, con la consiguiente liberación del contenido celular que son nutrientes para el hongo, lo que le permite un rápido crecimiento, proliferación y maduración de los pre-picnidios a picnidios conteniendo picnidiosporas a través de las cuales se disemina la enfermedad ayudado por las salpicaduras de las gotas de agua (Steinberg *et al.*, 2015). Es una de las enfermedades de mayor prevalencia en el trigo de toda Europa. Se caracteriza por la aparición en las hojas de lesiones cloróticas irregulares sobre las que, a veces, se desarrollan manchas necróticas que adquieren color gris ceniza. Son los cuerpos fructíferos donde se forma las ascosporas y los picnidios (Suffert *et al.*, 2011). En algunas ocasiones la septoriosis también puede ser producida por otro hongo ascomiceto *Phaeosphaeria nodorum*

(forma anamorfa, *Stagonospora nodorum*), en este caso se habla de mancha foliar por *nodorum* o *Septoria nodorum* blotch y mientras *S. tritici* afecta sólo a las hojas *P. nodorum* afecta tanto a las hojas como a las glumas. Cuando ambos patógenos se presentan juntos en un cultivo, dan lugar a la mancha compleja de la septoria o también conocida como complejo septoria.

### 13.2.2. FUSARIOSIS

La fusariosis del cereal se debe a infecciones por especies de hongos del género *Fusarium*, que infectan a un amplio rango de cereales, entre ellos el trigo. La fusariosis de los cereales de paja está provocada por especies *Fusarium* del grupo *roseum* (*F. graminearum* y *F. avenaceum* entre otros) y las especies *Microdochium nivale nivale* y *M. nivale majus* (Boletín GENVCE Mayo 2015). Las consecuencias de la fusariosis es una reducción el rendimiento de las cosechas y de la calidad del grano, se ha observado una reducción en el contenido de almidón, celulosa, hemicelulosa y proteína. El ciclo infectivo de *Fusarium* se muestra en la siguiente imagen.



Muy brevemente, el principal inóculo proviene de los rastrojos de plantas infectadas donde el hongo sobrevive como un micelio saprofítico. Bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad, los peritecios y los conidios maduran (Markell et al., 2003), liberando las ascosporas (forma sexual) y conidios (forma asexual) respectivamente. Las ascosporas liberadas desde los peritecios se dispersarán a grandes distancias por la lluvia, el viento o los insectos hacia la parte aérea de la planta de trigo (Trail 2009). Los conidios son dispersados por la salpicadura y por la

lluvia a menor distancia. Las esporas son depositadas en las espiguillas que están floreciendo, en contacto con el tejido del hospedador germinan emitiendo hifas que penetran en la planta a través de aberturas naturales como la base de la lema y la palea o a través de lesiones en los tejidos de la antera. Inicialmente se propaga intercelularmente y asintómicamente a través del xilema y la médula. A continuación, se propaga radial e intracelularmente, colonizando rápidamente los tejidos como el ovario y brácteas produciendo necrosis. El tejido colonizado se blanquea (Trail 2009). Los efectos drásticos se deben a la acción de las micotoxinas tales como zearalenona y DON (deoxinivalenol), este último es un factor de virulencia que causa necrosis tisular (Proctor *et al.*, 1995).

#### **14. LUCHA CONTRA LAS ENFERMEDADES**

Las principales causas de la persistencia de la enfermedad en los cultivos son las semillas contaminadas y rastrojos o restos de cultivos contaminados. Por otro lado, el uso de un cruzamiento intensivo como herramienta de mejoramiento en la búsqueda de variedades de trigo con mejores propiedades agronómicas, tecnológicas y nutricionales, ha conllevado una reducción de la diversidad genética, que implica la resistencia del trigo a estreses bióticos como *S. tritici*, *P. nodorum* y especies del género *Fusarium*, disminuya (Duba *et al.*, 2018).

##### **14.1. CONTROL QUÍMICO DE LAS ENFERMEDADES FÚNGICAS**

La aplicación de fungicidas sintéticos o agroquímicos constituye la principal estrategia de control de enfermedades fúngicas. En los cultivos de cereal en el campo destacan el propiconazol, ciproconazol, azoxistrobin y epoxiconazol que actúan inhibiendo el desarrollo del micelio o la formación de esporas, al interferir con procesos celulares esenciales del hongo. La Comisión Europea en su Reglamento de Ejecución 2018/1865 no renovó la autorización de la sustancia activa propiconazol en base a un informe de la Autoridad de Seguridad Alimentaria (EFSA) que establece, de acuerdo con los límites máximos de residuos, que no se puede considerar que la exposición de los seres humanos a la sustancia activa sea insignificante”, por ello, insta a los países miembros a la no utilización de formulaciones con este principio activo más allá del 10 de marzo del 2020.

La búsqueda de alternativa a los fungicidas químicos se hace necesario, por varios motivos: 1) el desarrollo de resistencia favorecido por el uso indiscriminado de los agroquímicos, unido a la

habilidad de los patógenos a adaptarse a la resistencia del hospedador y a los fungicidas, mediante la reproducción sexual, como el caso es el caso de *S. tritici*, que implica altos niveles de variabilidad (Linde *et al.*, 2002), II) los cambios en la composición de la comunidad fúngica desencadenada por los fungicidas sintéticos ya que pueden actuar tanto sobre hongos patógenos como no patógenos, los cuales, pueden comportarse como antagonistas evitando la propagación de otros hongos patógenos (Karlsson *et al.*, 2014), III) la capacidad de inducir la producción de micotoxinas (deoxynivaleno por *F. graminearum* y fumonisinas por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*) detectadas en los granos de trigo infectados y perjudiciales para la salud humana (Zachetti *et al.*, 2019), IV) los peligros que entraña su manejo, su uso requiere medidas de protección adecuadas como guantes, ropa de protección, mascarillas, no entrar en las áreas de cultivo durante un tiempo, V) por los efectos negativos en el medio ambiente, pueden filtrarse en el suelo y llegar a los acuíferos resultando perjudiciales para los organismos acuáticos, VI) la preocupación por la presencia de residuos de pesticidas en el producto que conllevará en un futuro próximo cambios en los procesos reguladores dentro de la Unión Europea y que se prevé reduzcan la disponibilidad de fungicidas efectivos (Jess *et al.* 2014).

#### 14.2. BÚSQUEDA DE VARIEDADES DE TRIGO MÁS RESISTENTES

Con el fin de reducir o evitar en la medida de lo posible el control químico, una de las estrategias es la utilización de variedades resistentes al patógeno. Cada vez son más los esfuerzos dirigidos a conseguir especies más resistentes a las enfermedades, a las condiciones climáticas, cada vez más adversas, lluvia fuerte y esporádica, periodos de sequía, inviernos más cálidos, etc.



Tritordeum, es un nuevo cereal resultado de la hibridación entre trigo duro (*Triticum durum*) y una especie de cebada silvestre de origen chileno (*Hordeum chilense*). Muestra una buena agronomía, soportando mejor la sequía, los climas extremos y siendo menos afectado por las enfermedades típicas de los cereales ([www.tritordeum.com](http://www.tritordeum.com)).

Contiene hasta un 49% menos de gluten que el trigo común y éste es más digerible al contener menos  $\omega$ -gliadinas, por lo que puede ser una alternativa para los que padecen sensibilidad al gluten, no para los celíacos.

Siguiendo esta metodología y con ayuda de la genómica se buscan variedades que con los genes de resistencia que se han identificado en los híbridos. Entre los genes propuestos *Yr36* de resistencia a la roya amarilla de trigo que confiere resistencia a todas las razas, los genes *Lr34*, *Lr46* y *Lr67* que confieren resistencia parcial en la etapa de la planta adulta contra *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis f.sp. tritici*, *Puccinia graminis f.sp. tritici* y *Blumeria graminis f. sp. tritici* (Krattinge *et al.*, 2015). La resistencia basada en genes no específicos de raza serán los mejores candidatos, ya que la resistencia resultaría más duradera en el campo (Lagudah, 2011).

En este apartado el uso de semillas certificadas es garantía de trazabilidad, pureza varietal, calidad, mayor poder germinativo reduciendo la dosis de siembra, el uso de herbicidas y se eliminan las enfermedades transmisibles por semillas aumentando la producción (Encuesta de calidad de los trigos españoles 2014). La variedad Cracklin, variedad de trigo blando de invierno, es la más comercializada en Castilla y León. Presenta una resistencia media a las enfermedades foliares oídio, septoriosis y roya parda y muy alta a la roya amarilla.

### **14.3. CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES FÚNGICAS**

El control biológico se encuentra enmarcado dentro del “manejo integrado de enfermedades”, conjunto de técnicas de control eficaces desde el punto de vista biológico, ecológico y económico. Los agentes de biocontrol pueden ser bacterias (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*), hongos filamentosos (*Tritordeum*, *Gliocladium*, *Chlonostachys* y *Ulocladium*) y levaduras (*Aureobasidium* y *Candida*) (Pretscher *et al.*, 2018).

#### **14.3.1. BIOCONTROL BASADO EN ORGANISMOS VIVOS**

La disponibilidad de agentes de biocontrol en el control de las enfermedades del trigo es muy limitado, sólo en el caso de la enfermedad producida por *Tilletia caries*, responsable de la caries o tizón del trigo, existe un control biológico alternativo al control químico, *Pseudomonas chlorophaciens*, bacteria Gram negativa con cierta actividad sobre las semillas, recogido en la guía de manejo de plagas al que se puede acceder desde la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://www.mapa.gob.es/es/>).

En el control biológico, las levaduras han sido extensamente estudiadas porque presentan características que les hacen apropiadas para ello: capacidad de colonizar superficies secas durante largos periodos de tiempo, no producir esporas alergénicas, generalmente no

patógenas, no producen micotoxinas o antibióticos y están presentes en una variedad de nichos ambientales (Parafati *et al.*, 2015).

Los ambientes naturales en los que se encuentran las levaduras compitiendo con patógenos son las mejores fuentes para el aislamiento de posibles agentes de biocontrol. Esta premisa ha permitido aislar e identificar numerosas levaduras antagonistas naturales frente a hongos responsables de enfermedades fúngicas post-cosecha de frutas, verduras y hortalizas. *Candida sake* CPA-1 aislada de la hoja y superficie de peras activa frente *B. cinerea* en manzanas (Viñas *et al.*, 1998), *Rhodotorula glutinis* Y-44 aislada de la hoja del tomate y del propio tomate, presenta propiedades antifúngicas frente a este mismo hongo en hojas y tomates (Kalogiannis *et al.*, 2006), *W. anomalus* y *Saccharomyces cerevisiae* también frente a *B. cinerea* en fresas (Oro *et al.*, 2018) al igual que *Pichia fermentans* en manzanas (Fiori *et al.*, 2012). *Mellerozyma guilliermondii*, *M. caribbica* y *Cryptococcus sp.* frente a *Penicillium expansum* en manzanas (Tournas *et al.*, 2019) y *Aureobasidium pullulans* contra *Monilinia laxa* en melocotones (Di Francesco *et al.*, 2015).

El análisis de las levaduras procedentes de nichos propios del sector de panificación como son los granos de cereal, harinas procedentes de la molienda de los granos y masas madre, tanto de trigo duro como del nuevo cereal Tritordeum, hojas y suelo, podría encontrarse las candidatas idóneas como biocontrol de los hongos fitopatógenos del trigo. Como antecedentes, las levaduras *Sporobolomyces roseus* y *Cryptococcus laurentii*, reducen la enfermedad por el hongo *P. nodorum* cuando están presentes en las hojas. Se cree que es por un mecanismo de competición por nutrientes (Fokkema *et al.*, 1979). Más reciente, *A. pullulans*, común en la filósfera de muchos cultivos se ha visto que actúa como antagonista de *Blumeria graminis*, responsable de la enfermedad del oídio (De Curtis *et al.*, 2012).

#### 14.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGENTES DE BIOCONTROL

La pared celular fúngica está compuesta mayoritariamente por glucano, formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6, siendo los más abundantes los primeros, formando quitina por unión de unidades de N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 y proteínas, mayoritariamente glicoproteínas, por lo que un posible mecanismo de acción de las

levaduras antagonistas es mediante la síntesis de proteínas con actividades  $\beta$ -glucanasas, quitinasas proteasas (Spadaro *et al.*, 2016). Ejemplos de actividad antifúngica atribuida a estas hidrolasas son: *Cryptococcus laurentii* LS-28 frente a *B. cinerea* y *P. expansum* mediada por actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa (Castoria *et al.*, 1997), *Aureobasidium pullulans* PL5 contra *Monilinia laxa*, en las frutas con hueso, contra *B. cinerea* y *P. expansum*, en las frutas con pepitas, mediada por una serín proteasa alcalina (Zhang *et al.*, 2012), o *Aureobasidium pullulans* LS-30 con actividad  $\beta$ -1,3- glucanasa y exoquitinasa frente a diferentes patógenos entre ellos *B. cinerea* y *P. expansum*, aunque más importante que las actividades enzimáticas, la competición por los nutrientes parece ser el mecanismo más importante, presentado por esta cepa cuando se inocula en heridas infectadas (Castoria *et al.*, 2001).

La síntesis de metabolitos secundarios volátiles constituye otro posible mecanismo de acción de las levaduras como agentes biocontrol, tal es el caso de *Wickerhamomyces anomalus*, que produce 2-feniletanol capaz de inhibir el crecimiento y síntesis de aflatoxinas de *A. flavus* (Sheng *et al.*, 2014). Pero los compuestos volátiles no sólo han mostrado ser efectivos antagonistas frente a hongos fitopatógenos, sino que también pueden ser útiles en clínica, ya que compuestos como el ácido propanoico, 2-metil, y 3-metilbutil éster, producidos en este caso por un hongo (*Muscodor crispans*), son capaces de inhibir cepas del patógeno humano *Mycobacterium tuberculosis* (Mitchell *et al.*, 2010).

En *Metschnikowia pulcherrima*, la competición por el hierro y la capacidad de formar biofilms son los dos principales mecanismos responsables de la actividad antagonista frente a *B. cinerea* (Parafati *et al.*, 2015), la reducción del contenido en hierro del medio de cultivo conlleva a una reducción en la germinación y crecimiento micelial del hongo cuando este se encuentra en bajas concentraciones, mientras que la formación de biofilms facilita la colonización (Spadaro *et al.*, 2016).

La inducción de respuestas de resistencia en la planta por el agente antagonista, es otro posible mecanismo de acción. Se ha observado que cuando *Candida oleophila* es inoculada en heridas en la superficie de pomelos se detecta un incremento en la síntesis de etileno por parte de las células superficiales del fruto (Droby *et al.*, 2002).

Los análisis transcriptómicos están contribuyendo a conocer los complejos procesos en la interacción antagonista-agonista. En la bacteria *Klebsiella pneumoniae* se ha visto que su presencia frente a *A. niger* induce en éste una regulación negativa de genes relacionados con el desarrollo de las hifas y una regulación positiva de los mecanismos de protección, como es el refuerzo de la pared celular (Nogueira *et al.*, 2019). En la acción antagonista de una cepa de

*Saccharomyces cerevisiae*, Zhao *et al.* (2019), integrando datos de transcriptoma y proteoma, han encontrado que la interacción con el hongo patógeno *F. graminearum* determina un cambio de expresión en un amplio número de genes, unos implicados en el metabolismo basal. También se ha visto que en la acción antagonista de una cepa de *W. anomalus* WRL-076 contra el hongo filamentoso *A. flavus* se produce una bajada transcripcional de genes implicados en conidiación y biosíntesis de aflatoxina (Hua *et al.*, 2019).

Aunque en algunos de esos trabajos se desconoce el agente (proteína o cualquier otro tipo metabolito) desencadenante de la inhibición.

#### **14.3.3. PRODUCTOS COMERCIALES PARA EL BIOCONTROL DE ENFERMEDADES FÚNGICAS**

Los productos basados en levaduras deben reunir una serie de cualidades para garantizar su eficacia y seguridad: levaduras en las formulaciones deben ser genéticamente estables, sin grandes requerimientos nutricionales que encarezcan el producto, resistentes a pesticidas y no patógenas, efectivos contra una amplia gama de patógenos, respetuoso con el medio ambiente y sin riesgo para la salud humana (Liu *et al.*, 2013).

Se han desarrollado productos comerciales como Shermer™, cuyo ingrediente activo es *Metschnikowia fructicola* (Bayer, Alemania) para el control de enfermedades post-cosecha de frutas y verduras. BioNext® y Candifruit™, cuyos ingredientes activos son *Candida oleophila* y *C. sake* (Sipcam-Inagra, España) para el biocontrol sobre frutas. Boni-Protect™ con *A. pullulans* (Bio-Protect, Alemania) (Pretscher *et al.*, 2018), también para en frutas.

Otras formulaciones, como Aspire™ (*Candida oleophila*, Liu *et al.*, 2013) y Yieldplus™ (*Cryptococcus albidus*, Janisiewicz & Korsten, 2002), permanecieron en el mercado poco tiempo por la inconsistencia de su actividad, ya que se veía fuertemente influenciada por las condiciones del entorno (Spadaro *et al.*, 2016).

## **2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

## ANTECEDENTES

En el desarrollo y ejecución del proyecto Propan, (*Obtención de productos de panificación innovadores mediante el desarrollo de nuevas levaduras panaderas y de líneas de alta calidad del nuevo cereal Tritordeum*), del programa Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, subprograma INNPACTO 2012, financiado por el MINECO y liderado por la empresa del sector de panificación, Atriam Bakers S.A., se generó una colección de levaduras. La colección, propiedad del Consorcio Propan (Atriam Bakers S.A., Apliena S.A., Office S.L., CSIC/IBFG y USAL) está formada principalmente por levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, pero también integra especies de levaduras no convencionales, no *Saccharomyces*, que, aunque originalmente no se consideraron de interés para el proyecto por su escasa capacidad de elevar masas panarias, en el transcurso de estos últimos años han adquirido gran relevancia en el mundo de las masas madre, ya que su presencia contribuye a mejorar las cualidades organolépticas de los productos elaborados con las masas en las que están. También, en la industria de la vinificación, hoy en día, suscitan gran interés por su capacidad de producir enzimas con las que ayudan a la transformación del mosto de uva en vino a la vez que producen compuestos que dan olores y sabores distintivos. Además, algunas **especies no *Saccharomyces*** se consideran que **pueden ser antagonistas** de otros microorganismos, ya que **llevan asociadas actividades antimicrobianas**.

Dado que las cepas no *Saccharomyces* de la colección Propan se habían aislado de muestras tomadas desde el origen de la materia prima, necesaria para la elaboración de productos de panificación, hasta de los productos finales, masas madre y de panificación, consideramos que esas levaduras podrían provenir del propio cereal. La presencia de las levaduras no *Saccharomyces* en el entorno del cereal podría suponer una protección para la planta contra microorganismos patógenos, por lo que cepas aisladas de esos entornos serían buenas candidatas para ser efectivas contra hongos patógenos de trigo. En base a estos antecedentes surge la propuesta de este trabajo de tesis doctoral.

## OBJETIVOS

El **objetivo general** del trabajo es contribuir al desarrollo de métodos eficientes, basados en el uso de microorganismos o productos derivados de estos, para el control de enfermedades fúngicas de cereales, en particular de trigo, dada la relevancia de este cereal en el sector agroalimentario de la región, con la finalidad de reducir el uso de antifúngicos químicos con alto impacto negativo en el medio ambiente y la salud.

Para ellos nos marcamos los **objetivos específicos** siguientes:

1. Buscar y seleccionar cepas de levadura capaces de inhibir, en condiciones de laboratorio, el crecimiento de hongos fitopatógenos de fácil acceso en colecciones tipo. Además de la colección de levaduras disponible, se generará otra a partir de nuevas matrices de la cadena de procesamiento de cereal, muestras de campo, grano almacenado, harina y harinas fermentadas, entre otras.
2. Establecer las condiciones óptimas de proliferación de las cepas seleccionadas para obtener la mayor actividad antifúngica y determinar a qué fracción o fracciones del cultivo se asocia la actividad.
3. Identificar los posibles metabolitos celulares implicados en la acción antifúngica y evaluar su actividad sobre hongos patógenos de trigo para conocer qué tipo de productos biológicos pueden ser efectivos en el tratamiento de las enfermedades fúngicas con mayor incidencia en trigo.
4. Evaluar *in vivo*, mediante ensayos en laboratorio, la efectividad antifúngica de los productos con mayor actividad identificados en el objetivo anterior.