



Figura 1. Daño producido por *Botrytis cinerea* en un racimo de uva tras cosecha.

¿Y si la solución para conservar más nuestras frutas y verduras está bajo nuestros pies?

El grupo IN-vid trabaja en el desarrollo de nuevos biofungicidas a partir de bacterias para inhibir el crecimiento de la botrytis en frutas, verduras y uva

➤ **TEXTO Y FOTOGRAFÍAS:** Ignacio Vicente-Díez, Alicia Pou y Raquel Campos-Herrera. Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja)

Encontrar nuevas herramientas que permitan retrasar la podredumbre de la fruta y de la verdura, tanto en el campo como después de su cosecha, es crucial debido a las considerables pérdidas económicas y al enorme desperdicio de alimentos que conllevan. Además, las regulaciones ambientales y de seguridad alimentaria exigen alternativas más sostenibles que las herramientas que hemos venido empleando hasta ahora. De esta manera, se está trabajando para asegurar que las formas de alargar

la conservación de la fruta y de la verdura no tengan un impacto negativo en el medio ambiente ni para la salud humana y, además, no supongan grandes costos energéticos ni económicos. En este contexto, el uso de microorganismos beneficiosos se ha convertido en una estrategia con un gran potencial. En particular, ciertos microorganismos que habitan en el suelo pueden ser claves para el desarrollo de nuevas herramientas y estrategias que alarguen la vida útil de los alimentos.



La importancia de la podredumbre

Las frutas y las verduras son alimentos muy perecederos que pueden perder fácilmente su calidad e inocuidad a lo largo de la cadena de suministro de alimentos. La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) estima que en los países en desarrollo se pierde hasta el 50% de las frutas y verduras desde su recogida en campo hasta su consumo final, mientras que en países desarrollados estas pérdidas pueden alcanzar el 30% [1]. Este hecho no solo representa una pérdida de alimentos, sino de recursos naturales e inversiones de los agricultores y de los intermediarios. El almacenamiento, el transporte y los desperdicios en los hogares son los puntos de pérdida más críticos de frutas y verduras, debido al uso inadecuado de los envases y a la mala gestión de estos alimentos. Las condiciones de almacenaje y transporte inadecuados provocan que los alimentos estén expuestos a altas temperaturas, desecación o daños físicos. Además, las frutas y verduras son especialmente perecederas debido a una enorme variedad de agentes patógenos, como pueden ser algunos hongos, capaces de provocar su rápido deterioro.

¿Qué causa la podredumbre?

Entre los diferentes agentes patógenos que pueden atacar a la fruta y a la verdura a lo largo de la cadena de suministro

destaca el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Helotiales: Sclerotiniaceae). Este hongo, bien conocido, por ejemplo, por el sector vitivinícola por ser el responsable de la podredumbre gris de la uva, es también uno de los mayores responsables de las pérdidas postcosecha de fruta y verdura en todo el mundo (figura 1). Al igual que ocurre con los racimos de uva en el viñedo, este hongo suele causar los mayores daños una vez la fruta o la verdura está madura y en condiciones de alta humedad. Además, *B. cinerea* es capaz de permanecer en estado de latencia durante un tiempo considerable antes de pudrir los tejidos cuando la fisiología de la fruta y de la verdura cambia y el entorno es propicio. Por ello, es importante estar alerta para tomar medidas que prevengan su daño incluso antes de que aparezcan los síntomas.

Soluciones prácticas actuales

En la actualidad, existen diversas herramientas químicas y físicas para mitigar las pérdidas postcosecha de frutas y verduras causadas por *B. cinerea*. No obstante, la efectividad de estas herramientas, así como los costes económicos y ambientales asociados, están sujetos a un intenso debate. Por ejemplo, los fungicidas sintéticos han demostrado ofrecer un control duradero sobre muchos patógenos de plantas y siguen siendo de gran importancia en la agricultura convencional. Sin embargo, su uso generalizado ha desencadenado graves problemas ambientales debido a su persistencia en el aire, el suelo, el agua y los alimentos, así como a la generación de resistencias por parte de algunos patógenos.

Por consiguiente, la Unión Europea (UE), a través del Pacto Verde Europeo, tiene como objetivo reducir a la mitad el uso de fungicidas químicos para el año 2030, recomendando su aplicación de manera limitada y promoviendo medidas preventivas y métodos de control no químicos [2]. Por otra parte, diferentes tecnologías físicas, como variaciones de temperatura, irradiación UV-C, presión o cambios en la composición atmosférica se han venido desarrollando para aumentar la resistencia de frutas y verduras al ataque de hongos que provoquen su podredumbre. Aunque a menudo se consideran tecnologías emergentes, no dañinas y libres de residuos, implican un alto consumo de energía y costos y no

son accesibles para pequeños y medianos productores e intermediarios. Por ello, se puede concluir que, en general, existe una urgente necesidad de desarrollar métodos ecológicos y económicamente viables para la gestión de patógenos.

Nuevas alternativas frente a *Botrytis cinerea*

Desde el grupo de investigación IN-vid del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) en Logroño, La Rioja, se ha venido trabajando en la búsqueda de nuevas soluciones al ataque de *B. cinerea* a la fruta y la verdura, tanto en campo como después de la cosecha. La estrategia que este grupo de investigación viene desarrollando consiste en el uso de biofungicidas capaces de inhibir el crecimiento del hongo sin alterar la calidad de la fruta y verdura, siempre cumpliendo con los criterios de seguridad marcados por la Unión Europea [3]. Pero, ¿qué son los biofungicidas y cuál es el origen de estos productos?

Los biofungicidas son agentes biológicos o productos derivados de organismos vivos que se utilizan para controlar o prevenir el crecimiento y propagación de hongos patógenos en los cultivos y en los alimentos a lo largo de la cadena de suministros. Estos agentes biológicos pueden ser microorganismos, como bacterias, hongos o virus, o pueden ser compuestos orgánicos producidos por esos microorganismos. Los biofungicidas funcionan de diversas maneras, incluyendo la competencia directa con los hongos patógenos, la producción de metabolitos antimicrobianos o la estimulación de las defensas naturales de las plantas contra enfermedades. Son una alternativa más ecológica y sostenible a los fungicidas químicos, ya que tienden a ser menos tóxicos para el medio ambiente y para otros organismos que no son objeto de manejo. Es importante destacar que, aunque los biofungicidas pueden ser efectivos en el control de enfermedades fúngicas, su eficacia puede variar según las condiciones específicas del cultivo y del entorno. Por lo tanto, es importante seleccionar y utilizar el biofungicida adecuado para cada situación particular.

El grupo de investigación IN-vid trabaja en el desarrollo de nuevos biofungicidas mediante el empleo de las bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, que son bacterias recientemente incluidas dentro de la familia Morganellaceae, perteneciente al orden 'Enterobacteriales'.

Este orden es un grupo amplio y diverso de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, con forma de bastoncillos dentro de la clase Gammaproteobacterias. Las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* están entre los microorganismos mejor estudiados debido a las diversas funciones ecosistémicas que llevan a cabo a lo largo de su complejo ciclo de vida y a su capacidad para producir nuevos compuestos bioquímicos con actividad insecticida, nematocida y fungicida, entre otras. Estas bacterias viven en el suelo, en el interior de los juveniles infectivos (JIs) de vida libre de los nematodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterohabdistidae, respectivamente), con los que tiene una relación simbiótica (figura 2).

Los JIs de los nematodos entomopatógenos llevan en su interior a estas bacterias y las transportan por el suelo hasta que encuentran un artrópodo al que pue-

den infectar. Los JIs entran en el artrópodo diana, normalmente en estadios inmaduros como larvas o pupas, a través de sus orificios naturales, y una vez en su interior liberan a las bacterias para producir la patogenicidad y la muerte del artrópodo. De esta forma las bacterias dejan de estar en simbiosis con sus nematodos y pasan a una fase patogénica en las que desempeñan tres importantes funciones: 1) matan rápidamente a los insectos que han colonizado, 2) se encargan de producir nutrientes a partir del cadáver para facilitar el crecimiento y el desarrollo de los nematodos, y 3) colonizan y vuelven a vivir en simbiosis con los JIs de los nematodos. Este complejo ciclo de vida, con múltiples acciones y relaciones con diferentes organismos en un entorno tan diverso como es el suelo está mediado a través de un complejo metabolismo en el que *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son capaces de producir una enorme varie-

dad de compuestos con un amplio rango de funciones que pueden ser muy eficaces en el control de *B. cinerea*.

Para desarrollar esta investigación, el grupo IN-vid aisló los nematodos entomopatógenos del suelo y, a continuación, extrajo las bacterias simbiotes de su interior. Una vez aisladas y caracterizadas, se llevan a cabo unas fermentaciones controladas de las bacterias (figura 3). De este modo, las bacterias producen metabolitos secundarios capaces de matar los insectos o, también, ser aplicadas frente a otros agentes dañinos como el hongo *B. cinerea*. La fermentación se realiza en matraces Erlenmeyer de 500 ml, llenos hasta la mitad de su volumen con un medio nutritivo a base de azúcares y aminoácidos de origen vegetal. En estos matraces se inocula una concentración conocida de bacterias y se incuban en agitación a 150 rpm, a 25±2 °C, en completa oscuridad durante 3 días. De esta forma, se logra obtener los metabolitos secundarios de estas bacterias y estudiar sus múltiples funciones como, por ejemplo, la capacidad de reducir los daños producidos por *B. cinerea* en la fruta y en la verdura.

En los últimos trabajos llevados a cabo por el grupo se ha estudiado cómo estas bacterias, en concreto las especies *Xenorhabdus nematophila* y *Photorhabdus laumondii*, son capaces de inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea*, tanto con experimentos *in vitro* (figura 4) como en aplicaciones en uva y en tomates Cherry.

A lo largo de los experimentos se demostró cómo los metabolitos solubles que producen estas bacterias impiden el crecimiento del hongo en placa, llegando a casi el 100% dependiendo de la especie [4]. Además, se ha trabajado en una línea de trabajo innovadora basada en el empleo de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, del inglés *Volatile Organic Compounds*), que son los compuestos químicos que liberan estos microorganismos como parte de su metabolismo tras producir la muerte del insecto diana y que, por su naturaleza, se vaporizan fácilmente en condiciones de temperatura y presión normales [5]. En particular, se ha observado que el crecimiento de *B. cinerea* se ve completamente inhibido en presencia de dichos volátiles (figura 5). Además, un resultado muy revolucionario es que, si las uvas son expuestas primero a estos volátiles durante unas 72 horas, la susceptibilidad a la infección del hongo se reduce

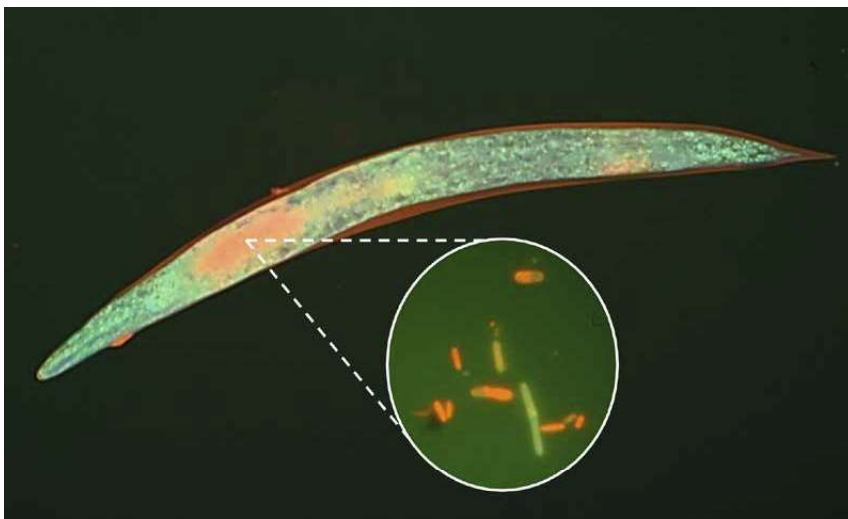


Figura 2. Nematodo entomopatógeno (*Steinernema carpocapsae*) y su bacteria simbiote (*Xenorhabdus nematophila*).

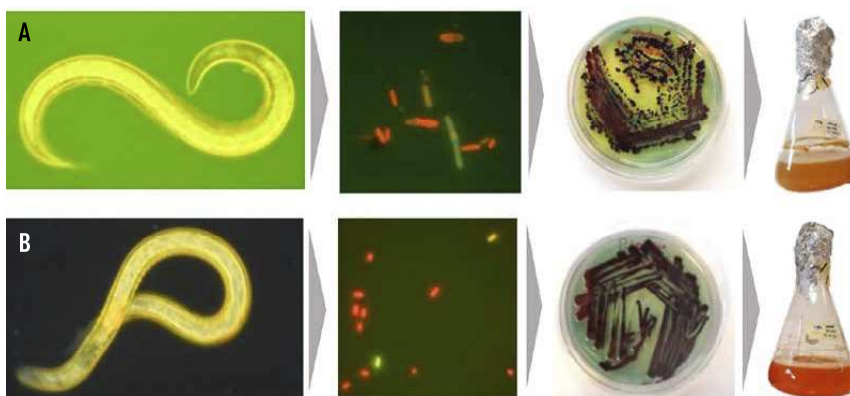


Figura 3. Proceso de obtención de los metabolitos secundarios de las bacterias simbiotes de los nematodos entomopatógenos. De izquierda a derecha: A) Nematodo entomopatógeno: *Steinernema carpocapsae* – Bacteria simbiote: *Xenorhabdus nematophila* – Placa de cultivo de *X. nematophila* – Fermento con los metabolitos secundarios de *X. nematophila*. B) Nematodo entomopatógeno: *Heterohabditis bacteriophora* – Bacteria simbiote: *Photorhabdus laumondii* – Placa de cultivo de *P. laumondii* – Fermentado con los metabolitos secundarios de *P. laumondii*.

considerablemente, de forma que podríamos tener unas uvas “acondionadas” para defenderse mejor al ataque de hongos.

No obstante, aún es necesario investigar si esa exposición puede afectar a la calidad de la uva, para asegurar que este tratamiento no tiene ningún efecto adverso o no esperado en su tratamiento posterior en vinificación o consumo directo.

La ventaja que presenta el uso de los VOCs de origen bacteriano como los producidos por *Xenorhabdus nematophila* y *Photorhabdus laumondii* es que no dejan residuos, tienen una amplia gama de funciones (toxicidad frente a patógenos, estimulación de la defensa de las plantas, etc.) y tienen un enorme potencial como herramienta en la agricultura del futuro. Hasta el momento no se habían empleado los VOCs producidos por estas bacterias terrestres para el manejo de *B. cinerea* en frutas y verduras tras su cosecha, por lo que estos hallazgos han supuesto un primer paso para el desarrollo de nuevas herramientas que eviten la podredumbre de las frutas y verduras, y han permitido al grupo IN-vid solicitar una patente con la referencia EP23382199.

El avance en las técnicas y estrategias destinadas al manejo fitosanitario de la fruta y de la verdura en campo y tras su cosecha es crucial en el contexto agrícola presente. El estudio de las bacterias terrestres *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* es objeto de un creciente interés dado su potencial como agentes biofungicidas. Los pasos a seguir en esta línea de investigación tienen que ir hacia la caracterización de los metabolitos secundarios producidos por estas bacterias, su evaluación en sistemas complejos plaga-enfermedad a una escala semicampo y hacia la mejor comprensión de sus interacciones ecológicas una vez aplicados en el viñedo.

El grupo IN-vid, gracias a la concesión de un nuevo proyecto de la convocatoria I+D+i Generación del Conocimiento, abordará estas cuestiones en un equipo multidisciplinar, en colaboración con investigadores nacionales e internacionales. Este abordaje, más ambicioso, permitirá sentar las bases para poder establecer los criterios regulatorios para su producción a escala industrial y su posible comercialización en un futuro cercano. Sin duda, estas aproximaciones contribuirán a aportar soluciones innovadoras y sostenibles en la protección de los productos vegetales y garantizar la buena conservación de los alimentos.

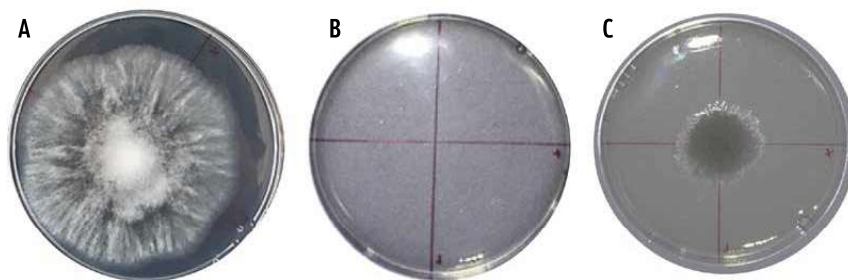


Figura 4. Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* mediante el uso de las toxinas producidas por las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*. A) Placa control; B) Placa con toxinas producidas por *Xenorhabdus nematophila*; C) Placa con toxinas producidas por *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii*.

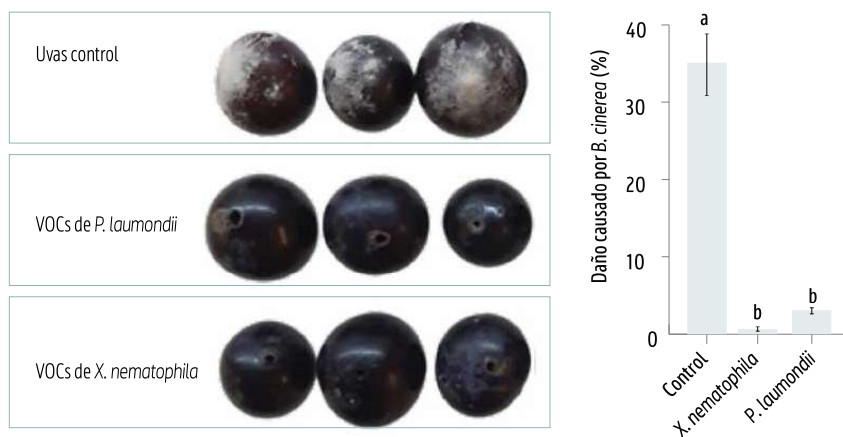


Figura 5. Impacto del uso de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos en los fermentos de *Xenorhabdus nematophila* y *Photorhabdus laumondii* en *Botrytis cinerea*. A) Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en uvas. B) Reducción del daño en las uvas tras la exposición a los VOCs.

Bibliografía

1. FAO (2019) *The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction.*
2. European Commission (2020) *Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system COM/2020/381 final.*
3. Directive 2009/128/EC (2009) *Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides, 309*
4. Vicente-Díez, I. et al. (2023) Exploring bacterial cell-free supernatants, unfiltered ferments and crude bacteria uses of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* (Morganellaceae) for controlling *Botrytis cinerea* (Helotiales: Sclerotiniaceae). *Biol. Control* 183, 105259.
5. Vicente-Díez, I. et al. (2023) Control of post-harvest gray mold (*Botrytis cinerea*) on grape (*Vitis vinifera*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) using volatile organic compounds produced by *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii*. *BioControl* 68, 549–563.