
EFFECTO DE METABOLITOS DE DIEZ AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp, SOBRE *Rhizoctonia solani* BAJO CONDICIONES IN VITRO

García Rosaima¹, Díaz Nelly², Riera Ramón³.

¹ Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT)

² Instituto de Estudios Avanzados (IDEA)

³ UPT Mérida “Kleber Ramírez”

rgcrespo26@inia.gob.ve

Resumen

El hongo antagonista *Trichoderma* spp, se viene recomendando como alternativa de manejo agroecológico de *R. solani* en la papa. Con el objeto de seleccionar aislados nativos de *este hongo* se hicieron tres ensayos bajo condiciones *in vitro*, utilizando 10 aislados de *Trichoderma* spp nativos de la región andina de Venezuela contra uno de *R. solani*: el primero consistió de pruebas de contraste para determinar metabolitos volátiles; el segundo usando el método del papel celofán para filtrar los metabolitos no volátiles difusibles en medio de cultivo y luego poniendo a crecer en éste *R. solani* y, un tercero obteniendo metabolitos extracelulares con un medio líquido determinado y prueba de su efecto contra *R. solani*. Se encontraron diferencias significativas en cuanto a la inhibición del crecimiento de *R. solani* con los metabolitos volátiles; que estuvo entre 55,56 % con M-11, M-21 y 77,78 % con M-14; con los metabolitos no volátiles estuvo entre 16,66 y 11,11% para M-11 y M-18 y, 33,33% con M-4, M-7 y M-21. En presencia de metabolitos extracelulares secundarios, *R. solani* no logró consumir glucosa excepto con M-14 y M-10. Además M-11 logró estimular la germinación y crecimiento de la radícula de semillas de lechuga. Los resultados demuestran que los aislados de *Trichoderma*, son capaces de producir metabolitos tóxicos y fungistáticos a *R. solani*; pudiendo incursionarse en estudios de caracterización de los mismos con miras a escalar en la producción, para utilizarlos en el manejo de Rhizoctonias en la papa.

Palabras clave: papa, *Trichoderma*, *Rhizoctonia solani*, metabolitos, biocontrol

Introducción

La rhizoctoniasis o costra negra de la papa ocasionada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn en la fase asexual y *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk en la fase sexual, se ha venido incrementando en los últimos años en zonas productoras del estado Mérida, alcanzando incidencias desde 5 hasta 60%. Las plantaciones son severamente afectadas por el estrangulamiento parcial o total de tallos, costra negra, deformación de tubérculos y disminución en el rendimiento hasta de un 50%. Como alternativa de manejo de esta enfermedad amigable con el ambiente, se viene recomendado el hongo biocontrolador *Trichoderma* (García *et al.*, 2002, 2005).

Son varios los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. como agente de biocotrol: parásita hongos fitopatógenos, produce metabolitos antibióticos volátiles o no, compite por el espacio o por los nutrientes, persiste especialmente en la rizosfera; promueve el desarrollo de plantas y raíces, aumenta la captación de absorción de los nutrientes, eficacia como fertilizante en la planta, fortalece la resistencia a estres ambiental y estimula la defensa de la planta frente a patógenos (Harman, 2004, 2006).

Muchas cepas de *Trichoderma* liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles (Cardoza *et al.*, 2005; Reino *et al.*, 2008), que producen inhibición de patógenos, además de actuar como moléculas señalizadoras en el diálogo con la planta (Vinale *et al.*; 2006). Los primeros estudios a nivel mundial sobre producción de metabolitos tóxicos de

hongos por *Trichoderma*, datan de 1.932, cuando Weindling, al hacer filtrados de cultivos de *T. lignorum*, aisló, el metabolito Gliotoxin muy tóxico en altas diluciones sobre *R. solani* (Weindling, 1934; Weindling y Emerson, 1936), posteriormente se publicó Viridin por *T. viride* el cual es altamente fungistático (Brian *et al.*, 1946) y Trichodermin en *T. viride* y *T. polysporum*, no excluyendo la posibilidad de encontrar también otro antibiótico péptico en éstos, el cual ha sido detectado en *T. hamatum* (Dennis y Wester, 1971 a y b).

A pesar de todas estas bondades, la adopción del biocontrolador *Trichoderma* en la papa, ha resultado en menor grado ya que su efectividad es variable debido a que ello está en dependencia de la efectividad de la cepa y la calidad del producto.

El presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar aislados nativos de *Trichoderma* spp, por su capacidad antibiótica frente a *R. solani*, bajo condiciones *in vitro*.

Materiales y Métodos

El estudio fue realizado en tres laboratorios: Laboratorio de Agrotécnia de la Universidad Politécnica Territorial del Estado Mérida “Kleber Ramírez”, Unidad de Biotecnología Vegetal del INIA-CENIAP en Maracay, Laboratorio de Biotecnología en Fitopatología del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Como material experimental se usaron 10 aislados de *Trichoderma* spp, nativos de la región andina venezolana, pertenecientes a la colección de hongos benéficos del Laboratorio Referencial de Biocontrol de Plagas Agrícolas

del INIA-Mérida provenientes de suelos. La cepa del hongo fitopatógeno contrastada con el antagonista fue *R. solani*, aislada de un tubérculo de la papa (*solanum tuberosum*) cv. “Andinita”, proveniente de Mucuchíes, Municipio Rangel del Estado Mérida. Se realizaron tres ensayos bajo condiciones *in vitro* a 25 °C, bajo diseños Completamente aleatorizados con tres repeticiones.

Primer Ensayo: Pruebas de contraste de los 10 aislados frente a *R. solani* para determinar metabolitos volátiles. Se hicieron siguiendo la metodología de Denis y Wester (1991), para lo cual se realizaron siembras por separado de los aislamientos de *Trichoderma* spp y de *R. solani* en el medio de cultivo de la Papa Dextrosa Agar (PDA), tomando un disco de 5 mm de diámetro de cultivos puros en crecimiento exponencial de 72 horas de edad. Las placas sembradas con *R. solani* se colocaron por encima de las de *Trichoderma*; Como testigo se dejaron los cultivos de *Trichoderma* y *R. solani* solos y por separado, se sellaron bien y se incubaron bajo 27 ± 2 °C.

Segundo Ensayo: Se usó el método del papel celofán para filtrar los metabolitos no volátiles difusibles en medio de cultivo y luego poniendo a crecer *R. solani*, *pa lo que se siguió la metodología de Sivan et. al.* (1984). Las evaluaciones fueron realizadas cada 24 horas durante cinco días tomando datos sobre crecimiento del hongo en cm, a partir de las cuales se calculó % Inhibición de crecimiento de *R. solani*.

Tercer Ensayo: Obtención de metabolitos extracelulares en un medio líquido determinando y prueba de su efecto contra *R. solani*. Se basó en

determinar indirectamente la producción de metabolitos primarios y secundarios en un cultivo cerrado (Tabla 1). Se utilizó la técnica enzimática para la cuantificación de la glucosa y el nitrógeno no consumidos por los aislados de *Trichoderma*. La absorbancia a la máxima longitud de onda, fue determinada en un espectrofotómetro Synergy HT. La disminución de la glucosa y la urea, fue observada en gráficos de dispersión, donde el eje de las “X” corresponde al tiempo medido en horas y el eje de la “Y” corresponde a la cantidad de glucosa o nitrógeno expresados en mg/mL. El factor crítico correspondió al nitrógeno; tomando como metabolitos secundarios los filtrados desde el tiempo en donde este fue agotado y donde inicia la esporulación del hongo.

Para realizar las pruebas de inhibición de *R. solani* en presencia de metabolitos de *Trichoderma* (Tabla 2), fueron usados 100 μ de medio determinado 4X, 300 μ de cada uno de los filtrados por separado y un disco de 2 mm del hongo crecido en el medio determinado con agar de *Rhizoctonia* durante 24 horas. Se colocaron controles con y sin el hongo tanto de metabolitos como del medio de cultivo y en agua y se cuantificó la cantidad de glucosa consumida por el hongo; lo cual es un indicativo indirecto de la inhibición sufrida a causa de la actuación de los metabolitos. La cantidad de inhibición es inversamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en el medio en relación a los testigos sin inocular.

Resultados y Discusión

En la Figura 1, se presentan los resultados sobre actuación de metabolitos volátiles de las cepas de *Trichoderma* que fueron liberados en el proceso de contrastación de estos con *R. solani*; se puede observar que hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la inhibición del crecimiento de *R. solani* según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney a $p < 0,05$; la cual estuvo en un máximo de 77,78 % con la actuación de las cepas M-11 y M-21 ; 72,22 % con M-4 y 66,67 % con M-7; que fue asociado en un mismo grupo estadístico superior; seguido de M-1, M-15, M-18 y M-23 con 61,11% quienes se ubicaron estadísticamente en otro grupo inferior; M-14 con 55,56 %; y, por último se ubicó M-10 con una inhibición de 27,78 y el testigo con 0%.

En la Figura 2, se presenta una vista panorámica de los resultados del ensayo *in vitro*, se muestra la inhibición del crecimiento de *R. solani* en presencia de la liberación de los metabolitos volátiles de *Trichoderma* en comparación a la placa donde este hongo creció sólo.

Lo anterior demuestra que estos metabolitos son tóxicos y fungistáticos para *R. solani*.

En la la Figura 2, se presentan los resultados del segundo ensayo sobre actuación de los metabolitos no-volátiles difusibles en medio de cultivo, donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney $p < 0,05$; se puede ver que hubo una inhibición del crecimiento de *R. solani* que estuvo en un máximo de 33,33% para los tratamientos con base a los

aislados M-4, M-7 y M-21; seguido de M-1 cuyos metabolitos produjeron una inhibición de 27,78%, luego M-10, M-14, M-15 y M-23 con una reducción del 22,22 %; en tanto que los metabolitos de M-11 y M-18 redujeron entre 16,66 y 11,11% respectivamente y a la vez fueron superiores al testigo.

En la Figura 4, se presenta una vista panorámica de los resultados del ensayo *in vitro*, se muestra la inhibición del crecimiento de *R. solani* en presencia de la liberación de los metabolitos no-volátiles de *Trichoderma* difusibles en el medio PDA en comparación a la placa donde este hongo creció sólo.

La obtención más acelerada de los metabolitos extracelulares depende de la capacidad del aislado de consumir inicialmente glucosa (crecimiento logarítmico) y de agotar el nitrógeno; lo cual coincide exactamente con la esporulación. Se obtuvieron extractos desde transparentes producto del metabolismo primario en los aislados M-14, M-15, M-18 con olores desde coco muy leve hasta inoloro; M-23 opaco e inodoro, M-21 amarillo y de olor extraño y, los provenientes de M-1; M-4, M-11 cuyos colores fueron marrón claro y olor a coco leve; el del M-10 fue verde oscuro inoloro. En cuanto a los metabolitos secundarios, la mayoría fueron de color marrón con olor a coco desde débil a fuerte; excepto M-18 cuyo extracto fue opaco de olor semejante a ácido acético; M-23 con color opaco y olor a coco y M-21 de color amarillo intenso y olor extraño. En la Figura 5, se muestran los metabolitos primarios y secundarios obtenidos de los 10 aislados de *Trichoderma* y que fueron

usados en las pruebas contra *R. solani*. Se pueden apreciar diferentes colores de acuerdo al metabolito presente en el filtrado obtenido en diferentes tiempos de desarrollo de cada una de los aislados estudiados en la cinética de crecimiento con el medio determinado.

En la Figura 6, se puede ver que en todos los medios donde se colocó el metabolito y se sembró *Rhizoctonia*, el contenido de glucosa fue superior a cuando se hizo crecer este en ausencia de los mismos; excepto con M-14 y M-10, los cuales resultaron ser iguales al control. Estos resultados demuestran que *Trichoderma* es capaz de producir metabolitos secundarios fungistáticos.

De acuerdo a estos resultados, se puede ver que hay un fuerte efecto de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento de *R. solani*; cuyas inhibiciones estuvieron por encima de cuando se usaron metabolitos difusibles en el medio PDA donde las reducciones bajaron a más de la mitad. Por otro lado, al evaluar los filtrados de los metabolitos primarios y secundarios de *Trichoderma* sobre *R. solani* y otros microorganismos, se puede disponer de los metabolitos que tienen un mayor efecto, en este caso fueron los del metabolismo secundarios.

La excelente capacidad mostrada en cuanto a la producción de metabolitos volátiles y no volátiles, por parte de los aislados estudiados, coincide con reportes hechos por otros autores quienes han encontrado que muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización de otros microorganismos a la raíz de las plantas; entre estos metabolitos, la producción de ácido arcianico, alamethicina, tricholin, peptaibols, antibioticos, 6-penthy- α -pyrone, massailactone, viridina, gliovirin, entre otros, son los más conocidos. En algunos casos, la producción de antibióticos está correlacionada con la habilidad de biocontrol. En ese sentido, la combinación de enzimas hidrolíticas y antibióticos resulta en un alto nivel de antagonismo comparado con los obtenidos por cada mecanismo por separado. En los últimos años, se han documentado efectos sinérgicos entre una endoquitinasa de *T. harzianum* y gliotoxin, y entre enzimas hidrolíticas y peptaibols en la germinación de conidias de *Botrytis cinerea* (Harman et al. 2004; Howell 2003).

Tabla 1. Medio Determinado para Cinética de crecimiento de *Trichoderma*.

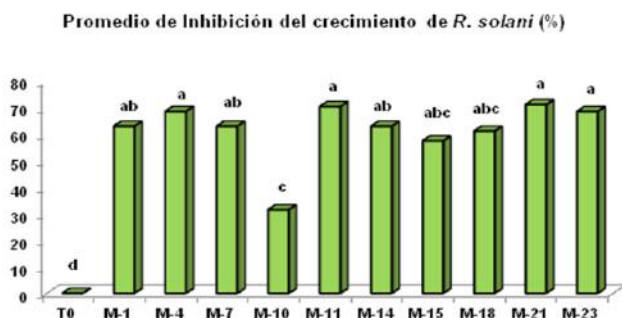
Macroelementos		Microelementos (2%)	
C6H12O6	6 g	FeSO4.7H2O	0.1%
Urea	0.3 g	CuSO4.5H2O	0.015%
MgSO4.7H2O	0.1 g	ZnSO4.7H2O	0.016%
KHPO4	0.0002	MnSO4.H2O	0.01%
MES (Sigma)	50 mM	Na2MoO4.2H2O	0.01%
pH 5.8			

Fuente: (Fraga et al., 2000)

Tabla 2. Medio Determinado. Ensayo de Inhibición del crecimiento de *R. solani*

Macroelementos		Microelementos (0,2%)	
C6H12O6	15 g	FeSO4.7H2O	0.1%
Urea	1.5 g	CuSO4.5H2O	0.015%
MgSO4.7H2O	1 g	ZnSO4.7H2O	0.016%
KHPO4	0.002	MnSO4.H2O	0.01%
		Na2MoO4.2H2O	0.01%
pH 5.8			

Fuente: (Tudzynsky, 1999)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Kruskal allis/Mann Whitney para $p < 0,05$.

Figura 1. Inhibición del crecimiento de *R. solani* in vitro por acción de metabolitos volátiles de 10 Aislados de *Trichoderma* spp.

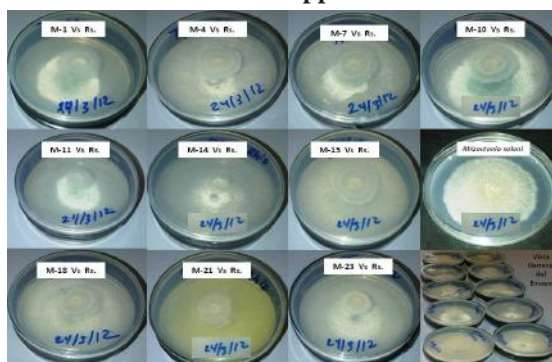
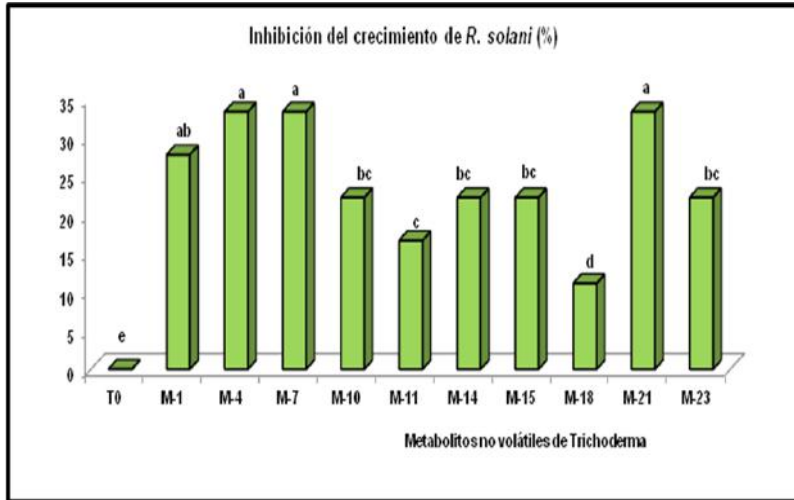


Figura 2. Vista general del ensayo sobre Inhibición del crecimiento de *R. solani* in vitro por acción de metabolitos volátiles de 10 Aislados de *Trichoderma* spp en pruebas de contrastes, bajo temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$



Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Kruskal allis/Mann Whitney para $p < 0,05$.

Figura 3. Inhibición del crecimiento in vitro de *R. solani* por parte de metabolitos no-volátiles

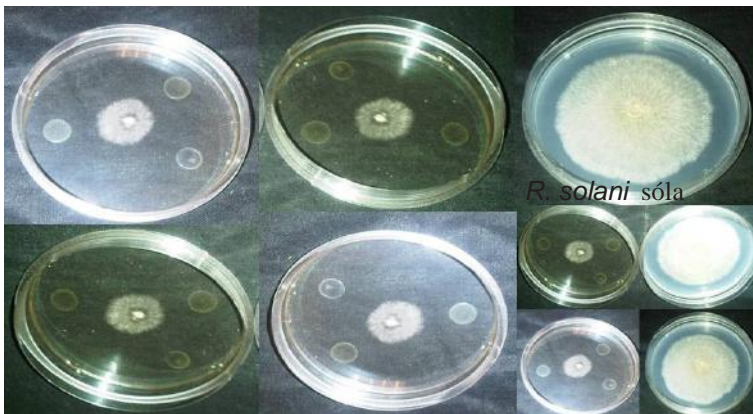


Figura 4. Vista general del ensayo sobre Inhibición del crecimiento de *R. solani* in vitro por acción de metabolitos no-volátiles de 10 Aislados de *Trichoderma* spp en pruebas de contrastes, bajo temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$

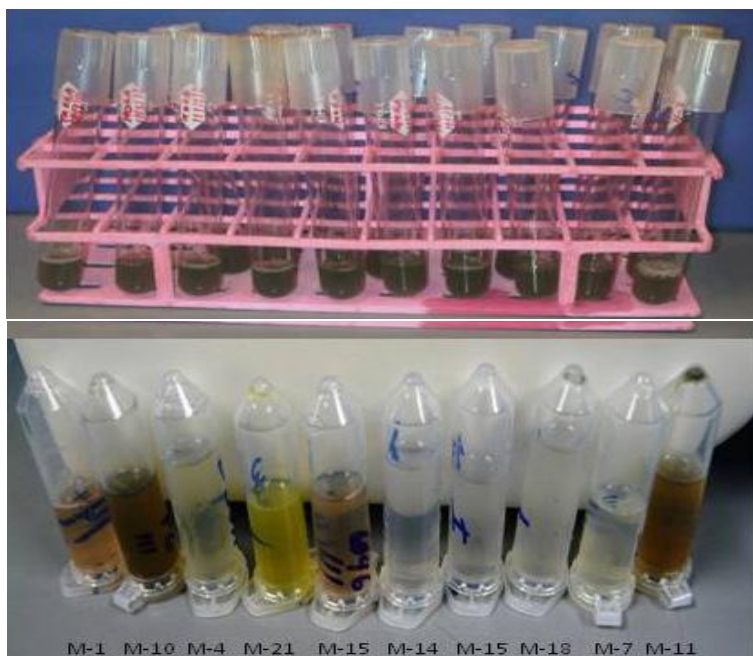
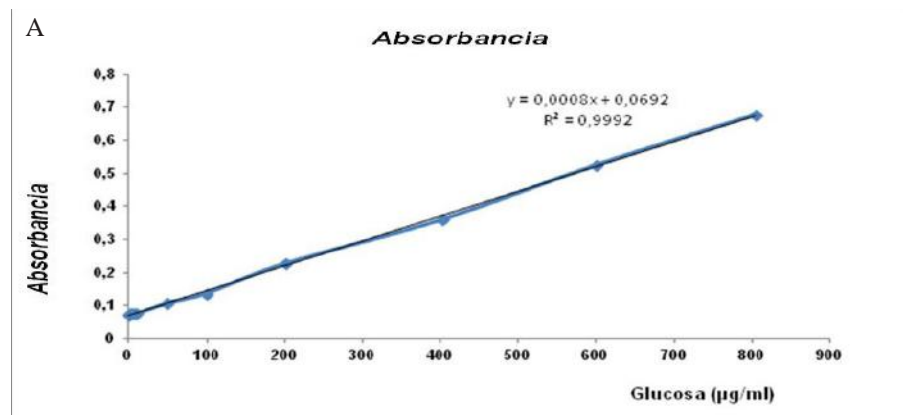
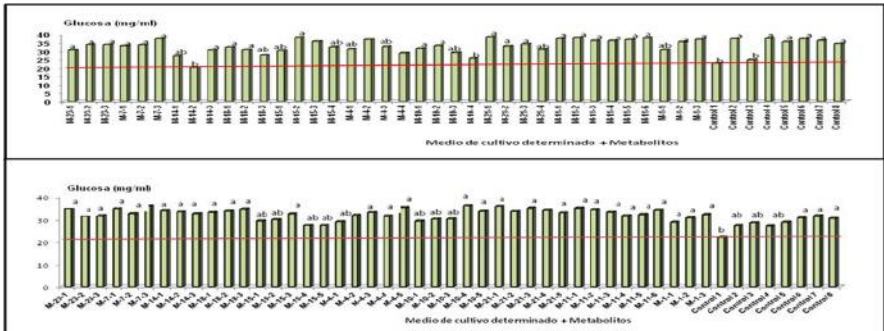


Figura 5. Metabolitos Primarios y Secundarios Extraídos de 10 Aislados de *Trichoderma*, obtenidos en el medio de cinética de crecimiento de Fraga et al. (2000).



B



Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Kruskal allis/Mann Whitney para $p < 0,05$.

Figura 6. Resultados del ensayo de Inhibición del crecimiento de *R. solani* en presencia de metabolitos primarios y secundarios extraídos de 10 aislados de *Trichoderma* spp. A.- Curva de absorbancia de los datos para el cálculo del contenido de glucosa consumido. B. Contenido de Glucosa en el medio donde se hizo crecer *R. solani*

Conclusiones

Los 10 aislados de *Trichoderma* estudiados, son capaces de producir metabolitos tóxicos y fungistáticos a *R. solani*; ello los ubica como potenciales biocontroladores por antibiosis. Es necesario incursionar en los estudios de caracterización de estos metabolitos con miras a escalar en la producción, para utilizarlos en el manejo de Rhizoctoniasis en papa.

Agradecimiento

Al Instituto de Estudios avanzado (IDEA), por el apoyo en logística y el permiso para usar los espacios, equipos e insumos disponibles en los laboratorios para realizar esta investigación.

Universidad Politécnica Territorial del Estado Mérida “Kleber Ramírez”, Extensión Bailadores por el apoyo prestado en prestar su laboratorio

realizar este trabajo.

Al Personal de la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola por su apoyo en la realización de algunas tareas.

Referencias Bibliográficas

- Cardoza, R.; Hermosa, M.; Vizcaíno, J.; Sans, L.; Monte, E.; Gutiérrez, S. (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En *Microorganism for industrial enzymes and biocontrol*. Mellado E. y Barredo J. L (eds). Reseachs Signpost, Kerala, India. pp.1-22.
- Dennis, C.; Webster, J. (1971). Antagonist properties of species-groups of *Thichoderma*. I. Production of non volatile antibiotics. *Trans. Brit Mycol. Soc.* 57:25-39.
- Dennis, C.; Webster, J. (1971). Antagonist properties of species-groups of *Thichoderma*. II. Production of

- volatile antibiotics. Trans. Brit Mycol. Soc. 57:47-4.
- Fraga, B.; Hernández, M.; González, M.; Garbarino, J. (2000). The biotransformation of 18-Hidroxy-9-epi-ent-pimara-7,15diene by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochem* 53:395-399.
- García, R.; García, A.; Garnica, J. (2002). Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa en el estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la papa*. 13(1): 24-40.
- García, R.; Salas, J.; Ramos, G. (2005). Producción de semilla de papa en Venezuela. Serie manuales de cultivo, INIA N°5.
- Harman, G.E. (2004). Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84:377-393.
- Harman, G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190-194.
- Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87(1): 4-10.
- Reino, J. L.; Guerrero, R. F.; Hernández-Galán, R.; Collado, I. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev.* 7: 89-123.
- Sivan, A.; Elad Y.; Chet, I. (1984). Biological Control Effects of New isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* .74: 498-501.
- Tudzynski, B. (1999). Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 52: 298-310.
- Vinale, F.; Marra, R.; Scala, F.; Ghisalberti, E. ; Lorito, M.; Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett Appl. Microbiol.* 43: 143-148.
- Weindling, R. (1934). Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24: 1153-1179.
- Weindling, R.; Emerson, O. (1936). The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of a *Trichoderma*. *Phytopathology*. 26: 1068-1070.