

Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos fitopatógenos del suelo.

Metabolic activity of *Trichoderma spp.* isolates for a control of soilborne phytopathogenic fungi.

M. Stefanova¹, A. Leiva¹, L. Larrinaga¹, M. F. Coronado¹

Resumen

Entre los hongos utilizados para el biocontrol de patógenos fúngicos de suelo, varias especies de *Trichoderma* han sido merecedoras de una mayor atención, su actividad resulta en una combinación de micoparasitismo y producción de metabolitos. Se estudió la actividad metabólica de cuatro aislamientos de *Trichoderma spp.* definidos como promisorios para el control de diversos patógenos del suelo, entre ellos *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium spp.* Los aislamientos A-34 (*Trichoderma harzianum*), A-86 (*Trichoderma viride*), A-53 (Sección *Trichoderma*) y PR-617 (Sección *Longibrachiatum*) producen metabolitos no volátiles con actividad antifúngica que reducen el crecimiento de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* en medio de cultivo enmendado con los filtrados a partir de cultivos líquidos donde fueron cultivadas las cepas antagónicas. La hidrólisis del almidón, gelatina, carboximetilcelulosa, quitina y caseína indicó la presencia en los filtrados de las enzimas líticas: carboximetilcelulasa, quitinasa y α 1,3 gluconasa, entre otras. El aislamiento A-86 emana además una lactona volátil con aroma a coco, probablemente 6 pentil alfa pirona que inhibe el crecimiento de *P. nicotianae*. Los metabolitos causan a nivel celular vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis.

Palabras clave: *Trichoderma*, metabolitos, biocontrol

Abstract

Various species of *Trichoderma* have received more attention, between the fungi used for biocontrol of soilborne pathogens. The effectiveness of *Trichoderma* lies in a combination of mycoparasitism and production of antifungal metabolites. The metabolic activity from four promissory *Trichoderma* isolates for the biological control of the most important soilborne plant pathogens: *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium spp.* was studied. The isolates A-34 (*Trichoderma harzianum*), A-86 (*Trichoderma viride*), A-53 (Section *Trichoderma*)

Recibido el 27-05-1999 ● Aceptado el 12-09-1999

1. Departamento de Microbiología, Laboratorio de Bacteriología, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Calle 110 # 504 esq. 5ta F, Playa. E-mail: inisav@ceniai.inf.cu

and PR-617 (Section *Longibrachiatum*) produced non volatiles metabolites with antifungal activity which reduce *P. nicotianae* and *R. solani* growth in medium emended with filtrates from liquid cultures, where the antagonic isolates were cultivated. The hidrolisis of starch, gelatine, caseine, carboxymethylcellulose and chitin indicated the presence of the lythic enzymes carboxymethylcellulase, chitinase and b- 1,3 gluconase among others in the filtrates. The isolate A- 86 also produced a volatil coconut - like smelling lactone, probably 6- pentyl a' pha pyrone, which inhibits *P. nicotianae* growth. Metabolites cause vacuolation, granulation, coagulation, desintegration and lysis at the cell level.

Key words: *Trichoderma*, metabolites, biocontrol.

Introducción

El biocontrol actualmente ocupa un lugar importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas por los patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* entre otros. Las especies de *Trichoderma* poseen buenas posibilidades en este sentido como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (1,2,8,10, 16).

En Cuba a partir de 1990 se

efectuaron diversos estudios dirigidos al biocontrol de hongos del suelo patógenos al tabaco, hortalizas y otros cultivos con aislamientos de *Trichoderma* que fueron seleccionados "in vitro" por su elevada capacidad hiperparásita y posteriormente utilizados en forma de biopreparados para combatir *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y otros fitopatógenos en condiciones de campo (11,12).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de conocer la presencia y participación de los metabolitos en la inhibición de los fitopatógenos que estas cepas de *Trichoderma* controlan.

Materiales y métodos

Los cuatro aislamientos de *Trichoderma* utilizados y sus especificidades se muestran en el cuadro 1. Para demostrar la presencia de metabolitos no volátiles, las cepas se cultivaron en los medios de cultivo líquidos papa-dextrosa (PD) y melaza-levadura torula (ML), este último empleado

en la producción de biopreparados del hongo. Los frascos con 200 ml de los medios se inocularon con discos (uno por frasco) de cultivos de 48 horas de crecimiento, la reproducción se efectuó de forma estática a temperatura entre 27-30° C.

Diez días despues se tomaron muestras del líquido o filtrados

Cuadro 1. Especificaciones de los aislamientos de *Trichoderma* estudiados.

No de aislado	Nivel de identificación	Efectividad
A-34	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> (tomate y pimentón) <i>Phytophthora capsici</i> (pimentón) <i>Phytophthora parasitica</i> (tomate)	<i>Pythium aphanidermatum</i>
A-53	Sección <i>Trichoderma nicotianae</i> (tabaco) <i>R. solani</i> <i>Pythium sp.</i>	<i>Phytophthora</i>
A-86	Sección <i>Trichoderma T. viride</i> (tomate) <i>P. parasitica</i> (tomate)	<i>R. solani</i> (tomate) <i>Fusarium oxysporum</i>
PR- 617	Sección <i>Longibrachiatum</i>	<i>P. nicotianae</i> (tabaco)

obtenidos mediante filtración con papel que luego fueron, centrifugados a 15000 rpm, durante 20 min, y por último el sobrenadante fue pasado por el filtro milipor de 0,22 µm.

Los filtrados fueron mezclados con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en una proporción de 1:1. Se comparó el tamaño de las colonias de *R. solani* y *Phytophthora nicotianae*, cepas Rs-21 y 223 respectivamente, crecidas en el medio enmendado y en las placas que contenían PDA solamente.

La actividad hidrolizante de los filtrados fue comprobada en medios de cultivo con almidón, gelatina, carboxymetilcelulosa, quitina y caseína. El líquido fue depositado en

los orificios a razón de 200µl y se registró la presencia de zona hidrolizada alrededor, una vez revelada la reacción con solución de yodo al 1%.

La producción de metabolitos volátiles se estudió cultivando la cepa antagonica en la base de la placa Petri sobre el medio PDA, y en la tapa, el hongo fitopatogeno, en este caso se empleó la cepa 223 de *P. nicotianae*. Las placas fueron selladas con cinta plástica y el efecto de los volátiles se comprobó por la comparación del diámetro de las colonias del patógeno con sus testigos a los 3 y 7 días del montaje.

La degradación de la celulosa por las cepas se determinó en tiras de papel de filtro introducidas en un medio

líquido de sales, distribuido en tubos. A los 15 y 20 días de incubación se comprobó la desintegración del papel con respecto al testigo no inoculado. Para determinar la presencia de enzimas celulíticas, las cepas se cultivaron en el medio de sales al que se le añadió celulosa más xylosa, como precursor de la síntesis de las enzimas, ambos al 1%. Luego de 21 días de incubación, se separó el sobrenadante y una vez filtrado se depositó en los orificios practicados en medio agarizado con carboxymetilcelulosa al 1%, además se evaluó la existencia de las otras enzimas líticas anteriormente

mencionadas.

Se comprobó el efecto sobre el micelio fúngico de los metabolitos producidos por las cepas A-53, A-34 y PR-617. Para esto se tomaron fragmentos del micelio de una colonia de *P. nicotianae* de 7 días de crecida en PDA que se colocaron en tubos con 1 ml de los filtrados, luego de 3 días de incubación a 27° C se hicieron observaciones en el microscopio óptico. El testigo fue montado con agua destilada estéril.

Se realizó un análisis de varianza utilizando el sistema STATITCF para un 5% de probabilidad de error.

Resultados y discusión

Los metabolitos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* provocaron un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia de *P. nicotianae* en comparación con el testigo. La cepa A-86 produjo un efecto fungistático notable sobre el hongo fitopatógeno (cuadro 2).

Otros autores (4,13) han mencionado, como parte del mecanismo de biocontrol, el efecto biológico fungistático de sustancias volátiles emanadas por sistemas vivos incluyendo a *Trichoderma*, aunque en la mayoría de los casos no se especifica la naturaleza de los mismos. Bengston *et al.*(1) determinaron la presencia de una lactona volátil, 6 -pentyl alfa pirona, con fragancia a coco, como metabolito principal de *Trichoderma viride*. La cepa A-86 perteneciente a esta especie es caracterizada por el mismo aroma, que sugiere la

presencia del mencionado metabolito o de otro con características similares.

Los filtrados de los aislamientos estudiados, mezclados con el medio de cultivo, limitaron el crecimiento de las especies fitopatógenas por la presencia de metabolitos biológicamente activos (cuadro 3).

Igualmente hidrolizaron la gelatina, caseína, leche, carboxymetilcelulosa (CMC) y la quitina, debido a la existencia de enzimas líticas de carácter proteolítico y celulítico, además de la enzima quitinasa. Los filtrados obtenidos a partir del medio basal enmendado con xylosa y celulosa tuvieron marcada actividad lítica sobre la CMC, no así sobre las proteínas, lo cual puede atribuirse a una mayor producción de enzimas del complejo celulasas en este medio. Estos filtrados también hidrolizaron la quitina y el almidón, esto último señala la existencia de

Cuadro 2. Efecto de los metabolitos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* contra *P. nicotianae*

Cepas	Diámetro de la colonia de <i>P. nicotianae</i> (mm)			
	Primer ensayo		Segundo ensayo	
	3 días	7 días	3 días	7 días
A-34	22,3 ^a	37,2 ^d	21,7 ^b	35,3 ^b
A-53	24,1 ^a	39,0 ^c	19,3 ^c	34,6 ^b
A-86	18,0 ^b	30,0 ^e	11,0 ^d	19,2 ^c
PR	22,0 ^a	41,5 ^b	18,3 ^c	34,8 ^b
Testigo	23,5 ^a	47,3 ^a	24,5 ^a	45,7 ^a

CV= 5,6%. CV= 2,4%. CV=4,7%. CV= 2,6%. DE= 1,23. DE= 0,95. CV= 0,89. DE= 0,88.

enzimas que atacan enlaces glucosídicos (cuadro 4).

Todas las cepas objeto de estudio colonizaron el papel de filtro y provocaron su desintegración a los 15-20 días. En este sentido, Gomez *et al.*(6) determinaron que cepas de *T. viride* y *T. harzianum* poseen actividad carboxymetylcelulasa, b-glucosidasa, xylanasa y b-xylosidasa comparable con la de *Trichoderma reesei* respecto

a la producción de celulasa en papel de filtro. La cepa PR-617 mostró poca actividad en esta prueba, sin embargo, en el filtrado a partir de la misma se detectó la presencia de enzimas celulíticas, posiblemente estimuladas por el sustrato específico empleado. La especie *T. longibrachiatum*, con la cual es afín dicha cepa, no induce normalmente niveles notables de esta enzima y necesita estimulantes para

Cuadro 3. Efecto de los metabolitos no volátiles sobre *P. nicotianae* y *R. solani*

Cepas	Diámetro de las colonias (mm)	
	<i>P. nicotianae</i> (ML / PD)	<i>R. solani</i> (ML / PD)
A-34	20,2 ^c / 22,1 ^c	38,3 ^b / 37,4 ^c
A-53	23,3 ^b / 21,5 ^c	39,2 ^b / 35,4 ^d
A-86	25,0 ^b / 27,3 ^b	40,7 ^b / 41,3 ^b
223(<i>P. nicotianae</i>)	38,0 ^a	-
<i>Rs-21</i> (<i>R. solani</i>)	-	52,2 ^a
	CV=3,4% CV= 2,7%	CV=2,6 CV=2,4
	DE=0,91 DE= 0,73	DE=1,09 DE=1,01

ML: medio melasa – levadura , PD: medio papa dextrosa.

Cuadro 4. Actividad lítica de los filtrados sobre diferentes sustratos.

Sustratos	PRc	PRs	86c	86s	53c	53s	34c	34s	ML		PD	
									53	34	53	34
Leche	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Quitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CM Celulosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C: Medio basal enmendado con celulosa + xylosa (1%). S: Medio basal enmendado con xylosa (1%). ML: Medio melaza-levadura torula. PD: Medio papa - dextrosa.

la producción enzimática (9).

El efecto directo de los metabolitos de los aislamientos A-34, A-53 y PR-617 sobre el micelio de *P.nicotianae* se expresó en deformaciones del micelio, desplazamiento del contenido citoplasmático, afinamiento y lisis de las paredes celulares, resultados que ofrecen respuesta al origen de los cambios estructurales microscópicos que ocurren en el contacto entre el patógeno y las cepas de *Trichoderma* y corroboran los obtenidos anteriormente por Cherif y Benhamou (2).

La producción activa de metabolitos extracelulares por las especies de *Trichoderma* y su importancia en el biocontrol ha sido señaladas en numerosos estudios (3,4,6,7,8,10), la manipulación genética de las proteinasas, incluso es una forma promisoría para incrementar la

actividad biológica de *T.harzianum* (4, 5). La detección de quitinasa sobre sustrato específico indica la biosíntesis de esta enzima por las cepas objeto de estudio. Cherif y Benhamou (2) y Uloha y Peberdy (16) informaron la existencia de quitinasa entre los metabolitos líticos de *Trichoderma* y sugirieron su importancia en el biocontrol como enzima micolítica. La combinación incluso de b 1,3 glucanasa y quitinasa es más efectiva en la inhibición de los hongos (8, 10,17).

Los aislamientos A-34, A-53, A-86 y PR-617 se emplean en forma de biopreparados para combatir los hongos del suelo en tabaco, hortalizas, granos y otros cultivos con una aceptación muy favorable por el agricultor. Parte de la efectividad de los mismos se puede atribuir a la producción de los metabolitos y su efecto sobre los patógenos, tal y como lo demuestran los resultados anteriormente expuestos.

Conclusiones

El crecimiento de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* se puede reducir mediante metabolitos no volátiles con actividad antifúngica producidos por los aislamientos A-34 (*Trichoderma harzianum*), A-86 (*Trichoderma viride*), A-53 (Sección *Trichoderma*) y PR-617 (Sección *longibrachiatum*).

Se constató en los filtrados la presencia de enzimas líticas, carboximetilcelulosa, quitinasa y b-1,3 gluconasa mediante la hidrólisis del almidón, gelatina, carboximetilcelulosa, quinina y caseína.

El aislamiento A-86 emana una

lactosa volátil, probablemente con una estructura química de 6 pentil alfa pirona que inhibe el crecimiento de *P. Nicotianae*.

Los metabolitos evaluados causan a nivel celular vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis.

Los aislamientos A-34, A-53, A-86 y PR-617 se pueden emplear como biopreparados que producen metabolitos capaces de combatir hongos del suelo en tabaco, hortalizas, granos y otros cultivos con aceptación muy favorable por parte del agricultor.

Literatura citada

1. Bengston, G., K.W. Boeddeker, H.P. Hanseen and I. Urbasch. 1992. Recovery of 6-pentyl- α pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by pervaporation. *Biotechnol. Tech.* 6(1): 23-26.
2. Cherif, M. and N. Benhamou. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma sp.* on *Fusarium oxysporum* f. spp *Radici lycopersici*. *Phytopatology*: 80 (12): 1406-1414.
3. Dickinson, J.M., J. R. Hauson, P.B. Hitchcock and N. Claydon. 1989. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, and antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*, *J. Chem. Soc, Lond, PERKEN TRANS.*, I, 11: 1885-1888.
4. Flores, A., I. Chet and A. Herrera- Estrella. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene prb 1. *Curr. Genet* 31: 30-37.
5. Geremia, R., G. Goldman, D. Jacobs, W. Ardiles, S. Vila, M. Van Montagu and A. Herrera-Estrella. 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene prb 1 related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol.* 8: 603-613.
6. Gomez, J., H. Esterbauer, I. Gómez and W. Steiner. 1990. Screening of some wild fungal isolates from cellulolytic activities. *Lett Appl Microbiol.*, 8(2): 67-70.
7. Ghisalberti, E.L., M.J. Narbey, M.M. Dewan and K. Sivasithamparan. 1990. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plan Soil*; 121 (2): 287-291.
8. Mauch, F., B. Mauch-Mani and T. Boller. 1988. Antifungal hidrolases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and b-1,3 gluconase, *Plant Physiol*; 88 (3) 936-942.

9. Royer, J. C. and J. P. Nakas. 1990. Inter-relationship of nylonase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl Environ. Microbiol.* 56 (8):2535-2539.
10. Sivan, A. and I. Chet. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum* J. *Gen Microbiol.* 135 (3): 675-682.
11. Stefanova, M. y I. Sandoval . 1995. Efectividad de *Trichoderma spp* en el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Boletín Técnico 2, CID-INISAV*, 22 p.
12. Stefanova, M. 1997. Biopreparados de *Trichoderma*: una forma de lucha efectiva contra patógenos fúngicos del suelo. *Agricultura Orgánica No. 2 y 3 agosto-diciembre*, p. 22-24.
13. Sundara Singh B. and S.B. Saksena. 1988. Fungistatic effect of volatiles produced by penicillia in soil *Sci. Cult.*, 54(1) 21-23.
14. Ulloa, C. J. and J. F. Peberdy. 1997. Purifications and characterization of an extracellular chitobiose from *Trichoderma harzianum* *Curr. Microbiol.* 23 (5): 285-289.
17. Vázquez-Garcidueñas, S., C.A. Leal-Morales and A. Herrera-Estrella. 1998. Analysis of the b-1,3- glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* . *Appl. Envirom. Micobiol.* 64 (4) 1442-1446.