

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR *Trichoderma spp.*, PARA EL BIOCONTROL DE MANCHA EN RED EN *Hordeum vulgare*, OCASIONADA POR EL FITOPATÓGENO *Drechslera teres*

Soto Alanis Kevin (1), Jiménez Hernández Norberto (1), Chávez Avilés Mauricio Nahuam (2)

1 Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo | Dirección de correo electrónico: kalvin_180895@hotmail.com; pa.nthom@hotmail.com

2 Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, División de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo | Dirección de correo electrónico: nchavez@itsch.edu.mx

Resumen

En México la producción de cebada anual es aproximadamente de 700,000 toneladas, sin embargo, cerca del 20%, se traduce en pérdidas de grano por causa de enfermedades, plagas y factores ambientales. En este sentido, la enfermedad con mayor impacto en la producción de cebada, es la mancha en red, la cual es ocasionada por el hongo fitopatógeno *Drechslera teres*, habitualmente se usan agroquímicos para controlar la enfermedad, pero el uso desmedido ha provocado la generación de cepas resistentes, contaminación y afectaciones a la salud del usuario, por ello se buscan alternativas viables para controlar fitopatógenos, como es el uso de hongos antagonistas, uno de los más estudiados es el género *Trichoderma*. En el presente trabajo se analizó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), producidos por tres cepas de *Trichoderma* (T1, T2 y T3), sobre el crecimiento de cuatro aislados de *D. teres* (1A3, 1B2, 2A3 y 2C3) mediante bioensayos *in vitro*. Los experimentos realizados mostraron que las cepas T1, T2 y T3 poseen actividad biocontroladora sobre *D. teres*, tanto en sistemas de contacto directo como en presencia de VOCs, por lo cual, dichas cepas podrían ser empleadas para el tratamiento de la mancha en red.

Abstract

In Mexico, annual barley production is approximately 700,000 tons nevertheless, around 20% of the grain is lost due to diseases, pests and environmental factors. In this sense, the disease with the greatest impact on the barley production is the network spot, which is caused by the fungus *Drechslera teres*, currently agrochemicals are employed to control this disease, however the excessive application of this compounds has caused development of resistant strains, contamination and affectations to the health of the consumer, hence it is necessary to find alternatives. An effective way to control phytopathogens is the use of antagonistic fungi, such as the genus *Trichoderma*. In this work, we analyzed the effect of the volatile organic compounds (VOCs) produced by three *Trichoderma* strains (T1, T2 and T3), on the growth of four isolated strains of *D. teres* (1A3, 1B2, 2A3 and 2C3) by bioassays *in vitro*. The experiments show that T1, T2 and T3 strains have biocontrol activity on the isolated strains of *D. teres*, in both bioassays, direct contact system and by VOCs; therefore such strains could be used for the treatment of the network spot.

Palabras Clave

Control biológico; *Trichoderma*; *Drechslera teres*; compuestos volátiles.

INTRODUCCIÓN

La cebada

Características y producción

La cebada, *Hordeum vulgare*, es una planta monocotiledónea que presenta granos recubiertos altamente resistentes a la degradación química, es conocida como un cereal de invierno y su cosecha comienza en primavera. Sus características nutricionales presentan una baja relación de grasas (2-3 %), una alta concentración de carbohidratos (68 %) y aproximadamente el 17 % son proteínas, las cuales dictaminan el destino final de los granos, es decir, si serán usados para elaboración de maltas cerveceras o como forraje [1].

En México, la producción anual es de aproximadamente 700,000 toneladas, el principal productor a nivel nacional es el estado de Guanajuato, sin embargo, alrededor del 20 % de la producción son pérdidas de grano útil debido a plagas, enfermedades y factores ambientales [2, 3]. De las pérdidas registradas, aproximadamente el 10 % son ocasionadas por la mancha en red, la cual es una enfermedad que afecta al sistema foliar de la planta, causando marchitamiento en las hojas y vainas, además de afectar el desarrollo de los granos. El agente causal de dicha enfermedad es el fitopatógeno, *Pyrenophora teres Drechs*, el cuál es un hongo ascomiceto cuya fase asexual corresponde a *Drechslera teres* [1, 4].

Tratamiento de plagas y enfermedades

Habitualmente para el tratamiento de plagas y enfermedades, como la mancha en red, se utilizan agroquímicos, sin embargo, el uso desmedido y constante de éstos, genera cepas de patógenos resistentes, lo cual es un problema a largo plazo. Además, el uso de agentes agroquímicos también representan problemas de contaminación en suelos, agua y aire, así como, afectaciones a la salud del usuario [5, 6, 7, 8].

En este sentido, una manera eficaz de combatir a dichos fitopatógenos, es el uso de microorganismos antagonistas

como el género *Trichoderma*. Dicho género presenta cepas de hongos con actividad antagonista, frente a diversos fitopatógenos, así mismo, presenta varios mecanismos de acción, como la competencia por sustrato y espacio, el micoparasitismo así como la antibiosis dentro del cual se encuentran los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y difusibles [9, 10, 11].

Actualmente no se tienen registros de biocontrol sobre *Drechslera teres* en la cebada, por parte de algún microorganismo antagonista, sin embargo, un estudio realizado por Mónaco y colaboradores (2012), en parientes cercanos de la cebada, como son el trigo y sorgo, han revelado que es posible inhibir el crecimiento de fitopatógenos como *Mycosphaerella graminicola* usando cepas de *Trichoderma*, lo cual sugiere que es posible biocontrolar cepas de *D. teres* mediante el uso de *Trichoderma* como antagonista [12, 13, 14].

Dicho lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles, producidos por tres cepas de *Trichoderma*, (T1, T2 y T3), en el crecimiento de cuatro aislados del fitopatógeno *Drechslera teres*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las cepas de *Drechslera teres* y *Trichoderma*

Las cepas de *D. teres* fueron aisladas de cultivos de sorgo, en el estado de Guanajuato, los cuales presentaban la sintomatología característica de la mancha en red de acuerdo con lo reportado por Moya (2015) [15]. Se seleccionaron hojas con daños foliares, se cortaron en trozos de 1 cm² y se sumergieron en agua destilada estéril durante 30 minutos, posteriormente se realizó una desinfección con etanol al 96 % durante 5 minutos, seguido de un lavado con agua destilada estéril. Adicionalmente, se preparó una solución de hipoclorito de sodio al 5 % y SDS (Dodecil sulfato sódico) al 2 %, en donde se sumergieron las hojas durante 5 minutos seguido de 3 lavados con agua destilada estéril y finalmente se colocaron los trozos de hojas en papel durante 20 minutos para eliminar restos de agua. Posteriormente, se realizó el aislamiento, purificación e identificación a nivel macroscópico de los aislados según

lo reportado por Frazzon (2002) [16], los cuáles se etiquetaron como 1A3, 1B2, 2A3 y 2C3.

Las cepas de *Trichoderma* T1 y T3, fueron donadas por el Ing. Agrónomo Juan Boyzo Marín y T2 fue donada por M.C. Alberto Flores García del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

Pruebas de antagonismo in vitro

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de ambos microorganismos con la finalidad de normalizar el crecimiento y tiempo de confrontación.

Para determinar la actividad antagónica por parte de las cepas de *Trichoderma*, se realizaron bioensayos por contacto directo en cajas Petri con medio PDA, colocando un disco de los aislados 1A3, 1B2, 2A3 y 2C3, al cabo de 36 horas, el disco con las cepas de T1, T2 y T3, de manera equidistante con respecto al crecimiento al 50 %. Esto se realizó para cada aislado, por separado. Se midió el crecimiento diametral de ambos hongos en periodos de 24 horas durante 7 días [17].

Una vez determinada la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma*, se realizaron bioensayos de volátiles, en donde se colocó un disco de cada aislado en una base de caja Petri con medio PDA, 36 horas después se inoculó otra base con un disco de las cepas T1, T2 y T3, ambas bases se unieron una contra otra y se sellaron (Fig. 1). Posteriormente, se midió el crecimiento diametral en periodos de 24 horas durante 7 días [18].

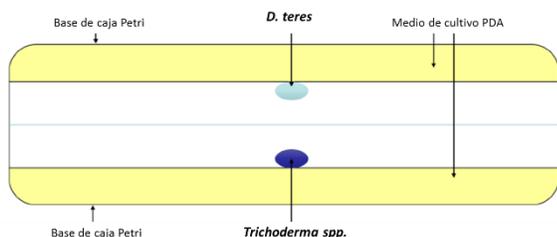


Figura 1: Diagrama representativo del sistema de confrontación por volátiles, en donde se coloca una base con el fitopatógeno y en la otra el antagonista. El sistema se repite para cada uno de los aislados y las combinaciones con las cepas de T1, T2 y T3. Modificado de Barakat & Abada (2013).

Para ambos sistemas se analizaron los porcentajes de inhibición y se realizó un análisis de normalización y

varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de una prueba *Post-Hoc* de Tukey con una $\alpha \geq 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de antagonismo en contacto directo

Los confortamientos en sistema dual por contacto directo confirmaron la hipótesis, en donde se estableció que las cepas de *Trichoderma spp.* son capaces de inhibir el crecimiento de los aislados de *D. teres*.

Todos los aislados vieron comprometido su crecimiento al interactuar con las cepas de *Trichoderma*, sin embargo, el aislado 1A3 mostró mayor inhibición en su crecimiento con respecto a los controles. Frente a T1 mostró una inhibición del 44.96 %, mientras que para T2 y T3 los valores fueron de 44 y 41.54 %, respectivamente. Esto sugiere que el aislado 1A3 presenta una mayor sensibilidad al estar en presencia de las tres cepas de *Trichoderma*.

En los experimentos con las cepas T1 y T2 el aislado 1B2, mostró valores de 29.1 y 37.57 % de inhibición, respectivamente. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la capacidad antagonista de T3, ya que obtuvo un porcentaje de inhibición del 5.5 %, con respecto a los controles. Escenarios semejantes se observaron con los aislados 2A3 y 2C3, los cuales presentaron una inhibición del 24.8 y 24.3 %, respectivamente, frente a la cepa T1, mientras que en confrontación con T2 los porcentajes de inhibición fueron 44.7 y 34.88 %, para 2A3 y 2C3, respectivamente. No obstante, la cepa de T3 también disminuyó significativamente su capacidad de inhibición, los aislados 2A3 y 2C3 frente a T3, mostraron porcentajes de inhibición de 6.79 y 2.94 %, respectivamente (Fig. 2). Esto sugiere que la cepa T2 tiene un mejor desempeño en el control biológico de los 4 aislados de *D. teres*, con respecto a T1 y T3.

Con base en estos resultados, se realizaron los bioensayos de volátiles para evaluar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles, producidos por las tres cepas de *Trichoderma*, sobre el crecimiento de los cuatro aislados de *D. teres*.

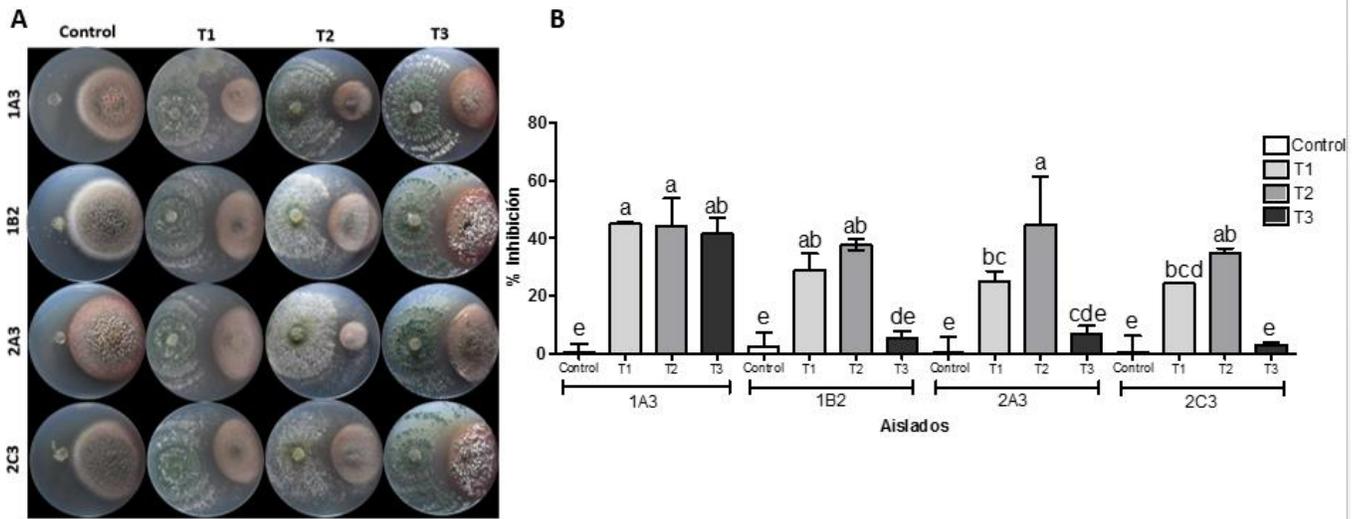


Figura 2: A) Se muestran fotografías representativas de los enfrentamientos duales en contacto directo, del lado derecho de cada caja se encuentra el aislado mientras que del lado izquierdo se encuentran las cepas de *Trichoderma* T1, T2 y T3. Para los controles, los discos de T1, T2 y T3 fueron reemplazados con discos de *E. coli*. B) En el gráfico se muestran los porcentajes de inhibición por grupo de aislados. Los datos graficados representan el promedio \pm DE de una $n=3$. Diferentes letras representan grupos estadísticamente diferentes, resultado del ANOVA y la prueba Post-Hoc de Tukey con $\alpha \geq 0.01$. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares.

Al igual que en contacto directo, todas las cepas de *Trichoderma* presentaron capacidad de inhibición. El aislado 1A3 frente a las cepas T1, T2 y T3, mostró valores de 21.2, 21.3 y 42.82 % de inhibición respectivamente, en comparación con los controles.

De la misma manera el aislado 1B2, mostró porcentajes de 16.1, 6.33 y 32.2 %, en presencia de T1, T2 y T3, respectivamente. Para el caso de los aislados 2A3 y 2C3, éstos mostraron porcentajes de inhibición de 27.9 y 27.4 % para el caso de T1, 2.9 y 37.2 % para el caso de T2 y 30.73 y 35.7 %, para el caso de T3, respectivamente (Fig. 3). En este sentido la cepa con mayor efectividad es T3,

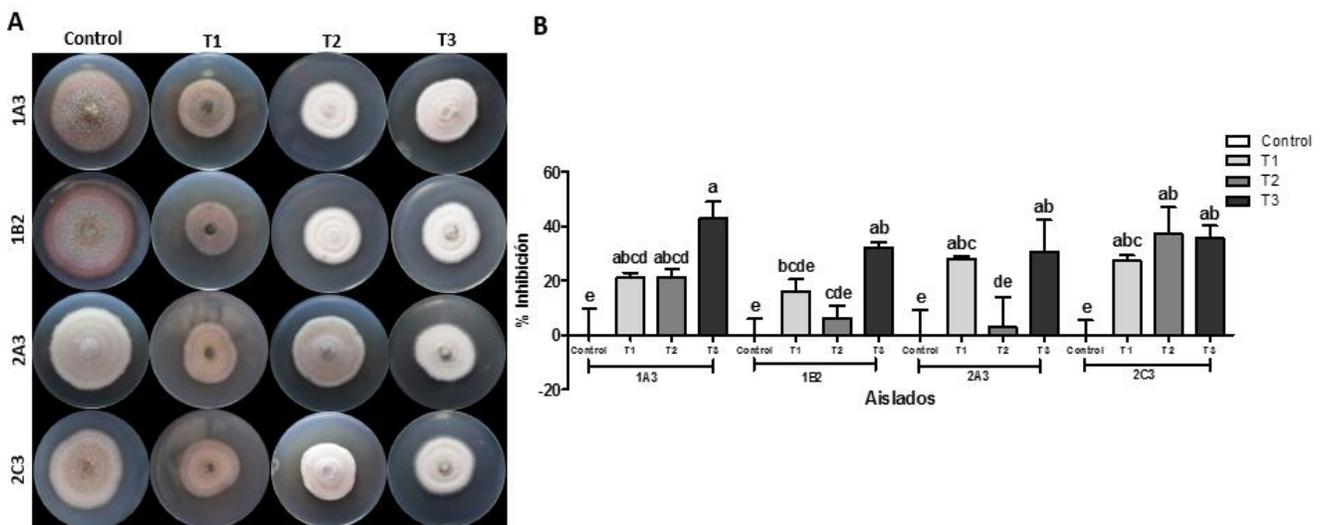


Figura 3: A) Se muestran fotografías representativas del crecimiento de los aislados 1A3, 1B2, 2A3 y 2C3 al término de las confrontaciones por volátiles, las cajas fueron inoculadas según la metodología, para los controles, los discos de *Trichoderma* T1, T2 y T3 fueron reemplazados con discos de *E. coli*. B) En el gráfico se muestran los porcentajes de inhibición por grupo de aislados. Los datos graficados representan el promedio \pm DE de una $n=3$. Diferentes letras representan grupos estadísticamente diferentes, resultado del ANOVA y la prueba Post-Hoc de Tukey con $\alpha \geq 0.01$.

con porcentajes de inhibición máxima de 42.86 %, seguido de T1 con 27.93 % de inhibición, lo cual sugiere que es posible el control biológico del fitopatógeno *D. teres*.

Con la finalidad de identificar cepas de *Trichoderma spp.* con actividad antagonista sobre el fitopatógeno *D. teres*, se realizaron los bioensayos en contacto directo, en donde se observó que las cepas T1, T2 y T3 son capaces de disminuir el crecimiento de los aislados de *D. teres*. Esto es debido a que las cepas presentan mecanismos de acción como: micoparasitismo y antibiosis, ya que durante los enfrentamientos en contacto directo, las cepas T1, T2 y T3 mostraron capacidad para colonizar a los aislados 1A3, 1B2, 2A3 y 2C3, generando un cambio en la morfología de éstos, como puede observarse en la Fig. 2. Además, ocurre una esporulación temprana por parte de los aislados, así como, un adelgazamiento en el micelio. Esto puede deberse a que las cepas T1, T2 y T3, poseen actividad enzimática de β -1,3-glucanasa, β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa, que afectan el crecimiento de *D. teres*, según lo reportado por Bautista-Ortega P. I. (2016) y Hernández-Hernández I. (2016) [19, 20].

Así mismo, las cepas de *Trichoderma*, presentan antibiosis, mediante la producción de metabolitos tóxicos para el fitopatógeno, dependiendo de las características, estos metabolitos, pueden ser compuestos difusibles o volátiles. En el caso de los compuestos difusibles, durante los ensayos en contacto directo, a partir del cuarto día de confrontación, se observa la aparición de una frontera que delimita los micelios de ambos hongos, esto sugiere que se generan compuestos difusibles en el medio, los cuales delimitan el crecimiento de *D. teres*, mientras que las cepas de *Trichoderma* rodean al micelio del fitopatógeno para después parasitarlo (Fig. 2). Con base en este comportamiento e investigaciones realizadas con anterioridad, se sugiere que las cepas de *Trichoderma* reconocen al fitopatógeno, por lo cual desarrollan sus hifas en dirección a él para micoparasitarlo. Así mismo, dependiendo del estímulo, será la respuesta en el metabolismo, que llevará a la producción de compuestos difusibles por parte de ambos hongos [21].

En este sentido, para analizar el efecto de un solo mecanismo de acción por parte de las cepas de *Trichoderma*, se realizaron los ensayos de inhibición por compuestos orgánicos volátiles, en donde las cepas T1,

T2 y T3, mostraron una disminución en el crecimiento de los aislados de *D. teres*, por efecto de los metabolitos volátiles (VOCs), la cepa con mayor porcentaje de inhibición fue T3, con rangos de entre 30 y 40 % de inhibición, lo cual sugiere que los VOCs producidos por la cepa T3 pueden ser una vía eficaz para el tratamiento del hongo fitopatógeno *D. teres*, de la misma manera los aislados 2A3 y 2C3 frente a T1 presentaron una inhibición significativa, mientras que T2 tuvo una disminución en su capacidad biocontroladora, sin embargo, para el aislado 2C3 tiene un porcentaje de inhibición mayor al 37 %, lo cual sugiere que éste aislado es más sensible a los VOCs producidos por T2 en comparación con las otras cepas. Aunado a este efecto, los cuatro aislados mostraron cambios en su morfología (Fig. 3). Al interactuar con los VOCs producidos por las cepas de *Trichoderma*, los cuatro aislados tuvieron una baja esporulación, lo cual sugiere que éstos volátiles afectan al crecimiento sexual de *D. teres*. Además, a partir del segundo día de confrontación, los bordes que habitualmente eran circulares se tornaron irregulares, lo cual sugiere que hay una afectación en la pared celular del hongo fitopatógeno, por parte de los VOCs producidos por las cepas de *Trichoderma*, en comparación con lo reportado por García-Álvarez (2016) [22]. Así mismo, se observó un cambio en la coloración del micelio de los cuatro aislados, en confrontación con las cepas T2 y T3, lo cual sugiere un cambio en el metabolismo del fitopatógeno en respuesta a la interacción con las cepas de *Trichoderma*.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que existe la posibilidad de controlar el crecimiento del hongo fitopatógeno *Drechslera teres*, mediante los compuestos orgánicos volátiles, producidos por las tres cepas de *Trichoderma*, por lo cual el control biológico podría ser una vía eficaz para el tratamiento de la mancha en red en los cultivos de cebada. Además, se abre la posibilidad de identificar nuevos metabolitos (VOCs), producidos por las cepas de *Trichoderma*, los cuales puedan tener una capacidad antifúngica.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con el financiamiento del PRODEP 2014 con número DSA/103.5/15/10775.

REFERENCIAS

- [1] Pereira Silvia, M. D. (2013). Herramientas para un manejo inteligente en trigos y cebadas. INIA, Jornada Cultivos de invierno. La Estanzuela.
- [2] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (s.f.). <http://www.fao.org/mexico/es/20092016>.
- [3] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <http://www.gob.mx/sagarpa/20092016>.
- [4] M. Carmona, D. B. (2008). Epidemiology and Control of Seed-borne Drechslera teres on Barley. Cereal Research Communications, 34(4), 637-645.
- [5] Brown, G. (1988). Efficacy of Guazatine and Iminoactidine for Control of Postharvest Decays of Oranges. Plant Disease/ Vol.72 No.10, 906-908.
- [6] Torres Sánchez, E., Cárdenas Cota, H., & M. de la Torre Martínez, M. (2011). Biocontrol de Plagas Agrícolas y Enfermedades de la Planta. 505-528.
- [7] A. Boebel, T., Lu, Y., G. Meyer, K., Yao, C., F. Daeuble, J., Bravo-Altamirano, K., & M. Nugent, B. (2016). Macrocyclic picolinamides as fungicides. United State Patent Application Publication, 1-146.
- [8] Lise Nistrup Jørgensen, Thies Marten Wiczorek, Hanne-Birgitte Christiansen & Birgitte Boyer Olsen. (2016). Fungicide resistance-related investigations. Applied Crop Protection, 81-88.
- [9] Moya, J., Garcia, S., Avilés, E., Andujar, F., & Nuñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de Trichoderma de suelos, sustratos y raíces. Revista APF 3(2): 11-16. 2014, 11-16.
- [10] Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismo de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. Protección vegetal, 24(1), 14-21.
- [11] Morath, S. U. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. Fungal Biology Reviews, 26(2), 73-83.
- [12] Alberto, S. (2013). Diferencias entre trigo y cebada. Agrícola Ceres, 37-39.
- [13] Mónaco, C., Stocco, M., Lampuganani, G., Abramoff, C., Kripelz, N., & Cordo, C. (2011). Capacidad biocontroladora de Trichoderma sp. sobre la manifestación de septoriosis del trigo. CIDEFI, CICBA, Curso de Terapéutica vegetal, 1-11.
- [14] LA, E. E. (2011). Desarrollo de epidemias en cultivos: análisis de sus componentes para un manejo integrado. INTA, Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno. Publicación miscelánea N° 109.
- [15] Moya, P., & N. Sisterna, M. (2012). Estudios Preliminares de Biocontrol de Mancha en Red de la Cebada en Semilla, con Cepas de Trichoderma spp. Análisis de Semillas, 2, 49-49.
- [16] Frazzon, A. P. G., Matsumura, A. T. S., & Van Der Sand, S. T. (2002). Morphological characterization and genetic analysis of Drechslera teres isolates. Genetics and molecular biology, 25(2), 235-241.
- [17] Baturó-Ciesniewska, A., Grabowski, A., & Panka, D. (2012). Diversity in the polish isolates of Drechslera teres in spring barley as determined through morphological features, mating types, reaction to control agents and rapd markers Journal of Plant Pathology, 94(2), 339-351.
- [18] Barakat, F. M., & Abada, K. A. (2013). Effect of volatile and non-volatile compounds of Trichoderma spp. on Botrytis fabae the causative agent of faba bean chocolate spot. Research WebPub, 1(August), 42-50.
- [19] Hernández H. I., Chávez A. M., Soria L. L. (2015). Determinación de la actividad de las enzimas endo- β -1,3-glucanasa y endo- β -1,4-glucanasa de Trichoderma spp., en el proceso de biocontrol de Colletotrichum gloeosporioides en presencia de Bacillus subtilis in vitro.
- [20] Bautista O. P., Chávez A. M., Pérez P. R. (2015). Determinación de la actividad de la enzima β -nacetilhexosaminidasa de Trichoderma spp. en el proceso de biocontrol de Colletotrichum gloeosporioides en presencia de Bacillus subtilis in vitro.
- [21] Infante D., Martinez B., González N., Reyes Y. (2009). Trichoderma mechanisms of action against phytopathogen fungi. Revista de Protección Vegetal, 24(1), 14-21.
- [22] García A. M., Chávez A. M., Soria L. L. (2016). Análisis de los mecanismos de biocontrol de Trichoderma spp. Y bacillus subtilis sobre colletotrichum acotatum.