



Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo

Gustavo Mariano Dal Bello¹, Cecilia Inés Mónaco¹ y Alicia Raquel Cháves²

¹ Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de la Plata y Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y ² Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Se estudió *in vitro* el efecto inhibitor del desarrollo de *Alternaria citri*, *Bipolaris cynodontis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia brachyspora*, *Curvularia lunata*, *Curvularia oryzae-sativae*, *Drechslera tritici-repentis*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotium rolfsii*, causado por los componentes volátiles que produce *Trichoderma hamatum*. Los organismos se cultivaron en un aparato formado por dos matraces conectados por sus bocas. En la atmósfera interior del sistema se determinó por cromatografía gaseosa la variación de dióxido de carbono, oxígeno y etileno, no encontrándose rastros de acetaldehído ni etanol. Debido a la actividad respiratoria de *T. hamatum* los niveles de dióxido de carbono aumentaron progresivamente, mientras disminuía el volumen de oxígeno. La producción de etileno fue baja y después del tercer día permaneció constante. Con excepción de *C. oryzae-sativae* y *B. cynodontis*, las demás especies fúngicas presentaron alteraciones en su crecimiento y desarrollo. Se sugiere la utilización de *T. hamatum* como potencial agente de control biológico.

Palabras clave

Trichoderma hamatum, Metabolitos volátiles, Control biológico.

Study of the effect of volatile metabolites of *Trichoderma hamatum* on the growth of phytopathogenic soilborne fungi

Summary

Volatile compounds produced by *Trichoderma hamatum* were tested for their capacity to suppress *in vitro* the growth of *Alternaria citri*, *Bipolaris cynodontis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia brachyspora*, *Curvularia lunata*, *Curvularia oryzae-sativae*, *Drechslera tritici-repentis*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor* and *Sclerotium rolfsii*. The organisms were cultured in an apparatus made with two Erlenmeyer flasks assembled by their top parts. With the aid of the gas chromatographic technique the variation of carbon dioxide, oxygen and ethylene in the internal system was determined. Acetaldehyde and ethanol were not found. Due to the respiratory metabolism of *T. hamatum* the carbon dioxide level progressively increased while the oxygen content decreased. Ethylene production was low and after three days remained constant. Excepting *C. oryzae-sativae* and *B. cynodontis* the other species showed changes in the growth and development. These results suggest the inhibitory volatiles of *T. hamatum* as one possible mechanism of biological control.

Key words

Trichoderma hamatum, Volatile metabolites, Biological control.

El crecimiento de las especies fúngicas que habitan en el suelo, sólo se produce junto a los restos orgánicos o en la rizosfera de plantas vivas, donde los organismos encuentran los estímulos necesarios para interrumpir su estado de latencia [1]. Fuera de esas zonas y

aun en condiciones ambientales apropiadas, existen mecanismos fungistáticos que impiden el desarrollo de los hongos. Varios estudios indican el origen principalmente biótico de la fungistasis [2-5], así como la capacidad de muchos hongos para sintetizar sustancias volátiles involucradas en el complejo responsable de ese fenómeno [1,6-9]. Otras veces el efecto de dichos metabolitos es estimulante de la germinación y el crecimiento fúngicos [6,10,11], habiéndose mencionado además como causantes de diversas enfermedades en los vegetales [8,12,13].

Distintos autores identificaron entre esos componentes gaseosos al dióxido de carbono, etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentanol [10,14-20], los cuales en diferentes concentraciones intervinen en la regulación del mecanismo fungistático. Las

Dirección para correspondencia:

Dr. Gustavo Mariano Dal Bello
Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de la Plata, Calles 60 y 118, CC31, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.
Fax: (+54 21) 252346
E-mail: healippi@isis.unlp.edu.ar

Aceptado para publicación el 4 de marzo de 1996

especies de *Trichoderma*, ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y con marcadas propiedades antagonistas [6,18,21], poseen representantes caracterizados por su alta producción de sustancias gaseosas. Según Dennis y Webster [7] lo que permite diferenciar a estas últimas, es un pronunciado aroma a coco que se desprende del cultivo. Dentro del grupo anterior se encuentra *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain. aggr. [22,23], cuyos metabolitos volátiles y su acción sobre el comportamiento cultural de diez especies de hongos fitopatógenos, habitantes permanentes o temporarios del suelo, fueron estudiados en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas

Entre los hongos fitopatógenos utilizados en el ensayo, se incluyeron siete especies de la familia Dematiaceae y tres especies que forman esclerocios, para determinar cualquier influencia de los metabolitos volátiles de *T. hamatum* sobre la biosíntesis de melaninas. Las especies fúngicas seleccionadas fueron: *Alternaria citri* Ell. & Pierce, *Bipolaris cynodontis* (Marig.) Shoem., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. ex Sorok.) Shoem., *Curvularia Brachyspora* Boed., *Curvularia lunata* (Wakk.) Boed., *Curvularia oryzae-sativae* Sivan, *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotinia minor* Jagger y *Sclerotium rolfii* Sacc. La primera fue aislada de manchas necróticas foliares de *Citrus limon* y los tres últimos del suelo junto con *T. hamatum*; los restantes se obtuvieron de semillas de *Triticum* spp, siguiendo las técnicas fitopatológicas de rutina.

Potencial fungistático de los metabolitos volátiles de *T. hamatum*

Todos los microorganismos se cultivaron en cajas de Petri con 10 ml de agar de papa glucosado (PDA) al 2% por caja, permaneciendo en estufa a 25°C hasta que las colonias cubrieron el 50% del medio. Para medir el efecto biológico de las sustancias volátiles de *T. hamatum* sobre la evolución normal de los demás hongos, se empleó un aparato diseñado con ese propósito [24]. El

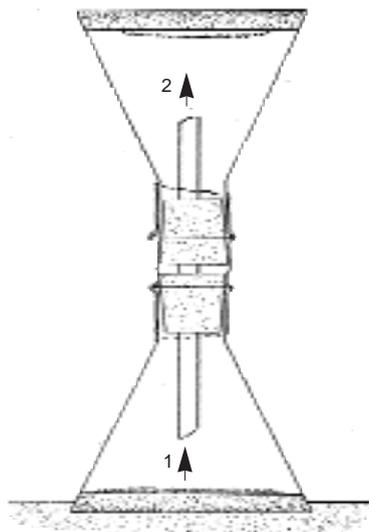


Figura 1. Aparato empleado para medir el efecto de las sustancias volátiles. 1: Producción de metabolitos volátiles; 2: Salida de gases.

mismo constaba de dos matraces Erlenmeyer de 250 ml, dos tapones horadados capaces de encajar en las bocas de ambos recipientes y un tubo de vidrio de 10-15 cm de longitud e igual diámetro que el de los orificios hechos en los tapones (figura 1). Los matraces se esterizaron por separado con 20 ml de PDA en cada uno de ellos, implantándoles en el centro del medio solidificado un disco de 5 mm de diámetro de *T. hamatum* o alguno de los patógenos, extraído con el sacabocados del cultivo correspondiente. El implante de *T. hamatum* se realizó 48 h antes que el de las otras especies, con el fin de asegurar que una adecuada concentración de metabolitos volátiles producidos en ese lapso, incidieran sobre el micelio superior. Seguidamente los frascos fueron conectados entre sí sellándose la zona de unión con Parafilm (American Can Company, USA) para impedir la fuga de los gases. Los controles se prepararon siguiendo la misma técnica, pero sin colocar a *T. hamatum* en el Erlenmeyer inferior. Cada uno de los tratamientos incluyó tres repeticiones, incubándose los cultivos en estufa a 25°C durante 10 días desde el armado del aparato. A los 3, 5 y 7 días se midieron los diámetros de las colonias de los fitopatógenos, expresándose los resultados en porcentajes de inhibición o estimulación. Asimismo se registró toda variación micelial en el color, aspecto y/o formación de estructuras reproductivas.

Análisis de los metabolitos volátiles

En forma complementaria y en los mismos periodos de tiempo, se determinaron algunos de los componentes de la atmósfera interna del matraz superior donde tenía lugar la acción antagonista. Para ello se recurrió a un equipo idéntico al descrito conteniendo sólo el cultivo de *T. hamatum* y provisto de muestreadores para gases. El análisis de los contenidos de dióxido de carbono, oxígeno, etileno, acetaldehído y etanol se realizó por cromatografía gaseosa empleando un cromatógrafo Shimadzu 6A (Japón). Para los dos primeros gases fueron utilizadas columnas de silica gel a 115°C y de tamiz molecular 5A a 0°C, conectadas en serie, hidrógeno como gas portador y un detector de conductividad térmica. El etileno, acetaldehído y etanol se detectaron con el mismo cromatógrafo y una columna de Poropack Q a 115°C. Se empleó nitrógeno como gas portador y un detector de ionización de llama. La longitud de las columnas fue de 150 cm con un diámetro externo de 3 mm y la temperatura del inyector alcanzó los 135°C.

RESULTADOS

Los porcentajes de inhibición o estimulación del crecimiento fúngico debidos a la actividad biológica de *T. hamatum*, se representan en la figura 2.

Pudo observarse que hubo cuatro patrones de comportamiento diferentes con respecto a la reacción de las especies fitopatógenas en contacto con los compuestos volátiles. *B. sorokiniana*, *B. cynodontis*, *C. oryzae-sativae*, *C. lunata* y *C. brachyspora* mostraron un incremento variable del porcentaje de inhibición en función del tiempo de exposición al antagonista. *B. sorokiniana* y *C. oryzae-sativae* fueron los más afectados. *D. tritici-repentis* y *S. rolfii* no obstante haber sido también inhibidos en su crecimiento presentaron un nivel cada vez menor de inhibición en el transcurso del ensayo. *R. solani* y *S. minor* no fueron afectados, mientras que *A. citri* fue la única especie cuyo desarrollo fue estimulado, especialmente después de tres días de iniciado el estudio. En la tabla 1 han sido descritos los niveles de dióxido de carbono y oxígeno hallados en la atmósfera interna del Erlenmeyer superior. Después de tres días de incubación a 20°C, el contenido

inicial de 0,03% de dióxido de carbono aumentó a 10,3% como resultado de la actividad respiratoria de *T. hamatum*. El contenido de dióxido de carbono continuó aumentando durante el resto de la experiencia, aunque mas lentamente.

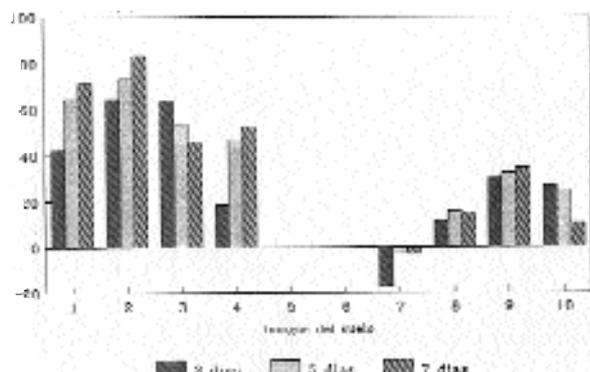


Figura 2. Porcentajes de inhibición o estimulación del crecimiento de los hongos fitopatógenos, causados por *Trichoderma hamatum*.
1: *Bipolaris sorokiniana*; 2: *Bipolaris cynodontis*; 3: *Drechslera tritici-repentis*;
4: *Curvularia oryzae-sativae*; 5: *Rhizoctonia solani*; 6: *Sclerotinia minor*; 7:
Alternaria tritici; 8: *Curvularia lunata*; 9: *Curvularia brachyspora*; 10:
Sclerotium rolfsii.

Los niveles de oxígeno disminuyeron en forma concordante. Otro gas cuya presencia se detectó fue el etileno. Los resultados obtenidos (tabla 1) indicaron que al cabo de tres días de incubación la producción de etileno pasó por su volumen máximo para después permanecer constante. Cabe aclarar que no hubo rastros detectables de acetaldehído y etanol.

Tabla 1. Evolución de la composición atmosférica dentro del equipo con el cultivo de *Trichoderma hamatum*.

Días	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	C ₂ H ₄ (ppm)
0	0,03	21,0	0,000
3	10,30	11,3	0,644
5	21,10	0,95	0,372
7	28,30	0,8	0,286

En relación a las características del micelio de los componentes volátiles de *T. hamatum*, se observaron distintos comportamientos culturales con respecto a los testigos. Mientras que las colonias de *C. oryzae-sativae* y *B. cynodontis* no presentaron variaciones en su aspecto y color, otras como *C. brachyspora* mostraron sólo una decoloración del micelio expuesto a los metabolitos o bien en el caso de *A. citri* y *R. solani* mantuvieron su color pero con un menor crecimiento micelial. Lo mismo ocurrió con *S. minor* y *S. rolfsii*, donde además no se formaron esclerocios ni aun a los veinte días.

En las restantes especies fúngicas inhibidas por los gases, se observaron desde colonias levemente decoloradas (*C. lunata*) a blancas (*B. sorokiniana* y *D. tritici-repentis*) con un crecimiento micelial menos denso y voluminoso.

DISCUSIÓN

La mayoría de los trabajos relacionados con el biocontrol de enfermedades de las plantas con *T. hamatum* involucran a hongos habitantes del suelo [25]. Entre ellos

se encuentran *B. sorokiniana*, *B. cynodontis*, *D. tritici-repentis*, *C. oryzae-sativae*, *C. lunata*, *C. brachyspora* y *S. rolfsii*, cuyo desarrollo micelial fue inhibido *in vitro* por los metabolitos volátiles que produjo el antagonista. Al analizar las atmósferas internas del dispositivo empleado en este ensayo, se determinó una alta concentración de dióxido de carbono y muy bajas de oxígeno y etileno. Estudios sobre la influencia del dióxido de carbono en el crecimiento y esporulación de distintas especies, demostraron que existe un efecto inhibitorio a concentraciones del gas superiores al 10% [8], nivel que fue superado por el metabolismo de *T. hamatum*. Ello explicaría las alteraciones del crecimiento de los fitopatógenos mencionados, si bien se conoce que hay una gran variación en la sensibilidad de las diferentes especies a dicho metabolito. En este sentido, se ha observado que algunos hongos son tolerantes e inclusive se ven estimulados al incubarlos en atmósferas con elevada concentración de dióxido de carbono [26], lo que podría haber ocurrido con *R. solani*, *S. minor* y *A. citri*.

Con respecto al etileno, éste posee una función fungistática sobre los microorganismos del suelo que se manifiesta según las características intrínsecas de cada ecosistema [27].

El resultado de las experiencias realizadas parece haber estado mas influenciado por los contenidos de dióxido de carbono que de etileno. Por otra parte se observaron modificaciones en el aspecto cultural de algunos de los hongos, como menor crecimiento micelial o interferencias en la biosíntesis de melaninas. Se ha comprobado que la melanización está directamente relacionada con el desarrollo de las colonias fúngicas y ciertos metabolitos volátiles pueden impedir la formación de estructuras reproductivas, esclerocios y conidios, reduciendo así la eficiencia patogénica de las mismas. Las melaninas también están asociadas a la protección del hongo a la luz UV, desecación, temperaturas extremas y a la resistencia al ataque de otros microorganismos. Esporas y micelio hialinos son rápidamente lisados en el suelo, mientras que células melanizadas pueden sobrevivir por varios años. Muchos antagonistas que causan lisis de las paredes fúngicas producen β 1,3-glucanasa y β 1,6-glucanasa, habiéndose demostrado que la capacidad lítica de esas enzimas depende del contenido de melaninas de la especie colonizada [28,29]. El efecto inhibitorio de los componentes volátiles de *T. hamatum* sobre el oscurecimiento de las hifas y/o la formación de esclerocios, debería disminuir el poder infectivo de algunos de los patógenos estudiados y sugiere su posible aplicación como mecanismo de biocontrol. Aunque de acuerdo con Hutchinson [20], es conveniente distinguir entre los metabolitos volátiles obtenidos en condiciones controladas de laboratorio y aquellos producidos a campo; los resultados *in vitro* sólo indican capacidades potenciales y la medida en que las mismas se expresarán dentro de cada ecosistema estará en función del balance entre la producción y la pérdida de los metabolitos, así como de la sensibilidad de los microorganismos involucrados.

Bibliografía

1. Hora TS, Baker R. Soil fungistasis: microflora producing a volatile inhibitor. *Trans Br Mycol Soc* 1972; 59:491-500.
2. Watson AG, Ford EJ. Soil fungistasis-A reappraisal. *Ann Rev Phytopathol* 1972; 10:327-348.
3. Alabouvette C. *Fusarium* wilt suppressive soils from the Chateaufrenard region: review of a 10-year study. *Agronomie* 1986;6: 273-284
4. Dutta BK, Ramarao P, Isaac Y. Evidence on the biological origin of soil fungistasis. *Z für Pfl und Pfl* 1982; 89:427-434.
5. Louvet J, Rouxel F, Alabouvette C. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. 1. Mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. *Ann Phytopathol* 1976; 8:425-436.
6. Camporota P. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie* 1985; 5:613-620.
7. Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans Br Mycol Soc* 1971; 11:223-246.
8. Hutchinson SA. Biological activities of volatile fungal metabolites. *Ann Rev Phytopathol* 1973; 11:223-246.
9. Smith AM. Ethylene in soil biology. *Ann Rev Phytopathol* 1976; 14:53-73.
10. Buston HW, Moss MO, Tyrell D. The influence of carbon dioxide on growth and sporulation of *Chaetomium globosum*. *Trans Br Mycol Soc* 1966; 49:387-396.
11. Page RM. Stimulation of sexual reproduction of *Pilobolus* by *Mucor plumbeus*. *Am J Bot* 1959; 46:579-585.
12. Hutchinson SA, Cowan ME. Identification and biological effects of volatile metabolites from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Trans Br Mycol Soc* 1972; 59:71-77.
13. Smith DL, Robinson PM. The effects of fungi on the morphogenesis of gametophytes of *Polypodium vulgare* L. *New Phytol* 1969; 68:113-122.
14. Dos Santos AF, Dhingra OD. Pathogenicity of *Trichoderma* spp on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* Can J Bot 1980; 60:472-475.
15. Elad Y, Chet I, Katan J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 1980; 70:119-121.
16. Elad Y, Hadar Y, Chet Y. The potential of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent under field conditions. En: Les antagonismes microbiens, 24eme colloque SFP, Bordeaux, INR, 1983:305-310.
17. Bashar MA, Rai B. Antagonistic potential of root region microflora of chickpea against *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceri*. *Bangladesh J Bot* 1994; 23:13-19.
18. Fries N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. *Trans Br Mycol Soc* 1973; 60:1-21.
19. Robinson PM, Garret MK. Identification of volatile sporostatic factors from cultures of *Fusarium oxysporum* *Trans Br Mycol Soc* 1969; 52:293-299.
20. Hutchinson SA. Biological activity of volatile fungal metabolites. *Trans Br Mycol Soc* 1971; 57:185-200.
21. Glen AT, Hutchinson SA. Some biological effects of volatile metabolites from cultures of *Saccharomyces cerevisiae* Meyer ex Hansen. *J Gen Microbiol* 1969; 55:19-27.
22. Kwok OCH, Fahy PC, Hoitink HA, Kuter GA. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 1987; 77:1206-1212.
23. Hoitink HA, Chung R. Interactions between *Trichoderma hamatum* and termophilic fungi in bark compost in suppression of *Rhizoctonia* damping-off. *Phytopathology* 1989; 79:1152.
24. Dal Bello GM. Técnica simple de bioensayo con metabolitos volátiles producidos por especies fúngicas. *Rev Fac Agronomía La Plata* 1992; 68:87-89.
25. Nelson ME, Powelson ML. Biological control of grey mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. *Plant Dis* 1988; 72:727-729.
26. Papavizas GC, Davey CB. Activity of *Rhizoctonia* in soil as affected by carbon dioxide. *Phytopathology* 1962; 52:759-766.
27. Lieberman M. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann Rev PI Physiol* 1979; 30:533-591.
28. Decal A, Melgarejo P. Effects of *Penicillium frequentans* and its antibiotics on anmelanized hyphae of *Monilinia laxa*. *Phytopathology* 1994; 84:1010-1014.
29. Bell A, Wheeler M. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann Rev Phytopathol* 1986; 24:411-451.