



Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Segunda parte: Biocontroladores fúngicos

CHÁVEZ, GEORGINA
MAMANI, MARISEL
ESPINAL, CRISTHIAN

TENORIO, REYNALDO
CRESPO, CARLA
ALVAREZ, MARÍA

CORRESPONDENCIA: GEORGINA CHÁVEZ LIZÁRRAGA
GEORGINACHA@GMAIL.COM

FECHA DE RECEPCIÓN: 16 DE ABRIL DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN 30 DE JULIO DE 2014

Resumen

Una de las características más interesantes de algunas cepas fúngicas es su acción antagonista que impide el crecimiento de otros microorganismos, la cual es particularmente importante en el control de patógenos. Los hongos son una de las plagas más difíciles de controlar, y la infección con éstos causa enormes pérdidas en los cultivos. En el Instituto de Investigaciones Fármaco y Bioquímicas se ha estudiado la capacidad biocontroladora de varias cepas fúngicas, siendo la más sobresaliente la cepa de *Trichoderma inhamatum* 12 QD. La producción de fermento de *Trichoderma inhamatum* fue optimizada y fue usado en el biocontrol de *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora infenstans* en cultivos de la papa, haba y tomate respectivamente.

Abstract

One of the most interesting characteristics of some fungi strains is their antagonist action which avoid the growth of other microorganisms, which is particularly important in the control of pathogens. Fungi plagues are one of the most difficult to control, and the infection whit them causes enormous looses in the cultivations. In the Institute of Biochemical and Pharmaceutical Research the biocontroller activity of several fungi strains have been studied, being *Trichoderma inhamatum* strain 12 QD one of the most outstanding. The production of ferment of *Trichoderma inhamatum* have been studied optimized and used in the biocontrol of *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* and *Phytophthora infenstans* in cultivations of potato, faba beans and tomato, respectively.

1 Área de Biotecnología Fúngica. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.

PALABRAS CLAVE

Biocontrol, *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD, fermento.

KEY WORDS

Biocontrol, *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD, ferment.

INTRODUCCIÓN

Nuestro país cuenta con una variedad de ámbitos geográficos que con sus diferentes climas permiten el cultivo de diversos granos, frutas y hortalizas. Estos cultivos son afectados por factores climáticos y por plagas de animales, insectos y microorganismos. Probablemente una de las plagas más difíciles de controlar son las enfermedades causadas por hongos. Las esporas de los hongos fitopatógenos pueden diseminarse con rapidez y facilidad afectando de esta manera cultivos vecinos, debido principalmente a que sus esporas pueden ser transportadas por insectos y/o el viento, afectando así diferentes órganos en la planta.

Un alto porcentaje de la producción agrícola es afectado por plagas fúngicas, teniéndose pérdidas económicas que suelen ser cuantiosas en algunos casos, estas pérdidas, sin duda alguna, tienen mayor impacto en los cultivos de los pequeños productores. Considerando que en nuestro país existen alrededor de 600.000 agricultores dedicados al cultivo de alimentos (BID, 2013) y que la agricultura familiar es la que produce la mayor parte de los alimentos de la canasta familiar, el problema de la contaminación fúngica es un problema que debe ser tratado como prioridad nacional.

Concedores de esta problemática en el Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas (IIFB) Luis Enrique Terrazas Siles a finales de los 90's se empezaron a estudiar tanto extractos vegetales (Figueroa, 1996; Mercado, 1997) como microorganismos para determinar su actividad antifúngica (Peña et al, 1998). Trás años de investigación se lograron aislar diferentes hongos con capacidad biocontroladora contra hongos patógenos de cultivos de importancia en Bolivia, siendo uno de los más representativos *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD. Los fermentos de esta cepa fueron utilizados exitosamente en el control de patógenos fúngicos de cultivos de papa y haba en la zona del Altiplano. En la actualidad en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del IIFB y en el Instituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN) se continúan realizan estudios del fermento de la cepa 12 QD, los mismos se centran en la identificación de metabolitos secundarios del fermento y en las enzimas presentes en el mismo; por otro lado se continúan los estudios de su acción en biocontroladora en otros cultivos como su acción contra fitopatógenos de la quinua y mango.

FITOPATÓGENOS FRECUENTES EN CULTIVOS BOLIVIANOS

El paso inicial en el desarrollo de biocontroladores fúngicos es el conocimiento de los patógenos fúngicos, para lo cual es necesario el aislamiento y la identificación macro y microscópica de los microorganismos causantes de enfermedades en los diferentes cultivos. Esto generalmente se hace colocando una porción de la planta dañada previamente lavada con alcohol y agua en placas agar papa dextrosa (PDA), posteriormente se somete a incubación entre 25-30°C, después de un tiempo, lo más probable es que crezcan un número de hongos, por lo cual se requiere hacer repiques hasta obtener cepas puras. Posteriormente se describen las características macroscópicas del hongo. Luego las cepas son teñidas con colorantes e identificadas al microscopio. Es importante identificar que cepas fúngicas son saprofitas y cuales patógenas para lo cual, una vez aislado e identificado el patógeno sospechoso, es importante también la comprobación de los postulados de Koch para verificar que el microorganismos aislado es el causante de la enfermedad en la planta.

El IIFB ha realizado en el transcurso de los años varios viajes de colecta a diferentes áreas de nuestro país, con el fin de conocer que áreas se encuentran más susceptibles al ataque de hongos. Estos viajes han permitido no solo coleccionar, sino aislar e identificar una variedad de fitopatógenos. Los hongos fitopatógenos encontrados en los diferentes viajes se encuentran detallados en la Tabla 1.

Tabla 1
Fitopatógenos fúngicos aislados e identificados en el IIFB

Cultivo	Hongo fitopatógeno	Referencia
Papa	Phytophthora infestans	Pelaez y Giménez 2001
Haba	Botrytis fabae, Botrytis cinerea, Alternaria solani, Uromyces sp.	Espinal et al, 2010; Espinal, 2009; Astorga et al, 2005; Astorga, 2005; Ciancas, 2006; Ciancas et al., 2005; Quiroga et al, 2003; Quiroga 2002; Pelaez y Giménez 2001
Maiz	Aspergillus sp.	Quiroga, 2002
Rábano	Cercospora	Pelaez y Giménez 2001
Garbanzo	Acochita rabie	Pelaez y Giménez 2001
Col	Alternaria sp.	Pelaez y Giménez 2001
Lechuga	Alternaria sp.	Pelaez y Giménez 2001
Huacataya	Puccinia	Pelaez y Giménez 2001
Limón	Fusarium sp.	Pelaez y Giménez 2001
Banano	Mycosphaerella	Pelaez y Giménez 2001
Quinua	Peronospora farinosa, Phoma sp., Phoma exigua var fobeata, Achomycota hyalapospor	Tenorio et al., 2010
Tuna	Cercospora sp., Phytophthora sp.	Tenorio et al., 2010
Tomate	Phytophthora infestans	Puño et al., 2011
Mango	Colletotrichum sp.	Mamani et al, 2014 (datos no publicados)

BÚSQUEDA DE CEPAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA

¿Cómo sabemos si una cepa tiene actividad biocontroladora? Pues al igual que para encontrar el fitopatógeno el primer paso es el aislamiento de la cepa, puesto que sólo con cepas puras podemos proceder a los enfrentamientos duales. Este método consiste en sembrar ambos el antagonista y el fitopatógeno en cajas petri con PDA, una vez crecidos los hongos, en una nueva caja petri con PDA se coloca un disco micelial del posible biocontrolador y en el otro extremo un disco micelial del patógeno, se incuba a condiciones predefinidas y se va evaluando la inhibición de crecimiento del fitopatógeno en función del tiempo. Este enfrentamiento hongo vs hongo tiene sin embargo sus desventajas, por ejemplo hay que estar seguros que ambos hongos crezcan a condiciones similares, y en la práctica se ha visto que a veces este es un factor muy difícil de controlar, por lo que una estrategia mucho más cierta consiste en el uso de fermentos producidos por el hongo biocontrolador.

PRODUCCIÓN DE FERMENTOS DE *TRICHODERMA INHAMATUM*

El género *Trichoderma* fue identificado en 1871, es un hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en suelos agrícolas y otros tipos de medios. Las especies de *Trichoderma* son conocidas por su capacidad de inhibir diferentes patógenos de plantas mediante la producción de metabolitos secundarios como antibióticos (Sivasithamparam & Ghisaberti, 1998) y enzimas degradadoras de la pared como quitinasas (Benhamou et al, 1994), β 1-3 glucanasas (Lorito et al., 1994), celulasas (Kovacs et al, 2009; de Castro et al, 2010), proteasas (Haran et al, 1996) y otras hidrolasas (Prasad et al, 2002).

En la actualidad existen varios fungicidas de origen biológico como el Trichobiot, el Tricobio y el Tricodamp (www.senasag.gob.bo) que se comercializan en nuestro país, que son concentrados de esporas de *Trichoderma*. No obstante, el enfoque del IIFB desde el principio fue el usar los fermentos del hongo, y no el microrganismo per se. Los diferentes tamizajes para la acción biocontroladora de hongos del cepario del IIFB dieron como resultado que la cepa 12 QD tenía una fuerte actividad biocontroladora en los enfrentamientos duales. Esta cepa fue caracterizada micro y macroscópicamente y finalmente se confirmó su género y especie con técnicas de biología molecular, identificándola como *Trichoderma inhamatum*.

Los primeros indicios de que la cepa de *Trichoderma inhamatum* 12 QD presentaba una interesante actividad biocontroladora se reportaron por la inhibición de crecimiento de fitopatógenos de la papa y el haba como *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* (Astorga, 2005). Un trabajo un poco más profundo determinó que el porcentaje de inhibición en enfrentamientos de *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD contra *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* alcanzaba el 61% y 80% respectivamente (Ciancas 2006). Los fermentos de *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD, mostraron ser efectivos también en la

inhibición de crecimiento de *Phytophthora infestans* un fitopatógeno de importancia en los cultivos de tomate, lográndose una inhibición del 81 % cuando se usaba una dilución de 1/8 del fermento (Puño et al, 2011).

Para la producción de un fermento es imprescindible que se optimicen las condiciones físicas químicas y biológicas para que se pueda maximizar la producción de metabolitos secundarios (Apaza, 2008). Estos factores incluyen: temperatura, aeración, variaciones de la fuente de carbono y nitrógeno, tamaño de inóculo inicial, uso de filtros e inductores, entre otros. Una vez optimizados los parámetros físicos, químicos y biológicos en cultivos en frascos erlenmeyer, es entonces posible el escalado a biorreactores de mayor capacidad (Figura 1). Con condiciones optimizadas para la producción de metabolitos secundarios se procedió a la producción de fermentos en un volumen de 20 Litros, los mismos serían empelados en una dilución 1/3 para el control efectivo de *Botrytis fabae* en cultivos de haba de la localidad de Chua en el departamento de La Paz (Espinal et al, 2010; Espinal, 2009).

Una característica sobresaliente de *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD es que ha demostrado ser útil en el control de larvas de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Vallejos, 2011). No obstante en esta investigación se usaron las esporas y no el fermento.

En la actualidad el área de Biotecnología Fúngica del IIFB está trabajando en conjunto con el IIPN en la identificación de los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma inhamatum* cepa 12 Q y se está optimizando la producción de quitinasas de este interesante microorganismo (datos no publicados).

Figura 1

Producción de fermentos de *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del IIFB.



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como se puede evidenciar en el presente minireview se han logrado grandes avances en el biocontrol con la identificación fitopatógenos que afectan cultivos nacionales, pero queda pendiente la realización de nuevos tamizajes de los hongos del cepario en los que se podrían encontrar microorganismos igual o aún más eficaces que *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD. Es necesario realizar más viajes de colecta que permitan la identificación de otros fitopatógenos causantes de enfermedades emergentes en las distintas áreas de nuestro país y el fermento de *Trichoderma inhamatum* cepa 12 QD debe ser probado en ellos no sólo a nivel laboratorio sino a nivel campo. Aún se debe pensar en el escalado del sistema ya que para grandes cultivos un fermento de 20 Litros resultará insuficiente, a su vez se debe establecer, con ayuda de expertos en Agronomía y/o Biología, el tiempo exacto en el que se debería aplicar el fermento para obtener el máximo beneficio. Se deben hacer estudios toxicológicos del fermento a fin de garantizar su inocuidad para el humano, la planta y el medio ambiente en general. Finalmente es necesario considerar la formulación del producto que permita su acceso a bajo precio a las comunidades campesinas de nuestro país y ese debe ser el motor que nos impulse especialmente este 2014 que se ha declarado año de la Agricultura Familiar.

Agradecimientos

Este minireview está dedicado a los pasados y presentes miembros del IIFB que trabajaron y trabajan actualmente en el área biocontrol por su valiosa contribución en el desarrollo de fungicidas biológicos.

Referencias

- Apaza, L. (2006) Optimización de parámetros físicos, químicos y biológicos del cultivo de *Trichoderma Inhamatum* BOL 12 QD para una mejor producción de compuestos biológicamente activos contra *Botrytis cinerea*. Tesis de maestría. UMSA. Bolivia.
- Astorga, P. (2005) Estudio de posibles biocontroladores de fitopatogenos de haba (*Vicia faba*) y de papa (*Solanum tuberosum*) Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.
- Astorga, P., Alvarez, M., Mattiasson, B y Giménez, A. (2005) Estudio de posibles biocontroladores de fitopatogenos de haba (*Vicia faba*) y de papa (*Solanum tuberosum*). Biofarbo 13:61-68
- Banco Interamericano de Desarrollo. www.iadb.org. Visitado el 7 de Octubre de 2013.
- Benhamou, N., Rey, P., Picard, K. y Trilly, Y. (1999) Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 89 (6): 506-517.
- Cavero, H. (2003) Inhibición de fitopatógenos por microorganismos fúngicos del cepario del IIFB. Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.
- Ciancas, J. (2006) Efecto biocontrolador de la cepa *Trichoderma Inhamatum* BOL 12 QD-1 sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea* causante de la mancha de chocolate en cultivos de haba de la comunidad de Chirapaca. Tesis de maestría. UMSA. Bolivia.
- Ciancas, J., Alvarez, T., Mattiasson, B. y Giménez, A. (2005) Hongos saprofitos con actividad biológica frente a los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria Solani*. Biofarbo 13: 87-93.
- De Castro, A.M., Ferreira, M.C., Da Cruz, J.C., Pedro, K.C.N.R., Carvalho, D.F., Leite, S.G.F., Pereira, Jr. N. (2010) High yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Res.* 1 (1): 1-8
- Espinal C., Huanca M., Terrazas, E., Giménez, A. (2010) Evaluación de la actividad bio-

- controladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 QD, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha de chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*). Biofarbo 18:13-30
- Espinal C. (2009) Evaluación de la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 QD, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha de chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*). Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.
- Figuerola, N. (1996) Evaluación antibacteriana, antifúngica, insecticida y caracterización química de los aceites vegetales extraídos de especies vegetales aromáticas con valor comercial. Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.
- Haran, S., Schickler, H. Chet, I. (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142 (9): 2321-2331.
- Kovács, K., Szakács, G., Zacchi, G. (2009) Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes. Process Biochem. 44(12): 1323-1329.
- Lorito M., Peterbauer, C., Hayes C.K., Harman, G.E. (1994) Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different compounds enhances inhibitions of spore germination. Microbiology 140 (3): 623-629.
- Mercado, M. (1997) Investigación e identificación de especies vegetales con actividad antifúngica. Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.
- Pelaez, D. y Giménez, A. (2001) Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos que afectan algunos cultivos de importancia económica en Bolivia. Biofarbo, 9:21-26
- Peña, C., Shamun, V., Lucana, C., Miranda, M. y Giménez, A. (1998) Aislamiento y perfil biológico de especies fúngicas de tierra. Biofarbo 6:17-23.
- Prasad, R.D., Rangeshwaran, R., Hegde, S.V., Anurup, C.P. (2002) Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. Crop Prot. 21 (4): 293-297.
- Puño, R., Terrazas, E., Alvarez, T., Giménez, A., Mendoza, L., Smeltekop, H., Loza-Murguía, M. (2011) Evaluación de la capacidad biocontroladora de metabólicos de *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD sobre cepas nativas de Phytophthora infestans *in vitro*. Journal of the Selva Andina Research Society 2: 26-33
- Quiroga, C., Pelaez, D., Giménez, A. (2003) Aislamiento e identificación de Hongos Fitopatógenos que afectan a cultivos de Haba (*Vicia faba*) en la región de Taraco y Maíz (*Zea mays*) en el valle de Cochabamba. Biofarbo 11: 9-13.
- Mercado, M. Investigación e identificación de especies vegetales con actividad antifúngica. Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia 1997
- Quiroga, C. (2002) Búsqueda de hongos como potenciales biocontroladores de fitopatógenos que afectan a cultivos de haba (*Vicia faba*) y maíz (*Zea mays*) en el manejo integrado de plagas. Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.
- SENASAG. www.senasag.gob.bo. Visitado el 10 de Abril de 2014.
- Sivasithamparam, K. y Ghisaberti, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*, Volumen I. C.C.P. Kubicek, G.E. Harman eds. Londres: Ediciones Taylor and Francis, pp. 300.
- Tenorio, R. (2011) Aislamiento, identificación y ensayos de control biológico *in vitro* de fitopatógenos de la quinua (*Chenopodium quinua*), la tuna (*Opuntia picus-Indica*) y la castaña (*Castanea sativa* Miller). Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.
- Vallejos. J. (2011) Determinación de la actividad larvicida e insecticida de *Bacillus* sp., *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL 12QD) y *Beauveria bassiana* (cepa BOL 2-QC) frente a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster* cepa ORR), realizado en el IIFB-FCFB. Tesina de licenciatura. UMSA. Bolivia.