

Actividad antagonista de *Gliocladium sp.* contra *Sclerotium cepivorum*

Antagonist activity of *Gliocladium sp.* against *Sclerotium cepivorum*

Humberto Castillo¹, Randall Rojas², Manuel Villalta³

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015
Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Castillo, H; Rojas, R; Villalta, M. Actividad antagonista de *Gliocladium sp.* contra *Sclerotium cepivorum*. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 57-64.

-
- 1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: humber198@hotmail.com, tel. 89483795.
 - 2 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: randallrojas16@gmail.com, tel. 84328050.
 - 3 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: mvilla024@gmail.com, tel. 88605074.

Palabras clave

Aislamiento; biocontrolador; inhibición del crecimiento radial; metabolitos secundarios.

Resumen

Algunos géneros fúngicos han sido utilizados para el control de agentes causantes de enfermedades en plantas, por lo que su actividad representa una alternativa para la disminución e incluso la sustitución de químicos sintéticos. Existen hongos antagonistas ampliamente estudiados, como *Trichoderma* sp., que concurre con otros hongos que poseen un alto potencial como agentes biocontroladores, entre ellos se destaca *Gliocladium* sp. En este estudio se pretende establecer la capacidad antagonista que tiene *Gliocladium* contra el patógeno causante de la pudrición blanca de la cebolla, *Sclerotium cepivorum*. Se logró aislar *Gliocladium* sp. a partir de una muestra de suelo dedicada al cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.), se subcultivó hasta obtener un cultivo axénico y se realizaron cultivos duales en placas con el hongo y el patógeno. Se determinó que el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) promedio obtenido a los ocho días de exposición (53,66%) no presentaba diferencias significativas ($p=0,19$) con el obtenido a los 15 días (54,20%) y, dadas las características de inhibición, se presume que el mecanismo de control presentado por la cepa de *Gliocladium* sp. utilizada responde a la producción de enzimas, metabolitos y posiblemente una mezcla de compuestos orgánicos volátiles capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de *S. cepivorum* aun sin que sus hifas entren en contacto.

Keywords

Isolation; biocontrol; inhibition of radial growth; secondary metabolites.

Abstract

Some fungal genus have been used in controlling disease-causing agents in plants, so their activity represents an alternative to reduce and even replace some synthetic chemicals. There are many studies about antagonistic Fungi, such as *Trichoderma spp.*, which concurs with other Fungi that have high potential as biocontrol agents, like the genus *Gliocladium*. In this study, it is intended to establish the antagonistic ability of this one against the pathogen causing white rot in onions *Sclerotium cepivorum*. It was possible to isolate *Gliocladium sp.* from a soil sample, which was subcultured until obtain an axenic culture and then, dual cultures were performed on plates with the fungus and the pathogen. The average IPRG obtained at 8 days of exposure (53.66%) showed no significant difference ($p= 0,19$) to the one obtained at 15 days (54.20%). It was presumed that the control mechanism presented by the strain of *Gliocladium sp.* used, responds to the production of enzymes, metabolites and possibly a mixture of volatile organic compounds capable of inhibit the growth and development of *Sclerotium* even if their hyphae don't come into contact.

Introducción

En Costa Rica, tanto la cebolla (*Allium cepa* L.) como el ajo (*Allium sativum*) son hortalizas de importancia económica. Para el año 2013 la producción de cebolla alcanzó 1247 ha, siendo la provincia de Cartago la principal zona productora, con 1100 ha (SEPSA, 2013). A su vez, el ajo tiene una alta demanda en el país, sin embargo, su producción se ve afectada por los bajos

rendimientos y la importación del producto. Se estima que la zona de Llano Grande de Cartago concentra dicha actividad, con 3 ha sembradas (Brenes & Guillén, 2014).

El hongo patógeno *Sclerotium cepivorum* es un habitante del suelo presente en clima templado y subtropical (Sarmiento & Monsalve, 2013). Se caracteriza por infectar las plantas del género *Allium* y ocasionar la enfermedad conocida como podredumbre blanca de la cebolla, generando con ello pérdidas importantes en los cultivos (Ouf et al., 2008). Este hongo tiene la capacidad de desarrollar esclerocios secundarios dentro de los esclerocios originales, generando una gran capacidad de resistencia en el suelo que puede prolongarse hasta por 20 años y que dificulta su control (Rojas et al., 2010; Astorga-Quirós et al., 2014b). El hongo invade las raíces y bulbos en forma de moho blanco y sedoso para luego formar los esclerocios. Los compuestos de azufre en los exudados favorecen la germinación de los esclerocios, ocasionando la podredumbre de la planta joven; si la planta está en estado tardío inicialmente no presenta síntomas pero sí durante su almacenamiento (Astorga-Quirós et al., 2014b).

Una de las estrategias de combate contra *S. cepivorum* es el uso de fungicidas, sin embargo, es una técnica poco práctica y con un considerable impacto ambiental, por lo que se han implementado otros métodos como el biocontrol (Jiménez et al., 2013). A pesar de la resistencia de los esclerocios, diversos estudios han demostrado su susceptibilidad frente a otros microorganismos (Sarmiento & Monsalve, 2013); por ejemplo, la acción antagonista in vitro de *Trichoderma* sp. contra *S. cepivorum* ha sido evaluada por varios autores (Shalaby et al., 2013; Sarmiento & Monsalve, 2013; Astorga-Quirós et al., 2014a).

Los hongos biocontroladores utilizan diversos mecanismos, tales como las enzimas quitinolíticas, antibióticos que inhiben el crecimiento de otros hongos. También se caracterizan por competir por nutrientes y evitar que su tejido huésped sea colonizado por patógenos, mientras que muchos inducen resistencia en las plantas (Narayanasamy, 2013).

Gliocladium sp. es un género perteneciente al filo Ascomycota, del que se han descrito al menos 32 especies (Roskov et al., 2015). Su potencial como biocontrolador se ha evidenciado frente a *Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Slerotinia*. El principal método de acción observado en *Gliocladium* es el enrollamiento de sus hifas alrededor de las del patógeno (Helyer et al., 2014).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad antagonista in vitro del hongo biocontrolador *Gliocladium* sp., aislado a partir de suelo dedicado al cultivo de cebolla, sobre el hongo patógeno *S. cepivorum* a través del análisis del índice de inhibición radial.

Metodología

Aislamiento del biocontrolador

Gliocladium sp. se aisló a partir de una muestra de tierra proveniente de cultivos de cebolla de la provincia de Cartago, Costa Rica. Para el aislamiento se tomó como base la metodología y el medio de cultivo descrito por Vargas et al. (2009). La metodología empleada se detalla a continuación:

- Se tomaron 10 g de suelo y se disolvieron en 90 ml de agua destilada (10^{-1}), procurando realizar la mayor homogenización posible. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Para cada dilución realizada, se inoculó 1 ml en placas de Petri con agar Rosa de Bengala (0,3 g/l cloranfenicol; 0,1 g/l estreptomycin; pH 6). Las placas se dejaron incubando a temperatura ambiente (24-25 °C) durante ocho días. Para el aislamiento únicamente se emplearon las placas que presentaban colonias separadas y bien definidas.

- Se identificaron las colonias de hongos que por su apariencia y características (color y crecimiento de los micelios, entre otras) tenían probabilidades de ser de *Gliocladium* sp. y se subcultivaron en placas de Petri con PDA acidificado. Una vez que las colonias subcultivadas crecieron, se identificaron bajo el microscopio las que, por sus características morfológicas, efectivamente eran *Gliocladium* sp. y se procedió a subcultivarlas nuevamente en PDA acidificado.

Pruebas in vitro de la capacidad biocontroladora de *Gliocladium* sp. para *S. cepivorum*

La capacidad biocontroladora de la cepa de *Gliocladium* sp. aislada se probó de forma in vitro mediante pruebas de inhibición de crecimiento radial en cultivos duales, tomando como base la metodología propuesta por Agarwal et al. (2011). En placas de Petri (8,5 cm de diámetro) con PDA acidificado se procedió a sembrar en un extremo un disco (7 mm de diámetro) del micelio activo del biocontrolador. En las mismas placas se colocó en el otro extremo un disco del mismo tamaño con el micelio activo del patógeno. Se dejaron incubando a temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C. En total se cultivaron 16 placas, sin contar los controles. Los controles únicamente contenían, en un extremo, un disco con el micelio activo, ya fuera del patógeno o del hongo con la supuesta actividad antagonista. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) se calculó con base en mediciones a los 8 y a los 15 días para las 16 placas con el fin de determinar, aparte de la capacidad biocontroladora de *Gliocladium*, si esta aumentaba o disminuía según el tiempo que estuvieran expuestos los dos hongos. El PICR se calculó con la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{100 * r1 - r2}{r1}$$

r1= diámetro de colonia control de *S. cepivorum*

r2= diámetro de colonia de *cepivorum* en cultivo dual con *Gliocladium*.

Resultados

Aislamiento de *Gliocladium* sp.

Se logró obtener un cultivo puro de *Gliocladium* sp. después de varios subcultivos, a partir del aislamiento, utilizando una muestra de suelo dedicada al cultivo de cebolla (figura 1).

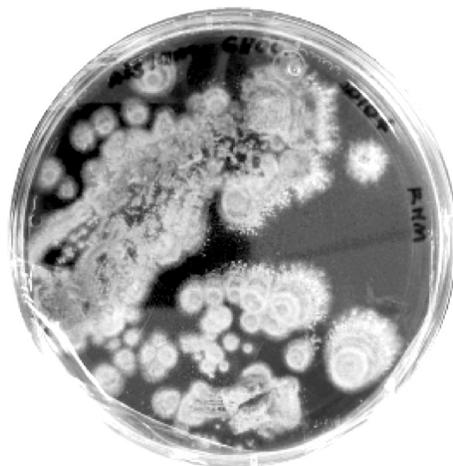


Figura 1. Cultivo axénico en PDA acidificado obtenido del *Gliocladium* sp. aislado.

Como se observa en la Figura 1, la especie de *Gliocladium* sp. que se logró aislar presenta la particularidad de que libera compuestos que tiñen el medio de cultivo (PDA) de un color rojizo. Las colonias se caracterizan por ser de color amarillo con zonas rojizas, pero estas características cambian con la edad del cultivo.

Para la identificación se examinaron sus estructuras en el microscopio. En la Figura 2 se observa el conidióforo de *Gliocladium* sp.

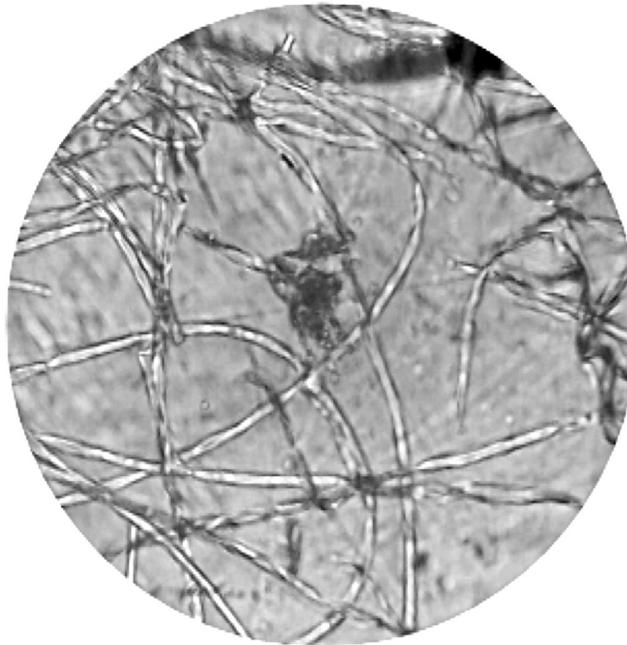


Figura 2. Características morfológicas del conidióforo que presenta la cepa aislada de *Gliocladium* sp. (40X).

Se observa que el conidióforo presenta fiálides ramificadas con conidios esféricos en sus puntas y aglomerados.

Pruebas in vitro de la capacidad biocontroladora de *Gliocladium* sp. para *S. cepivorum*

El PICR promedio de *S. cepivorum* calculado a los 8 días fue de 53,66%, mientras que a los 15 días fue de 54,20%.

Con el fin de determinar si hubo diferencia significativa o no entre los PICR calculados para los 8 y los 15 días, se realizó un análisis estadístico. Al emplearse la prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificada se determinó que los datos obtenidos no presentaban un comportamiento normal ($n= 32$, $w^*= 0.90$ y $p= 0.01$), por lo que se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para analizarlos, obteniéndose: $H= 1.64$ y $p= 0.19$. Estos resultados indican que no existe diferencia significativa entre los PICR calculados, es decir, el tiempo de exposición, ya sea 8 o 15 días, no ejerce un efecto directo sobre la inhibición del crecimiento del patógeno por parte de *Gliocladium*.

Cabe destacar que, según lo observado en las pruebas de antagonismo, la inhibición del crecimiento del patógeno se debió principalmente a la liberación de metabolitos al medio por parte del biocontrolador, presencia que se evidencia debido a que tiñeron el medio PDA de un tono rojizo (figura 3).



Figura 3. Pruebas de inhibición del crecimiento radial de *S. cepivorum* empleando *Gliocladium* sp. como agente biocontrolador.

Discusión

Narayanasamy (2013) indica que se han buscado métodos eficientes de aislamiento de *Gliocladium* sp., debido a los múltiples beneficios de este hongo como agente biocontrolador de hongos fitopatógenos. Este autor establece que el medio de aislamiento más eficiente fue el empleado en esta investigación, que consiste en el medio Agar Papa Dextrosa modificado con Rosa Bengala, cloranfenicol y sulfato de estreptomina. Sin embargo, de acuerdo con Young et al. (2010), al no ser este medio selectivo para *Gliocladium* sp., se debe proceder a una identificación visual basada en características morfológicas distintivas de *Gliocladium* sp., tal como se realizó en su aislamiento.

Menciona Walsh (2010) que una de las características microscópicas de *Gliocladium* sp. es la presencia de conidióforos y fiálides semejantes a las de *Penicillium*; estos conidióforos son erectos y poseen ramificaciones en la parte superior. Kim et al. (2010) destacan que sus fiálides son ramificadas y al final de ellas se encuentran los conidios con morfología esférica y en grupos, formando una bola. Estas características descritas por dichos autores concuerdan con lo observado bajo el microscopio de *Gliocladium* sp. aislado (figura 2). Las colonias obtenidas del aislamiento son amarillas, lo que concuerda con las características de *Gliocladium roseum* sp., mencionadas por Rojas (2004), cuyas colonias pueden ser blancas, amarillas o rojizas (figura 1).

En cuanto a los resultados sobre el potencial antagonista de *Gliocladium* sp. sobre *S. cepivorum*, se observa que después de exponer al antagonista contra el patógeno durante 8 o 15 días, el biocontrolador fue capaz de inhibir el crecimiento del segundo en más de la mitad de lo que este crece normalmente cuando está en un cultivo solo.

Un agente de biocontrol puede actuar contra los agentes patógenos mediante el uso de uno o más de los siguientes mecanismos: competencia, antibiosis y parasitismo, o mediante la activación de los mecanismos de defensa de la planta hospedera (Narayanasamy, 2013). En este caso específico, el crecimiento de *Gliocladium* no es agresivo, por lo que se infiere que su

potencial antagonista contra el agente causal de la pudrición blanca de la cebolla no se basó en colonizarlo, sino en producir una serie de enzimas y metabolitos secundarios con capacidad antifúngica (figura 3). Con el fin de prevenir que el espacio y los nutrientes fueran colonizados por el patógeno, el antagonista pudo haber aumentado la producción de enzimas quitinolíticas o antibióticos, entre otras sustancias, que inhibieran su crecimiento y desarrollo.

Ya se ha reportado que, aparte de producir quitinasas, este hongo también produce metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, y que incluso sus hifas pueden matar el hongo por actividad enzimática sin penetración (Saputra et al., 2013). El principal compuesto volátil producido por *Gliocladium* sp. es el 1,3,5,7-ciclo-octatetraeno, que es un efectivo inhibidor del crecimiento fúngico (Liouane et al., 2010). En 2003, Stinson et al. encontraron que el hongo producía una mezcla de compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés) que resultaban letales para ciertos patógenos o que al menos tenían capacidad para inhibir y detener su crecimiento. Estas características hacen de *Gliocladium* un organismo con alto potencial para su utilización en prácticas agrícolas sostenibles para evitar o sustituir los químicos de origen sintético en el control de algunas enfermedades.

Las especies de *Gliocladium* y *Trichoderma* son agentes biocontroladores muy conocidos, a los que se les ha atribuido esta cualidad por su poderosa capacidad de producir un amplio rango de antibióticos (Merillón & Gopal, 2012). Incluso, existen dos especies de *Gliocladium* (*catenulatum* y *virens*) a partir de las cuales se han registrado biofungicidas comerciales (Saputra et al., 2013) que se usan en un amplio rango de situaciones, incluyendo la prevención o el control de enfermedades fúngicas en plantas (Helyer et al., 2014).

Conclusiones

En esta investigación se aisló el hongo biocontrolador *Gliocladium* sp. a partir de muestras de suelo dedicadas al cultivo de cebolla, y se determinó que este microorganismo es capaz de inhibir hasta en más del 50% el crecimiento normal del agente causal de la pudrición blanca en ajo y cebolla (*S. cepivorum*). No se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición de crecimiento radial obtenido a partir de mediciones realizadas a los 8 y 15 días de cultivo dual y de acuerdo con las características del halo de inhibición, se presume que el mecanismo de control presentado por la cepa de *Gliocladium* sp. aislada es la liberación de enzimas, metabolitos y/o posiblemente una mezcla de compuestos orgánicos volátiles al medio, con capacidad para inhibir el crecimiento y desarrollo del patógeno, incluso sin necesidad de que sus hifas entren en contacto, sin embargo, se requieren mayores estudios para su comprobación.

Bibliografía

- Agarwal, T., Malhotra, A., Trivedi, P.C. & Biyani, M. (2011). Biocontrol potential of *Gliocladium virens* against fungal pathogens isolated from chickpea, lentil and black gram seeds. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1833-1839.
- Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. & Rivera-Méndez, W. (2014a). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82-91.
- Astorga-Quirós, K., Zúñiga-Vega, C. & Rivera-Méndez, W. (2014b). Aislamiento e identificación de patógenos de la estirpe silvestre del ajo (*Allium sativum* L.). *Tecnología en Marcha*, 27(1), 77-84.
- Brenes-Madriz, J. & Guillén-Watson, A. (2014). Establecimiento de un protocolo *in vitro* para el cultivo del ajo (*Allium sativum*) en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 27(4), 49-57.

- Demirci, E., Dane, E. & Eken, C. (2011). In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Biology*, 35, 457-462
- Helyer, N., Cattlin, N.D. & Brown, K.C. (2014). *Biological Control in Plant Protection: A Colour Handbook*. EE.UU.: CRC Press.
- Jiménez, M.A., Asdrúbal, A., Ulacio, D. & Hernández, A. (2012). Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones de campo. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 3(1), 14-25.
- Kim, J.Y., Yun, Y.H., Hyun, M.W., Kim, M.H. & Kim, S.H. (2010). Identification and characterization of *Gliocladium viride* isolated from mushroom fly infested oak log beds used for shiitake cultivation. *Mycobiology*, 38(1), 7-12.
- Liouane, K., Saïdana, D., Edziri, H., Ammar, S., Chriaa, J., Mahjoub, M., Said, K. & Mighri, Z. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of extracts from *Gliocladium* sp. growing wild in Tunisia. *Medicinal Chemistry Research*, 19(8), 743-756.
- Merillón, J.M. & Gopal, K. (2012). *Plant Defense: Biological Control*. Londres, Springer Science & Business Media.
- Narayanasamy, P. (2013). *Biological Management of Diseases of Crops: Vol.1: Characteristics of Biological Control Agents*. India: Springer Science & Business Media.
- Ouf, S.A., Ali, M.I. & Ibrahim, A.E. (2008). In Vitro Evaluation of the Biocontrol Activity of Some Biofungicides on *Sclerotium cepivorum*. *Int. J. Agricultural Biology*, 10, 241-248.
- Rojas, L. (2004). *Hongos alcalino-tolerantes como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico*. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2189/Documento_completo.PDF?sequence=1
- Rojas, V., Ulacio, D., Jiménez, M.A., Perdomo, W. & Pardo, A. (2010). Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk. y la pudrición blanca en ajo. *Bioagro*, 22(3), 185-192.
- Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Kunze, T., Culham, A., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., DeWalt, R.E., Decoc, K.W. & De Wever, A. (Eds.) (2015). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 21st April 2015*. Obtenido de www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, Holanda.
- Saputra, H., Pusputa, F. & Tjandrawati, T. (2013). Production of an antibacterial compound against the plant pathogen *Erwinia carotovora* subs. *carotovora* by the biocontrol strain *Gliocladium* sp. T.N.C73. *Journal of Agricultural Technology*, 9(5), 1157-1165.
- Sarmiento, G.A. & Velandía-Monsalve, J. (2013). Evaluación de hongos y bacterias aislados de gallinaza en el biocontrol de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Ciencia y Agricultura*, 10(2), 37-43.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). (2013). *Boletín Estadístico Agropecuario N°24, Serie cronológica 2010-2013*. San José: MAG. Obtenido de <http://www.infoagro.go.cr/BEA/BEA24.pdf>
- Shalaby, M.E., Ghoniem, K.E. & El-Diehi, M.A. (2013). Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1579-1589.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, E., Sears, J. & Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165, 913-922.
- Vargas, S., Pastor, S. & March, G.J. (2009). Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiological Research*, 164, 196-205.
- Walsh, E. (2010). Estudio de la productividad del cultivo de *Delphinium*, variedad *Sea Waltz*, con la aplicación de microorganismos benéficos (*Trichoderma harzianum*, *Gliocladium* spp., *Bacillus subtilis*, *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp.) bajo condiciones de campo, Cusubamba-2008. Quito: Escuela Politécnica Nacional.