

CONTROL NATURAL DEL HONGO DE PUDRICIÓN PARDA, *Botrytis cinerea*, POR MEDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES

NATURAL CONTROL OF THE BROWN ROT FUNGUS, *Botrytis cinerea*, BYE MEANS OF VOLATILE COMPOUNDS

Felipe Venegas • Alejandro Saavedra
 Profesores Guías: Darly Arellano • Jonathan Canales
 Asesor Científico: Andrés Quiroz
 Colegio The Forest School Pitrufquén • IX Región de Araucanía
 d.arellano01@ufromail.cl

Resumen

En Chile, la *Botrytis* es el principal problema de índole fitopatológico, que afecta a la uva de mesa y berries de exportación. Para combatirla se utilizan fungicidas sintéticos. Sin embargo, ha desarrollado resistencia específica hacia ellos. En este sentido, los hongos saprófitos liberan al ambiente compuestos orgánicos volátiles antifúngicos. Por lo anterior, el objetivo general de esta propuesta consiste en evaluar el efecto antifúngico de hongos saprófitos nativos sobre cepas de *B. cinerea*. Para comprobar este efecto antifúngico de hongos saprófitos, se trabajó con 6 muestras de hongos nativos de Pitrufquén. Se realizaron bioensayos de antagonismo, poniendo en contacto el hongo de la fruta (*Botrytis cinerea*) con las 6 especies de hongos saprófitos, para observar cuál o cuáles de ellos produce inhibición de la *Botrytis*. De las 6 muestras de hongos, dos de ellas, rotuladas M2 y M3 inhibieron tanto la producción de esporas de *Botrytis* como el crecimiento del micelio.

Palabras claves: *Botrytis cinerea*, compuestos volátiles, hongos saprófitos, micelio, esporas.

Abstract

In Chile, the *Botrytis* is the main problem of phytopathological nature affecting exportation fruits, such as strawberry, raspberry and table grape. To attack the *Botrytis*, synthetic fungicides are used. However, the *Botrytis* has developed specific resistance towards them. In this sense, saprophytic fungi releases to the environment organic volatile compounds with antifungal activity. For this reason, the general objective of this proposal consisted in evaluating the antifungal effect of the saprophytic fungi on *Botrytis cinerea* strains. To prove this antifungal effect of the saprophytic fungi, in this proposal worked with 6 samples of native fungi from Pitrufquén, where the fungus of the fruit was contacted with the 6 samples, for observing which of them produce inhibition against the *Botrytis*. From the 6 samples of fungi, two of them rotulated as M2 and M3 inhibited the production of spores and the mycelium growth of the fungus.

Keywords: *Botrytis cinerea*, volatile compounds, saprophytic fungi, mycelium, spores.



Introducción

Botrytis cinerea, también conocido como hongo de pudrición o moho gris, es un hongo fitopatógeno altamente polífago, responsable del mayor porcentaje de pérdidas económicas en la industria de frutas y hortalizas frescas a nivel mundial. Se estima que las pérdidas alcanzan un 20% de la producción mundial de estos productos, equivalente a USD 130 billones por temporada. En Chile es el principal problema de índole fitopatológico que afecta a la uva de mesa de exportación, provocando en algunas temporadas, importantes pérdidas las que se visualizan durante la post-cosecha y al arribo a los mercados de destino de la producción, lo que significa no percibir US\$ 252 millones por concepto de exportación de la uva (Esterio *et al.*, 2011).

Considerando que más del 10% de los fungicidas desarrollados y comercializados por la industria de agroquímicos son para el control de *B. cinerea*, esta oferta es insuficiente. Esto se debe a que *Botrytis* ha desarrollado distintos niveles de resistencia a diversos productos fitosanitarios, como los pertenecientes a los grupos de las dicarboximidias, anilinoimidazoles e hidroxianilidas, entre otros. Su control comprende un manejo integrado de prácticas culturales y un control químico preventivo, mediante el uso de botryticidas sobre los estadios más susceptibles a la infección, tales como floración, envero y pre-cosecha y, en post-cosecha, mediante el uso de anhídrido sulfuroso. Sin embargo, aunque se realicen todas estas prácticas, su control no ha resultado satisfactorio (Esterio *et al.*, 2006). El principal problema, derivado del uso de fungicidas químicos, es el incremento en la resistencia genética de *B. cinerea* a fungicidas, debido a un plan de aplicación deficiente. Además, actualmente se requiere la

aplicación de nuevos productos sustentables, debido a las estrictas normas de exportación vigentes para berries y frutales en general, que regulan el uso de estas sustancias químicas sintéticas. Adicionalmente, dado el notable poder adaptativo del patógeno, es necesario que las estrategias de manejo de la enfermedad evolucionen permanentemente hacia nuevas alternativas de control. Estas no sólo deben ser eficientes sino, además, causar un mínimo impacto negativo al medio ambiente. Como alternativa al uso de fungicidas de síntesis se ha propuesto a nivel mundial, el empleo de biocontroladores como *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. El biofungicida más ampliamente empleado en Chile para combatir esta enfermedad corresponde a Serenade® (Bayer). Este fungicida biológico interfiere en la adherencia del patógeno, inhibe la germinación de esporas, interrumpiendo el crecimiento del hongo. Por otro lado, se han probado diversas especies de hongos antagonistas a *B. cinerea*, a nivel de ensayos de laboratorio, tales como *Trichoderma harzianum* (Zimand *et al.*, 1996), *Trichoderma viride* y *Trichoderma longibrachiatum* (Bendahmane *et al.*, 2012).

Trichoderma atroviride (Freeman *et al.*, 2004) y *Trichoderma* sp (Molina *et al.*, 2006; Bogumil *et al.*, 2013). En nuestro país, la Empresa Bionativa comercializa el producto Trichonativa® (Reg. SAG N° 2587) que es un producto biotecnológico, registrado como biofungicida de formulación líquida en base a 3 cepas de *Trichoderma* spp. Este producto ha disminuido considerablemente la incidencia y severidad del ataque de *B. cinerea* en el estado fenológico de pre-apriete y pre-cosecha de uva de mesa.



Debido a lo anterior, urge la búsqueda de medidas de control alternativas de esta enfermedad. Una interesante y promisoría fuente de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos son los producidos por hongos saprófitos, debido al ambiente altamente competitivo en el que se desarrollan, presentándose este tipo de producto como nueva alternativa sustentable con el medio ambiente y con un gran potencial como antifúngico natural (Schalchli *et al.*, 2011). Es por ello que la biodiversidad fúngica que presentan los bosques de la Región de La Araucanía motivó a este equipo de trabajo a buscar, identificar e investigar el potencial antifúngico que presentan hongos saprófitos asociados a bosque nativo de la Región de La Araucanía. Además, la preocupación por la preservación del medio ambiente, el otorgar un valor agregado a los productos frutícolas que se generan en esta Región, son motivaciones importantes que permitieron generar y proponer esta idea.

Para ello se implementaron las siguientes metodologías de investigación: 1) Prospección de bosques con porcentaje significativo de especies nativas, 2) colecta de hongos saprófitos, 3) aislamiento del micelio, 4) ensayos de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*.

La presente propuesta pretende responder a la siguiente pregunta: ¿Pueden los hongos saprófitos nativos a través de la liberación de compuestos volátiles inhibir el crecimiento de *B. cinerea*?

Hipótesis

Hongos saprófitos recolectados de la Comuna de Pitrufquén liberan compuestos orgánicos volátiles que inhiben el crecimiento del hongo de la fruta *Botrytis cinerea*.

Objetivo General

Evaluar el efecto antifúngico de compuestos orgánicos volátiles de hongos saprófitos nativos sobre cepas de *Botrytis cinerea*.

Objetivos Específicos

1. Conocer las características reproductivas de los hongos saprófitos de Chile.
2. Describir el comportamiento de *Botrytis cinerea*.
3. Analizar las características fungicidas de los hongos saprófitos nativos.

Metodología

La investigación se llevó a cabo mediante un estudio bibliográfico y experimental cualitativo y cuantitativo, en el que se describió las características de los hongos y posteriormente se comprobó experimentalmente si es posible la inhibición de *Botrytis cinerea*.

Para esta investigación se trabajó con 6 especies de hongos recolectados en la comuna de Pitrufquén en el sector "Los Galpones". Las muestras fueron seleccionadas de acuerdo a su ubicación dentro del bosque, es decir, a una distancia no menor de 5 metros entre una y otra, con el objetivo de evitar la contaminación cruzada. Las muestras fueron introducidas en bolsas plásticas rotuladas. Para su traslado al laboratorio se utilizó un sistema refrigerado (5-10° C).

En esta investigación se midió el halo de inhibición de crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

La investigación en la parte experimental se realizó en los laboratorios de la Universidad de la Frontera, mediante el siguiente procedimiento.

Semana 21 de junio: Se realizó la recolección de 6 especies de hongos del sector "Los Galpones", utilizando técnicas de recolección específica para hongos: cadena de frío, rotulación de muestras, guantes de látex y bolsas plásticas de multiuso.

Los hongos fueron recolectados por los dos estudiantes en diferentes lugares del bosque, llegando como máximo a 30 metros, desde la carretera hacia el interior del último hongo extraído.

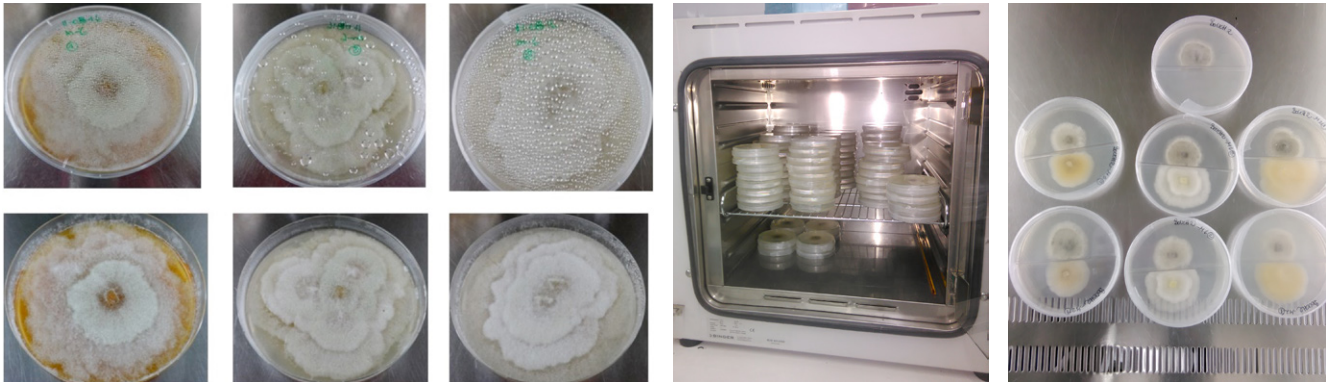
Semana 07 de julio: Se realizó la primera etapa experimental del proyecto en el Laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de La Frontera, con la ayuda del Dr. Andrés Quiroz.

Trabajo realizado: Aislación de hongos extraídos del sector "Los Galpones".

Materiales:

- Solución de Agar papa dextrosa como medio de cultivo.
- Placas de Petri (90 x 15 mm).
- Bisturí.
- Muestras (6 especies de hongos).
- Parafilm.
- Alcohol 70°.
- Cámara de flujo laminar.
- Estufa de incubación.





Procedimiento:

1. Esterilizar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%.
2. Limpiar hongos con agua destilada.
3. Extraer micelio de cada muestra de hongo, utilizando el bisturí, para posteriormente incubar la muestra en una placa Petri con Agar. Procedimiento que se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar. Por cada hongo se extrajeron 3 muestras de micelio.
4. Sellar las placas de Petri con Parafilm.
5. Incubar las muestras de micelio en la estufa de incubación a 27° C, por una semana.

Semana del 12 de julio: Se realizó la segunda etapa de la investigación en el Laboratorio de Química Ecológica de la Universidad de la Frontera.

Trabajo realizado: Aislación de micelio de hongos saprófitos.

Materiales:

- Solución de Agar papa dextrosa como medio de cultivo.
- Placas de Petri (90 x 15 mm).
- Bisturí.
- Muestras de hongos aislados en la etapa anterior.
- Parafilm.
- Alcohol al 70%.
- Cámara de flujo laminar.
- Estufa de incubación.

Procedimiento:

1. Esterilizar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%
2. Realizar un pequeño corte de la parte del micelio más purificada y nueva de las muestras de hongos previamente trabajado.
3. Incubar la parte del micelio en una placa de Petri con medio de cultivo nutritivo con agar-agar.

4. Sellar muestras con Parafilm.

5. Incubar las muestras de micelio en la estufa de incubación a 27° C.

Semanas 18 de Julio y 29 de Julio. Se realizó la purificación del micelio mediante repliques.

Materiales:

Los mismos utilizados en aislamiento de micelio de hongos saprófitos.

Procedimiento:

Similar al de aislamiento de micelio de hongos saprófitos, con la diferencia que se tomó parte del micelio y se volvió a sembrar en placas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA).

Semana del 22 de Agosto: Se realizó el ensayo de inhibición en los laboratorios de la Universidad de la Frontera.

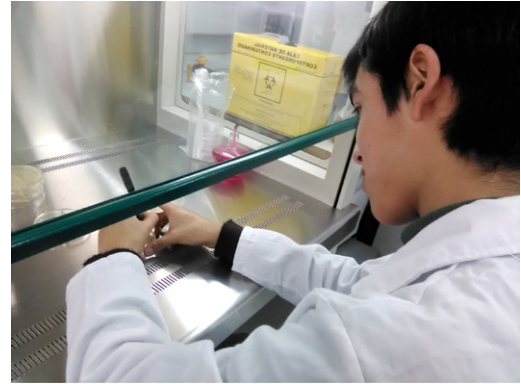
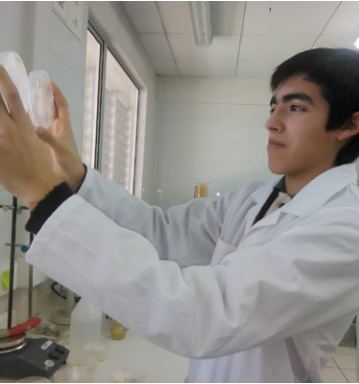
Materiales:

1. Los mismos utilizados anteriormente.
2. Cuatro muestras diferentes de *Botrytis cinerea*, facilitadas por la Universidad de Chile, con diferentes susceptibilidades a la presencia de compuestos volátiles.

Procedimiento:

1. Realizar 8 placas de Petri como control de las 4 muestras de *Botrytis*, rotuladas (BoUCH 1, BoUCH 2, BoUCH 3 y BoUCH 4).
2. Realizar en placas de Petri bicompartida 56 pruebas de inhibición con los cuatro tipos de *Botrytis* y las 6 especies de hongos previamente trabajadas y purificadas.
3. Incubar muestras en estufa de incubación a 27° C.





Semana del 29 de agosto se realizó un bioensayo de las muestras que revelaron resultados de inhibición en el procedimiento anterior.

Materiales:

Los mismos utilizados anteriormente.

Procedimiento:

1. Analizar las placas realizadas el 22 de agosto, y determinar cuáles de ellas mostraron un cambio en el desarrollo de la *Botrytis*.
2. Replicar las muestras de control de las *Botrytis* 1, 2 y 3.
3. Realizar bioensayo de interacción a través de compuestos volátiles utilizando el sistema de placas de Petri y las siguientes interacciones: BoUCH 1-M3, BoUCH 2-M3, BoUCH 3-M3 y BoUCH 3-M2.
4. Incubar muestras en estufa de incubación a 27° C.
5. Analizar resultados finales.

Resultados Cualitativos

Los resultados obtenidos cualitativamente, es decir, a simple vista al realizar el ensayo de inhibición de *B. cinerea* a través de la liberación de compuestos orgánicos volátiles de hongos saprófitos fueron los siguientes:

En las cepas de la *B. cinerea* de las muestras BoUCH2 y BoUCH3 se contemplaron las siguientes alteraciones: La zona micelial disminuyó en poca proporción en el caso de BoUCH 2. Lo relacionado con la esporulación, es decir, el medio reproductivo de los hongos de manera asexual (las esporas) se vio disminuido en BoUCH2 y BoUCH3 (la zona de color oscuro con apariencia de pelusa observada en la fotografía control).

En la cepa de *B. cinerea* BoUCH1, solo se pudo observar una disminución del diámetro del micelio.

En la cepa de *B. cinerea* BoUCH4 no ocurrió ningún cambio.

Análisis y discusión

Los resultados presentados anteriormente indican la diferente susceptibilidad de las cepas de *B. cinerea* al efecto de compuestos orgánicos volátiles emitidos por los hongos saprófitos extraídos de la región de La Araucanía comuna de Pitrufquén, lo cual se demuestra a través de la disminución de la capacidad reproductiva, por la alteración de sus estructuras, tanto a nivel de crecimiento de micelio como de esporulación. Lo anterior se demuestra a través de la interacción de BoUCH1 y M3, donde se observa una disminución del desarrollo del micelio. Adicionalmente, en la interacción de BoUCH2 y M3, disminuye el diámetro del micelio, pero se observa una amplia inhibición de la esporulación de esta cepa de *B. cinerea*, demostrando la capacidad de los volátiles, emitidos por M3, de inhibir el crecimiento a través de la inhibición de ambas estructuras reproductivas (esporas y micelio), a diferencia del ejemplo anterior. Sin embargo, en el caso de interacción de BoUCH3 con M2 y M3, solo se observó una disminución de esporas y finalmente, BoUCH4 no presentó alteración alguna. Lo anteriormente señalado, sugirió una acción específica de los compuestos orgánicos volátiles, emitidos por las cepas de hongos saprófitos, sobre las diferentes cepas de *B. cinerea*, debido a la susceptibilidad dada por esta.

Estos resultados indican que dos de los seis hongos trabajados durante esta investigación lograron inhibir



a la *B. cinerea*, por medio de los compuestos orgánicos volátiles liberados por ellos, lo que se comprueba con la técnica utilizada para realizar los bioensayos de in-

hibición: “placas divididas donde se obtiene una interacción entre *B. cinerea* con M3 y M2, solo por contacto aéreo, que es lo que permite este tipo de técnica”.

Cepa de <i>Botrytis</i> 1, 2 y 3	Diámetro Cepa de <i>Botrytis</i> incubada control (Cm)		Diámetro Cepa de <i>Botrytis</i> incubada con hongo saprófito (Cm)		Muestra de hongo
BoUCH 1 Día 1	6,3	5,8	4,8	5,5	M3
BoUCH 1 Día 2	6,5	6	5	5,7	M3
BoUCH 2 Día 1	4,6	4,4	4,4	3,8	M3
BoUCH 2 Día 2	4,7	4,5	4,5	3,9	M3
BoUCH 3 Día 1	4,9	4,7	4,9	4,6	M2
			4,9	5	M3
BoUCH 3 Día 2	5	4,9	5,1	4,7	M2
			5,2	5,2	M3

Tabla 1: Comparación de los diámetros de los micelios de *Botrytis cinerea*.

Conclusión

Terminado el proceso de investigación de aceptar nuestra hipótesis, que dice relación con que “Hongos saprófitos recolectados de la Comuna de Pitrufquén liberan compuestos orgánicos volátiles que inhiben el crecimiento del hongo de la fruta *Botrytis cinerea*”. Verificando la inhibición de la *B. cinerea* con dos de los seis hongos recolectados, dando cumplimiento al objetivo general y a los específicos, por medio de la revisión bibliográfica y evidencia experimental. Se debe tener en cuenta que *B. cinerea* es un hongo patógeno que afecta la fruta tanto en Chile como a nivel mundial, que provoca grandes pérdidas económicas y que por diversas razones se hace cada día más difícil de controlar, lo que hace necesario buscar nuevas alternativas de control como la planteada en esta investigación: compuestos orgánicos volátiles derivados de hongos saprófitos pertenecientes a nuestra flora chilena.

De nuestra pregunta de investigación “¿Pueden los hongos saprófitos nativos a través de la liberación de compuestos volátiles, inhibir el crecimiento de *B. cinerea*?”

Se puede responder con base experimental y científica, que se inhibe el crecimiento de la *Botrytis cinerea*, ya que se comprueba que dos de los seis hongos recolectados influyen en la disminución de producción de esporas y micelio, que son parte del sistema reproductivo de los hongos, lo que permite controlar esta enfermedad que afecta a muchos países del mundo. En la actualidad, no existe un producto basado en compuestos volátiles, por lo cual este trabajo es un hallazgo científico-tecnológico importante para la industria agraria-frutícola, que se proyecta a un trabajo de investigación en la identificación específica de los hongos M2 y M3, en base a la extracción de su ADN e identificar por métodos químicos las moléculas volátiles que liberan estos dos hongos, que causaron la inhibición de *B. cinerea*.



Bibliografía

Bendahmane BS, Mahiout D, Benzohra IE, Benkada MY. 2012. Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. *World Applied Sciences Journal* 17: 278 - 283.

Bogumił A, Sas L, Lisek A, Trzciński P, Harbuzov A. 2013. Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Horticulturae* 25: 123 - 132.

Esterio M, Ramos C, Auger J, Munitiz R, Nitsche J. 2006. Eficacia diferencial de boscalid, boscalid y pyraclostrobin y cyprodinil y fludioxonil, sobre genotipos de *Botrytis cinerea*: transposa, vacuma y boty. En: Resúmenes XVI Congreso Nacional de Fitopatología SOCHIFIT. La Serena, Chile.

Esterio M, Auger J, Ramos C, Araneda J. 2011 *Botrytis* en uva de mesa de exportación: PCR en Tiempo Real, una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas. *Revista el Fruticultor* 5: enero 2011.

Molina G, Zaldúa S, González G, Sanfuentes E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque* 27: 126 -134

Freeman S, Minz D, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, Maymon M, Nitzani Y, Kirshner B, Rav-David D, Bilu A, Dag A, Shafir S, Elad Y. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110: 361 - 370.

Schalchli H, Hormazabal E, Becerra J, Birkett M, Alvear M, Vidal J, Quiroz A. 2011. Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelia cultures of saprophytic fungi. *Chemistry and Ecology* 27: 503 - 513.

Zimand G, Elad Y, Chet I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1255 - 1260.



Trabajo de recolección de hongos saprófitos en la comuna de Pitrufuquén

