

EVALUACION DE LA TOLERANCIA DE CEPAS MICROBIANAS (*Trichoderma orquidea*, *Trichoderma higerilla* y *Fusarium sp*) RESPECTO AL DESARROLLO DE EXTRACTOS VEGETALES *Ruta chalepensis* (ruda), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Plantago major* (Llantén)

García, Ahidaly Cód. 12332001; Ramírez, Angélica Cód. 12332019; Franco, Lina Cód. 12331031; Lopera, Johanna Cód. 13331016

Docente: Carlos Isidro Acevedo

RESUMEN

La economía agroindustrial Colombiana se ha visto en déficit debido al ataque de diversos Fitopatógenos que existen en la mayoría de cultivos; como métodos de control se están utilizando agentes químicos nocivos los cuales están desestabilizando los ecosistemas ya que estos se encuentran expuestos a dichos agentes. El objetivo de este proyecto es presentar nuevas alternativas de aprovechamiento de plantas con componentes antimicóticos que faciliten el control de microorganismos perjudiciales además teniendo en cuenta que sería una buena opción biológica ya que tiene factores favorables tanto en economía como en equilibrio ambiental para la utilización en grandes y pequeñas industrias. Este trabajo se llevo a cabo en la Universidad de Santander (UDES) donde realizamos hidrodestilacion de las plantas *Ruta chalepensis*(ruda), *Thymus vulgaris*(tomillo), *Plantago major*(Llantén) posterior a esto adicionamos combinación de estos extractos en medios de PDA evaluando en cada una de ellas el crecimiento de cepas de *Fusarium sp.*, *Trichoderma higerilla* y *Trichoderma orquidea* para determinar la tolerancia o inhibición de estas cepas obteniendo como resultados que los tres extractos favorecen el crecimiento de *Trichoderma Orquídea* pero en la mayoría de los extractos se observo la inhibición de *Fusarium* a excepción del extracto de Ruda.

PALBRAS CLAVE: Hidrolato, tolerancia, evaluación, antagonismos, hidrodestilacion, Extractos, plantas, cepas microbianas

INTRODUCCION

En la actualidad se han ido desarrollando diferentes formas de contribuir a la conservación del medio ambiente en el área agrícola con productos biológicos, estos productos evitan o excluyen insumos externos de síntesis químicas que empobrecen el suelo contrarrestando la acción de las poblaciones de organismo beneficios, disminuyendo los nutrientes para las plantas y contaminando fuentes de agua.

El manejo integrado de plagas es un método para combatir poblaciones no deseadas siendo responsable con el medio ambiente. Existen productos biológicos que pueden llegar a ser muy efectivos para el control de plagas. Se conocen sustancias extraídas de plantas que tiene un efecto anti fúngico contra la población dañina y sin contaminación de recursos suelo y agua. (Gonzales, 2007 CIUDAD BOGOTA).

En Colombia se conoce que existe de 250000 a 500000 especies vegetales antifúngicas, de las cuales se estima que al menos un 10% han sido estudiados en sus aspectos químicos y propiedades biológicas valorando la diversidad de estructuras químicas en la búsqueda de nuevos compuesto bioactivos. (PIÑOL, 2001).

La planta de tomillo, es conocida científicamente como *Thymus vulgaris*, tiene aceites esenciales dentro de su composición, es una planta reconocida por sus propiedades terapéuticas y cuyas partes aéreas ya han sido estudiadas comprobándose la existencia de sustancias en ella con actividad antifungica, en su composición posee aceites esenciales, ricos en carvacrol y cineol, además tiene importantes cantidades de timol y borneol, dentro de los componentes del tomillo, destacan los aminoácidos.

La ruda, cuyo nombre científico es *Ruta graveolens*, los aceites esenciales de esta planta son ricos en ácidos y terpenos; dentro de los primeros destaca el ácido salicílico y el anísico, dentro de los terpenos destacan el cineol y limoneno. Entre otros componentes de la ruda se destacan las sustancias flavonoides, las cuales tienen muchas propiedades. Las más importantes son las de antioxidante y las anticancerosas. (Hoss, 1992)

METODOLOGIA

Este proyecto se realizó en la Universidad de Santander (UNDES). Para la realización de este utilizamos planta de *Ruta chalepensis* (Ruda A), *Plantago major* (Llantén B), *Thymus vulgaris* (Tomillo C), las cuales fueron tomadas en los cultivos de la Finca la esperanza en las afueras de la ciudad de Bucaramanga.

Proceso de Selección y Obtención de Hidrolatos (Lopez)

En el laboratorio realizamos el proceso de selección de las hojas de las plantas tomando 65g de cada planta y suspendiéndola en un vaso de precipitado con agua, luego se realizó un proceso de hidrodestilación (ALBARRACÍN, 2003) el cual duró un tiempo de (15min/70% de potencia) para cada una de las plantas. Transcurrido dicho tiempo se obtuvieron 3 hidrolatos cada uno de 25ml cuales se suspendieron en frascos estériles y se llevaron a refrigeración por 8 días.

Combinación de los extractos en medio PDA

Primero se realizó la caracterización de las tres cepas a trabajar que fueron: *Trichoderma higerilla*, *Trichoderma orquídea* y *Fusarium sp.* Posteriormente se adicionaron los hidrolatos al medio PDA y se inoculó por método de punción los hongos *T. higerilla* y *T. orquídea* de la siguiente manera:

1. En 6 cajas de medio PDA con 0.5ml de cada uno de los extractos.

La ruda posee una abundante cantidad de taninos, que son unas sustancias muy conocidas por sus efectos antioxidantes.

El llantén conocida científicamente como *Plantago major*, posee entre sus componentes varias sustancias azucaradas, como el sorbitol, la sacarosa y la fructosa, también flavonoides. (Folcará & Venaclocha, 2000)

2. En 6 cajas de medio PDA con 0.25 ml de cada uno de los extractos; se realizaron las combinaciones respectivas (C y B), (C y A) y (A y B).

3. Por duplicado en medio PDA con 0.123ml de los extractos se realizó la combinación (A, B y C).

Se dejaron las cajas a temperatura ambiente bien cerradas; durante una semana se evaluaron sus cambios.

Después de (15) días de realizados los hidrolatos se realizaron de nuevo combinaciones pero se inocularon los hongos *Fusarium* y *T. orquídea*.

1. Se tomaron 7 cajas de medio PDA con la misma metodología de las combinaciones anteriores pero solo se inoculó el hongo *Fusarium sp.*

2. En 7 cajas de medio PDA con sus respectivos extractos se inocularon los dos hongos

De igual manera estas cajas se dejaron a temperatura ambiente y se evaluó la tolerancia o inhibición de *Fusarium sp.* y la competencia de los dos hongos por los sustratos. (Badii ML, 2006)

RESULTADOS Y DISCUSION

ANÁLISIS DE LOS HONGOS RESPECTO A LOS HIDROLATOS

- *Trichoderma Orquídea*

Esta cepa en los tres análisis demostró que fue la que mayor crecimiento con una

mayor tolerancia al medio, en el hidrolato de tomillo se presentó el mayor crecimiento en menor tiempo, teniendo en cuenta que desde los 4 días se dejó a temperatura ambiente su crecimiento fue abundante (figura 1,a), de igual manera el crecimiento constante con una tolerancia al medio para los hidrolatos de ruda (figura 1,b) y llantén (figura 1,c), Por los tanto se puede asegurar que los tres hidrolatos son apropiados para promover el desarrollo de las cepas *Trichoderma orquídea* para poder ser usado como fitopatógeno (Villegas, 2012) y además aumentar su potencial antagónico con las propiedades químicas de estas especies naturales, siendo usado sus extractos en medios de crecimiento básico para hongos y así ser estudiada su aplicación a nivel agroindustrial. (Vargas N, 2005)



FIGURA 1. Agar PDA: *Trichoderma Orquídea* con los hidrolatos, crecimiento constante en los tres medios.

- *Trichoderma higerilla*

Respecto a la anterior cepa de *Trichoderma higerilla*, se observó un menor crecimiento no presenta tolerancia pero el crecimiento no es igual de abundante y constante siendo un crecimiento similar al crecimiento control. En el crecimiento en hidrolato tomillo se observó un crecimiento lateral en la placa (figura 2.a), en los otros medios con llantén (figura 2,b) y ruda (Figura 2,c) el crecimiento fue modesto relativamente menor a la cepa 1 (figura 1) en los 15 días de observación, por lo tanto los hidrolatos potencializa el crecimiento de

Trichoderma higerilla pero no de la misma



FIGURA 2. Agar PDA: *Trichoderma higerilla* con los hidrolatos, crecimiento medio, no presenta crecimiento abundante.

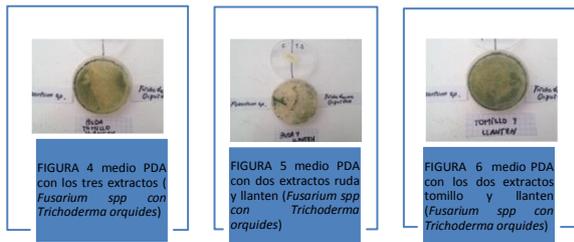
manera que *Trichoderma orquídea*.

- *Fusarium sp.*

Se observó mínima tolerancia de esta cepa para los extractos de tomillo (Figura 3,a) y llantén (Figura 3.b) inhibió el crecimiento de *Fusarium sp.* en los 15 días de dejar a temperatura ambiente, en cambio en el medio con ruda presento crecimiento abundante posiblemente el hongo no es sensible a los componentes químicos de esta especie pues permite potenciar el crecimiento en un agar básico para hongos, siendo patógeno se debe tener en cuenta los dos extractos que disminuyen su crecimiento y que además potencializan el crecimiento significativamente en mayor proporción para *Trichoderma orquídea* (figura1)



FIGURA 3. Agar PDA: *Fusarium sp* con los hidrolatos, inhibición de crecimiento en medios en hidrolatos de tomillo y llantén y crecimiento abundante en hidrolato de ruda



Con base en estos resultados se analiza el crecimiento en medio PDA de las especies para ver su competencia y antagonismo y además la tolerancia al medio modificado con cada extracto.

Al realizar el análisis en combinaciones tanto de extractos como de cepas se encontró que las que potencializan de manera más significativa el antagonismo de *Trichoderma orquídea* sobre *Fusarium sp.*, (Nalimovas, 2011) fueron la combinación de los tres extractos (Figura 4) y la unión de tomillo y llantén (figura 6), teniendo un mayor resultado antagónico para el medio en que se encuentra el tomillo llantén con la cepa del fitopatógeno con *Trichoderma orquídea*. En cambio por ejemplo en algunos medios como la unión de la ruda con el llantén se observó crecimiento significativo de este fitopatógeno.

Se determinó que la cepa que presenta mayor crecimiento en los extractos es *Trichoderma orquídea* y que dos de estos son inhibidores de el fitopatógeno (tomillo y llantén) y que el extracto de ruda no realiza inhibición para *Fusarium sp.* Además que la combinación de extractos que represento mayor potencial antagónico al Fitopatógeno fue tomillo y llantén con la cepa de *Trichoderma orquídea*.

PROPIEDAD DE LOS HIDROLATOS

El tomillo en su composición fisicoquímica, la cual posee terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos con diez átomos de carbono como lo son el timol, carvacrol, p-cimeno y linalol, flavonoides (derivados de apigenol y luteolol), (Camargo, 2009) con capacidad

antifúngica podría ser atribuida atacando la membrana citoplasmática de microorganismos destruyendo la capacidad selectiva y permitiendo el escape de componentes intracelulares lo que sumado a su capacidad de inactivar enzimas explicaría la actividad contra el desarrollo fúngico. Las plantas son biológicamente activas por ende el llantén produce metabolitos secundarios que presentan actividad antimicótica de acuerdo a sus propiedades se encuentran flavonoides entre ellos la luteolina y la noscapina, (García, Montana, & Píneros, 2012) causando al hongo un efecto inhibitorio, por otra parte la ruda de acuerdo a su composición fisicoquímica como los aceites esenciales de esta planta son ricos en ácidos y terpenos; dentro de los primeros destaca el ácido salicílico y el anísico, dentro de los terpenos destacan el cineol y limoneno la cual son metabolitos secundarios volátiles con actividad antimicótica causando una acción citotóxica en la célula. (PIÑEROS, 2006)

CONCLUSIONES

- Este proyecto nos ayudó a establecer y evaluar el comportamiento de los hongos (*Trichoderma higerilla T. orquídea* y *Fusarium sp.*) en relación a los extractos trabajados observando su tolerancia o su efecto inhibitorio cuando se encontraban en contraste uno a otro.
- Los tres extractos representaron potencializador de crecimiento para *Trichoderma orquídea* e inhibición o disminución de crecimiento en su mayoría para *Fusarium sp.*

BIBLIOGRAFIA

ALBARRACÍN, M. (2003). *COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE . MANIZALES.*

- Badii ML, A. J. (2006). Control biológico, una forma sustentable (Biological control, a sustainable). 1-16.
- Camargo, J. (2009). AISLAMIENTO DE PRINCIPIOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS PRESENTE EN ESPECIES COLOMBIANAS DE LA FAMILIA BURSERACEAE. *Pontificia Universidad Javeriana*.
- Folcará, S., & Venaclocha, B. (2000). Usos terapeuticos del tomillo y la ruda. *Revista de Fitoterapia*, 5-13.
- Garcia, H., Montana, E., & Pineros, J. (2012). EXTRACTOS NATURALES DE PLANTAS MEDICINALES; CONCEPTO, PREPARACION, USOS.
- Gonzales, M. (2007 CIUDAD BOGOTA). EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL EXTRACTO DE TOMILLO (*Thymus Vulgaris*) CONTRA *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA* , 1-71.
- Hoss, R. (1992). Guía metodológica: Uso de extractos vegetales en la regulación de plagas y enfermedades. *revista de facultad agronomica*.
- Lopez, i. (s.f.). EFN.
- Nalimovas, M. (2011). PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DE TRICHODERMA SPP. COMO ANTAGONISTA DE HONGOS FITOPATÓGENO. *Laboratorio de Bacteriología INISAV*.
- PIÑEROS, J. E. (2006). PLANTAS MEDICINALES (COMPENDIO DE FARMACOLOGIA VEGETAL). *Editorial Universit*.
- PIÑOL, M. (2001). Relaciones entre el metabolismo primarios y secundarios de las platas.
- Vargas N, P. A. (2005). Efecto de extractos vegetales y funguicidas sinteticos sobre el crecimiento micelial in vitro. *revista de la facultad de agronomia* , 1-14.
- Villegas, M. (2012). *Trichoderma* spp. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y SU POTENCIAL BIOLÓGICO EN LA AGRICULTURA SOSTENIBL. *ORIOUS soluciones con biotecnologia*.