

## **Exudados de semillas de *Phaseolus vulgaris* y su relación con algunos microhongos del suelo**

Rodríguez F <sup>1</sup>, Cotes A. M. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Básicas Departamento de Microbiología- Grupo GICA-UP, , Universidad de Pamplona, Email: [francrincon@unipamplona.edu.co](mailto:francrincon@unipamplona.edu.co)

<sup>2</sup>Laboratorio de Control Biológico, Programa MIP, Corpoica, Tibaitatá, Colombia

Recibido 12 Septiembre 2006

Aceptado 22 Noviembre 2006

### **ABSTRACT**

This research is a study about the composition of the exudates from pregermination bean seeds treated with *Trichoderma koningii* and its relationship with biological control of the root rotting. The results suggest that the reducing sugars, amino acids and peptides were exudates from seeds and removed during the controlled pregermination. This compounds would serve as source of nutrition to the *T. Koningii* to colonize the teguments and would be involved in the protection mechanisms against *Rhizoctonia solani*.

### **KEY WORDS**

Biological Control Mechanisms , exudates, seeds pregermination , Phytopathogenic fungi.

### **RESUMEN**

En el presente trabajo se hizo un estudio sobre la composición de los exudados de semillas de frijol pregerminadas y tratadas con *Trichoderma koningii*, y se propuso establecer su relación en el control biológico de la pudrición radical. Los resultados sugieren que los azúcares reductores, aminoácidos y péptidos, exudados por las semillas, removidos durante la pregerminación controlada, servirían como fuente de nutrición a *T. koningii* para colonizar los tegumentos y, por lo tanto, estarían implicados en los mecanismos de protección contra *Rhizoctonia solani*.

### **PALABRAS CLAVES**

Mecanismos de Control biológico, exudados, pregerminación de semillas, hongos fitopatógenos.

## INTRODUCCIÓN

Las raíces y las semillas en germinación, poseen una zona externa que se caracteriza por una alta actividad microbiana. Esta zona se denomina rizosfera esfermosfera. Dicha actividad es debida a la exudación de cantidades significativas de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas (Hayman, 1969), controlados genéticamente por la planta e influenciados por el ambiente (Windels, 1991), que promueven el crecimiento de hongos y bacterias, formando microcolonias sobre las superficies de estos órganos. Un ejemplo es la armoniosa asociación mutualista entre micorrizas arbusculares (MA) y las plantas, que ocurre solo si hay una serie de señales químicas exudadas por las raíces antes del contacto. Una vez establecida la asociación ocurre un intercambio bidireccional de nutrientes a través de arbusculos del hongo o haustorios extensamente ramificados en las células de la planta. Las plantas micorrizadas, mejoran así su estado nutricional y muestran resistencia a patógenos radicales y tolerancia a diferentes tipos de estrés (Morales et al., 2007 y Buee et al., 2000).

En muchas otras asociaciones los microorganismos, como *Trichoderma spp.*, además de colonizar la rizosfera, pueden inducir en la planta respuestas de defensa contra patógenos e incrementar la emergencia y el crecimiento vegetal (Ahmad et al., 1988). Este hongo del suelo puede también inactivar otros hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo, utilizando para ello diferentes mecanismos como el micoparasitismo, lisis, antibiosis y competencia por nutrientes (Benítez et al., 2004; Rodríguez et al., 1999). Se ha demostrado que el efecto antagonista de *Trichoderma sp.* sobre las semillas y raíces de la planta es debido en parte a su habilidad para colonizar sus superficies de manera competitiva con patógenos como *Pythium sp.*, *Fusarium solani f. sp. pisi*, *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*, *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, y *Rhizoctonia solani* (Rodríguez et al., 1999).

Los exudados también pueden inhibir el

crecimiento de los patógenos por mecanismos directos o indirectos, tanto de origen constitutivo como inducido. Es así como en plántulas de frijol, a través de los exudados de las raíces, se puede inducir una respuesta metabólica para producir compuestos fungitóxicos (fitoalexinas), que las defienden del ataque de hongos fitopatógenos (Cardoso et al., 1987).

Algunas enzimas han sido detectadas en los exudados de semillas y raíces (Rodríguez et al., 1999). Así por ejemplo, en la rizosfera de maíz, en raíces de perejil y de *Arabidopsis thaliana*, atacadas por *Pseudomonas syringae*, se ha detectado alta actividad deshidrogenasa asociada a la reducción de la manosa en manitol y principalmente con la aplicación de ácido salicílico a la planta (Rodríguez et al., 1999). El manitol, siendo un devorador molecular de radicales libres, que son potencialmente nocivos a las células, está relacionado con el incremento en la eficiencia fotosintética y metabólica y con la osmoprotección de la planta. Esto indica que la manitol deshidrogenasa puede intervenir en la síntesis de defensas bioquímicas (como las fitoalexinas), o defensas estructurales (como el reforzamiento de la pared celular) (Rodríguez et al., 1999). La expresión de ésta y otras enzimas hacen parte de las respuestas de la planta para contrarrestar la infección por los patógenos.

En el presente trabajo se hizo un estudio sobre la composición de los exudados de semillas de frijol pregerminadas y tratadas con *Trichoderma koningii* (cepa TH-11), semillas que fueron resistentes en un 82% contra *Rhizoctonia solani* (Rodríguez et al., 1999), y se propuso establecer su relación con el control biológico de la pudrición radical.

## METODOLOGÍA

La extracción de los exudados se hizo siguiendo los procedimientos descritos por Nelson y Craft, (1989). Después de 2 horas de imbibición y agitación constante a 120 r.p.m. y 20°C, la solución se recogió en condiciones asépticas, se filtró y se almacenó en tubos

eppendorff a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Se determinó la concentración de exudados por g de semilla de diferentes tratamientos, según la metodología desarrollada por Rodríguez et al., (1999): 1) exudados de semillas sin pregerminar y sin tratar con *T. koningii* (NP); 2) exudados de semillas sin pregerminar y tratadas con *T. koningii* (NPTH); 3) exudados de semillas pregerminadas sin tratar con *T. koningii* (P); y 4) exudados de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (PTH). El mismo procedimiento se realizó para exudados de semillas imbibidas durante 4, 6, 9 y 12 h.

Se determinó el contenido de nitrógeno total de los exudados liofilizados por el método de microkjeldahl. También se realizó un análisis cinético de la concentración de azúcares (Nelson, 1944; Sigma, 1995; Somogyi, 1952) y un análisis de la concentración de proteínas totales (Bradford, 1976).

El diseño experimental para los ensayos en suelo fue completamente al azar. Las mediciones de nitrógeno total, concentración de azúcares y concentración de proteína fueron el resultado de tres lecturas. Para establecer la relación existente entre los componentes de exudados y el control biológico de *Rhizoctonia solani*, cada experimento fue repetido tres veces, con sus respectivas extracciones. Las diferencias significativas entre los tratamientos fueron determinadas mediante un análisis de varianza y una prueba de Duncan, utilizando las medias de las tres mediciones de cada una de las variables. En el caso de las curvas de calibración se trabajó con coeficientes de correlación mayores de 0.98, y se sometieron a la prueba de regresión de los mínimos cuadrados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**AZÚCARES:** En general, los exudados de los diferentes tratamientos de semillas extraídos durante las primeras doce horas de imbibición incrementaron la concentración de azúcares reductores, presentando diferencias

significativas entre los tratamientos de semillas: alta concentración (hasta  $1649.5 \mu\text{g/g}$ ) en los exudados de semillas no pregerminadas (NPTH y NP), y baja concentración (hasta  $522.7 \mu\text{g/g}$ ) en los exudados de semillas pregerminadas (PTH y P) (figura N° 1).

La presencia o no del antagonista en los diferentes tratamientos de semillas no estuvo relacionada con la cantidad de azúcares exudados. Las semillas que no fueron sometidas al proceso de pregerminación controlada exudaron, aproximadamente, 3 veces más azúcares reductores, lo que puede contribuir a la infección por *Rhizoctonia solani*. Para el caso de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (PTH), la alta protección (82%) contra *R. solani* puede relacionarse inversamente con la baja concentración de azúcares reductores en sus exudados, tal como lo sugirieron Sivan y Chet (1989) para el control de *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* y *F. o. f. sp. melonis* en algodón y melón. Los azúcares exudados por las semillas pueden también ser removidos por *T. koningii*, ya que le sirven como fuente alimenticia durante la pregerminación controlada, siendo un factor clave en la colonización de los tegumentos por este antagonista y, por lo tanto, implicado en los mecanismos de protección contra *R. solani*. De otro lado, el contenido de glucosa en los exudados tuvo un comportamiento similar al de azúcares reductores, aunque, con valores mucho más bajos. El contenido de glucosa con respecto al total de azúcares reductores representó menos del 9% en los exudados.

**CONTENIDO DE NITRÓGENO:** El contenido de nitrógeno proteico, representa aminoácidos libres, péptidos y proteínas presentes en exudados de semillas. La tendencia es que las semillas que han sido sometidas al proceso de pregerminación controlada, en ausencia o presencia de *T. koningii*, contienen exudados de bajo contenido de compuestos nitrogenados (hasta 0.21%), mientras que las semillas que no han sido sometidas a este

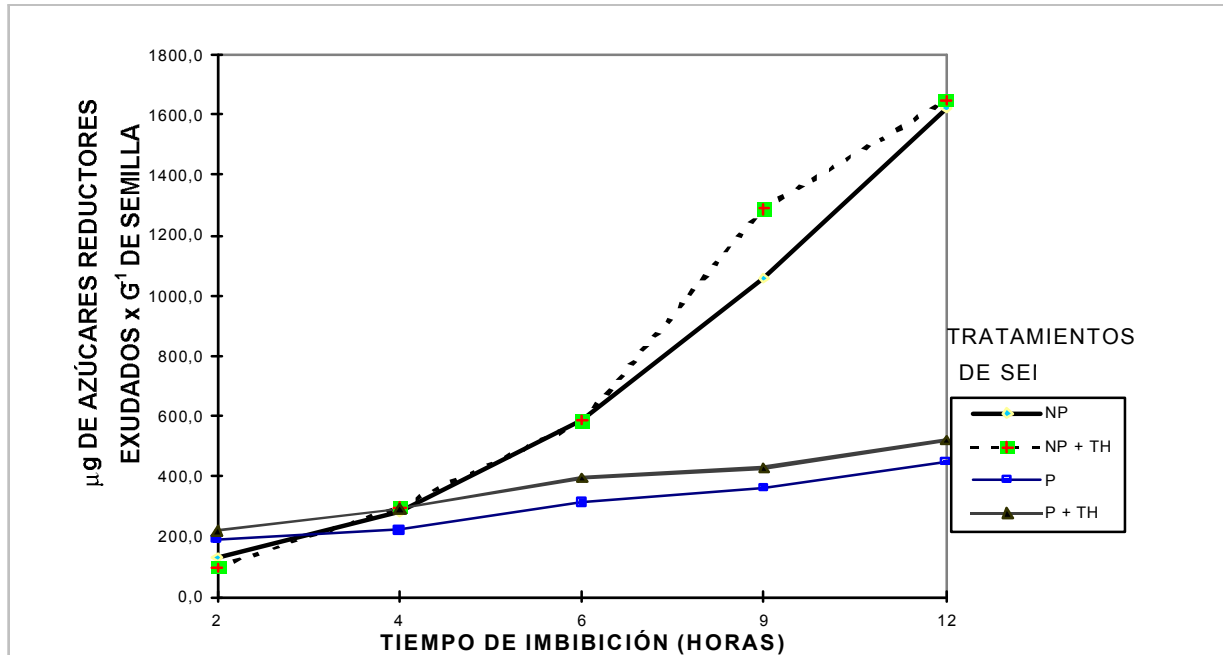


Figura N° 1. Cinética de la acumulación de azúcares reductores libres presentes en exudados de semillas, obtenidos entre 2 y 12 horas de imbibición. NP semillas no pregerminadas; NP+TH semillas no pregerminadas tratadas con *T. Koningii*; P semillas pregerminadas; P+TH semillas pregerminadas en presencia de *T. Koningii*.

proceso, tratadas o no con *T. koningii*, sus exudados contienen aproximadamente 3 veces más compuestos nitrogenados (hasta 0.68%) (Figura N° 2), lo que puede contribuir, al igual que los azúcares reductores, a la infección por *Rhizoctonia solani*, dado que estas semillas presentaron alta incidencia de la enfermedad.

Para el caso de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (PTH), la alta protección obtenida contra *R. solani* puede relacionarse inversamente con la baja concentración tanto de compuestos nitrogenados como de azúcares reductores en sus exudados. También los compuestos nitrogenados exudados por las semillas serían

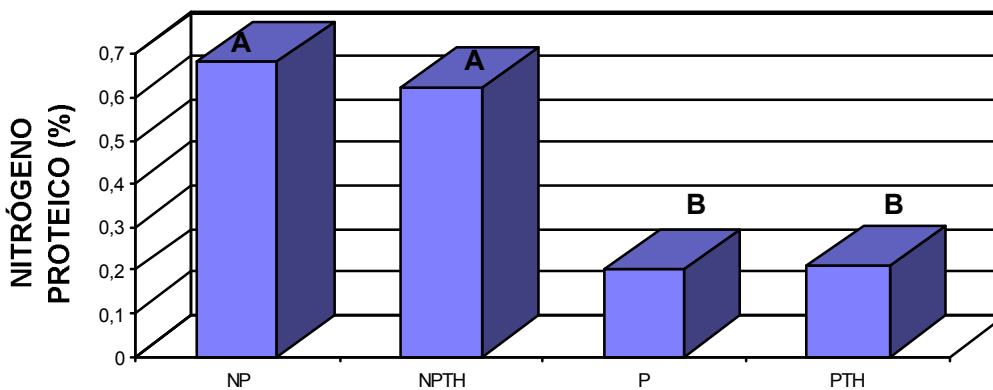


Figura N° 2. Contenido de nitrógeno proteico por gramo de semilla de los exudados obtenidos después de 12 horas de imbibición. NP exudados de semillas no pregerminadas; NPTH exudados de semillas no pregerminadas tratadas con *T. Koningii*; P exudados de semillas pregerminadas; PTH exudados de semillas pregerminadas en presencia de *T. Koningii*.

removidos por *T. koningii*, ya que le pueden servir como fuente de nutrición durante la pregerminación controlada, siendo otro factor clave en la colonización de los tegumentos por este antagonista y, por lo tanto, implicado en los mecanismos de protección contra *R. solani*.

**PROTEÍNAS:** Los exudados de semillas pregerminadas, en presencia o ausencia de *T. koningii* (PTH y P) presentaron la mayor concentración de proteína (desde 204 µg /g hasta 151 µg /g), desde las dos horas de imbibición hasta las doce horas y manteniéndose relativamente estable durante este tiempo; mientras que los exudados de semillas no pregerminadas, con y sin *T. koningii* (NPTH y NP), presentaron baja concentración de proteínas

desde 7 µg/g hasta 64 µg /g) (Figura N° 3), manteniéndose relativamente estable después de las 6 horas de imbibición.

Estos hechos indican que la pregerminación controlada de semillas, en ausencia o presencia de *T. koningii* (P y PTH), permite que se active la maquinaria de síntesis de proteínas involucradas en los procesos fisiológicos de la germinación, de ahí que se hayan detectado altas concentraciones de estos polímeros en sus exudados durante doce horas después de iniciada la imbibición.

Los resultados sugieren que los azúcares reductores, los aminoácidos y péptidos, exudados por las semillas, que serían removidos durante la pregerminación

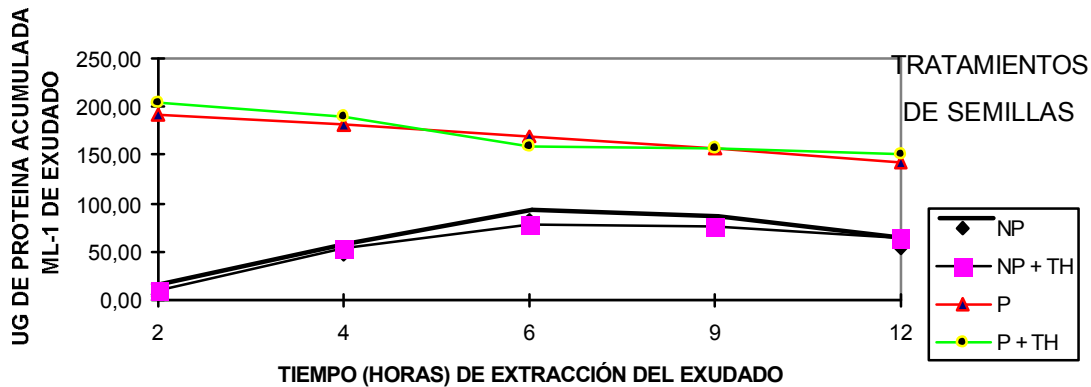


Figura N° 3. Cinética de la acumulación de proteína soluble en exudados de semillas de frijol, obtenidos entre 2 y 12 horas de imbibición. NP semillas no pregerminadas; NP+TH semillas no pregerminadas tratadas con *T. Koningii*; P semillas pregerminadas; P+TH semillas pregerminadas en presencia de *T. Koningii*.

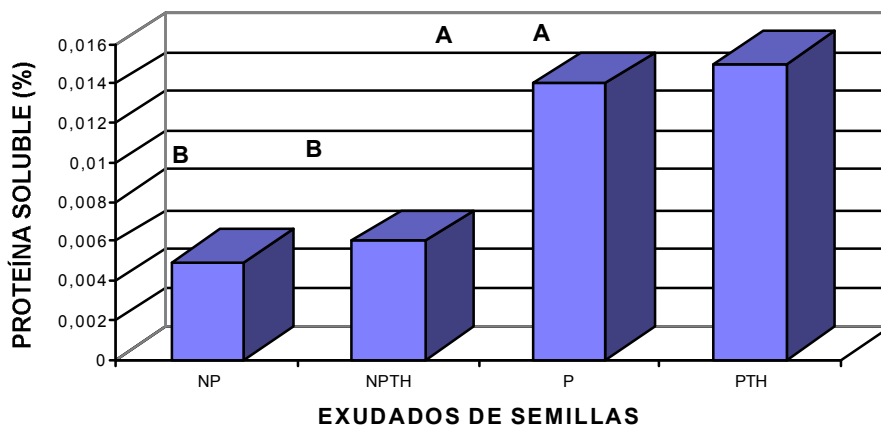


Figura N° 4. Contenido de proteína soluble por gramo de semilla en exudados obtenidos después de 12 horas de imbibición. NP semillas no pregerminadas; NPTH semillas no pregerminadas tratadas con *T. Koningii*; P semillas pregerminadas; PTH semillas pregerminadas en presencia de *T. Koningii*.

controlada, servirían como fuente de nutrición de *T. koningii* para colonizar los tegumentos y, por lo tanto, estarían implicados en los mecanismos de protección contra *R. solani*.

La baja concentración de proteínas, al igual que la alta concentración de otros compuestos nitrogenados y la alta concentración de los azúcares reductores exudados por las semillas no pregerminadas (NP y NPTH) pueden contribuir a la infección por *Rhizoctonia solani*, dado que estas semillas presentaron alta incidencia de la enfermedad.

Sin embargo, este hecho no explica la presencia de síntomas severos en semillas pregerminadas (P), cuyos exudados presentaron alta concentración de proteínas y baja concentración tanto de compuestos nitrogenados como de azúcares reductores. Esto sugiere que pueden existir otros compuestos, diferentes a las proteínas, aminoácidos, péptidos y azúcares reductores, que contribuirían en forma más directa a la infección por este patógeno.

Adicionalmente, el contenido de alta concentración de proteínas en los exudados de estas semillas indicaría la presencia de enzimas que podrían estar también implicadas en los mecanismos de defensa. Los exudados de semillas pregerminadas (P), las cuales también contenían alta cantidad de proteínas pero no fueron protegidas, diferirían de los de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (PTH) principalmente en el tipo y actividad enzimática de defensa. Posiblemente esta actividad enzimática de defensa pudo ser aportada, e inducida en las semillas PTH, por *T. koningii*.

La acción antimicrobiana de las plantas implicada en la resistencia contra fitopatógenos, también se ha relacionado con proteínas de la patogénesis, denominadas proteínas PR y de otras moléculas que pertenecen a grupos fenólicos y a otros grupos químicos. Algunas de las proteínas PR registradas en la literatura en diferentes

especies de plantas, como tomate, frijol y arveja, son las quitinasas (básica, ácida, vacuolar, apoplástica) (Granham et al., 1994) y las b-1,3- glucanasas (las mismas variantes), a las que se les ha demostrado actividad hidrolítica sobre paredes de hongos causantes de pudrición radical, como *Fusarium solani f. sp. phaseoli*, *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Benhamou et al., 1993). La importancia de las quitinasas se ha demostrado en otros modelos, como plantas de tabaco transgénicas que expresan el gen de la quitinasa de frijol bajo el control del promotor 35S del CaMV para la resistencia al patógeno *Rhizoctonia solani* (Broglie et al., 1991).

## CONCLUSIONES

Del total de los compuestos nitrogenados encontrados en los exudados, sólo una pequeña parte corresponde a proteína soluble. Así, en los exudados obtenidos después de doce horas de imbibición de semillas no pregerminadas (NP y NPTH), el 0.8% de los compuestos nitrogenados corresponden a proteína soluble y el 99.2 % a aminoácidos libres y péptidos (Figura N° 2 y 4). De igual forma, en los exudados de semillas pregerminadas (P y PTH) el 7 % de los compuestos nitrogenados, corresponden a proteína soluble, mientras el 93 % a aminoácidos libres y péptidos. Estos resultados muestran que los exudados de las semillas pregerminadas, en ausencia o presencia de *T. koningii* (P y PTH), contienen aproximadamente 9 veces más proteína que los exudados de las semillas sin pregerminar, sin tratar o tratadas con *T. koningii* (NP y NPTH). Para el caso de las semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii* (PTH), la alta protección del 82% contra *R. solani* puede relacionarse directamente con la alta concentración de proteínas e inversamente con la baja concentración de otros compuestos nitrogenados y de azúcares reductores, en sus exudados.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AHMAD, J.J., BAKER, R. (1988). Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Can J. Microbiol.* 34: 229-234.
- BENHAMOU, N.; BROGLIE, K.; BROGLIE, R., CHET, I. (1993). Antifungal effect of bean endochitinase on *Rhizoctonia solani*: ultrastructural changes and cytochemical aspects of chitin breakdown. *Can. J. microbiol.* 39: 318-328.
- BENITEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., CODÓN, A.C. (2004). Biolcontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. *International Microbiol.* 7: 239-248
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- BROGLIE, K.; CHET, Y.; HOLLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWLTON, S.; MAUVAIS, C.J., BROGLIE, R. (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1196.
- BUEE, M., ROSSIGNOL, M., JAUNEAU A, RANJEVA R., BÈCARD G. (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant Microbe interact.* 13: 693-698.
- CARDOSO, J.E., ECHANDI, E. (1987). Nature of protection of bean seedlings from *Rhizoctonia* root rot by binucleate *Rhizoctonia*-like fungus. *Phytopathology* 77: 1548-1551.
- GRANHAM, L.S., STICKLEN, M.B. (1994). Plant chitinases. *Can. J. Bot.* 72: 1057-1083.
- HAYMAN, D.S. (1969). The influence of temperature on the exudation of nutrients from cotton seeds and on preemergence damping-off by *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Bot.* 47:1663-1669.
- MORALES, G., Molinero-Rosales, N., Ocampo, J.A., García, J.M.. (2007). Endocellulase activity is associated with arbuscular mycorrhizal spread in pea symbiotic mutants but not with its ethylene content in root . *Soil Biol and Biochem.* 39 (3): 786-792
- NELSON N.J. (1944). A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucosa. *Biol. Chem.* 153: 375-380
- NELSON, E.B., CRAFT, Ch. M. (1989). Comparative germination of culture-produced and plant-produced sporangia of *Pythium ultimum* in response to soluble seed exudates and exudate components. *Phytopathology* 79:1009-1013.
- RODRÍGUEZ, F., COTES, A.M. (1.999). Contribución al estudio de los mecanismos de acción relacionados con la protección biológica del frijol contra *R. solani* mediante la utilización de una técnica de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. En: *Boletín Ascolfi* 25: 32 -35.
- SIGMA DIAGNOSTICS. (1995). Procedure N° 510. The enzymatic determination of glucose. Sigma chemical company d.b.a.
- SIVAN, A., CHET, I.(1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on *rhizosphere* colonization. *Phytopathology* 79: 198-203.
- SOMOGYI, M. (1952). Notes on sugar determination . *J. Biol. Chem.* 195:19-23
- WINDELS, C. (1991). Biological control in the rhizosphere: is it a war or a race?. Biological control of plant diseases. Proceedings of a symposium. Minnesota Agricultural Experimental Station. University of Minnesota