

## ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* (FUNGI: ASCOMYCOTA) A DIFERENTES TEMPERATURAS

### ANTAGONIST ACTIVITY OF *TRICHODERMA ASPERELLUM* (FUNGI: ASCOMYCOTA) AT DIFFERENT TEMPERATURES

Harold A. Vargas-Hoyos<sup>1,4</sup>, Ever A. Rueda-Lorza<sup>2,5</sup>, Elizabeth Gilchrist-Ramelli<sup>3,6</sup>

#### Resumen

El género *Trichoderma* (Fungi: Ascomycota: Sordariomycetes: Hypocreaceae) contiene especies con gran capacidad antagonista. Se ha determinado a la temperatura puede ser un factor limitante para el crecimiento de dichas especies. La evaluación in vitro puede sugerir su desempeño en campo, lo que permite evidenciar aislamientos viables para el uso en control biológico. En este trabajo se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la actividad antagonista de 27 aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. (Fungi: Agaricomycetes) y *Colletotrichum* sp. (Fungi: Sordariomycetes). De ellos, 16 y 9 presentaron inhibición  $\geq 70\%$  contra *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp., respectivamente. Los aislamientos T46, T84, T92 y T109 alcanzaron inhibición  $\geq 75\%$  para ambos fitopatógenos. Los aislamientos T46 y T109 fueron evaluados por su antagonismo frente a *Rhizoctonia* sp. a las temperaturas: 4, 10, 15, 20, 25, 30 °C. A excepción de 4 °C, en todas las temperaturas evaluadas, la inhibición del crecimiento del fitopatógeno fue  $\geq 75\%$ . A 30 °C, ambos antagonistas inhibieron el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. T46 en un 94% y T109 en un 95%. Se demostró actividad biológica en todas las temperaturas, confirmando el potencial antagonista de este microorganismo.

*Palabras clave:* antagonismo in-vitro, temperatura, *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., *Trichoderma* spp.

#### Abstract

The genus *Trichoderma* (Fungi: Ascomycota: Sordariomycetes: Hypocreaceae) contains species with high antagonistic capacity. It has been determined that the temperature can be a limiting factor for growth of these species. Evaluation in vitro may suggest their field performance, allowing evidence of viable isolates for use in biological control. In this paper, 27 isolates of *Trichoderma* spp. were assayed using a dual culture against *Rhizoctonia* sp. (Fungi: Agaricomycetes) and *Colletotrichum* sp. (Fungi: Sordariomycetes). From those, 16 and 9 showed an inhibition  $\geq 70\%$  against *Rhizoctonia* sp. and *Colletotrichum* sp., respectively. The isolates T46, T84, T92, and T109 achieved an inhibition  $\geq 75\%$  for both phytopathogens. These isolates were submitted to different temperatures: 4, 10, 15, 20, 25, and 30 °C in order to evaluate their antagonism against *Rhizoctonia* sp. With the exception of 4 °C, for every temperature assayed the inhibition in growth of the phytopathogen was  $\geq 75\%$ . For 30 °C both antagonists inhibited the growth of *Rhizoctonia* sp.; T46 at 94% and T109 at 95%. Biological activity was shown for all the temperatures, confirming the antagonistic potential of this microorganism.

*Key words:* in vitro antagonism, temperature, *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., *Trichoderma* spp.

Recibido: noviembre 2011. Aceptado: mayo 2012.

<sup>1</sup> Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. Medellín (Antioquia), Colombia.

<sup>2</sup> Corporación para Investigaciones Biológicas, Unidad de Fitosanidad y Control Biológico. Medellín (Antioquia), Colombia.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín). Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos: <sup>4</sup> <barharold@hotmail.com>; <sup>5</sup> <arueda@cib.org.co>; <sup>6</sup> <elygilchrist@hotmail.com>.

## INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Trichoderma* (Fungi: Ascomycota: Sordariomycetes: Hypocreaceae) están ampliamente distribuidas en el mundo (De Respinis et al. 2010). Dichas especies desarrollan papeles destacados en la ecología microbiana; se han catalogado como simbioses de plantas (Harman et al. 2004), parásitos de fitopatógenos (Benítez et al. 2004, Vinale et al. 2008) y promotoras de crecimiento vegetal (Chacón et al. 2007, Tarango et al. 2009). Por tal motivo, se considera a estos microorganismos como necesarios en la dinámica funcional del suelo.

Como la mayoría de organismos vivos, los hongos se ven afectados por los cambios en las condiciones ambientales, que dificultan su establecimiento y desarrollo (Hjeljord et al. 2000). En algunas situaciones se han descrito adaptaciones por parte de los microorganismos para sobrellevar las condiciones adversas, lo que ha resultado en características propias que les permiten cumplir exitosamente su ciclo de vida (Zak y Wildman 2004). Para los hongos empleados en el biocontrol no se describe un comportamiento igual en todos los casos, dado que cambios en las condiciones ambientales presentes en los sistemas agrícolas, puede reflejarse en la falta de efectividad al momento de controlar enfermedades de las plantas.

A la fecha se han identificado y clasificado más de cien especies de *Trichoderma* (Druzhinina et al. 2006). Lo cual evidencia la importancia de este microorganismo en el área de la micología y en especial del control biológico.

Las pruebas de antagonismo in vitro han sido ampliamente registradas y reconocidas, permiten evaluar la velocidad de colonización de microorganismos en un medio de cultivo particular en relación al enfrentamiento directo con un competidor. Por lo cual se convierte en una herramienta de primera elección para

conocer la actividad biológica de aislamientos antagonistas.

En general, la mayoría de especies del género *Trichoderma* se consideran mesófilas, la baja temperatura y el clima seco pueden llegar a influir negativamente en su actividad (Kredics et al. 2003, Samuels 2006). Según Zak y Wildman (2004), se consideran condiciones ambientales estresantes o adversas cuando los microorganismos son sometidos a situaciones que difieren de las denominadas “ideales” de crecimiento, bien sea en el laboratorio o en el campo. El efecto destacado de la temperatura en la fisiología del crecimiento de los hongos se evidencia por la inhibición en la elongación de la hifa, la disminución en: la germinación de las conidias (Santamarina y Rosello 2006) y de la formación del tubo germinal (Kredics et al. 2003), por ello se ha considerado este factor como limitante en el desarrollo de los microorganismos.

Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antagónica de 27 aislamientos de *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos y evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de algunos aislamientos seleccionados, con el fin de obtener aislamientos candidatos a realizar evaluaciones en condiciones de campo.

## MATERIALES y MÉTODOS

**Reactivación y mantenimiento de los aislamientos de *Trichoderma asperellum* y los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp.** Se reactivaron los aislamientos de *Trichoderma* spp., *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp. facilitados por la unidad de Fitosanidad y Control Biológico, de la Corporación para Investigaciones Biológicas (F y CB-CIB), Medellín. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados fueron: T18, T20, T21, T22, T23, T24, T25, T26, T27, T29, T30, T38, T46, T57, T58, T73, T74, T75, T79, T83,

T84, T86, T88, T90, T92, T109, T110 (tabla 1), descritos anteriormente por Hoyos-Carvajal et al. (2009) como estimuladores de crecimiento vegetal en frijol. Los aislamientos se reactivaron en medio de cultivo con agar granulado y

extracto de suelo, se cultivaron durante 7 días a  $25 \pm -2$  °C y se conservaron en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) a 4 °C, para su utilización se replicaron en igual medio y se incubaron a  $25 \pm -2$  °C.

**Tabla 1.** Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. (Fungi: Sordariomycetes) sobre *Rhizoctonia* sp. (Fungi: Agaricomycetes) y *Colletotrichum* sp. (Fungi: Sordariomycetes) [intervalo de confianza del 95%: \* =  $\pm 4,85$ ; \*\* =  $\pm 9,08$ ; las letras *a* y *b* representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ )]

Aislamiento	Especie	% de inhibición	
		<i>Rhizoctonia</i> sp.*	<i>Colletotrichum</i> sp.**
T18	<i>T. longibrachiatum</i>	68 ab	61 ab
T20	<i>T. asperellum</i>	75 ab	68 b
T21	<i>T. asperellum</i>	80 b	61 ab
T22	<i>T. asperellum</i>	80 b	57 ab
T23	<i>T. harzianum</i>	69 ab	25 a
T24	<i>T. harzianum</i>	71 ab	68 b
T25	<i>T. asperellum</i>	74 ab	51 ab
T26	<i>T. asperellum</i>	69 ab	70 b
T27	<i>T. asperellum</i>	68 ab	65 ab
T29	<i>T. longibrachiatum</i>	74 ab	63 ab
T30	<i>T. asperellum</i>	56 a	62 ab
T38	<i>T. asperellum</i>	78 ab	59 ab
T46	<i>T. asperellum</i>	81 b	78 b
T57	<i>T. asperellum</i>	73 ab	51 ab
T58	<i>T. asperellum</i>	72 ab	66 ab
T73	<i>T. longibrachiatum</i>	69 ab	61 ab
T74	<i>T. asperellum</i>	69 ab	68 b
T75	<i>T. asperellum</i>	81 b	64 ab
T79	<i>T. asperellum</i>	75 ab	66 ab
T83	<i>T. asperellum</i>	68 ab	74 b
T84	<i>T. asperellum</i>	81 b	75 b
T86	<i>T. asperellum</i>	69 ab	70 b
T88	<i>T. asperellum</i>	64 ab	70 b
T90	<i>T. asperellum</i>	76 ab	68 b
T92	<i>T. asperellum</i>	80 b	75 b
T109	<i>T. asperellum</i>	82 b	76 b
T110	<i>T. asperellum</i>	63 ab	76 b

**Pruebas de antagonismo in vitro.** Esta evaluación se realizó modificando la metodología de Asran-Amal et al. (2010), se enfrentaron los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia* sp. (aislado de cultivo de papa) y *Colletotrichum* sp. (de la colección de fitopatógenos de la F y CB-CIB), según la técnica de cultivo dual; en una caja de Petri con medio PDA, discos de 5 mm de diámetro provenientes de cultivos de 7 días de crecimiento en PDA, se sembraron en sentido opuesto y a una distancia de 3 cm. Se realizaron tres réplicas por cada enfrentamiento y se dejaron en incubación a  $25 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 12 h:12 h, durante 4 días. Para los controles, se sembró un disco de 5 mm de diámetro sin antagonista. Después del periodo de incubación se midió el radio de crecimiento micelial expresado en porcentaje de inhibición de crecimiento, calculado según la siguiente ecuación:

$$PI = (RL - Ri)/RL \times 100, \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde, **PI** (*porcentaje de inhibición*): proporción del radio de crecimiento afectado por el antagonista; **RL** (*radio libre*): radio de crecimiento micelial del patógeno en el control; **Ri** (*radio influenciado*): radio de crecimiento micelial del patógeno en presencia de *Trichoderma* spp. El experimento se repitió 2 veces en el tiempo.

**Observaciones microscópicas.** Se obtuvieron imágenes microscópicas de las hifas de los hongos sobre los cuales se evaluó la actividad antagonista con el fin de relacionarlo con los hallazgos macroscópicos, para ello se utilizó un microscopio *Nikon Eclipse E200* el cual tenía adaptada una cámara digital de alta definición *Nikon DS-Fi1*.

**Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* sp. contra *Rhizoctonia* sp.** De los aislamientos evaluados como antagonistas

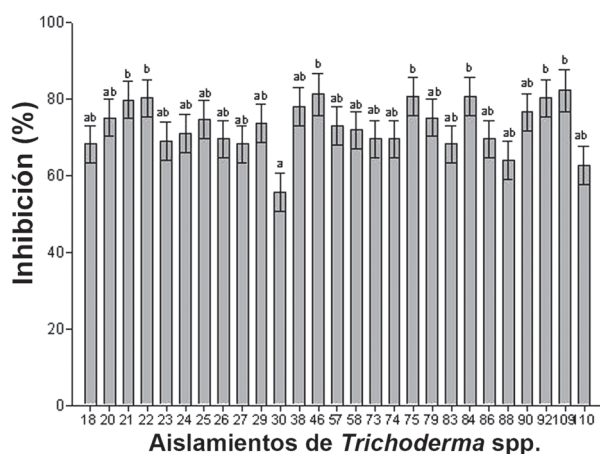
de *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp., se seleccionaron los dos que mejor actividad antagonista in vitro mostraron contra ambos fitopatógenos, y fueron *T. asperellum* T46 y T109. Cultivos en PDA de éstos aislamientos se incubaron a diferentes temperaturas: 4, 10, 15, 20, 25, 30 °C. Para cada temperatura, se realizó una curva de crecimiento hasta el día en el que el cultivo obtuvo el máximo crecimiento permitido en la caja de Petri. Las pruebas de antagonismo in vitro se realizaron según las modificaciones de la metodología de Asran-Amal et al. (2010), descritas anteriormente pero bajo las diferentes condiciones de temperatura. Se calculó la tasa de crecimiento con la ecuación de la pendiente de la curva tomando todos los puntos de medición (ecuación 1). El experimento se repitió 2 veces en el tiempo.

**Análisis estadístico.** Los tratamientos se compararon utilizando un análisis de varianza (ANOVA) seguida de la comparación de medias de *Tukey*. Se realizaron evaluaciones de homocedasticidad y normalidad de los datos utilizando las pruebas de *Levene* y *Kolmogorov-Smirnov*, respectivamente.

## RESULTADOS

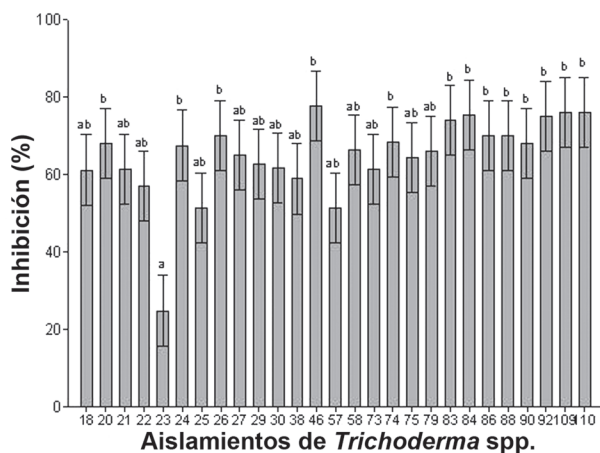
**Pruebas de antagonismo in vitro.** Los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron antagonismo contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp. Para *Rhizoctonia* sp., 16 de los 27 aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados presentaron un porcentaje de inhibición (**PI**) superior al 70%; de los cuales; los aislamientos T22, T46, T75, T84, T92 y T109 presentaron un  $PI \geq 80\%$ ; los aislamientos T20, T21, T38 y T79 un  $PI \geq 75\%$ ; y los aislamientos T24, T25, T29, T57, T58 y T90 un  $PI \geq 70\%$ . El aislamiento con menor actividad antagonista fue el T30 con un PI de 55,5% (figura 1).

Para *Colletotrichum* sp., 9 de los 27 aislamientos de *Trichoderma* evaluados presentaron un



**Figura 1.** Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. (Fungi: Sordariomycetes) sobre *Rhizoctonia* sp. (Fungi: Agaricomycetes) [las barras representan los intervalos de confianza del 95 %; las diferentes letras representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ )]

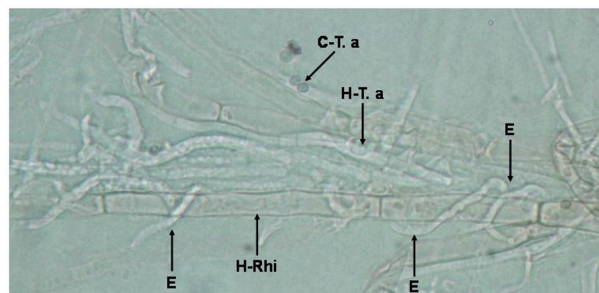
porcentaje de inhibición (PI) superior al 70%. Los aislamientos T46, T84, T92, T109 y T110 presentaron un PI  $\geq$  a 75%; y los aislamientos T26, T83, T86 y T88 presentaron un PI  $\geq$  a 70%. El aislamiento con menor actividad antagónica fue el T23 con un PI de 25% (figura 2).



**Figura 2.** Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. (Fungi: Sordariomycetes) sobre *Colletotrichum* sp. (Fungi: Sordariomycetes) [las barras representan los intervalos de confianza del 95 %; las diferentes letras representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ )]

Los aislamientos: T46, T84, T92 y T109 obtuvieron un PI  $\geq$  a 75% para ambos fitopatógenos, todos correspondientes a *T. asperellum* (tabla 1).

Se destaca el micoparasitismo de *T. asperellum* sobre el micelio del fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. (figura 3).



**Figura 3.** Micoparasitismo de *Trichoderma asperellum* sobre *Rhizoctonia* sp. a 25 °C, 40X. **H-Rhi** = hifa de *Rhizoctonia* sp. **H-T. a** = hifa de *T. asperellum*. **C-T. a** = conidia de *T. asperellum*. **E** = enrollamiento micelial de *T. asperellum* sobre *Rhizoctonia* sp.

**Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de los aislamientos de *Trichoderma* sp. contra *Rhizoctonia* sp.**

Los aislamientos de *Trichoderma asperellum* evaluados presentaron actividad antagónica en todas las temperaturas evaluadas. Existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. con y sin la presencia de los aislamientos T46 y T109 (figura 4). El tiempo de crecimiento de *Rhizoctonia* sp. para el control fue mayor en las temperaturas de 4 y 10 °C, 54 y 28 días después de sembrados, respectivamente. Para el resto de las temperaturas (15, 20, 25 y 30 °C) se realizó lectura hasta el día 8. A 25 °C fue la temperatura en la que más rápido se observó la colonización completa de la caja de Petri (día 6) (figura 4).

El crecimiento control de *Rhizoctonia* sp. fue significativamente ( $p < 0,001$ ) diferente al

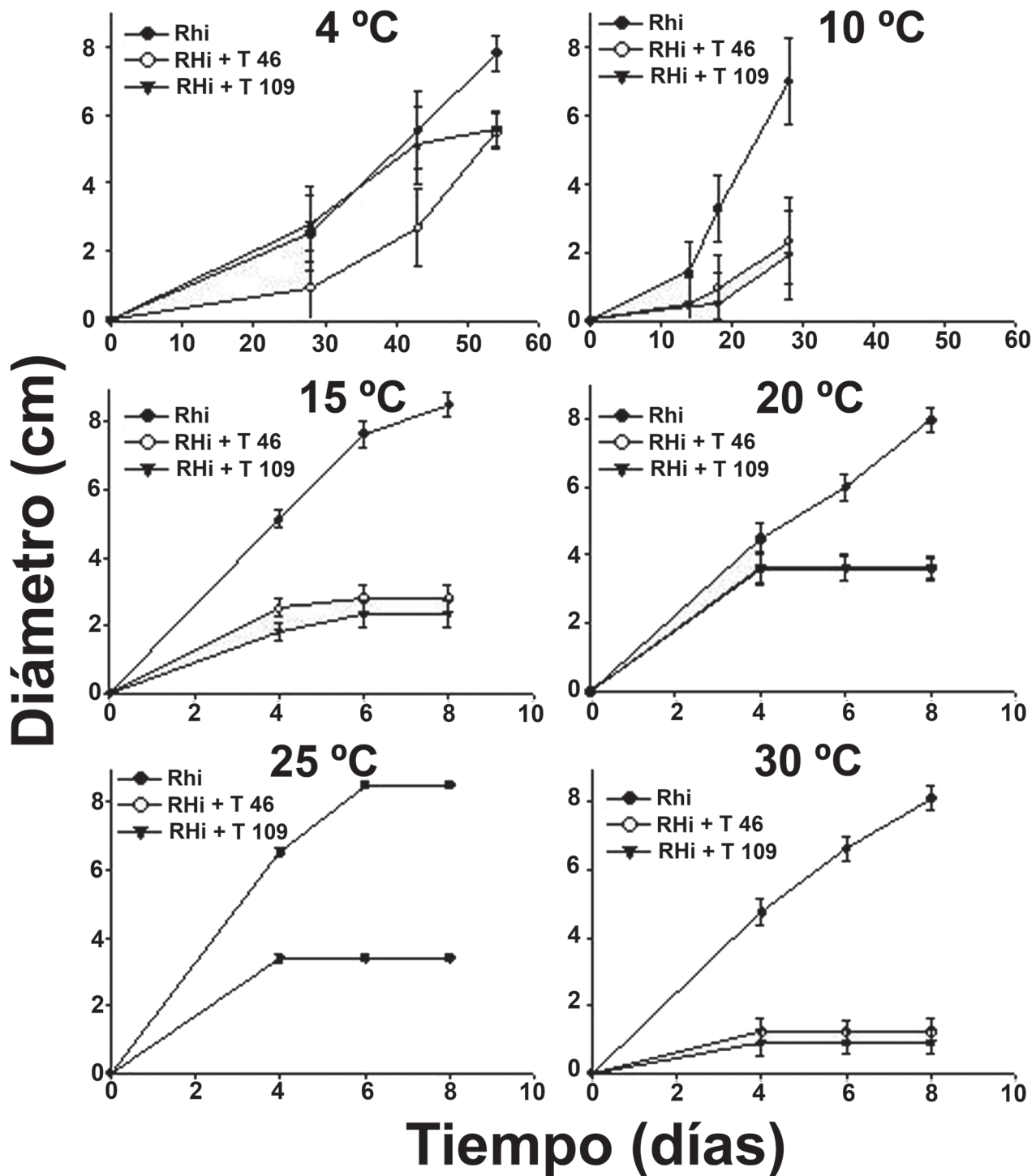
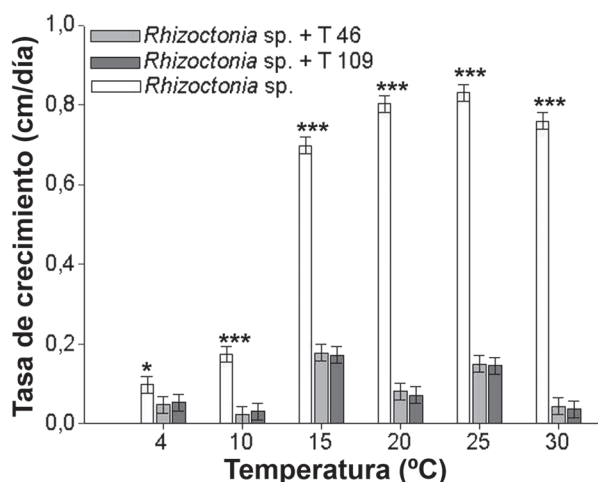


Figura 4. Crecimiento de *Rhizoctonia* sp. en presencia de *T. asperellum* T46 y T109 a diferentes temperaturas en PDA: 4, 10, 15, 20, 25 y 30 °C (las barras representan el intervalo de confianza del 95%)

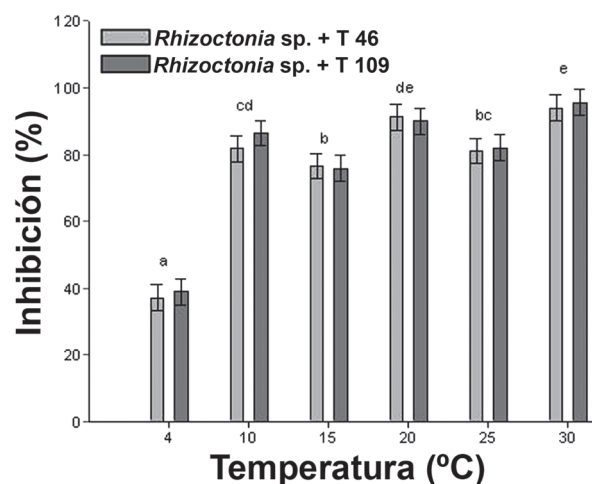
crecimiento en los enfrentamientos con T46 y T109 (figura 5). En promedio, el porcentaje de disminución en la tasa de crecimiento (cm/día) para *Rhizoctonia* sp. en presencia de los aislamientos de *T. asperellum* fue para 4 °C del 49%, para 10 °C del 84%, para 15 °C del 75%, para 20 °C del 90%, para 25 °C del 82% y para 30 °C del 95%. No se observaron diferencias significativas entre los aislamientos T46 y T109.



**Figura 5.** Efecto de *T. asperellum* T46 y T109 sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. a diferentes temperaturas en 4, 10, 15, 20, 25 y 30 °C [las barras representan el intervalo de confianza del 95%; los asteriscos (\*) representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) y altamente significativa ( $p < 0,001$ ) de los tratamientos para cada temperatura]

A excepción de 4 °C, en todas las temperaturas evaluadas el porcentaje de inhibición del crecimiento en *Rhizoctonia* sp. fue superior al 75% (figura 6).

A 30 °C hubo diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ), donde los aislamientos T46 y T109 inhibieron el crecimiento del fitopatógeno en 94 y 95%, respectivamente. En la temperatura de 4 °C, la inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* sp. fue de 37% (T46) y 38% (T109) (figura 6).



**Figura 6.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* sp. en presencia de *T. asperellum* T46 y T109 a diferentes temperaturas en PDA: 4, 10, 15, 20, 25 y 30 °C [las barras representan el intervalo de confianza del 95%; las diferentes letras representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ )]

## DISCUSIÓN

Las pruebas de antagonismo in-vitro evidenciaron aislamientos de *Trichoderma* spp. con actividad inhibitoria del crecimiento contra hongos fitopatógenos (figuras 1 y 2; tabla 1). Dado que se realizó la técnica de cultivo dual, la rapidez de crecimiento del antagonista disminuyó las expectativas de sobrevivencia del fitopatógeno en el medio empleado. Pero como tal, no es una técnica que permita evidenciar la capacidad micoparasítica del antagonista (Hoyos-Carvajal et al. 2008b). En cambio, puede revelar la velocidad de colonización de un sustrato definido bajo condiciones particulares. En el momento de realizar la determinación de la actividad antagonica, imágenes microscópicas revelaron una interacción favorable a los aislamientos antagonistas al presentar enrollamiento del micelio de *Trichoderma asperellum* sobre el micelio del fitopatógeno (figura 3), esta evidencia da indicios de actividad micoparasítica que conlleva a la muerte del fitopatógeno (Sivakumar et al. 2000). Los aislamientos con mejor capacidad antagonica se obtuvieron de

la especie *T. asperellum*, lo que coincide con reportes anteriores donde se resalta esta especie como importante controladora biológica (Benítez et al. 2004, Marcello et al. 2010). La evaluación realizada con *Rhizoctonia* sp. presentó mayor sensibilidad y menor variación en los resultados que la realizada sobre *Colletotrichum* sp. (figuras 1 y 2; tabla 1), el cual fue el criterio para seleccionar el primer fitopatógeno para las siguientes evaluaciones. De los 27 aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados frente a *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp., 25 presentaron un porcentaje de antagonismo mayor o igual a 70% para algún fitopatógeno. Contra *Rhizoctonia* sp. los aislamientos T21, T22 y T92 alcanzaron un porcentaje de antagonismo de 80%; T46, T75 y T84 alcanzaron un porcentaje de antagonismo de 81%, y se destaca el aislamiento T109 que logró la mayor inhibición con 82% (figura 1), esto coincide con lo publicado por Hoyos-Carvajal et al. (2008a), donde este aislamiento obtuvo una clasificación de “1” en el grado de micoparasitismo contra *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. De igual manera los aislamientos T46 y T84 se destacan por tener un alto grado de antagonismo in vitro sobre *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. (Hoyos-Carvajal et al. 2008b). Este mismo trabajo resalta un grupo de *T. asperellum* que sobresale sobre el resto de las especies evaluadas, de tal manera que de 73 aislamientos evaluados, el 49% presenta actividad antagónica específica y corresponde a aislamientos de esta especie, lo cual demuestra la alta prevalencia en toda la zona tropical y la capacidad de enfrentar microorganismos fitopatógenos.

Contra el fitopatógeno *Colletotrichum* sp. no se obtuvo porcentaje de antagonismo mayor o igual a 80%. El aislamiento T83 alcanzó un 74%, T84 y T92 alcanzaron un 75%, T109 y T110 alcanzaron un 76% y el mayor porcentaje de inhibición lo presentó el aislamiento T46 con un 78% (figura 2). Estas pruebas permitieron seleccionar los aislamientos que posteriormente

fueron evaluados con diferentes regímenes de temperatura.

Los aislamientos de *T. asperellum* T46 y T109, toleraron un ámbito amplio (4 a 30 °C) de temperatura demostrando actividad antagónica en todas las temperaturas evaluadas, confirmando el potencial antagónico de este microorganismo. Esto coincide con el trabajo de Antal et al. (2000), quienes al evaluar el crecimiento de 360 cepas de *Trichoderma* spp. a 5 y 10 °C encontraron que el hongo puede tolerar estas temperaturas y presentar actividad antagónica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Pythium debaryanum* y *Rhizoctonia solani*. En este mismo trabajo se registró la producción de estructuras de invasión (aprosorios) a 10 °C y se hace referencia a trabajos previos donde se indica que este tipo de interacciones no son dependientes de la temperatura. De igual manera, Singh et al. (2009) evaluaron un grupo de hongos antagonistas con el fin de determinar la capacidad antagónica y de “desplazamiento” sobre el fitopatógeno *Fusarium pseudograminearum* en restos de cosecha de trigo, evaluaron 2 aislamientos de *Trichoderma harzianum* y observaron buena capacidad de crecimiento en todas las temperaturas excepto a 5 °C en PDA. Al realizar las evaluaciones de antagonismo y desplazamiento encontraron fuerte antagonismo en las temperaturas evaluadas y alto índice de desplazamiento entre 20 y 35 °C, lo cual evidencia el efecto de la temperatura en la capacidad antagónica y biológica de los aislamientos de *T. harzianum*.

En todas las temperaturas evaluadas, excepto 4 °C, la inhibición se presentó desde el primer día de lectura (figura 4), lo que evidenció la capacidad de *Trichoderma asperellum* para colonizar rápidamente el sustrato y ejercer control sobre el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. Para 4 °C la inhibición se estableció a los 54 días para ambos aislamientos (figura 4). Esta

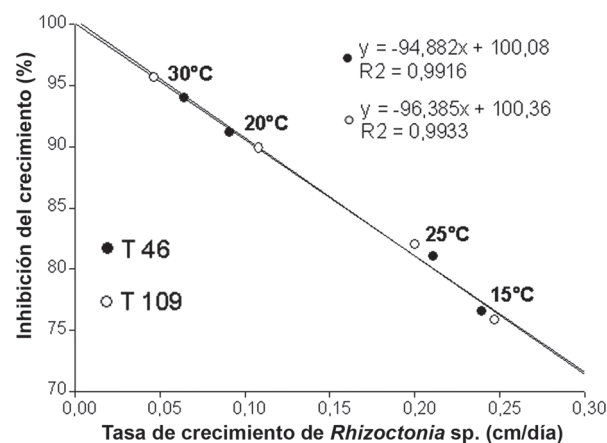


cualidad se incrementó en las temperaturas altas (25 y 30 °C) (figura 5) y coincide con lo registrado por Schubert et al. (2009) quienes evaluaron varios rangos de temperatura para *Trichoderma* sp. encontrando mejor crecimiento en los medios de cultivo evaluados a 25 y 30 °C; así mismo determinaron una disminución en la tasa de crecimiento proporcional a la disminución de la temperatura. De igual manera Mukherjee y Raghu (1997), determinaron el rango óptimo de crecimiento para un aislamiento de *Trichoderma* sp. obtenido de esclerocios de *S. rolfsii* entre 25 y 30 °C, y encontraron un sobrecrecimiento de *Trichoderma* sp. al realizar enfrentamiento directo en medio de cultivo PDA.

Los resultados muestran que los aislamientos de *Trichoderma asperellum* T46 y T109, presentaron capacidad antagonista que se puede evidenciar en temperaturas desde los 4 hasta los 30 °C (figura 6), presentando diferentes velocidades de respuesta según la temperatura pero sin existir un cambio drástico en su comportamiento. Al relacionar los datos del porcentaje de inhibición y la tasa de crecimiento de *Rhizoctonia* sp. en presencia de *T. asperellum* a 30, 25, 20 y 15 °C, se evidenció efecto de la temperatura sobre la capacidad inhibitoria de los aislamientos de *T. asperellum* (figura 7), de tal manera, a menor temperatura se observó menor porcentaje inhibitorio y mayor tasa de crecimiento del fitopatógeno. La pendiente en ambos casos fue negativa y el  $R^2$  fue de 0,9916 y 0,9933 para *Rhizoctonia* sp. enfrentada con T46 y T109, respectivamente, demostrando que la capacidad antagonista depende en gran medida del desarrollo del antagonista y esta a su vez puede llegar a ser influenciada por factores presentes en diferentes ambientes donde concurren antagonistas y patógenos.

## CONCLUSIONES

En este trabajo los aislamientos evaluados de *Trichoderma* spp. presentaron efecto antagonista significativo sobre *Rhizoctonia*



**Figura 7.** Relación del porcentaje de inhibición y la tasa de crecimiento de *Rhizoctonia* sp. en presencia de *T. asperellum* a 30, 25, 20 y 15 °C

sp. y *Colletotrichum* sp. lo cual permite seleccionar estos aislamientos como potenciales herramientas para el control biológico.

En el ensayo de antagonismo in vitro realizado con *T. asperellum* sobre *Rhizoctonia* sp. a 25 °C, se observó la capacidad micoparasítica del hongo antagonista, evidenciada por la habilidad de realizar “enrollamiento” sobre la hifa del fitopatógeno. Cuatro aislamientos de *T. asperellum* (T46, T84, T92 y T109) presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento sobre ambos fitopatógenos, consolidando esta especie como buena antagonista.

Los aislamientos de *T. asperellum* pueden crecer en un amplio rango de temperaturas, lo cual demuestra su capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes, el mayor porcentaje de inhibición de *T. asperellum* sobre *Rhizoctonia* sp. estuvo entre 20 y 30 °C, sugiriendo que la temperatura óptima de crecimiento para el antagonista está en ese intervalo. La temperatura juega un papel determinante en el crecimiento y capacidad antagonista de *T. asperellum*, dado que a bajas temperaturas se disminuye la velocidad

de elongación de la hifa y la obtención de nutrientes, por lo tanto se retardan todos los procesos metabólicos involucrados en el control de fitopatógenos.

## AGRADECIMIENTOS

A la *Corporación para investigaciones biológicas* por facilitar del material biológico. Este trabajo se realizó gracias al soporte financiero de Colciencias: Proyecto # 15959-Contrato 298 de 2008 y a la Dirección de Laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

## REFERENCIAS

- Antal Z, Manczinger L, Szakacs G, Tengerdy RP, Ferenczy L. 2000. Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycological Research*, 104 (5): 545-549.
- Asran-Amal A, Moustafa-Mahmoud SM, Sabet KK, El Banna OH. 2010. *In vitro* antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17: 153-157.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Chacón MR, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado-Jarana J. 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*, 10 (1): 19-27.
- Chang YC, Chang YC, Baker R, Kleifiel O, Chet I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant disease*, 70: 145-148.
- De Respini S, Vogel G, Benagli C, Tonolla M, Petrini O, Samuels GJ. 2010. MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: A model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, 9: 79-100.
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47: 55-64.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews: Microbiology*, 2: 43-56.
- Hjeljord LG, Stensvand A, Tronsmo A. 2000. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biological Control*, 19: 149-160.
- Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I., Orduz, S. 2008(a). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*. 26 (3): 451-458.
- Hoyos-Carvajal L, Duque G, Orduz S, 2008(b). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2 (1): 76-86.
- Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bisset J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* (51): 409-416.
- Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41 (1): 37-42.
- Marcello CM, Steindorff AS, Silva SP, Silva RN, Bataus LAM, Ulhoa CJ. 2010. Expression analysis of the *exo-b-1,3-glucanase* from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, 165: 75-81.
- Mukherjee PK, Raghu K. 1997. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*. *Mycopathologia*, 139: 151-155.
- Samuels GJ. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96: 195-206.
- Santamarina MP, Rosello J. 2006. Influence of temperature and water activity on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. *Crop Protection*, 25: 1130-1134.
- Schubert M, Mourad S, Fink S, Schwarze FW. 2009. Ecophysiological responses of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* (T-15603.1) to combined environmental parameters. *Biological Control*, 49: 84-90.
- Singh DP, Backhouse D, Kristiansen P. 2009. Interactions of temperature and water potential in displacement of *Fusarium pseudograminearum* from cereal residues by fungal antagonists. *Biological Control*, 48: 188-195.
- Sivakumar D, Wijeratnam RSW, Abeysekara M, Wijesundara RLC, Marikar FMT, Abeysekara M. 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of Rambutan. *Phytoparasitica*, 28 3: 240-247.
- Tarango SH, Nevárez VG, Orrantia E. 2009. Growth, yield and nutrient status of pecans fertilized with biosolids and inoculated with rizosphere fungi. *Bioresource Technology*, 100: 1992-1998.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL, Lorito M. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 80-86.
- Zak JC, Wildman H. 2004. Fungi in stressful environments. En: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. San Diego (California, U. S. A.): Elsevier Academic Press. p. 303-315.