

Evaluación de aislamientos de *Trichoderma spp.* contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero

Evaluation of *Trichoderma spp.* isolates against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* under *in vitro* and greenhouse conditions

Lilliana Hoyos-Carvajal¹, Paola Chaparro², Miriam Abramsky³, Ilan Chet³ y Sergio Orduz⁴

RESUMEN

Se evaluó la eficacia biológica de ocho aislamientos de *Trichoderma spp.* provenientes de suelos de Colombia para el control de los agentes causales de volcamiento, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Los análisis *in vitro* mostraron la capacidad antagonista de todos los aislamientos evaluados. En condiciones de invernadero, cuatro aislamientos fueron altamente eficaces contra *S. rolfsii* en plantas de frijol en semillero (>90% de reducción de la enfermedad) y dos aislamientos fueron eficaces contra *R. solani* en plantas de algodón en semillero (58 y 61% de reducción de la enfermedad). El análisis UP-PCR y DS-PCR permitió determinar tres grupos de aislamientos; dentro de estas asociaciones formadas no se encontró ninguna relación evidente entre la posición en el dendrograma y la actividad antagonista, pero sí permitió separar las especies de *Trichoderma* por grupos, e incluso encontrar diferencias dentro de aislamientos de una misma especie. Los resultados muestran que el comportamiento micoparasítico de los aislamientos de *Trichoderma spp.* varía según el hongo fitopatógeno, evidenciando una amplia especificidad del antagonista por su sustrato, es decir por el hongo atacado; por lo tanto es necesario realizar cuidadosas selecciones del aislamiento de *Trichoderma* que se utilice en programas de control de fitopatógenos.

Palabras clave: eficacia biológica, control biológico, hongo fitopatógeno, UP-PCR, DS-PCR

ABSTRACT

The biological effectiveness of eight isolates of *Trichoderma spp.* coming from Colombian soils was evaluated under *in vitro* and greenhouse conditions for the controlled causal agents of damping-off, *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *In vitro* analysis showed the antagonistic capacity of all evaluated isolates. Under greenhouse conditions, four isolates were highly effective against *S. rolfsii* in bean nursery plants (>90% of disease reduction) and two isolates were effective against *R. solani* in cotton nursery plants (58 and 61% of disease reduction). The analysis UP-PCR and DS-PCR permitted the determination of three groups of isolates. Within these associations no clear link between the position in the dendrogram and antagonistic activity was found, but it allowed separation of species of *Trichoderma* by groups and even within isolates of the same species. The results indicate that the mycoparasitic capacity of *Trichoderma spp.* varies according to the phytopathogen fungi, showing a broad specificity of the antagonist for its substrate that is attacked by the fungus. Therefore it is necessary to make careful selections of the isolates of *Trichoderma* to be used in pathogens control programs.

Key words: biological effectiveness, biological control, phytopathogen fungi, UP-PCR, DS-PCR.

Introducción

Los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. causan enfermedades en los tallos y las raíces de una gran variedad de cultivos y son responsables del volcamiento de plántulas de semillero y pudriciones en etapas de pre y posemergencia (Adams, 1990; Goldman *et al.*, 1994). Estas dos especies de fitopatógenos ocupan

nichos ecológicos similares y su rango de hospederos es semejante; sus estructuras de resistencia están constituidas por esclerocios que pueden permanecer viables en el suelo hasta 10 años y pueden escapar con facilidad de la acción de los fungicidas de origen sintético (Adams, 1990). El control con fungicidas de origen sintético se hace difícil debido a que se han de atacar los esclerocios remanentes en el suelo y se debe mantener la acción tóxica en el tiempo.

Fecha de recepción: 11 de marzo de 2008. Aceptado para publicación: 5 de noviembre de 2008

¹ Profesora auxiliar, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. limhoyosca@unal.edu.co

² Investigadora, Research Associate Microbiology Department, San Antonio, Texas (USA). pao48@hotmail.com

³ Investigadores, Facultad de Agricultura, Universidad Hebrea de Jerusalén, Jerusalén (Israel). chet@agri.huji.ac.il

⁴ Profesor asociado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín; Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín (Colombia). sorduzp@unalmed.edu.co

Por esta razón, las dos especies de hongos fitopatógenos son un buen objetivo para seleccionar un agente de control biológico que pueda reducir los nuevos propágulos generados por los fitopatógenos y además que se multiplique y colonice el suelo donde se hallan las estructuras infectivas de los patógenos; estas características las ofrecen hongos antagonistas como *Trichoderma spp.* (Mathivanan *et al.*, 2000). Tanto *R. solani* como *S. rolfsii* son susceptibles al ataque de algunos aislamientos de *Trichoderma spp.* Se ha encontrado actividad micoparasítica contra *Rhizoctonia spp.* en aislamientos de *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. viride*, *T. virens* y *Trichoderma sp.* (Howell *et al.*, 2000; Jakhar *et al.*, 1998; Jeffries y Young, 1994; Lewis *et al.*, 1996). También *Sclerotium spp.* es parasitado por aislamientos de *T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. hamatum* y *T. harzianum* (Inbar *et al.*, 1996; Lewis y Fravel, 1996), y algunas de estas cepas presentan actividad antagónica sobre ambos fitopatógenos. En condiciones controladas y de campo se ha demostrado la eficacia de *Trichoderma* para controlar enfermedades causadas por *R. solani* en plantas de algodón, lechuga, berenjena, oca y girasol, logrando reducciones significativas del patógeno en estos cultivos (Chun y Choi, 1990; Mathivanan *et al.*, 2000).

La selectividad de aislamientos particulares de *Trichoderma* sobre los fitopatógenos se debe a factores de reconocimiento que determinan en forma inicial la acción de antagonismo de un hongo sobre otro y que, posteriormente, desencadenan respuestas típicas de micoparasitismo, como producción de enzimas líticas. En estudios respecto al mecanismo de acción de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia spp.* y *Sclerotium spp.* se ha encontrado que la interacción inicial entre antagonista y fitopatógeno obedece a la acción de lectinas durante el proceso de reconocimiento y posteriormente se inicia la liberación al medio de diversas enzimas con actividad quitinolítica, gluconolítica, celolítica y proteolítica (Carsolio *et al.*, 1999; El-Katatny *et al.*, 2001; Inbar *et al.*, 1996) que tienen como finalidad degradar las estructuras del hongo fitopatógeno y después nutrirse de los productos resultantes de la actividad enzimática (Goldman *et al.*, 1994). También se ha demostrado que en la interacción *Trichoderma*-planta-patógeno hay mediación directa del antagonista sobre la planta para que el patógeno no la ataque; una revisión reciente del fenómeno la realizó Howell (2006), y en ella se exponen algunos mecanismos mediante los cuales la planta de algodón puede escapar del ataque de patógenos; *Trichoderma* modula o estimula algunas respuestas en la planta. *T. virens* elicit la producción de terpenoides sobre la planta de algodón, haciendo que

esta se proteja contra la infección por *R. solani* (Hanson y Howell, 2004).

Con el fin de conocer qué rango de especies o tipos de aislamientos de *Trichoderma* son antagónicos sobre un organismo en particular y garantizar la calidad en posteriores formulaciones es necesario llevar a cabo pruebas para la identificación del hongo de interés. Con tal finalidad se han utilizado marcadores multisitio que ofrecen información de la especie y permiten hacer un monitoreo a nivel infragenérico (o infraespecífico); tales marcadores incluyen DS-PCR (reacción en cadena de la polimerasa, PCR, de doble estringencia) (Lubeck *et al.*, 1999) y UP-PCR (PCR con iniciadores universales) (Matioli y Brito, 1995). Estos últimos se han utilizado en la identificación de cepas de *Trichoderma* con alta actividad micoparasítica. Tanto los marcadores UP-PCR como los DS-PCR son similares a los RAPD (amplificación al azar de fragmentos polimórficos) ya que sin previo conocimiento de la secuencia a amplificar se generan múltiples bandas. No obstante, la UP-PCR y la DS-PCR utilizan temperaturas de alineamiento relativamente altas (>53 °C), características que les confieren alta reproducibilidad en los patrones de bandas generados.

Con estos antecedentes se planteó como objetivo de este estudio evaluar la capacidad de ocho aislamientos de *Trichoderma spp.*, de Colombia, para reducir las enfermedades causadas por *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones de laboratorio y de invernadero y utilizar marcadores moleculares UP-PCR y DS-PCR como criterio para la identificación de las especies de los aislamientos de *Trichoderma* y para un posible establecimiento de relaciones entre la actividad micoparasítica de *Trichoderma* sobre los fitopatógenos empleados en el presente estudio.

Materiales y métodos

Material biológico

Se estudiaron 7 aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (T-21, T-25, T-26, T-71, T-86, T-109 y T-110) y 1 de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (T-29), para un total de 8 aislamientos, procedentes de la colección de microorganismos de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), obtenidos en suelos de la sabana Cundiboyacense e identificados mediante caracteres moleculares, morfológicos y metabólicos (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009). Para el análisis molecular, además de los aislamientos de *Trichoderma* se incluyeron una cepa de *Gliocladium spp.* G-56 y una de *Fusarium spp.* Los aislamientos

de patógenos de algodón y frijol para los estudios *in vitro* se colectaron en Colombia y se identificaron mediante caracteres morfológicos (Barnett, 1960). El experimento de invernadero se ejecutó en la Facultad de Agricultura de la Universidad Hebrea de Jerusalén. Todos los hongos se mantuvieron en PDA y se subcultivaron según lo requerido a 25 °C.

Análisis de antagonismo *in vitro*

Los aislamientos de *Trichoderma spp.* se evaluaron contra *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. y se determinó su capacidad antagonica de acuerdo con el sistema de rangos descrito por Royse y Ries (1978). Para tal fin, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con PDA se colocaron discos de 4 mm de diámetro del antagonista y del fitopatógeno a una distancia de 3 cm; la distancia de los microorganismos con respecto al borde de la caja de Petri fue de 3 cm. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se mantuvo a 20 °C en fotoperíodo 12:12 (luz:oscuridad) durante 4 días. El grado de antagonismo se evaluó según una escala en proporciones crecientes, donde un valor de 1 representa un cubrimiento del 100% de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno y 5 la ausencia de desarrollo del antagonista y crecimiento de un 100% del fitopatógeno. Un aislamiento de *Trichoderma* se consideró antagonista contra el patógeno si el promedio de los grados para una comparación determinada (3 cajas de Petri) era ≤ 2 , y no antagonista si el promedio era ≥ 3 . A los aislamientos con un grado entre 2 y 3 no se les asignó clasificación (Roise y Ries, 1978). El análisis estadístico de los experimentos *in vitro* se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con el programa Statistica versión 5.1 - 1998 (StatSoft, Inc.) y la separación de grupos estadísticamente homogéneos se llevó a cabo por medio de la prueba de gráfico de cajas y bigotes (*box and whisker plots*).

Experimentos en invernadero

Los experimentos se realizaron en semilleros de algodón (*Gossypium barbadense* L.) y de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con potes de 0,5 kg de tierra (arcillo-arenosa, pH 7,4). Se inocularon simultáneamente en los potes las conidias de *Trichoderma* (1×10^6 conidias/g de tierra) y los hongos patógenos. *R. solani* (2 g micelio/kg de tierra) para inducir síntomas de mal del tallo en algodón y *S. rolfsii* (80 mg micelio/kg de tierra) para inducir síntomas de moho blanco en el frijol. Se dejó un tratamiento denominado control absoluto en el cual no se inocularon hongos, y otro denominado testigo enfermo el cual fue inoculado solamente con el fitopatógeno. Las condiciones de crecimiento de las plantas se controlaron en un invernadero a 25-27 °C de temperatura y a 70-80% de humedad relativa. Cada

experimento constaba de 10 réplicas y se realizó en tres épocas diferentes.

Los síntomas de la enfermedad se registraron 7 días después del tratamiento. La incidencia se definió como porcentaje de plantas enfermas y la reducción de la enfermedad se determinó como $100 \times (X-Y/X)$, donde X es el número de plantas enfermas en el testigo enfermo y Y las plantas enfermas en cada tratamiento. Para el análisis estadístico de los experimentos de invernadero se realizó un Anova y comparaciones de Tukey, en un diseño totalmente al azar con el programa Statistica versión 5.1 - 1998 (StatSoft, Inc.).

Extracción de ADN

Se efectuó de acuerdo con el método modificado descrito por Castle *et al.* (1998). Los aislamientos de los hongos se cultivaron en medio líquido (extracto de levadura 2,5%, glucosa 2,5%, NaNO_3 0,2%) durante ocho días a 28 °C y 125 rpm. Posteriormente se recuperó el micelio por filtración y se liofilizó. Un gramo del micelio liofilizado se maceró en nitrógeno líquido, se le agregaron 7,5 mL de *buffer* de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,2; 50 mM EDTA; 3% SDS; 1 M NaCl; 1% Mercaptoetanol) y se incubó a 60 °C por una hora, mezclando cada 10 min. Después se adicionó un volumen de cloroformo:isoamil alcohol (24:1) y se mezcló por inversión hasta formar una emulsión. Luego se centrifugó a 4 °C, 6.000 g por 15 min y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. El tratamiento con cloroformo:isoamil alcohol se realizó dos veces más. Posteriormente se añadieron 0,54 volúmenes de Isopropanol, se centrifugó a 4 °C, 3.500 g por 5 min, el *pellet* se secó al vacío y se resuspendió en 300 μL de *buffer* Tris EDTA. A continuación se realizó una digestión con ARNasa A en concentración final de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se incubó a 37 °C por 30 min. Después se adicionó acetato de sodio pH 5,2 a una concentración final de 0,3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto y luego se centrifugó a 4 °C, 3.000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 500 μL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 4 °C, 3.000 g por 10 min. Posteriormente el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 300 μL de *buffer* Tris EDTA. Por último las muestras se centrifugaron a 4 °C, 1.350 g durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos. La integridad de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio y se midió la concentración por densitometría usando el software Quantive One 4.0.3 (Biorad), comparando la intensidad de las bandas de interés con el marcador de peso molecular low DNA mass ladder (Gibco BRL).

DS-PCR

Se usaron los *primers* para microsatélites A137 (5' GGCTCGAAGTGGACTAGCAC 3') y B175 (5'TATA CCTTTCGTTTCGGCCTG 3') y los *primers* RAPD OPM02 (5'-ACAACGCCTC-3'), OPM07 (5'-CCGTGACTCA-3') y OPM-08 (5'-TCTGTTCCCC-3'); en las combinaciones, A137-OPM02, B175-OPM08 y 58A-OPM07. La reacción de amplificación contenía *buffer* PCR 1X, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM, *primer* microsatélite 0,8 μM, *primer* RAPD 1,6 μM, *Taq polimerasa* 1 U (Gibco BRL), 25 ng de ADN y agua destilada estéril hasta completar un volumen de 25 μL. El programa de amplificación se realizó en dos fases: la primera consistió en 15 ciclos de 94 °C por 20 s 53 °C por 1 min y 72 °C por 20 s. En la segunda fase se realizaron 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 35 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. El programa de amplificación incluyó una denaturación inicial de 94 °C por 2 min y una elongación final de 72 °C por 1 min (Matioli y Brito, 1995).

UP-PCR

La técnica UP-PCR contempla el uso de un único *primer* de aproximadamente 16-21 nucleótidos en longitud y un máximo de 30 ciclos en cada reacción de amplificación. En este trabajo se utilizaron los *primers* L-45 5'-GTAAAC-GACGGCCAGT-3' y L-15/AS19 5'-GAGGGTGGCGGC-TAG-3' (Lubeck *et al.*, 1999). Las concentraciones de los reactivos fueron las mismas utilizadas para DS-PCR; el programa de amplificación incluyó una denaturación inicial a 94 °C por 2,5 min, seguida por 30 ciclos de 92 °C por 50 s, 53 °C por 90 s y 72 °C por 30 s, finalizando con una fase de extensión de 72 °C por 3 min.

Análisis

Todas las reacciones de amplificación se realizaron al menos dos veces y la separación de los productos amplificados por DS-PCR y UP-PCR se efectuó en geles de poliacrilamida al 12% y se revelaron con AgNO₃ (Sambrook *et al.*, 1989).

Los resultados obtenidos con los marcadores moleculares se analizaron con el algoritmo de grupos de medias aritméticas (Uppma) y el coeficiente de similitud de Jackard que permitió la construcción de un dendrograma construido con el software Statistica (StatSoft, Inc.), versión 5.1, que muestra las relaciones entre los aislamientos analizados.

Resultados y discusión

Antagonismo *in vitro* y en invernadero de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii* y *R. solani*

Los aislamientos de *Trichoderma spp.* evaluados contra *S. rolfsii* mostraron 100% de actividad antagonica. De acuerdo con resultados preliminares de los ensayos de antagonismo *in vitro*, sobre el aislamiento evaluado de *R. solani* es necesario el establecimiento inicial de *Trichoderma spp.* en las cajas de Petri de 12 a 24 h antes, ya que el crecimiento del antagonista es menor en comparación con el del fitopatógeno durante los 3 a 5 días iniciales, pero al cabo del noveno día *Trichoderma spp.* logra establecerse sobre *R. solani* y parasitar totalmente su micelio. Todos los aislamientos, excepto T-71 (*T. asperellum*), mostraron un 100% de actividad antagonica para *R. solani* (tabla 1). De acuerdo con los resultados de los ensayos de antagonismo *in vitro*, todos los aislamientos utilizados en este estudio poseen actividad antagonica sobre los aislamientos empleados de *S. rolfsii* y *R. solani*; no obstante, en pruebas *in vitro* con este último, tal como se mencionó anteriormente, es necesario el establecimiento inicial de los aislamientos de *Trichoderma* en las cajas de Petri.

En condiciones de invernadero los aislamientos *T. asperellum* T-21 y T-71 fueron efectivos controlando la infección causada por *S. rolfsii*. En tratamientos con estos antagonistas la enfermedad tuvo una incidencia entre 3,3 y 3,7% en semilleros de plantas de frijol, logrando una reducción superior al 90% (tabla 2). T-86, T-109 y T-110 (*T. asperellum*)

TABLA 1. Grado de micoparasitismo de *Trichoderma spp.* sobre *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones *in vitro*.

Aislamiento	Especie	Grado de micoparasitismo	
		<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i>
T-25	<i>T. asperellum</i>	1,00 a	1,00 a
T-26	<i>T. asperellum</i>	1,00 a	1,00 a
T-29	<i>T. longibrachiatum</i>	1,00 a	1,00 a
T-109	<i>T. asperellum</i>	1,00 a	1,00 a
T-110	<i>T. asperellum</i>	1,00 a	1,00 a
T-21	<i>T. asperellum</i>	1,00 a	1,00 a
T-86	<i>T. asperellum</i>	1,33 a	1,33 a
T-71	<i>T. asperellum</i>	2,33 b	1,00 a

Los valores promedio de cada tratamiento seguidos de la misma letra son grupos estadísticamente homogéneos (prueba de Cajas y Bigotes).

TABLA 2. Control *Sclerotium rolfsii* en plantas de frijol por siete aislamientos de *Trichoderma spp.* en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Especie	Porcentaje de incidencia	Porcentaje de reducción de la enfermedad
T-21	<i>T. asperellum</i>	3,70 a	91,93 a
T-26	<i>T. asperellum</i>	50,00 c	9,65 bc
T-71	<i>T. asperellum</i>	3,33 a	92,10 a
T-86	<i>T. asperellum</i>	3,33 a	58,77 abc
T-109	<i>T. asperellum</i>	10,74 ab	74,56 ab
T-110	<i>T. asperellum</i>	22,22 abc	47,37 abc
T-29	<i>T. longibrachiatum</i>	14,44 ab	65,79 abc
Testigo relativo		42,22 bc	0,00 c
Testigo absoluto		0,00 a	100,00 a

Tratamientos con la misma letra indican grupos homogéneos (Tukey $\alpha=0,05$).

TABLA 3. Control de ocho aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre *Rhizoctonia solani* en semillas de algodón en condiciones de invernadero.

Aislamiento	Especie	Porcentaje de incidencia	Porcentaje de reducción de la enfermedad
T-21	<i>T. asperellum</i>	38,68 bc	35,41 bcd
T-25	<i>T. asperellum</i>	31,64 abc	40,51 bcd
T-26	<i>T. asperellum</i>	20,20 ab	59,86 b
T-71	<i>T. asperellum</i>	28,29 abc	43,79 bcd
T-86	<i>T. asperellum</i>	41,11 bc	42,99 bcd
T-109	<i>T. asperellum</i>	21,10 ab	58,08 bc
T-110	<i>T. asperellum</i>	44,49 bc	14,99 cd
T-29	<i>T. longibrachiatum</i>	38,73 bc	29,03 bcd
T. absoluto		0,00 a	100,00 a
T. enfermedad		50,34 c	8,61 d

Tratamientos con la misma letra indican grupos homogéneos (Tukey $\alpha=0,05$).

y T-29 (*T. longibrachiatum*) presentaron una actividad antagónica media en condiciones de invernadero, con porcentajes de reducción de la enfermedad entre 47 y 74%. El aislamiento T-26 de *T. asperellum* no mostró actividad controladora y presentó valores de incidencia de la enfermedad similares a los de las plantas inoculadas con el fitopatógeno (únicamente 50%). La disminución de la incidencia de la enfermedad causada por *R. solani* observada en semilleros de plantas de algodón fue menor que en el caso anterior (tabla 3). Los aislamientos T-26 y T-109 de *T. asperellum* presentaron una reducción de la enfermedad cercana a un 60% con respecto a las plantas inoculadas únicamente con *R. solani* en las cuales la incidencia del “mal de tallo” fue de un 50%. Tratamientos de *T. asperellum* T-21, T-25, T-71 y T-86 y *T. longibrachiatum* T-29 presentan valores intermedios de control de la enfermedad con porcentajes de reducción de incidencia entre 29 y 43%. La actividad más baja en control de *R. solani* se presentó en el tratamiento con el aislamiento T-110 de *T. asperellum*, con 15% en reducción de la enfermedad.

Usualmente se infiere que la actividad antagónica *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* constituye un indicativo inicial de su promisorio actividad biológica contra hongos fitopatógenos. Regularmente se seleccionan los mejores y luego se lleva a ensayos de invernadero y posteriormente a campo, donde se descarta un considerable número de aislamientos como agentes de regulación biológica de hongos fitopatógenos por la inconsistencia de actividad entre el medio *in vitro* y en invernadero (Carsolio *et al.*, 1999; Howell, 1998). En el presente trabajo algunos aislamientos eficientes en las pruebas *in vitro* mostraron una disminución o incluso ausencia en su actividad micoparasítica en invernadero y viceversa, es decir no existe un indicativo claro de actividad entre los ensayos de laboratorio y los realizados *in vivo*, en contraste con investigaciones similares de Durman *et al.* (1999) quienes encontraron una buena correlación entre los métodos *in vitro* y los ensayos en invernadero. Lo anterior puede explicarse por las diferencias en las condiciones ambientales y nutricionales que se presentan en los ensayos *in vitro* y en ensayos en

los cuales se utiliza suelo como sustrato o se exponen los hongos a condiciones medioambientales “no artificiales”, ya que en tales casos varían sustancialmente elementos como complejos de aire, disponibilidad de nutrientes y minerales, pH, distribución de agua, temperatura y luz (Carlile y Watkinson, 1996). El efecto de estos elementos esenciales logra incidir en la capacidad antagónica de los aislamientos, pudiendo existir pequeñas diferencias en los micrositios del sustrato que determinen la acción antagónica de *Trichoderma spp.*, lo cual no ocurre en una caja de Petri donde las condiciones son homogéneas. Lo anterior es confirmado por Askew y Laing (1994) quienes sostienen que el microclima en suelo en viveros se caracteriza por alto contenido de humedad y variaciones de la temperatura; tales cambios pueden alterar el estado fisiológico del hongo y este a su vez la capacidad micoparasítica de *Trichoderma*, la cual es una respuesta a la necesidad de fuentes de nutrición (Vasseur *et al.*, 1995), como lo demuestran los estudios de expresión de las enzimas de los genes *ech42* y *prb1* implicados en micoparasitismo, sugiriendo que ambos genes parecen ser regulados por la disponibilidad de nutrientes y por el estado fisiológico del hongo antagonista (Carsolio *et al.*, 1999). Adicionalmente, en las pruebas *in vitro* no se tiene en cuenta la interacción con la planta, la cual es determinante para el funcionamiento del antagonista como tal (Howell *et al.*, 2000).

Un análisis comparativo del control de *S. rolfsii* y *R. solani* muestra que no todos los aislamientos de una misma especie de *Trichoderma* actúan de la misma manera e intensidad contra ambos patógenos; por el contrario, su actividad es altamente específica. Este es el caso de T-109 (*T. asperellum*) el cual tiene niveles intermedios en la reducción de la enfermedad causada por *S. rolfsii*, pero en el control de *R. solani* es uno de los más eficaces. T-26 (*T. asperellum*) no controla *S. rolfsii*, incluso se alcanza a observar niveles de incidencia de la enfermedad similares al control sin tratamiento con antagonistas, pero para el caso de control de *R. solani* posee altos niveles de reducción de la enfermedad. Una razón de estos fenómenos de especificidad pueden ser las interacciones bioquímicas entre hongos. En estudios de Elad *et al.*, (1983) acerca de este fenómeno, se aisló una lectina de las hifas y del filtrado del cultivo en medio líquido de *R. solani*, a su vez las paredes de la célula de *Trichoderma spp.* contienen galactosa, que previene la aglutinación de esta lectina (Goldman *et al.*, 1994). De ambos estudios se concluye que la lectina presente en las hifas de *R. solani* se une a los residuos de galactosa en las paredes de la célula de *Trichoderma spp.* y da inicio a la acción micoparasítica sobre el fitopatógeno. Los extractos y filtrados de cultivos de *S. rolfsii* también

exhibieron actividad aglutinante (Barak *et al.*, 1985); sin embargo, la especificidad del azúcar, la actividad de aglutinación y la estabilidad de la aglutinina son absolutamente diferentes de la de *R. solani*.

De igual forma los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la especificidad micoparasítica sobre fitopatógenos que existe entre aislamientos de una misma especie de *Trichoderma* y advierten respecto a la necesidad de realizar búsqueda y estudio de aislamientos con alta actividad antagónica sobre diversos patógenos, sin generalizar o extrapolar su eficacia a un amplio rango de hongos.

Análisis UP-PCR y DS-PCR

Los datos obtenidos por los análisis de los marcadores moleculares (figura 1) permitieron una separación intergenérica, estableciéndose tres grupos (figura 2): uno donde se ubican los aislamientos de *T. asperellum* y *T. longibrachiatum*, un segundo grupo de *T. asperellum* –y el más cercano a este género– fue el conformado por el aislamiento G-56 de *Gliocladium sp.* y un tercero constituido por el aislamiento de *Fusarium sp.* Dentro de los aislamientos de *Trichoderma*, los marcadores empleados originaron dos subgrupos, uno compuesto por aislamientos de la especie *T. asperellum* y otro constituido por el aislamiento de *T. longibrachiatum* T-29, el cual presentó en todas las reacciones de amplificación un patrón de bandas diferentes al resto de ejemplares utilizados en el ensayo. Adicionalmente, dentro de los ejemplares analizados de la especie *T. asperellum*, los marcadores detectaron diferencias, estableciendo tres subgrupos en interior de este taxa no correlacionados con actividad biológica antagonista pero sí con diferencias biogeográficas y metabólicas (Hoyos *et al.*, 2009).

Los marcadores moleculares empleados, UP-PCR y DS-PCR, indican que *T. longibrachiatum* T-29 mostró ser el más divergente de los aislamientos (16% de similitud) con respecto a los demás aislamientos de la especie *T. asperellum* que comparten un 55% de similitud (figura 2), pero incluso se demuestra que dentro de los ejemplares de *T. asperellum* existen diferencias. Sin embargo, no se encontró correlación entre la actividad antagonista y las agrupaciones establecidas en los dendrogramas, lo cual puede deberse a que muchos genes contribuyen al micoparasitismo, y diferentes especies pueden tener involucradas diversas rutas metabólicas o estrategias biológicas para desarrollar su potencial como agentes de control biológico efectivos, por lo tanto es usual que los análisis filogenéticos no generen grupos consistentes con agrupaciones generadas por características de micoparasitismo (Hoyos *et al.*, 2009).

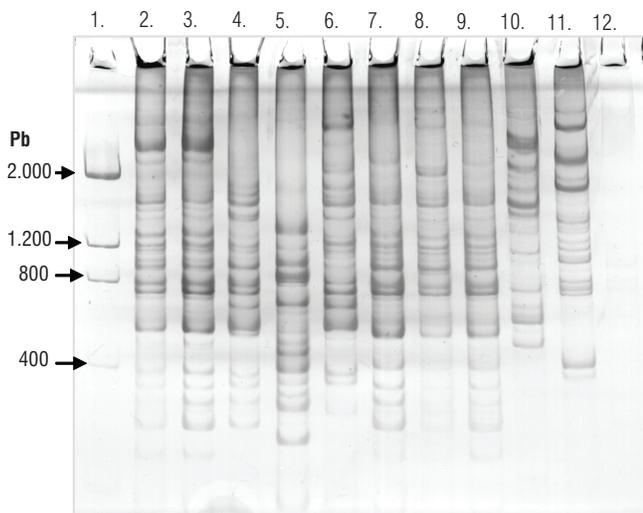


FIGURA 1. Perfiles de bandas de aislamientos de *Trichoderma spp.* obtenidas por PCR de doble estringencia (UP-PCR). 1. Marcador de peso molecular, Low DNA mass ladder (Gibco), 2. T-21, 3. T-25, 4. T-26, 5. T-29, 6. T-71, 7. T-86, 8. T-109, 9. T-110, 10. G-56, 11. *Fusarium spp.*, 12. Blanco.

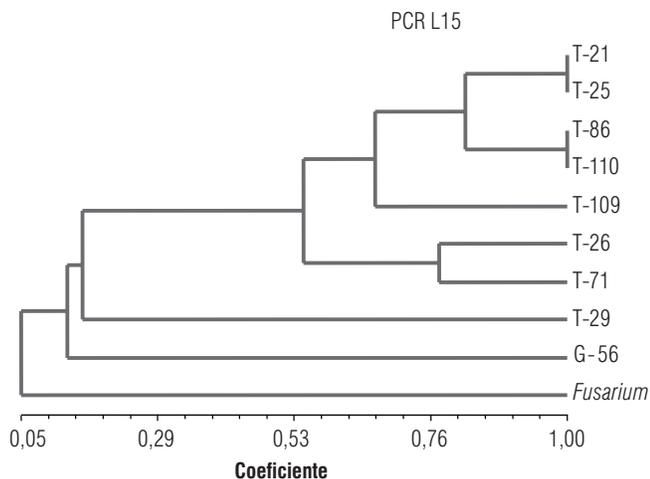


FIGURA 2. Dendrograma que ilustra las relaciones genéticas entre ocho aislamientos de *Trichoderma spp.* obtenido por PCR de doble estringencia (UP-PCR) y PCR con iniciadores universales (DS-PCR) analizado por el método de grupos de medias aritméticas (Upgma).

Conclusiones

En las pruebas *in vitro* los aislamientos de *Trichoderma spp.* evaluados contra *S. rolfisii* mostraron 100% de actividad antagonista, y para *R. solani*, todos los aislamientos, excepto T-71 (*T. asperellum*). No obstante las pruebas *in vitro*, usualmente empleadas como método de selección preliminar de agentes de control biológico, en las condiciones experimentales de este trabajo no fueron un buen indicativo de la actividad antagonista en suelo; un ejemplo

de ello lo constituye el aislamiento *T. asperellum* T-71 que muestra un comportamiento deficiente en pruebas de laboratorio contra *S. rolfisii*, pero en condiciones de invernadero controla la enfermedad totalmente. Caso contrario sucede con algunos otros aislamientos de esta especie, como T-26, T-86 y T-110, eficientes en condiciones de laboratorio pero no en invernadero.

En este trabajo se evidencia una alta especificidad de los aislamientos de *Trichoderma* por su sustrato (hongo fitopatógeno); se demuestra a lo largo de los experimentos que este hongo antagonista es altamente selectivo en su ataque, difiriendo inclusive en su efectividad biocontroladora de aislamientos de una misma especie, para el caso *T. asperellum* T-71 específico para *S. rolfisii*, pero no para *R. solani*, y *T. asperellum* T-109 muy efectivo contra *R. solani*. Por lo anterior se puede concluir que no es posible extrapolar actividad antagonista de aislamientos de *Trichoderma* en condiciones de invernadero basándose en experimentos *in vitro* y tampoco por taxones particulares como usualmente se realiza.

Los marcadores moleculares empleados no permitieron realizar una separación consistente de grupos de aislamientos dentro de una misma especie por su actividad antagonista.

Agradecimientos

Esta investigación recibió la ayuda financiera de Colciencias, CIB, SENA y la Universidad Hebrea de Jerusalén. Un reconocimiento especial al Dr. Vladimir Gouli por proporcionar algunos de los aislamientos de *Trichoderma* utilizados en este estudio y al Dr. John Bissett por la identificación de los mismos.

Literatura citada

- Adams, P.B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 59-72.
- Askew, D.J. y M.D. Laing. 1994. The *In Vitro* screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* an evaluation of different environmental sites on *Trichoderma* as sources of aggressive strains. *Plant Soil* 159, 277-281.
- Barnett, H.L. 1960. *Illustrated genera of imperfect fungi.* Burgess Publishing Co, Minneapolis. 215 p.
- Barak, R., Y. Elad, D. Mirelman, e I. Chet. 1985. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction between *Trichoderma* and *Sclerotium rolfisii*. *Phytopathol.* 75, 458-462.
- Bell, D.K., H.D. Wells y C.R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Phytopathol.* 72, 396-400.

- Carlile, M.J. y S.C. Watkinson. 1996. *The fungi*. 3rd ed. Academic Press, San Diego. 482 p.
- Carsolio, C., N. Benhamou, S. Haran, C. Cortez, A. Gutierrez y A. Herrera-Estrella. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 929-935.
- Castle, A., D. Speranzini, N. Rghei, G. Alm, D. Rinker y J. Bissett. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 133-137.
- Durman, S., A. Menéndez, A. Godeas. 1999. Evaluation of *Trichoderma* spp. as antagonistic of *Rhizoctonia solani* *in vitro* and as biocontrol in greenhouse tomato plants. *Revista Argentina de Microbiología* 31, 13-18.
- El-Katatny, M.H., M. Gudelj, K.H. Robra, M.A. Elnaghy y G.M. Gübitz. 2001. Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 137-43.
- Elad, Y. I. Chet, P. Boyle y Y. Henis. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathol.* 73, 85-88.
- Esposito, E. y M. da Silva. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 89-98.
- Gómez, I., I. Chet y A. Herrera-Estrella. 1997. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Mol. Gen. Genet. MGG* 256, 127-135.
- Goldman, G.H., C. Hayes y G.E. Harman. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends Biotechnol.* 12, 478-482.
- Grondona, I., R. Hermosa, M. Tejada, M.D. Gomis, P.F. Mateos, P. D. Bridge, E. Monte e I. García-Acha. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl. Environment. Microbiol.* 63, 3189-3198.
- Hanson, L.E. y C.R. Howell. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathol.* 94, 171-176.
- Hoyos-Carvajal, L.M., S. Orduz y J. Bissett. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet. Biol.* (en prensa).
- Howell, C.R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathol.* 96, 178-180.
- Howell, C.R., L.E. Hanson, R.D. Stipanovic y L.S. Puckhaber. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathol.* 90, 248-252.
- Inbar, J., A. Menendez e I. Chet. 1996. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* 28, 757-763.
- Jakhar, S.S., M.S. Chauhan y J.C. Duhan. 1998. Management of root rot of cotton (*Gossypium* species) caused by *Rhizoctonia* species. *Plant Dis. Res.* 13, 115-118.
- Jeffries, P. y T.W.K. Young. 1994. Biocontrol of Plant Pathogens. In: *Interfungal Parasitic Relationships*. CAB International, Wallingford. pp. 181-221.
- Lewis, J.A. y G.C. Papavizas. 1991. Biocontrol of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in the field with formulations of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Crop Protection* 10, 396-402.
- Lubeck, M., I. Alekhina, S. Lubeck, D. Jensen y S. Bulat. 1999. Delineation of *Trichoderma* two different genotypic groups by a highly robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridization. *Mycol. Res.* 103, 289-298.
- Matioli, S. y R. Brito. 1995. Obtaining genetic markers by using double – stringency PCR with microsatellites and arbitrary primers. *BioTechniques* 19, 752-758.
- Mathivanan, N., K. Srinivasan y S. Chelliah. 2000. Biological control of soil-borne diseases of cotton, eggplant, okra and sunflower by *Trichoderma viride*. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* 107, 235-244.
- Papavizas, G.C. y J.A. Lewis. 1989. Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *Sclerotium rolfsii*. *Plant Pathol.* 38, 227-86.
- Pervaiz, A., S. Miller, T. Meulia, H.A. Hoitink y J. Kim. 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma harzianum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5421-5426.
- Raeder, U. y P. Broda. 1985. Rapid preparation of ADN from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1, 17-20.
- Royse, D.J. y S.M. Ries. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathol.* 68, 603-607.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY.
- Vasseur, V., M. Van Montagu y G. Goldman. 1995. *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. *Microbiol.* 147, 767-774.