UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÌA
POSTGRADO EN AGRONOMÌA

AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp., NATIVOS DE VENEZUELA, PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (Kûhn) EN MAÍZ (*Zea mays L.)*

Ing. Agr. Cecilia Mercedes Pèrez Pèrez

Febrero, 2012

Trabajo de Grado presentado como requisito final para optar al título de *Magister Scientarium* en Agronomía, Orientación Protección Vegetal.

Dra. Nelly de Albarracín

Tutora

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO EN AGRONOMÍA

Comisión de Estudios de Postgrado

VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por: **CECILIA MERCEDES PÉREZ PÉREZ, C.I. 10.342.574**, bajo el título "**IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp., MEDIANTE TÉCNICAS MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES, PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (KUHL) EN MAÍZ (*Zea mays* L.)**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de ***Magíster Scientiarum* en Agronomía**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 28 de octubre de 2011 a las 3:00 pm., para que la autora lo defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en el Salón "D" del Doctorado en Ciencias Agrícolas, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBADO**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa una contribución al estudio de la diversidad del género *Trichoderma* en Venezuela.

Es un aporte en el uso de las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos benéficos.

Comisión de Estudios de Postgrado POSTGRADO EN AGRONOMÍA Facultad de Agronomía U.C.V. MARACAY

Realizó la identificación de cepas de *Trichoderma* que además de biocontroladores, se comportan como inductoras del crecimiento de la planta.

El Jurado sugiere la modificación del título por: "Aislamientos de *Trichoderma* spp., nativos de Venezuela, promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* (Kuhl) en Maíz (*Zea mays* L.)".

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 28 días del mes de octubre del año 2011, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la Dra. Nelly Sanabria.

MSc. LUIS JOSÉ SUBERO
C.I. 3.325.649
AGRONOMÍA-UCV

Dra. DAYNET SOSA
C.I. 84.394.634
FUNDACIÓN IDEA

Comisión de Estudios de Postgrado POSTGRADO EN AGRONOMIA Facultad de Agronomía U.C.V. MARACAY

Dra. NELLY SANABRIA
C.I. 3.919.310
AGRONOMÍA-UCV
Tutor(a)

NS/zp
28/10/11

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre **Zenaido Francisco**, hombre de inigualable sabiduría y respeto por la vida, quien con amor guió mis luchas, metas, sueños con gran sentido de responsabilidad, justicia, perseverancia y pasión.....Por siempre **PAPA**.

A mi madre **Luisa Elena**, mujer incansable, quien con su comprensión, cariño, amor y apoyo permite que mis sueños sean alcanzados con esmero y entusiasmo.

A mis hermanos: **Laura**, **Francisco**, **Rosario**, **Ana**, **Dámaso** y **Yetty** quienes realizan grandes aportes a mi vida de infinitas maneras; todo mi amor, confianza, respeto y cariño para ustedes. Los quiero mucho hermanos, juntos siempre!

A mi esposo **Argenis José**, hombre de inigualable paciencia e intachables valores, tu compañía, apoyo y amor avivan mi existencia para seguir adelante cada día.

A mi preciosa hija, regalo de Dios, **Melanie Cecilia**, quien con su ternura, paciencia, amor y alegría me brinda días mágicos y maravillosos, relegando los infortunios ineludibles de la vida para mostrarme lo extraordinario de vivir. Para ti hija todo mi ser, mis esfuerzos, mis sueños y mis luchas para regalarte un mundo mejor.

A mi amiga del alma **Mariangel**, por su constancia, cariño y apoyo en todo momento.

A mis queridos y estimados amigos: **David**, **Juan Carlos** y **Orestes**, por su invaluable compañía, apoyo y amistad sincera.

A TODOS MIL GRACIAS….

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por darme la vida, y las herramientas necesarias para enfrentarla con alegría, entusiasmo y confianza, lo que hace posible culminar una meta para iniciar otra.

Al Dr. Iván Galindo (IDEA), Dr. Alexander Hernández (UCLA), Dra. Daynet Sosa (IDEA) y a la Dra. Nelly Sanabria (UCV), junto a sus equipos de trabajo, por sus aportes científicos para canalizar las ideas planteadas en este estudio.

Al INIA, institución donde laboro y me permite poner en práctica los conocimientos adquiridos.

A Orestes Elosegui por su apoyo en la identificación de los aislamientos de *Trichoderma* mediante características morfológicas.

A María Gabriela, Glenda Aponte y Luis Salazar por sus aportes a este estudio a través de sus experticias técnicas de laboratorio.

Al personal académico del Postgrado de Agronomía, especialmente a los Profesores Asdrúbal Arcia, Gustavo Trujillo, Yonis Hernández, Luis Subero, Jocelyne Ascencio, José Vicente Lazo, entre otros no menos especiales, por sus enseñanzas y contribución en la formación de ciudadanos dignos de esta patria.

Al personal administrativo del Postgrado de Agronomía, por su paciencia y apoyo en la consolidación de este nivel alcanzado.

A mi familia, por su apoyo incondicional en todas las metas que me propongo.
A mis amigos del Postgrado Aida, Soledad, Marisela, Rossmary, Arnaldo y Dayana con quienes compartí esta grata experiencia y a todos los que me acompañaron en esta meta.

A TODOS MIL GRACIAS….

RESUMEN

La rhizoctoniosis o mancha bandeada del maíz, causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, es una enfermedad fúngica con alta incidencia y distribución en las principales zonas maiceras de Venezuela, causando disminución de los rendimientos (Perdomo *et al*., 2007); siendo el uso de fungicidas químicos, el método más utilizado para su control. No obstante, las experiencias de aplicaciones sucesivas de productos químicos resultan muchas veces en la aparición de aislamientos tolerantes a éstos; al respecto, Lòpez *et al*., (2010), reportan que *R. solani* ha adquirido resistencia a fungicidas orgánicos como el PCNB, Captan, Dichlone, Maneb y Thiram, así como también a fungicidas sistémicos como Carboxin y Benomylo. Por esa razón y el deterioro al ambiente por parte de estas moléculas químicas, existe una tendencia al uso del control biológico en la actualidad, donde se reconocen las potencialidades de *Trichoderma,* como antagonista sobre *R. solani* y otros hongos del suelo, así como promotor del crecimiento de las plantas ya sea eliminando los patógenos que las deprimen, solubilizando micronutrientes, incrementando la absorción y produciendo reguladores del crecimiento vegetal. En este estudio, se seleccionaron e identificaron cinco de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. provenientes de Aragua, Carabobo, Distrito Capital y Guárico, promisorios en el control de *R. solani* en maíz, bajo condiciones *in vitro* y de umbràculo. Los análisis *in vitro*, se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado y comparaciones de medias con la Prueba de Mínima Diferencia Significativa (MDS) de Fisher ($\alpha = 0,05$), observándose la capacidad antagónica de todos los aislamientos evaluados, con una inhibición del crecimiento del patógeno desde 50 PIC. En condiciones de umbráculo, se utilizó la misma prueba estadística con los cinco aislamientos seleccionados, los cuales fueron altamente eficaces contra el patógeno en plantas de maíz en macetas, mostrando una reducción de la enfermedad mayor de 70%. La clave interactiva para características morfológicas *TrichoKey* 2.0, no identificó los cinco aislamientos; mientras que la amplificación de la región ITS1-ITS2, determinó la especie de todos los aislamientos evaluados, resultando A1, M11, M12 y 05211 como *T. koningiopsis* y 04017 como *T. ghanense.* Este último, se presume sea la primera vez reportado en el país y como controlador de *R. solani* en maíz.

***Palabras Claves*:** ITS, *in vitro,* técnicas moleculares, características morfológicas, *Trichо*Key

ABSTRACT

The rhizoctoniosis or banded spot leaf corn, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn, is a fungal disease that has a high incidence and distribution in major maize growing areas of Venezuela, causing lower yields (Perdomo *et al*., 2007), being the use of fungicides, the most widely used for control. However, the experiences of successive applications of chemicals often results in the appearance of isolates tolerant to them and in this regard, Lopez *et al*., (2010) report that *R. solani* have become resistant to organic fungicides such as PCNB, Captan, Dichlone, maneb, and thiram, as well as fungicides and benomyl as Carboxin. For that reason and deterioration to the environment by these chemical molecules, there is a tendency to use biological control at present, which recognizes the potential of *Trichoderma*, as an antagonist on *R. solani* and other soil fungi, as well as promoting the growth of plant pathogens either by removing the depressed, solubilizing micronutrient absorption and producing increased plant growth regulators. In this study, we selected and identified five of thirteen isolates of *Trichoderma* spp. from Aragua, Carabobo, Capital District and Guárico, promising in the control of *R. solani* on corn, under *in vitro* conditions and greenhouse conditions. *In vitro* tests were conducted under a completely randomized design, and comparisons of means with the least significant difference test (MDS) of Fisher ($\alpha = 0.05$), showing the antagonistic capacity of all isolates tested, with an inhibition of growth of the pathogen from 50 PIC. In greenhouse conditions, we used the same test statistic with the five selected strains, which were highly effective against the pathogen in maize plants in pots, showing a greater disease reduction of 70%. The interactive key *TrichoKey* 2.0, did not identify the species of the five isolates, while amplification of the ITS1-ITS2 region, determined the species of all isolates tested, resulting in A1, M11, M12 and 05211 as *T. koningiopsis* and 04017 as *T. ghanense*. The last species is presumed to be the first reported in the country and as controller of *R. solani* on corn.

Keywords: ITS, *in vitro,* molecular technique, morphological characters, *TrichoKey*

INDICE GENERAL

RESUMEN…….. ii

ABSTRACT…… iii

INDICE GENERAL…… iv

INDICE DE CUADROS……. viii

INDICE DE FIGURAS..... x

INTRODUCCIÓN…… 13

OBJETIVO GENERAL……... 17

Objetivos Específicos…….....……..... 17

REVISIÓN DE LITERATURA……..…….. 18

1. Importancia del cultivo de maíz (*Zea mays*)…….. 18
2. Rhizoctoniosis o mancha bandeada del maíz ……..... 19

2.1 Sintomatología…...…… 20

2.2 Etiología…..……...…… 21

2.3 Patogénesis y Epidemiología…… 24

3. Control Biológico…… 25

4. El Género *Trichoderma*……..……..... 28

4.1. Morfología y taxonomía…… 28

4.2. Ecología y distribución…… 34

4.3. Mecanismos de acción directa sobre el patógeno..... 36

4.3.1 Biocontrol por competencia…… 36

4.3.2 Micoparasitismo……... 38

4.3.3 Antibiosis…… 39

4.3.3.1 Antibiosis por enzimas hidrolíticas…… 40

4.3.3.2 Antibiosis por metabolitos secundarios…… 40

4.3.4 Competencia…… 43

4.4 Mecanismos adjuntos…… 44

4.4.1 Estimulación del crecimiento de las plantas y tolerancia al estrés por parte de la planta…… 44

4.4.2 Facilita la solubilización y absorción de nutrientes del suelo.. 46

4.4.3 Biorremediación de suelos…….. 47
4.4.4 Inducción de mecanismos de defensa de las plantas…… 48
4.4.5 Productor de proteínas…….. 51
4.5 Importancia de la correcta identificación de especies de *Trichoderma*..... 52
4.6 Métodos para identificar aislamientos de *Trichoderma*…… 57
4.6.1 Análisis morfológico……. 57
4.6.2 Análisis molecular…….. 57
4.6.2.1 ADN mitocondrial…… 58
4.6.2.2 Genes del RNA ribosomal (ADNr)…….. 59
4.6.3 Genes de proteínas…….. 61
4.6.3.1 Factor de Elongación durante la Traducción (TEF)…… 61
4.6.4 Otros genes usados en filogenia de *Trichoderma*……- 61
4.6.5 Reconstrucción filogenética…… 62
4.6.5.1 Método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA)……. 62
4.6.5.2 Método de agrupamiento de vecinos (Neighborg Method)……..... 63
4.6.5.3 Máxima Parsimonia……..... 63
4.6.5.4 Estimación de máxima probabilidad (MLE)…… 63
4.6.5.5 Reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica GCPSR)…… 64
4.6.6 Pruebas metabólicas…… 66
MATERIALES Y MÉTODOS…….. 69
Ubicación de los experimentos……..…… 69
Microorganismos……...…….. 69
Material Vegetal……..…..…… 69
Purificación e identificación del patógeno…….…… 70
Pruebas de Porcentaje de Germinación de Semilla…… 70
Multiplicación de *R. solani*……. 71
Multiplicación de *Trichoderma* spp…….. 71

Capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani in vitro*……..... 72
Pruebas de Patogenicidad de *R. solani* sobre el híbrido de maíz H-3001… 74
Aislamiento del patógeno……..... 75
Capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani in vivo*…….. 75
Inoculación con *R. solani* y *Trichoderma* spp..... 75
Identificación morfológica de los aislamientos de *Trichoderma* spp…… 77
Identificación molecular de las especies de *Trichoderma* spp…… 78
Extracción del ADN……..... 78
Integridad del ADN…….. 79
Cálculo de la concentración de ADN extraído…… 80
Validación de la calidad de ADN a través de su amplificación por ITS…….. 80
Preparación de muestras para la secuenciación..... 81
Alineamiento de las secuencias de los aislamientos de *Trichoderma* spp. con *T.asperelum*…… 82
Identificación de especies en el género *Hypocrea/Trichoderma* con el programa *Trich*Okey 2.0……... 83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….. 84
Aislamiento, purificación e identificación del patógeno…… 84
Capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* spp., frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones *in vitro*…… 84
Competencia…… 84
Micoparasitismo…… 89
Capacidad antagonista de los aislamientos *Trichoderma* spp., frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones de umbráculo…… 91
Prueba de patogenicidad del aislamiento de *R. solani*…… 91
Evaluación de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani in vivo*…….. 93
Evaluación de promoción de crecimiento vegetal…… 94

Identificación morfológica de la especie de los aislamientos de *Trichoderma*, a tres y cinco días de crecimiento del cultivo…… 99
Aislamiento A1……... 100
Aislamiento M11…… 101
Aislamiento M12…… 102
Aislamiento 05211…… 103
Aislamiento 04017…… 104
Identificación molecular de las especies de *Trichoderma* spp…… 105
Integridad del ADN……..... 105
Amplificación por PCR de fragmentos ITS…… 105
Análisis de similitud BLAST-NCBI…… 106
Alineamiento múltiple de las secuencias…… 110
CONCLUSIONES…… 114
RECOMENDACIONES…… 116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…… 117
ANEXOS..... 135

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Procedencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp ……**72**

Cuadro 2. Escala de evaluación de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani*. …….....**74**

Cuadro 3. Tratamientos para la evaluación "*in vivo*" de plantas inoculadas con *Trichoderma* spp., y *R. solani*.....…….....**77**

Cuadro 4. Secuencias nucleotídicas usada para ITS-PCR.....**80**

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la amplificación del ADN de los aislamientos de *Trichoderma* …….....**81**

Cuadro 6. Comparación de medias del Porcentaje inhibición del crecimiento (P.I.C) de los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra el aislamientos de *R. solani*……..**86**

Cuadro 7. Comparación de medias del índice de antagonismo de *Trichoderma* spp contra el aislamiento de *R. solani*.…….....**89**

Cuadro 8. Incidencia y reducción de Rizoctoniosis frente a *Trichoderma* spp., en plantas de maíz en condiciones de umbráculo.....**93**

Cuadro 9. Comparación de medias de las variables altura, peso fresco y peso seco de la planta.....**94**

Cuadro 10. Comparación de media de las variables longitud, peso fresco, peso seco y volumen radicular de la planta.…….....**96**

Cuadro 11. Identificación de la especie de los aislamientos de *Trichoderma* mediante la amplificación de la región ITS1-ITS2.…….....**107**

Cuadro 12. Distribución de los aislamientos de *Trichoderma* por sección, grupo y por especies……..**108**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sintomatología de Rhizoctoniosis o mancha bandeada del maíz, tanto en estado vegetativo como en estado de madurez fisiológica de la planta….**21**

Figura 2. Característica típica de *R. solani* y sus ramificaciones en ángulo recto (a la izquierda). Crecimiento del hongo en condiciones *in vitro* (a la derecha).**22**

Figura 3. El dendrograma muestra la relación genética entre los AGs de *R. solani*, en base a las secuencias del espaciador transcrito interno (ITS)……**24**

Figura 4. Ciclo de la enfermedad causada por *R. solani*……..**25**

Figura 5. Estructura de *Trichoderma* spp. (100x)……...**33**

Figura 6. Diagrama de la repetición en tándem de los genes que codifican para los ARNrs donde se muestran las regiones ITS……...**60**

Figura 7. Diagrama del Factor de Elongación durante la Transcripción 1-α. Se muestran los oligonucleótidos usados para la amplificación de los diferentes fragmentos a estudiar……**61**

Figura 8. Diagrama que muestra las anclas (GSH) y (SSH) desarrolladas por Druzhinina *et al.*, (2005). Los colores indican las bases a las que corresponde la secuencia……**62**

Figura 9. El análisis simultáneo de varios genes muestra topologías similares para especies relacionadas (Taylor *et al*., 2000)……**64**

Figura 10. Técnica de enfrentamiento: A la derecha de cada caja, *R. solani*; a la izquierda aislamientos de *Trichoderma*. Tomada a las 72 horas después del inicio de la prueba……..**87**

Figura 11. Comportamiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra el aislamiento de *R. solani in vitro*, a las 72 horas……**88**

Figura 12. A. Zona de contacto e inhibición del crecimiento micelial del patógeno por parte del aislamiento M11. B. Microfotografía de hifas del aislamiento M11 invadiendo las hifas de *R. solani* (100x)……**90**

Figura 13. Síntomas de *R. solani* en maíz H-3001……...**92**

Figura 14. Hifas de *R. solani*, obsérvese ángulo recto. (100x)……**92**

Figura 15. Desarrollo vegetativo de las plantas de maíz H-3001, con los diferentes tratamientos. A: T1; B y C: T2; D: T3, T5; E: T7, T9……**95**

Figura 16. Desarrollo vegetativo de las plantas de maíz H-3001, con los diferentes tratamientos. A: T1; B y C: T2; D: T3; E: T5……....**97**

Figura 17. Características de la colonia de los 13 aislamientos de *Trichoderma* spp en condiciones *in vitro*……**99**

Figura 18. A. Crecimiento de *T. koningiopsis* en PDA a los 3 días. **B.** Fiálides. C. Conidios elipsoidales. D. Clamidosporas intercalada ……**100**

Figura 19. A. Crecimiento de *T. koningiopsis* en PDA a los 3 días. **B.** Masa de conidios. **C.** Fiálides **D.** Conidios elipsoidales. **E.** Clamidosporas terminales……...**101**

Figura 20. A. Crecimiento de M12 en PDA a los 3 días. **B.** Fiálides. **C.** Conidios elipsoidales. **D.** Clamidosporas intercalada y terminales……..**102**

Figura 21. A. Crecimiento del aislamiento 05211 en PDA a los 3 días. B. Fiálides ampuliformes C. Fiálides intercaladas D. Conidios elipsoidales…….**103**

Figura 22. A. Crecimiento de *T. ghanense* en PDA a los 3 días. **B.** Fiálides ampuliformes **C.** Fiálides lageniformes **y D.** Conidios elipsoidales……...**104**

Figura 23. Análisis del ADN de los aislamientos seleccionados de *Trichoderma* spp. Línea M: marcador de ADN de bajo peso molecular. Línea 1: A1. Línea 2: M11. Línea 3: M12. Línea 4: 05211. Línea 5: 04017……..**105**

Figura 24. PCR de la amplificación de la región ITS1-ITS2 de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Línea M: marcador de ADN de bajo peso molecular. Línea 1: A1. Línea 2: M11. Línea 3: M12. Línea 4: 05211. Línea 5: 04017……**106**

Figura 25. Reporte del software *TrichoKey* donde se indica la ubicación de las anclas de la secuencia de ITS de los aislamientos 05211, A1, M12 y M11y la sección a la que pertenece……**109**

Figura 26. Reporte del software *TrichoKey* donde se indica la ubicación de las anclas de las secuencias de ITS del aislamiento 04017 y la sección a la que pertenece……...**109**

Figura 27. Comparación por alineamiento de las secuencias de 05211, 04017, A1, M12 y M11, con respecto a *T. asperelum*. Los recuadros rojos indican cambios en las secuencias de los aislamientos y la especie de referencia; el recuadro azul indica el inicio del alineamiento entre los aislamientos y *T asperelum*……**112**

INTRODUCCIÓN

El maíz constituye una fuente energética alimenticia de gran importancia en el mundo. Es utilizado como materia prima para la elaboración de harina precocida, aceite, alimento para animales y otros usos, siendo el principal alimento de consumo en nuestro país. El rendimiento medio del maíz en los trópicos es de 1800 kg/ha comparado con una media mundial de más de 4000 kg/ha (FAO, 2010). Sin embargo, la planta de maíz, aunque de reconocida adaptabilidad y resistencia, sufre frecuentemente de ataques de plagas y enfermedades, que provocan trastornos o anomalías que alteran la fisiología normal de la misma, lo cual modifica su desarrollo y reduce o anula su producción (Fontana y González, 2000).

Entre las diversas plagas y enfermedades que inciden en los rendimientos del cultivo, se destaca la rhizoctoniosis o mancha bandeada del maíz causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn (López *et al.*, 2010), la cual se desarrolla en las hojas y las vainas, y consiste en manchas concéntricas características que cubren extensas áreas de las hojas y las brácteas infectadas; siendo el principal daño la pudrición pardusca de las mazorcas, que presenta un moho algodonoso de color café claro con esclerocios pequeños, redondos y negros. La enfermedad se presenta, generalmente, cuando el maíz está en proceso de maduración y está casi siempre asociada al estrés de la planta, debido a períodos de sequía (especialmente en suelos arenosos) y altas temperaturas. El hongo ataca las raíces y los entrenudos del tallo, invadiendo la médula, la cual se vuelve negruzca (carbonosa) y fibrosa, llena de micelio y esclerocios del hongo. La propagación del hongo se efectúa a través de los esclerocios, que permanecen en el suelo con los restos de cosecha; tales esclerocios se observan también externamente en la superficie del tallo (Echagüe *et al.*, 2008).
El hongo es polífago y afecta a muchas especies de plantas, entre ellas el sorgo, la soya, el girasol, el ajonjolí, tomate, pimentón, entre otros; complicando el trabajo de los fitomejoradores en la búsqueda de resistencia genética. No obstante, la acentuada habilidad saprofítica que presenta hace inefectiva la rotación de cultivos como medida de control cultural (Mora, 1996).

Habitualmente el control de este microorganismo es mediante el uso de moléculas químicas, que a pesar de tener una efectividad rápida y específica constituyen un grupo de sustancias altamente tóxicas, cuya persistencia en el medio ambiente conlleva a graves problemas ecológicos como la contaminación de las aguas subterráneas y la entrada en la cadena alimenticia, causando fuerte impacto en gran cantidad de organismos, incluyendo a los humanos. Además, el uso ininterrumpido de estas sustancias ha provocado la aparición de microorganismos patógenos resistentes a los fungicidas químicos empleados para su control; por ejemplo, han aparecido cepas del hongo *Phytophthora infestans* y *P. parasitica* resistente a metalaxil (Muiño *et al.*, 2007).

Finalmente, la prohibición del uso de productos químicos como el bromuro de metilo, entre otros, para el control de diversas enfermedades del suelo, debido al impacto negativo sobre el ambiente, ha permitido la implementación del manejo integrado de plagas destacándose el control biológico, el cual es capaz de mantener la densidad de organismo negativos para los cultivos en valores más bajo que el que se podría presentar en su ausencia causando menor daño económico, pudiendo a su vez, utilizarse como método complementario, eficaz y seguro para contribuir con los objetivos planteados en una agricultura sustentable con un mínimo impacto ambiental sin deterioro a la salud humana (Rodríguez *et al.*, 2004).

Los productos biológicos, como los antagonistas de hongos del suelo, tienen la gran ventaja que pueden ser aplicados desde el comienzo de la actividad agrícola como el tratamiento de semillas, la protección de semilleros, y a nivel de campo para controlar patógenos del suelo que afecten los cultivos, tomando en cuenta que en el caso de las plantaciones donde el ambiente juega un papel fundamental, su uso y conservación debe ser realizado mediante tecnologías apropiadas (Bengtson *et al.*, 1992).

Entre las ventajas del control biológico, resalta el hecho de que no produce residuos tóxicos que contaminen el ambiente, por lo tanto es también posible recuperar cuencas contaminadas; es definitivamente más económico que cualquier producto

químico que se quiera emplear para el control de plagas o enfermedades; es seguro, ya que actúa contra el hospedante o especies afines y no contra especies ajenas al proceso, no provoca mutaciones en las poblaciones a las cuales puede atacar. Analizando algunas de las ventajas y de las desventajas, se debe enfatizar el impacto ambiental que el control biológico tiene y en la economía que él representa, y eso conlleva a la necesidad de impulsar esa área, muy especialmente al desarrollo de los recursos humanos dedicados a esta actividad (Arcia, 2002).

La actividad antagónica de *Trichoderma*, biocontrolador de una amplia gama de fitopatógenos del suelo de importancia agrícola, ha sido ampliamente estudiada en diferentes partes del mundo con el propósito de evaluar en condiciones controladas su potencial fungicida y a la vez recomendar las de mejor comportamiento, para pruebas de campo. En Cuba, por ejemplo, el control de hongos fitopatógenos a través del empleo de biopreparados a base de *Trichoderma*, es uno de los métodos utilizados en el manejo integrado de plagas en solanáceas; sin embargo, el uso de cepas comerciales presenta dificultades con su persistencia en el suelo (González *et al.*, 1999). Por esta razón se considera importante la obtención de aislamientos nativos, mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona específica donde serán aplicados (Cabrera *et al.*, 2000).

Por todas las razones planteadas, se propuso identificar aislamientos nativos de *Trichoderma* spp que resultasen promisorios en el control de la mancha bandeada de la hoja de maíz causada por *Rhizoctonia solani*, tanto *in vitro* como *in vivo*; lo que permitirá usarlos en estudios posteriores en la determinación de la calidad de los mismos en condiciones de campo, para poder masificarlos y emplearlos en la oportunidad requerida. Para la identificación de las especies de este género, se recurrió a los caracteres morfológicos como una herramienta necesaria en los estudios taxonómicos; asimismo se aplicaron técnicas moleculares de identificación, las cuales permiten estudiar características estables y no modificables por el ambiente, como lo son la región interna transcrita del ADN ribosomal. Aunque la mayoría de las descripciones de especies se basan en revisiones de un número limitado de aislamientos donde las diferencias morfológicas son claras; estas

diferencias son menos claras cuando aumenta el número de especies. Este resultado sugiere que no hay suficientes caracteres morfológicos y culturales para definir, de manera confiable, el nivel de especie, por lo que se indica la descripción de características moleculares que permitan contrastarlas con bases de datos ampliamente revisados y testeados por expertos en el área, de manera de obtener resultados más cercanos en cuanto a la identidad de la especie (Shafiquzzaman, 2007).

OBJETIVO GENERAL

Identificar aislamientos nativos de *Trichoderma* spp., promisorios en el control de la mancha bandeada del maíz (*Zea may* L.) causada por *Rhizoctonia solani* Kühn

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad antagonista *in vitro* de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. procedentes de los estados Aragua, Carabobo, Distrito Capital y Guárico, frente a *Rhizoctonia solani*

2. Comparar el comportamiento de los aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp., en cuanto a la agresividad *in vivo* contra *R. solani* en maíz.

3. Identificar la especie de los aislamientos de *Trichoderma* spp., promisorios en el control de *R. solani,* mediante características morfológicos.

4. Identificar la especie de los aislamientos de *Trichoderma* spp. mediante la secuencia de la región ITS1-ITS2 del ADN ribosomal.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Importancia del cultivo de maíz (*Zea mays*)

El maíz, es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo; y el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea, por lo que representa una gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. Globalmente, el maíz se cultiva en más de 140 millones de hectáreas, con una producción anual de más de 580 millones de toneladas métricas. El maíz tropical se cultiva en 66 países y es de importancia económica en 61 de ellos, cada uno de los cuales siembra más de 50.000 hectáreas con un total de cerca de 61,5 millones de hectáreas y una producción anual de 111 millones de toneladas métricas (FAO, 2010).

En Venezuela el maíz generalmente tiene un bajo rendimiento promedio de 3,0 t/ha, para producir grano seco se siembra en su totalidad, durante la época de lluvias (Segovia *et al.,* 2009). La baja productividad es debida a varios factores bióticos (insectos, malezas y enfermedades) y abióticos (clima y suelo). Dentro de las enfermedades destacan los virus debido al bajo rendimiento de grano seco obtenido; las bacterias de gran interés por la baja calidad de la mazorca; y los hongos que constituyen el mayor número patógenos que atacan al maíz destacándose el Tizón del sur (Anamorfo (*Bipolaris maydis;* Teleomorfo (*Cochliobolus heterostro*)); Tizón del norte (Anamorfo (*Exserohilum turcicum* Leonar & Suggs); Teleomorfo (*Setosphaeria turcica* Lutrell)); Mancha gris de la hoja (Anamorfo (*Cercospora zeae maydis* Tehon & Daniels; Teleomorfo (*Mycospharella* sp.)); Mancha de asfalto (Anamorfo: no se conoce; Teleomorfo (*Phyllachora maydis*)); Mancha marrón (*Physoderma (Physoderma zeae maydis* Shaw); Mancha blanca del maíz (Teleomorfo (*Curvularia* spp.); Borde blanco del maíz (Teleomorfo (*Marasmiellus paspalus*)); Roya común del maíz (*Puccinia sorghi* Shwein); Roya americana(*Puccinia polysora* Underw); Roya tropical (*Physopella zeae* Mains) ; Carbón del maíz (*Ustilago maydis* (DC); Fusariosis en maíz (Anamorfo (*Fusarium*

verticillioides)Teleomorfo (*Gibberella fujikuroi* Sawada)); Falsa punta loca del maíz (*Peronosclerospora sorghi*) y rhizoctoniosis o mancha bandeada del maíz causada por *Rhizoctonia solani* Kühn (De León, 2004).

Este último, ha sido ampliamente estudiado en el mundo debido a que afecta a toda la planta, tanto en estado vegetativo como durante la madurez fisiológica, habiéndose reportado en siembras experimentales y comerciales, causando grandes pérdidas económicas; justificando la revisión y aplicación de alternativas de control más amigables con el ambiente, de comprobada factibilidad económica y efectivas para minimizar el impacto de la diversidad de fitpatógenos del suelo (Singh *et al.,* 2002).

2. Rhizoctoniosis o mancha bandeada del maíz

La mancha bandeada del maíz causada por el hongo *R.solani*, es una enfermedad común en diversas partes del mundo que causa grandes pérdidas para los agricultores (Singh *et al.,* 2002). En India, por ejemplo, se reportaron disminuciones en el rendimiento entre 11-40 % en campos experimentales; al probar 141 germoplasmas bajo infección artificial, y sólo 35 se comportaron como resistentes a la enfermedad (Echagüe *et al.,* 2008). En América está presente desde hace muchos años, pero recientemente se ha observado una alta incidencia en siembras de maíz y una amplia gama de cultivos de importancia económica (De León, 2004). En Venezuela, desde el año 1995, se ha señalado que la enfermedad afecta severamente hojas, tallos y mazorcas de maíz en la colonia agrícola de Turén, estado Portuguesa, lo que ha traído como consecuencia una disminución en el rendimiento de los cultivares comerciales que actualmente se siembran (Cardona *et al.*, 1999; Pineda *et al.*, 2008). La mancha bandeada o rizoctoniosis del maíz afecta a todos los cultivares disponibles en Venezuela, observándose la susceptibilidad en campo (Cabrera, 1998).

2.1 Sintomatología

Esta enfermedad se desarrolla en las hojas y en las vainas, las cuales muestran manchas concéntricas características, que cubren extensas áreas de las hojas y las brácteas infectadas. Las lesiones pueden juntarse causando la muerte de las hojas superiores. Las manchas aparecen en la vaina de las hojas, junto al nivel del suelo. La enfermedad progresa rápidamente desde un comienzo, extendiéndose de la vaina hacia la hoja; en los ataques severos destruye el tallo. El hongo también ataca raíces y entrenudos del tallo, invadiendo la médula, la cual se vuelve negruzca (carbonosa) y fibrosa, llena de micelio y esclerocios del hongo (Fig. 1) (Rodríguez, 200).

Su principal daño es la pudrición pardusca de las mazorcas, que presenta un moho algodonoso de color café claro con esclerocios pequeños, redondos y negros. La enfermedad se presenta, generalmente, cuando el maíz está en proceso de maduración y está casi siempre asociada al estrés de la planta, debido a períodos de sequía (especialmente en suelos arenosos) y altas temperaturas; disminuyendo el valor comercial del mismo. La propagación del hongo se efectúa a través de los esclerocios, los cuales se observan externamente en la superficie del tallo y en los restos de cosecha. Los esclerocios caídos al suelo germinarán en el siguiente período cuando las condiciones de humedad y temperatura estén dadas, y pueden permanecer en el suelo durante muchos años, llegando a convertirse en las estructuras de resistencia del hongo garantizando la perpetuación del mismo, año tras años. En el campo, la enfermedad suele presentarse en “parches” irregulares dentro del cultivo. La reducción en el peso de los granos es el factor más importante de esas pérdidas (Echagüe *et al.*, 2008).

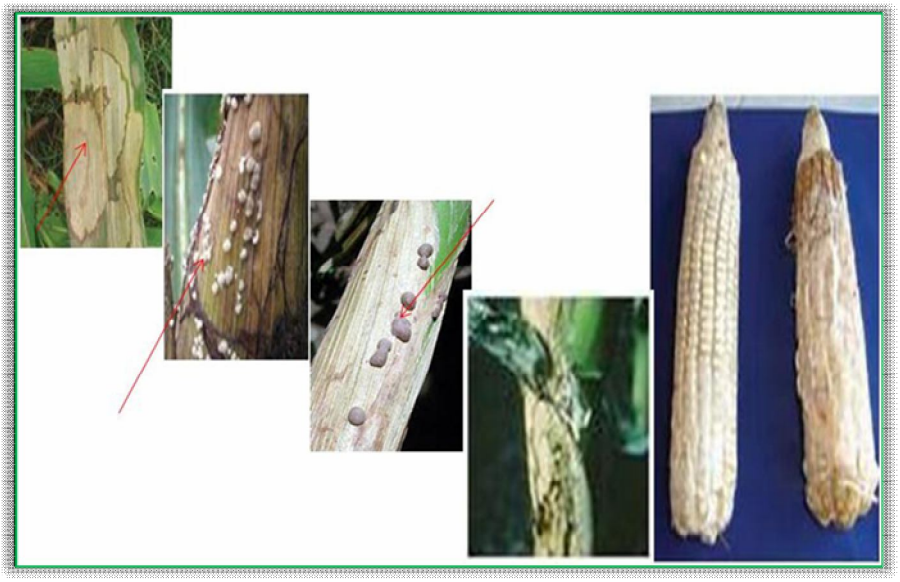


Figura 1. Sintomatología de Rhizoctoniosis o mancha bandeada del maíz, tanto en estado vegetativo como en estado de madurez fisiológica de la planta.

2.2 Etiología

El estado anamorfo del hongo es *R. solani* y el teleomorfo es *Thanatephorus cucumeris* (Frank.) Donk, que es un Basidiomicotas, Ceratobasydiales. Las hifas de *R. solani* son capaces de anastomosarse (fusión de hifas), por lo que los diferentes aislamientos han sido agrupados en función a esta particularidad, siendo el micelio casi siempre de color canela o castaño oscuro y las hifas de diámetro que va desde los 8 a 10 micras. Las hifas vegetativas jóvenes tienen sus células multinucleadas y se ramifican cerca del septo distal de la célula, pero las características más típicas de *R. solani* son sus ramificaciones en ángulo recto, constricciones en el punto de origen de la ramificación de la hifa, formación de un septo en la rama cerca de su origen y un septo tipo doliporo (Fig. 2) (Agrios, 1998).

Por su parte, *T. cucumeris* se distingue por una combinación de caracteres. El himenio (racimos de basidios) es discontinuo y distintivo, aunque variable, los holobasidios son relativamente cortos y anchos, de forma abarrilada a subcilíndrica, no uniforme ni constreñida cerca de la mitad y poco más ancho que la hifa de soporte. Los esterigmas son fuertes y generalmente erguidos, mientras que las

esporas son mucosas, de paredes delgadas, prominentemente apiculadas, no amiloides, hialinas, tienden a ser oblongas a elipsoidales, aplastadas por un lado y, a menudo, más anchas hacia el extremo distal (Agrios, 1998).

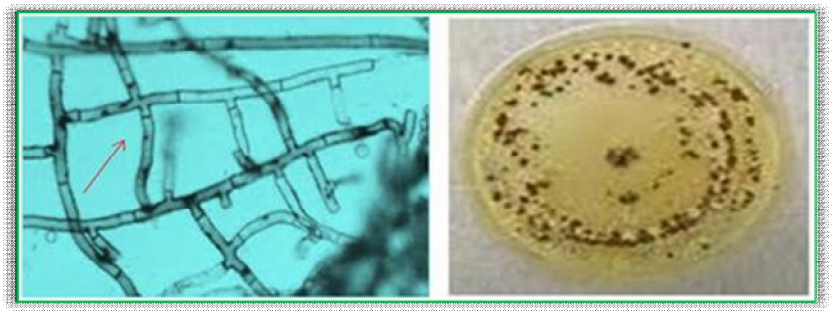


Figura 2. Característica típica de *R. solani* y sus ramificaciones en ángulo recto (a la izquierda). Crecimiento del hongo en condiciones *in vitro* (a la derecha)

El hongo es una especie heterogénea conformada por numerosas cepas, las cuales difieren en las características de crecimiento *in vitro* y en patogenicidad (Ogoshi *et al.*, 1990). Característicamente las distintas cepas poseen células somáticas multinucleadas, desarrollan esclerocios indiferenciados, no forman esporas asexuales (conidios) y producen estructuras sexuales con la morfología de *T. cucumeris*, cuya aparición en la naturaleza es rara y, además, difícil de inducir experimentalmente. Sobre la base de la ocurrencia o ausencia de compatibilidad vegetativa (anastomosis), las cepas han sido separadas en grupos de anastomosis (AGs), los cuales, con algunas excepciones (AG-BI y AG-8), pueden ser considerados como poblaciones genéticamente distintas (Carling *et al.*, 2002).

La independencia genética de los AGs ha sido comprobada mediante análisis bioquímicos y moleculares, pero la evaluación de anastomosis, aunque laboriosa, ha sido señalada como la metodología de mayor confiabilidad para la diferenciación de cepas en *R. solani* (González *et al.*, 1999).

Actualmente hay catorce AGs en *R. solani* descrito en la literatura (AG-1 al 13 y AG-BI) (Ogoshi *et al.*, 1990; Carling *et al.*, 2002) (Fig. 3), e incluyen cepas patógenas y no patógenas. 13 AGs (AG-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -

13 y-BI); aunque en una reciente discusión, se formuló una propuesta para definir AG-BI como un subconjunto de AG-2. Además de la AG-2, AG-1, -3, -4, -6, -8 y -9 también se ha dividido en subconjuntos. Los cuatro AGs descritos inicialmente, (AG-1, -2, -3 y -4) causan enfermedades importantes en las plantas en todo el mundo, mientras que el resto de los AGs son menos destructivos y por lo general tienen una distribución geográfica más restringida. AG-12 es único entre los AGs de *R. solani*, porque muchos de sus aislamientos son micorrízicos en campos australianos (Carling *et al.,* 2002). Las cepas AG-BI y AG-8 tienen la habilidad de fusionarse con miembros de otros AGs. Por otra parte, las regiones de ADN recombinante (Fig. 3) ilustran las estimaciones de las relaciones filogenética del grupo de anastomosis (AG) -13 y todos los AGs de *R. solani*; AG-2 se presenta como subconjuntos de -2 a 1, -2 BI, IIIB -2-2, -2-2, IV, LP -2-2, -2-3, y -2-4; esto permite aseverar que este hongo es un género criptado, pues aún cuando existe independencia genética entre los grupos de anastomosis, hay cierta relación entre ello debido a la cercanía entre parientes (Ogoshi *et al.,* 1990).

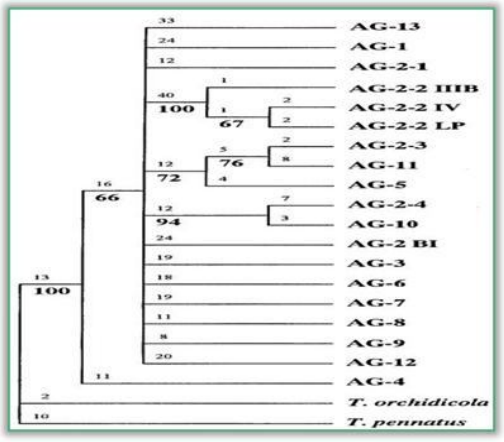


Figura 3. El dendrograma muestra la relación genética entre los AGs de *R. solani*, en base a las secuencias del espaciador transcrito interno (ITS).

En el caso de Venezuela se ha reportado el grupo de anastomosis de *R. solani* AG1-IA en las zonas productoras de maíz de Guárico, Portuguesa, Barinas y Yaracuy; lo cual ha sido comprobado en diversos estudios donde se ha incluido el estudio fenotípico en invernadero y el análisis molecular (Perdomo *et al*, 2007).

2.3 Patogénesis y Epidemiología

R. solani puede penetrar al hospedante mecánicamente o bajo la acción de enzima o toxinas, dependiendo de la etapa de la penetración, mediante la forma de un micelio estéril, incoloro cuando pasa por su estado juvenil pero que se torna amarillo o de color café claro conforme madura. Luego ocurre la anastomosis, dando origen a la formación de una hifa heterocariótica. El patógeno sobrevive casi siempre en forma de micelio o esclerocios en el suelo, en plantas perennes infectadas o en órganos de propagación (Fig. 4) (Rodríguez, 2000).

El patógeno se mantiene de una temporada a otra en forma de esclerocio (estructura de resistencia) en el suelo germinando cuando las condiciones ambientales son favorables, siendo el óptimo para el desarrollo de la enfermedad 18ºC, y disminuyendo cuando la temperatura del suelo aumenta, mientras que el micelio se encuentra en restos vegetales, así la población de *R. solani* puede incrementarse cuando se cultiva maíz en el mismo campo sucesivamente (Rodríguez, 2000).

Los niveles altos de humedad y sobretodo la falta de drenaje, tienden también a incrementar la formación de esclerocios sobre las hojas y tallos del maíz, y al germinar los esclerocios, el hongo invade toda la planta, especialmente a través de heridas (Rodríguez, 2000). Por otro lado, el número de lesiones inducidas en el hospedante es también reflejo de la cantidad de inóculo presente en el suelo (Mora, 1996).

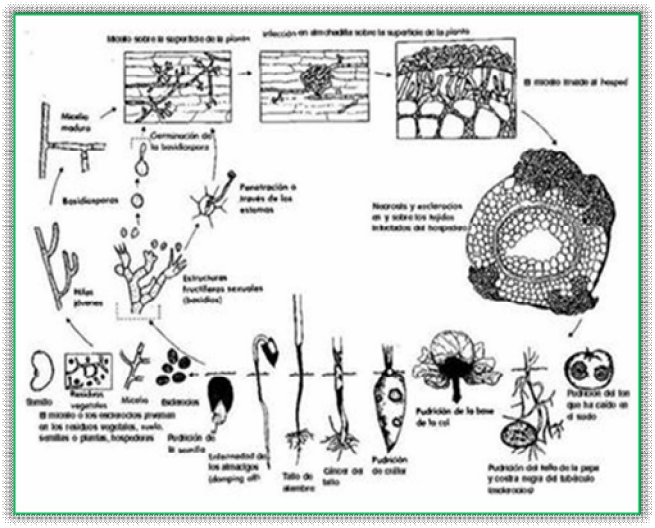


Figura 4. Ciclo de la enfermedad causada por *R. solani*

3. Control biológico

El control biológico fue originalmente definido como "la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia" (DeBach, 1977; DeBach y Rosen, 1991). Éste se distingue de otras formas de control de plagas por actuar de una manera densodependiente, esto es, los enemigos naturales se incrementan y destruyen una gran porción de la población cuando la densidad de esta población se incrementa.

Por su parte Obregón, (2001) lo define como la acción de los parásitos predadores y patógenos para mantener la densidad de otro organismo en valor más bajo que el que se podría presentar en su ausencia. En la naturaleza los microorganismos no viven aislados unos de otros, si no que se encuentran en distintas relaciones de tipo simbiótico o antagonista.

Asimismo, Pérez Consuegra, (2004) hace referencia a una definición de control biológico enunciada por Van Driesche y Bellows (1996) donde expresa que "el control biológico es el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciendo esta

menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de éstos", esta definición es bastante amplia e incluye todos los grupos de organismos con capacidad para mantener y regular poblaciones de organismos plaga a un nivel bajo, por lo tanto todos pueden considerarse agentes de control biológico y estar incluidos en la categoría de enemigo natural por ser considerados parásitos, depredadores o patógenos, entre otros.

Más recientemente, la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) citado por Guédez *et al*; (2009), define el control biológico como "la utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos". Desde este punto de vista se incluyen en este concepto no solo los parasitoides, depredadores y patógenos de insectos y ácaros, sino también el de fitófagos y patógenos de malezas así como feromonas, hormonas juveniles, técnicas autocidas y manipulaciones genéticas.

Existen tres técnicas generales de control biológico; importación o control biológico clásico, incremento y conservación. Cada una de estas técnicas se puede usar bien sea sola o en combinación en un programa de control biológico. En el control biológico clásico, los enemigos naturales son deliberadamente importados de una región a otra con el propósito de suprimir una plaga de origen exótico. En el control biológico aumentativo, la eficacia de aquellos enemigos naturales que se encuentran en el lugar es realzada por liberaciones de individuos criados en insectario. En este sentido, la conservación de los entomófagos va dirigida preferentemente contra plagas endémicas, no obstante también incluye el mejoramiento de las posibilidades de establecimiento de especies introducidas para el control biológico de plagas exóticas o incrementar la eficiencia de especies criadas masivamente en laboratorio (Ehler, 1990; Trujillo, 1991).

En Venezuela, a pesar de que no existen cifras oficiales sobre las plagas que ingresan, en los últimos años han sido numerosas las nuevas plagas detectadas, siendo previsible que esta tendencia se mantenga en el futuro, en este escenario el control biológico constituye una herramienta válida. A pesar de no haber existido

una política nacional, sino hasta ahora, donde el control biológico comienzan a tener importancia a nivel gubernamental, a través del Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria SASA hoy conocido como el Instituto Nacional de Salud Agrìcola Integral (INSAI); se ha venido empleando el control biológico en varios cultivos como hortalizas, maíz, caña de azúcar, ajonjolí, tabaco, café entre otros, con muy buenos resultados tanto en lo económico como en el rescate del ambiente y alimentos libres de contaminantes (Guédez *et al*; 2009).

Dentro del control biológico, los hongos y bacterias antagonistas resultan importantes para el manejo de los fitopatógenos. En el mundo se conoce un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos. Este efecto es aprovechado por el hombre para la regulación, tanto de patógenos cuyo hábitat es el suelo, como aquellos que se desarrollan en la parte foliar de las plantas. Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permiten ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Infante *et al*; 2009).

Desde los primeros estudios en esta temática y hasta el presente, entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma* , debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos. *Trichoderma* Rifai como un controlador biológico y antagonista natural de fitopatógenos muestra una amplia gama de hospedantes y dentro de ellos están los hongos fitopatógenos de importancia, tales como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd.y Hans, *Fusarium roseum* Link, *Botrytis cinerea* Pers, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp. *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., entre otros (Howell y Stipanovic, 1995).

4. El Género *Trichoderma*

4.1. Morfología y taxonomía

Trichoderma agrupa hongos filamentosos anamórficos o imperfectos (mitóticos) que de forma artificial han venido clasificándose en la División Deuteromicota y dentro de ésta, en la clase de los Hifomicetos. Se reproducen de forma asexual mediante un ciclo en el que alternan micelios y esporas (conidios). Estas estructuras asexuales se forman a partir de células desnudas, sin la envoltura adicional de un cuerpo fructífero. En algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto, sexual o teleomorfo (meiótico), dentro del género *Hypocrea* y géneros relacionados como *Podostroma*, *Sarawakus*, *Aphysiostroma* y *Protocrea* (Druzhinina y Kubicek, 2005; Samuels, 2006), demostrando que las especies del género *Trichoderma* son un grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (Kuhls *et al.*, 1996). En este sentido, se ha identificado a *Hypocrea lixii* como el estado teleomorfo de *Trichoderma harzianum*, *H. atroviridis* como el teleomorfo de *T. atroviride*, e *H. virens* como el teleomorfo de *T. virens* (Chaverri *et al.*, 2001 y 2003; Dodd *et al.*, 2003), tres de las especies del género más usadas en el control biológico (Monte, 2001).

El género *Trichoderma* se describió hace más de 200 años por Persoon, (1794). Desde entonces y hasta la llegada de las técnicas moleculares, la taxonomía del género se basó en criterios morfológicos, que son herramientas subjetivas, imprecisas e ineficaces cuando se trata de diferenciar especies o clasificar nuevos aislamientos dentro de este género. Entre las primeras clasificaciones, basadas en criterios morfológicos, se encuentran las de Rifai (1969) y Bisset (1991). Rifai estableció nueve “agregados específicos”, en cada uno de los cuales encuadró especies filogenéticamente distintas pero con una morfología similar. Más tarde, Bisset revisó las especies de *Trichoderma* existentes, los “agregados específicos” y algunas formas anamórficas de *Hypocrea*, y propuso la división del género *Trichoderma* en cinco nuevas secciones:*TRICHODERMA*, *PACHYBASYUM*, *LONGIBRACHIATUM*, *SATURNISPORUM* E *HYPOCREARUM* (Bisset, 1991[a]).

Los primeros estudios orientados a caracterizar cepas de *Trichoderma,* no basados en criterios morfológicos, aplicaron características fisiológicas y/o bioquímicas (Zamir y Chet, 1985; Stasz *et al.,* 1989; Grondona *et al.,* 1997). Actualmente, el uso de técnicas moleculares como RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism), perfiles RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR), secuencias de distintas zonas del genoma o marcadores SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) se están imponiendo, para la identificación de cepas, la sistemática del género y la monitorización de agentes de biocontrol; lo que a su vez ha permitido conocer que el número de cromosomas por núcleo y el tamaño del genoma varían según la especie, de 3 a 7 y de 30,5 a 38,8 Mb, respectivamente (Goldman *et al.,* 1998; Muthumeenakshi *et al.,* 1994; Arisan-Atac *et al.,* 1995; Hermosa *et al.,* 2000; 2001; Rubio *et al.,* 2005 y Martínez *et al.,* 2008).

Particularmente útiles resultan los datos de secuencias obtenidos de las regiones ITS (internal transcribed spacer) y de genes como los que codifican el factor de elongación de la transcripción 1-α (tef1) o la endoquitinasa 42 (ech42), o el ADNr 18S y el ADNr 28S, ya que han permitido establecer taxones moleculares (Kullning-Gradinger *et al.,* 2000; Kubicek *et al.,* 2003), describir nuevas especies como *T. asperellum* (Lieckfeldt *et al.,* 1999) o *T. pleurotum* (Komon-Zelazowska *et al.,* 2007), relacionar especies como *T. harzianum* con su fase sexual *H. lixii* (Chaverri *et al.,* 2003), o distinguir y tipificar aquellas formas que son dañinas para los cultivos de champiñón (Hermosa *et al.,* 2000).

En la actualidad, se aceptan trece grupos o "clades" dentro del género *Trichoderma* : *CERAMICA*, *HARZIANUM*, *STROMATICUM*, *BREVICOMPACTUM*, *VIRIDE*, *MINUTISPORUM, MEGALOCITRINA, LUTEA, SEMIORBIS, CHLOROSPORA, STRICTIPILE* y *LONGIBRACHIATUM* (Samuels, 2006; Degenkolb *et al.,* 2008); aunque en los últimos 20 años, como consecuencia del uso de las técnicas de biología molecular y de la continua búsqueda de aislamientos en nuevos ecosistemas, la sistemática de este género está sometida a continuos cambios.

Constantemente se señala que el género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios

sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos y según Villegas (2005), *Trichoderma* se ubica taxonómicamente en:

Reino: Fungi.

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Trichoderma*.

Gams & Bisett (1998) señalan que las características macroscópicas de *Trichoderma* son: colonias de rápido crecimiento en PDA, 7-9 cm de diámetro después de tres días, micelio aéreo flucoso, blanco a ligeramente gris o raramente amarillo, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta de 8mm en diámetro, concéntricas o cerca de las márgenes de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril. Al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas o en algunos aislados ferruginosas. Pocos aislamientos producen abundantes cristales amarillos. Exudados incoloros a ámbar o amarillo verdoso. Pigmentaciones amarillo grisáceas son comunes en algunas especies, pero no son muy distintivas, al contrario algunas especies son mejor caracterizadas por una completa ausencia de pigmentación, mientras que algunos aislamientos muestran pigmentaciones rojizas. Características como cristales en el medio son producidas únicamente por *Trichoderma aureoviride*. Indistintamente olores de mohos o humedad son producidos por diferentes cepas de *Trichoderma*. Características de olores aromáticos parecidos a coco son producidos comúnmente por algunas cepas de *Trichoderma viride* y a veces por *Trichoderma auroviride*.

Según Gams & Bisett (1998), las características microscópicas de los aislamientos de *Trichoderma*, son las siguientes:

a) Fiálides.- pueden estar dispuestos regularmente en forma de verticilos, en parejas alternadamente o en disposiciones irregulares. El cuerpo de los fiálides es una característica de algunas divisiones, así en la división *Pachybasium* los fiálides son característicamente pequeños y verticales, mientras que en la división *Longibrachiatum* son alargadas en forma de cilindro, en la mayoría de las cepas las partes terminales de los fiálides tienden a ser alargadas y estrechas (Fig. 5).

b) Hifas.- pueden ser anchas y rectas o relativamente angostas y flexibles. La punta de los conidioforos en especies de la división *Pachybasium* termina en una elongación la cual podría ser recta ondulada y espiralada.

c) Conidias.- existen varias formas de conidias desde globosas, elipsoides, ovoidales y de pequeños cilindros, la parte final en forma estrecha basal y truncada. En general las variaciones de las dimensiones de las conidias en *Trichoderma* no son grandes; sin embargo, las especies que son parecidas pueden ser usualmente diferenciadas en tamaño. La superficie de las conidias aparece lisas en la mayoría de las especies en observaciones a través de la luz del microscopio, aunque algunas especies tienen conidias aparentemente lisas y con estructuras adicionales. En algunos grupos de *Trichoderma viride* las conidias suelen ser ásperas y rugosas, y las conidias pueden tener proyecciones laterales en forma de balas al exterior en dos especies *T. saturnisporum* y *T. ghanense*. Los pigmentos de las conidias también son características que varían de color desde cuerpos verdes o plomo o café pero estos colores no son frecuentes; en algunas especies maduras las conidias suelen ser de color verde obscuro y otras suelen ser más pálidas.

d) Clamidosporas.- son muy comunes en las especies de *Trichoderma* pero estas tienden a ser en forma de globo o elipse, terminal o intercalada, con olores a moho o humedad, de color amarillento o verdoso y de 6-15 µm de diámetro en la mayoría de especies.

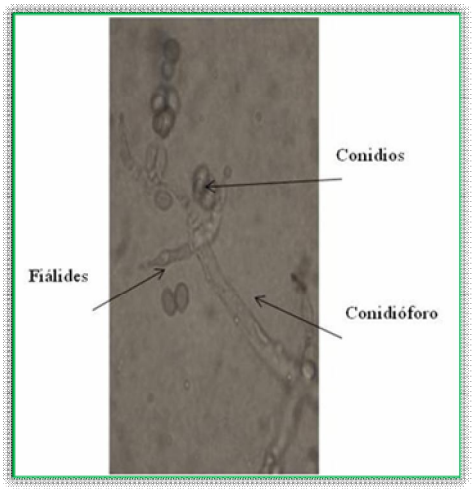


Figura 5. Estructura de *Trichoderma* spp. (*100x*)

Las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30 ºC). Debido a esto se dice que las especies de *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios. Además, éstas toleran condiciones ambientales adversas, constituyéndose en las estructuras de sobrevivencia del hongo, permitiendo que éste perdure a través del tiempo (Díaz, 1994).

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, los conidióforos son ramificados, se presentan con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran

parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Harman, 2003).

Las colonias de las especies del género *Trichoderma* en medios de cultivos agarificados generalmente tienen un crecimiento rápido, 9 cm en cuatro días, con una superficie lisa al principio, que luego toma un color verde brillante debido a la gran cantidad de conidios que se forman en las puntas de las hifas; sin embargo, se ha señalado que también pueden ser de color blanco o amarillo. El micelio está compuesto por hifas hialinas, septadas, muy ramificadas y superficie lisa (Elósegui, 2006).

4.2. Ecología y distribución

El género se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos le confiere a este género la posibilidad de ser utilizado en la industria de la biotecnología (Harman, 2006).

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores

microbianos, siendo el hierro un elemento esencial para su correcto desarrollo (Carsolio *et al*., 1999; Howell, 2003).

Las especies de *Trichoderma* son de vida libre, comunes en los ecosistemas del suelo y la raíz. Algunos reciente descubrimientos demuestran que son oportunistas, simbiontes de plantas avirulentas, así como ser parásitos de otros hongos. Por lo menos ciertas cepas resistentes penetran en la epidermis de las raíces y en algunas células debajo de este nivel. Producen o liberan una variedad de compuestos que inducen respuestas de resistencia localizada o sistémica, y esto explica su falta de patogenicidad para las plantas. Estas asociaciones de microorganismos-raíz causan cambios sustanciales en el proteoma y el metabolismo de la planta. Las plantas están protegidas de numerosas clases de patógeno por parte de respuestas que son similares a la resistencia sistémica adquirida y a la resistencia sistémica inducida de las rizobacterias. La colonización de la raíz por *Trichoderma* spp. también mejora con frecuencia el crecimiento y desarrollo de éstas, la productividad de los cultivos, la resistencia al estrés abióticos y a la captación y utilización de nutrientes (Harman, 2006).

En cuanto a los parámetros ambientales necesarios para su crecimiento, *Trichoderma* puede crecer dentro de un amplio rango de temperaturas, aunque la especie *T. brevicompactum* se diferencia de otras especies de *Trichoderma* porque tiene un crecimiento mucho más lento, con temperaturas de crecimiento óptima y máxima, entre 26-28ºC y 30-32ºC, respectivamente (Kraus *et al.*, 2004).

Otro aspecto destacable es la resistencia relativa de varias especies de *Trichoderma* a numerosos fungicidas químicos utilizados en agricultura, como los organoclorados de tipoendosulfano (Smith, 1995; Shaban y El-komy, 2001) y bencimidazoles (Mukherjee *et al.*, 2003).

Este hecho, junto con su velocidad de crecimiento y su fácil adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas, daría a *Trichoderma* ventaja sobre otros muchos hongos filamentosos, en la colonización de suelos, cuando forman parte de formulados utilizados en el control de hongos fitopatógenos.

4.3 Mecanismos de acción directa sobre el patógeno

El género *Trichoderma* presenta una gran facilidad para colonizar las raíces de las plantas, que ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Varios mecanismos de acción se han demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma* spp. actúa como biocontrolador y como colonizador de las raíces, como son: micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo del sistema radicular, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y de resistencia inducida. De estos, los primeros cuatro mecanismos mencionados tienen acción en el hongo fitopatógeno, los otros son indirectos, ya que su acción es elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta (Harman, 2006; Elad, 1983).

4.3.1 Biocontrol por competencia

Fungistásis. Un buen antagonista es capaz de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otras especies, incluyendo plantas, y sobrevive bajo condiciones adversas o competitivas (Benítez, *et al*., 2004). La resistencia a compuestos tóxicos puede estar asociada con la presencia en cepas de *Trichoderma* de sistemas de Transporte ABC (Harman *et al*., 2004). Por esta razón son muy eficientes en el control de patógenos, cuando se aplica en combinación con fungicidas químicos como el bromuro de metilo, benomyl, captan u otros (Vyas *et al*., 1995).

Se han utilizado cepas fúngicas de este género para el control de enfermedades de plantas, lo cual ha resultado un trabajo innovador, ya que se han seguido varias

estrategias encaminadas a aumentar su capacidad de degradar la pared celular de los hongos a los que ataca, con el fin de obtener cepas de *Trichoderma* mejores que las ya existentes. Así, mediante la transformación de cepas de *Trichoderma harzianum* con genes de quitinasas y glucanasas, se han obtenido cepas con actividades enzimáticas muy superiores a las de la cepa silvestre (Rangel *et al.,* 2010).

Ciertas especies de *Trichoderma* como *T. harzianum, T. atroviride, T. asperellum, T. hamatum, T. gamsii, T. viride* o *T. virens*, son utilizadas para el control biológico de enfermedades en la agricultura. En algunos casos, en programas de manejo integrado, combinando agentes biológicos y químicos, para reducir la dosis de estos últimos hasta niveles subletales, gracias al efecto sinérgico de la acción de ambos tipos de tratamiento (Monte, 2001; Harman *et al*., 2004; Jiménez-Díaz *et al.*, 2010).

Actualmente hay más de 50 productos biológicos formulados en el mercado internacional, de los cuales un 68% actúa por competencia y antibiosis, 15% solo por competencia, 8% por competencia, antibiosis y lisis y 5% por hiperparasitismo, aunque algunos incluyen la resistencia inducida y la promoción del crecimiento en sus mecanismos de acción, de éstos un 68% va dirigido a hongos fitopatógenos de suelo (*Rhizoctonia solani*, Kühn, *Pyhtium* spp, *Fusarim* spp, *Sclerotium* spp, *Verticillium* spp, *Agrobacteriumtumefacien*), solo un 20% a enfermedades aéreas (antracnosis, oidio, mildiu, cercosporiosis.) y el resto a enfermedades de postcosecha causadas por los hongos *Penicillium* spp y *B. cinerea* (Rangel *et al.,* 2010)

4.3.2 Micoparasitismo

Son varias las enzimas producidas con capacidad de hidrolizar las paredes celulares de numerosos hongos. Estas enzimas incluyen endoquitinasas, proteasas, exoglucan-b-1,3 glucosidasas, endoglucan-b-1,6 glucosidasas, etc. Estas enzimas son inducidas por los diferentes polímeros componentes de la pared de distintas estructuras de los hongos fitopatógenos.

Este proceso puede ser dividido en cuatro sucesos principales:

1. Crecimiento quimiotrófico: Donde exudados del patógeno atraen a *Trichoderma* spp.

2. Reconocimiento: Algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. son específicos a algunos fitopatógenos, y es en esta etapa donde el fenómeno de especificidad de ataque se define. Esta etapa es influenciada por las lectinas.

3. Adhesión: una vez *Trichoderma* spp. ha reconocido al patógeno lo envuelve y se adhiere a las hifas cubriéndolo totalmente.

4. Degradación: el paso final es la degradación de la pared celular del hongo fitopatógeno por medio de la producción de enzimas como proteasas y endohidrolasas. En el micoparasitismo es fundamental la producción de enzimas que puedan degradar al patógeno. Diversos estudios se han realizado en enzimas tales como quitinasas, gluconasas, quitobiosidasas, hidrolasas, proteasas, etc., su actividad sobre la germinación de esporas y todos los estados de vida de los patógenos y se ha encontrado una clara correlación entre la producción de enzimas y la actividad antifungal (Lorito *et al.,* 1998).

Entre los mecanismos de acción de *Trichoderma,* el micoparasitismo es el más conocido y estudiado. En los últimos 20 años se han purificado distintas CWDEs (enzimas que degradan la pared celular de los hongos, por sus siglas en inglès) y clonado sus genes: proteasa PRB1 y PRA1 (Geremía *et al.*,1993; Suárez *et al.,* 2004), quitinasas CHIT33, CHIT36, CHIT37, CHIT42 y CHIT72 (Ulloa *et al.*,1992; de la Cruz *et al.,* 1992, Lorito *et al.,* 1994a, Viterbo *et al.*,2002), α-glucanasas AGN13.1 (Ait-Lahsen *et al.*,2001) y AGN13.2 (Sanz *et al.*,2005), β-1,3 glucanasas BGN13.1 (de la Cruz *et al.*,1995a), β-1,6 glucanasas BGN16.2 y BGN16.3 (de la Cruz *et al.*,1995b, Montero *et al.,* 2005 y 2007). Se ha realizado el aislamiento de los genes que codifican dichas enzimas (García *et al.,* 1994; Hayes *et al.,* 1994; Limón *et al.,* 1995; Peterbauer *et al.,* 1996), obtenido transformantes de *Trichoderma* (Migheli *et al.,* 1998; Limón *et al.,* 1999; Sanz *et al.,* 2005; Montero-Barrientos *et al.,* 2007) así como la regulación de los genes relativos al mismo (Lorito *et al.,* 1996a; Mach *et al.,* 1999). Además, se han obtenido plantas transgénicas de tabaco

(*Nicotiana tabacum*) y patata (*Solanum tuberosum*) que sobreexpresan la endochitinasa CHIT42 de *T. harzianum*, mostrando ser altamente tolerantes a patógenos foliares (*Alternaria alternata*, *A. solani*, y *Botrytis cinerea*) y patógenos de suelo (*R. solani*) (Lorito *et al.,* 1998; Dana *et al.,* 2006); en Tijerino, (2010).

4.3.3 Antibiosis

Se considera como el mecanismo de acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos y está fuertemente ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo (Tronsmo y Harman, 1998; Singh *et al.,* 2002). Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico. En la práctica uno de los antecedentes ha sido el caso de la aparición de cepas de *Agrobacterium tumesfaciens* resistentes a el Agrosin 84, un antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* (Infante *et al*; 2009).

4.3.3.1 Antibiosis por enzimas hidrolíticas

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* secretan enzimas hidrolíticas que le permiten penetrar la pared celular de los hongos fitopatógenos y utilizando su contenido celular. Las glucanasas, quitinasas y proteasas son enzimas que hidrolizan los nutriente inmunoestimulante de la pared celular de fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani y Pythium* sp, las cuales se inducen, al menos parcialmente, ante el contacto directo con el hospedante (González *et al*., 2011).

Las glucanasas son enzimas que degradan los b-glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, identificados por los productos de hidrólisis: (i) las exo-b-glucanasas, las cuales hidrolizan el sustrato por ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor, y (ii) las endo- b-glucanasas, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace b de la cadena polisacarídica, liberando pequeños oligosacáridos. La

degradación de los b-glucanos por los hongos se acompaña frecuentemente de la acción sinérgica de las endo- y exo-b-glucanasas (Zeilinger *et al*., 2007).

Asímismo, las paredes celulares de los fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* (Sacc), *Rhizoctonia solani* (Kühn), y *Pythium* sp. están en su mayoría compuestos de 1,3-b-glucanos y quitina, y algunos como los Oomycetes (ejemplo, *Pythium* sp.), que poseen los 1,3-b-glucanos, también contienen celulosa en lugar de quitina, lo que explica la importancia de estas enzimas en la capacidad antagónica de *Trichoderma* y por lo tanto en su utilidad como bioplaguicida (Martínez *et al*., 2008).

4.3.3.2 Antibiosis por metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios fueron sólo materia de interés para los químicos orgánicos que se ocupaban principalmente de su aislamiento, identificación y síntesis, pero no de aspectos como el metabolismo del hongo o sus interacciones ecológicas (Cardoza *et al.,* 2005).

Los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* se clasifican en diferentes grupos según su origen biosintético y su estructura química. Por lo general, una cepa tiene la capacidad de producir varios metabolitos, algo que dificulta poder relacionar una determinada ruta biosintética con su capacidad de biocontrol. De manera general, en base a las estructuras identificadas hasta ahora de los diferentes metabolitos que exhiben actividad antibiótica en *Trichoderma,* se pueden distinguir dos grupos principales:

I. *Metabolitos de bajo peso molecular (< 3000 Da) y volátiles*: incluyen compuestos aromáticos sencillos, algunos poliquétidos como pironas y butenólidos, terpenos volátiles y de tipo isociano, y sustancias relativamente no polares que tienen unapresión de vapor significativa. En el ambiente del suelo, estos compuestos orgánicos volatiles (VOCs) podrían recorrer distancias a través del sistema edáfico y la rizósfera, y mejorar la condición de un organismo al modificar la fisiología de otros organismos competidores, como sucede con la 6-pentil-α-pirona (6PP) (Keszler *et al.,* 2000; Vinale *et al.,* 2008; Daoubi *et al.,* 2009).

II. *Metabolitos de alto peso molecular y polar*: incluye peptaiboles que pueden exhibir su actividad en interacción directa por contacto entre especies de *Trichoderma* y sus antagonistas (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Szekeres *et al.,* 2005).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas "antibióticos" (Tronsmo y Harman, 1998). Al inicio se estimó que la actividad inhibidora de aislamientos de *Trichoderma* sobre otros hongos se debía solo a compuestos no volátiles. Dennis y Webster (1971), pioneros en esta temática, con la realización de los trabajos más completos acerca de la función de los antibióticos producidos por hongos del género *Trichoderma* sobre patógenos de las plantas. Ellos relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma* spp. con compuestos no volátiles, entre los que se encontraban uno identificado como trichodermina y otros metabolitos peptídicos. En investigaciones posteriores Webster y Lomas (1964) citados por Infante *et al*; 2009, determinaron que *Trichoderma* spp. produce dos antibióticos más: gliotoxina y viridina. Más tarde Oliver y Germain citado por Martínez *et al*; 1998, informaron que *T. harzianum* Rifai produce numerosos antibióticos como son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

Posteriormente, Dennis y Webster (1971), detectaron que la actividad antibiótica de algunos aislamientos se debía también a la producción de compuestos volátiles, y notaron que los aislamientos más activos poseían un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista. Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático.

Stefanova *et al.,* (1999), señalaron la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma* y concluyeron que los mismos reducen el crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan

y *R. solani* en medios de cultivo envenenado con filtrados líquidos donde se habían cultivado las cepas antagónicas. Plantean además, que éstos causan a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. Por otro método, Rivero (2008), evaluó el efecto de antibiosis de dos aislados de *Trichoderma* en cultivo dual con *A. padwickii*, *B. oryzae*, *C. lunata* y *Phoma* sp., obteniendo inhibición significativa del crecimiento radial de estos patógenos.

Samuels (1996), señala sobre un grupo de cepas de *Trichoderma* denominado "Q" que produjeron gliotoxina y fueron efectivas frente a *R. solani*, pero no frente a *Pythium ultimum* Trow; mientras que otro grupo de cepas "P", que excretaron gliovirina mostraron resultados opuestos. Es decir, que la producción metabólica de los aislamientos de *Trichoderma* presenta, al igual que el micoparasitismo, determinada especificidad.

4.3.4 Competencia

La competencia de un controlador biológico puede resultar en la aniquilación de la población perjudicial, y puede darse a favor de *Trichoderma* spp. debido a su alta velocidad de crecimiento y desarrollo (Tronsmo y Harman, 1998; Fernández – Larrea, 2001). La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros) y microelementos. Esta forma de competencia en los suelos o sustratos ricos en nutrientes no tiene importancia desde el punto de vista práctico. Por ello, cuando se emplea fertilización completa o existe exceso de algunos de los componentes de los fertilizantes e inclusive en suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz.

La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una micobiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno

y colonización del sustrato. Un ejemplo fehaciente de estas interacciones es el notificado por Durman *et al.,* (2003), quienes encontraron una disminución del crecimiento de *R. solani* y de la viabilidad de los esclerocios por la acción de diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. Este hongo está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Infante, 2009).

Por otra parte, la capacidad para colonizar la rizósfera de las plantas es un punto clave en el proceso ya que un agente de control biológico que no sea capaz de crecer en la rizósfera no podrá competir por el espacio y los nutrientes de ese ecosistema (Howell, 2003). Por ejemplo, la competición de *T.harzianum* por el espacio físico es un mecanismo particularmente importante para el biocontrol de fitopatógenos como *B. cinerea*, causante de la "podredumbre gris" en racimos de uvas. En la bibliografía se pueden encontrar otros casos en los que se alude a la competencia por los nutrientes como responsable directo del efecto antagonista de *Trichoderma* (Stefanova *et al.,* 1999).

4.4 Mecanismos adjuntos

4.4.1 Estimulación del crecimiento de las plantas y tolerancia al estrés por parte de la planta

Otro de las aplicaciones de *Trichoderma* lo constituye el hecho de participar como promotor de crecimiento y desarrollo de las plantas, convirtiéndose en un aliado altamente importante en el manejo agrícola. La profundidad alcanzada por las raíces en presencia de este hongo, permite entre otros aspectos, que la planta sea más tolerante a la sequía. En estudios realizados con maíz indican que las raíces colonizadas por *Trichoderma* spp**.** requieren un 40% menos de fertilizantes nitrogenados con relación a las raíces que no se encuentran colonizadas (Harman, 2006). Conociendo que dicho cultivo demanda mucho Nitrógeno, existe la

posibilidad real que las aplicaciones de este conjunto químico, sean disminuidas, reduciendo así los costos de aplicación y una mejora apreciable del medio ambiente. El empleo del *Trichoderma* puede beneficiar a los productores agrícolas en sus propósitos de lograr cosechas más sanas y con mayor productividad (Páez, 2006).

Durante muchos años ha sido conocida la habilidad de estos hongos para incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo vegetal. *Trichoderma* spp. actúa como bioestimulante del crecimiento radicular, pues promueve el desarrollo de raíces debido a la secreción de fitohormonas, lo que permite, debido al incremento de masa radicular, una mejor asimilación de nutrientes y de humedad, aumentando la resistencia frente a situaciones de estrés biótico. Existiendo reportes en especies herbáceas como lechuga (*Lactuca sativa* Linnaeus), maíz (*Zea mays* Linnaeus), tabaco (*Nicotiana tabacum* Linnaeus), zapallo (*Cucúrbita maxima* Linnaeus), petunia (*Petunia hybrida* Linnaeus), tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill), entre otras (Cardoza *et al.*, 2005).

Este mecanismo puede atribuirse al control de fitopatógenos menores, a la producción de hormonas, producción de vitaminas, y conversión de nutrientes (zinc, magnesio y potasio) en el suelo. Estos nutrientes se encuentran en una forma no asimilable, así *Trichoderma* logra hacerlo asimilable para las plantas. La estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas, producto de las aplicaciones de *Trichoderma* spp., junto con los mecanismos de control puede, en alguna medida, explicar la estimulación de crecimiento. Pese a lo anterior, también se ha observado este efecto en cultivos bajo condiciones controladas, donde se han generado ambientes libres de patógenos (Benhamou y Chet, 1993).

La cepa T-22 de *Trichoderma* es uno de los ejemplos más estudiados en materia de estimulación del crecimiento de las plantas. Al aumentar el crecimiento de las raíces esto puede traducirse en el aumento de la productividad de la planta. En muchos casos, estas respuestas son el resultado de los efectos directos sobre plantas: disminución de la actividad de la microflora de la raíz, e inactivación de los compuestos tóxicos en la zona de la raíz. Los hongos beneficiosos aumentan la absorción de nutrientes, la eficiencia del uso del nitrógeno, y pueden solubilizar los

nutrientes del suelo. Las bases genéticas y moleculares de estos efectos son desconocidas, observándose diferencias en las respuestas entre líneas de plantas y cultivares, al menos en el maíz. Recientemente, fue demostrada la promoción del crecimiento fenotípico de las plantas por bacterias, la cual es inducida por la liberación de la acetoína, por compuestos volátiles y por el 2,3-butanediol84; no obstante los inductores moleculares de la promoción del crecimiento vegetal por *Trichoderma* spp. aún son desconocidos (Harman *et al.*, 2004).

Otras propiedades identificadas en *Trichoderma* a lo largo del proceso de interacción con la planta, son la resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico y cambios en el estado nutricional (Howell, 2003). Estudios recientes demuestran que algunas cepas de *Trichoderma* pueden regular los niveles de auxina en la rizósfera y estimular el crecimiento de las plantas y, por extensión, proteger el sistema radical e inducir la defensa sistémica frente al ataque de patógenos (Cardoza *et al.*, 2005).

4.4.2 Facilita la solubilización y absorción de nutrientes del suelo

Trichoderma spp. necesita fuentes de carbono difícilmente biodegradables como ligninas y celulosas para desarrollar su metabolismo. Por ello es capaz de movilizar nutrientes del suelo mediante excreción de enzimas extracelulares que transforman compuestos nitrogenados orgánicos en inorgánicos, fundamentalmente amonio, compuestos fosforados orgánicos en fósforo inorgánico, etc. Esta solubilización de nutrientes, permite a la planta utilizar parte de estos, aumentando su salubridad y resistencia al ataque de microorganismos patógenos (Cardoza *et al.*, 2005).

Asimismo, el efecto de *Trichoderma* en la solubilización de los fosfatos insolubles del suelo, facilita su asimilación por los cultivos. *Trichoderma* forma asociaciones con micorrizas, aumentando de manera significativa la rizósfera del suelo, permitiéndole a las plantas hacer una mayor extracción de nutrientes y con un alto grado de asimilación. Se ha demostrado también que este hongo es compatible con un biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum*, una bacteria que fija Nitrógeno en el suelo; por lo que se establecen relaciones de ayuda mutua, con el consiguiente beneficio para la nutrición de los cultivos (Villagra, 2007).

4.4.3 Biorremediación de suelos

Trichoderma es capaz de degradar compuestos órganoclorados, clorofenoles, y otros insecticidas como el DDT, endosulfán, pentacloronitrobenceno, aldrin y dieldrin, además de herbicidas como trifluralin y glifosato. Este hongo posee enzimas que ayudan a la degradación inicial del material vegetal y por último enzimas de mayor especialización que contribuyen a la simplificación de moléculas complejas como pesticidas (Agamez, *et al.*, 2009). Esto abre las puertas hacia la descontaminación de extensas áreas de suelos que se han contaminado por el uso irracional e indiscriminado de pesticidas de un alto efecto residual, causantes de grandes daños para la salud animal y humana.

Trichoderma posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos, incluyendo a los funguicidas. Sin embargo, el nivel de resistencia difiere entre cepas. Algunas líneas han sido seleccionadas o modificadas para ser resistentes a agroquímicos específicos. La mayoría de productores de cepas de este hongo destinadas a control biológico poseen información relacionada con la susceptibilidad o resistencia a un amplio rango de agroquímicos. Esto con el fin de que estos aislamientos sean compatibles con métodos de control aplicados, los cuales incluyen control químico (Agamez, *et al.*, 2009).

Este hongo posee enzimas tales como celulasas, hemicelulasas y xylanasas que ayudan a la degradación inicial del material vegetal y por último enzimas de mayor especialización que contribuyen a la simplificación de moléculas complejas como son las de los biopesticidas (Katayama y Matsumura, 1993).

4.4.4 Inducción de mecanismos de defensa de las plantas

Se señala que la estimulación de mecanismos de defensa de las plantas es debido a moléculas activadoras del hospedante. La habilidad de algunas cepas de *Trichoderma*

para proteger plantas contra patógenos de raíces puede ser atribuido al efecto antagonista contra la invasión del patógeno (Howell, 2003). No obstante, estas asociaciones de raíz-hongo también estimulan los mecanismos de defensa de la planta, donde cepas de *Trichoderma* adicionadas a la rizósfera, protegen las plantas contra diferentes clases de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos, mediante mecanismos de resistencia similares a la respuesta de hipersensibilidad, resistencia sistémica adquirida (SAR) e inducción de resistencia sistémica (ISR) (Harman *et al*; 2006). En ciertos casos, la inducción de resistencia inicia con una respuesta local por parte de la planta alrededor del punto de necrosis y es asociada con un incremento rápido de la síntesis de ácido salicílico (AS) y la posterior activación de un gran número de genes que codifica para la producción de proteínas (PR) relacionadas con la patogenicidad. Subsecuentemente, la resistencia se expresa sistémicamente y se desarrolla en todas las partes de la planta, fenómeno conocido como: Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Durrant y Dong, 2004).

En la actualidad, se han sugerido una serie de inductores sintéticos de resistencia que involucran el ácido salicílico (AS) como señal intermediaria que conduce a SAR inhibiendo la acción de la catalasa; convirtiendo el H2O2 en H2O y O2. La inhibición resulta en una acumulación de especies reactivas de oxígeno que puede actuar como mensajeros secundarios para inducir la expresión de los genes responsables de SAR (Chen *et al*; 1993). No obstante, algunos autores consideran que la inhibición de la catalasa no solo se logra por acción del AS. La inducción de ciertas proteínas no es producto de la acumulación del H2O2 sino del AS directamente, además, la actividad de la enzima no decrece con el tratamiento de AS. Así mismo, los niveles de AS dentro del tejido son muy bajos como para inhibir la catalasa, y el H2O2 en altos niveles también puede inducir la producción de AS (Hammerschmidt y Smith, 2000).

Investigaciones en ese sentido, han revelado que la expresión de la quitinasa (Chit42) de *Trichoderma harzianum* en plantas de tabaco y papa resulta en líneas transgénicas altamente tolerantes o completamente resistentes *contra Alternaria alternata, Alternaria solani, Botrytis cinerea y Rhizoctonia solani.* De esta manera, la

protección de plantas parece ser un resultado exclusivamente del incremento en la actividad enzimática de éstas. En otros casos, expresiones heterogéneas de pectinasas y glucanasas en plantas resultan en un refuerzo enzimático contra patógenos pero no en estimulación específica de los mecanismos de resistencia en plantas (Harman *et al*; 2004).

El concepto de inducción de resistencia al hospedante está apoyado por el trabajo de Yedidia *et al.,* 1999 en Howell (2003), quien demostró que plántulas de pepino de 7 días de edad, inoculadas con esporas de *T. harzianum* (T-203) a una concentración final de 10^5U.C./mL, sembradas en un sistema aséptico hidropónico, iniciaron respuestas tanto en las raíces como en las hojas. Ellos también demostraron que las hifas del hongo biocontrolador penetraron la epidermis y la corteza superior de la raíz del pepino. Esta respuesta de la planta se ha caracterizado por un aumento en la actividad de la peroxidasa (a menudo asociada con la producción de compuestos fungitóxicos), un aumento de la actividad de la quitinasa, y la deposición de callos en la superficie interior de la pared celular. El aumento de la actividad enzimática fue observado tanto en las raíces como en las hojas. Curiosamente, la defensa de la planta llegó a silenciarse con el tiempo y comenzó a parecerse a una relación simbiótica micorrizógena. Más tarde, Yedidia *et al.,* 2001 en Howell (2003), mostraron que la inoculación de las raíces de pepino con *T.harzianum* (T-203) indujo una serie de proteínas patogénicas, incluyendo enzimas hidrolítica. Las plantas tratadas con un producto químico inductor de resistencia a las enfermedades (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) muestran las respuestas de defensa similares a las de las plantas inoculadas con el control biológico (agent.might), donde al principio del proceso de infección se suprime la resistencia de la planta, pero la resistencia sistémica mejorada se produce una vez que los hongos micorrícicos se establecen en las raíces.

Otro hongo con similares características lo constituye el género *Fusarium*, el cual incluye razas y cepas tanto patógenas como no patógenas de las plantas. Las no patógenas tienen actividades fuertes de biocontrol; estos hongos muestran inducción de resistencia a cepas y razas patógenas de *Fusarium* y *Pythium*. Al igual que

Trichoderma, Fusarium tiene varios mecanismos para el antagonismo directo al patógeno e inducción de resistencia a las plantas, todos estos mecanismos son probablemente importantes en el biocontrol. De manera similar, el hongo del género *Rhizoctonia* contiene especies y cepas patógenas y no patógenas, las no patógenas actúan con frecuencia como agentes de control biológico induciendo resistencia a la planta. Por lo que se concluye que los hongos micorrizògenos simbiontes de las plantas, suprimen la resistencia de la planta durante el proceso de infección inicialmente, pero la resistencia sistémica mejorada puede producirse una vez que los hongos micorrícicos se establecen en las raíces. Otros hongos patógenos de las plantas, incluye las cepas de *Penicillium* y *Phoma*, las cuales tienen habilidades similares. Los efectos de los hongos inductores de resistencia tienen muchas semejanzas con los de *Trichoderma* spp., en particular, una vez que infectan a las células externas de raíces de las plantas, se limitan a esta zona, e inducen respuestas de resistencia. Así, los estudios de *Trichoderma* y estos otros hongos son susceptibles de proporcionar el conocimiento general relevante para todos estos sistemas (Harman, 2006).

4.4.5 Productor de proteínas

Otro aspecto importante es la capacidad de *Trichoderma* para secretar proteínas lo presenta como una alternativa a los organismos empleados hoy día como “fábricas celulares” para la producción de proteínas con fines farmacéuticos, ya que se dispone de eficaces sistemas de transformación (Cardoza *et al.*, 2006). En la industria es utilizado, debido a que es un productor eficiente de muchas enzimas extracelulares, se emplea comercialmente para la producción de celulasas y hemicelulasa (especialmente *T.reesi* Simmons), xylanasa (*T.longibratum)* y quitinasa (*T.harzianum*) y otras enzimas que degradan polisacáridos complejos. Son usadas con frecuencia en la industria textil y alimenticia para estos propósitos. Por ejemplo, las celulasas se utilizan en el proceso de prelavado de las telas de jeans para conferir con mayor facilidad la textura de desteñido. También forman parte de alimento para aves con el fin de incrementar la digestión de las hemicelulosas de la cebada y otros

cereales. En la industria panificadora se utiliza para potencializar el uso de las levaduras (Kuhls *et al.*, 1999).

Trichoderma reesei es la principal fuente industrial de celulasas y hemicelulasas utilizados para despolimerizar biomasa en azúcares simples que se convierten en productos químicos intermedios y biocombustibles, como el etanol. Inesperadamente, considerando la utilidad industrial y la eficacia de las enzimas carbohidratos-activos de *T. reesei*, su genoma codifica un menor número de celulasas y hemicelulasas que cualquier otro hongo secuenciado capaz de hidrolizar vegetales polisacáridos de la pared celular. Muchos genes del *T. reesei* que codifican las enzimas activas en hidratos de carbono y se distribuyen en grupos no aleatorios, se encuentran entre las regiones de síntesis con otros Sordariomycetes (clase de la subdivisión Pezizomycotina, la cual incluye a hongos ascomicetos. Esta clase generalmente produce sus ascas en cuerpos fructíferos periteciales. Esta clase también es conocida como Pyrenomycetes ya que suelen aparecer en bosques que han sido arrasados por el fuego). Numerosos genes que codifican las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios pueden promover la supervivencia de *T. reesei* en su hábitat del suelo competitivo, pero el análisis del genoma proporciona una visión mecanicista de su extraordinaria capacidad de secreción de proteínas, lo que ofrece una guía básica para la construcción de mejora de las cepas de *T. reesei* para aplicaciones industriales, tales como la producción de biocombustibles (Martìnez *et al.*, 2008).

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiciplicidad de éstos es una característica importante, ya que con ellos y/o con el uso de combinaciones de antagonistas con diferentes modos de acción, se reduce el riesgo de desarrollo de resistencia en el patógeno. Tal como señala Benítez (2004), *Trichoderma* es un buen antagonista debido a que es capaz de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otras especies. Por ejemplo, Martínez *et al.*, (1998), observaron al evaluar 59 aislamientos de *Trichoderma*, competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis. En casi todos los aislamientos determinaron al menos un tipo de

interacción hifal bien definida, y algunos de ellos presentaron hasta cuatro tipos de interacción sobre *R. solani*. Esto favorece el control por un lado y disminuye la posibilidad de que surja resistencia en el patógeno al antagonista (Infante, 2009).

4.5 Importancia de la correcta identificación de especies de *Trichoderma*

A pesar de la evidente importancia económica de este género, la taxonomía de *Trichoderma* es todavía problemática para establecer las especies, ya que los estudios basados en la morfología no han resultado en una revisión comprensiva satisfactoria, debido a los pocos caracteres morfológicos disponibles. Esto nos advierte del cuidado al seleccionar aislamientos controladores sin riesgo de que éstos se conviertan en enemigos del cultivo y/o de los animales; tal como se ha venido señalando con algunas especies de *Trichoderma* que afectan la producción de hongos comestibles (Ramírez, 2010).

Los tricotecenos son unas toxinas que pertenecen al un grupo de compuestos químicos cercanos entre sí producidos por varias especies como *Fusarium, Cephalosporium, Myrothecium, Trichoderma* y *Stachybotrys* y se estima sean los responsables de enfermedades producidas por la ingestión de alimentos, de grano o forraje enmohecido. De las diferentes toxicosis descritas por tricotecenos, las más estudiadas son la Aleukia Tóxica Alimentaria (ATA) y la stachybotritoxicosis. Aunque las propiedades alergénicas de los hongos son ampliamente conocidas, el primer trabajo sobre un transtorno de salud de este tipo por inhalación de toxinas fúngicas (tricotecenos) en un lugar de trabajo no industrial, no aparece hasta 1988 en un hospital de Quebec. El personal expuesto presentaba síntomas de gran fatiga que después de los análisis pertinentes se atribuyó a la presencia de tricotecenos en esporas de *Stachybotrys atra* y *Trichoderma viride*. A estos síntomas se les denominó "síndrome de fatiga crónica". Este síndrome se estudió entre los empleados de una escuela superior y ha sido la causa también de enfermedades en trabajadores de oficina, con efectos de naturaleza alérgica sobre la salud, entre otros (Samuels *et al*., 2002).

Otra especie de *Trichoderma* asociadas a enfermedades humanas la constituye *Trichoderma longibrachiatum,* la cual fue encontrada infestando de la piel en un niño de 11 años con anemia aplástica grave y neutropenia prolongada. El paciente recibió tratamiento antimicótico sistémico y se sometió a trasplante de médula ósea. Siendo ésta la primera descripción de la infección por *T.longibrachiatum* en un paciente pediátrico. También es el primer caso tratado con éxito con la terapia médica. Una revisión de la literatura sugiere que *Trichoderma* spp. está reconocido como patógenos humanos con frecuencia cada vez mayor, sobre todo para los pacientes inmunocomprometidos, y se debe considerar en el diagnóstico diferencial de infecciones fúngicas en la población pediátrica (Tovar, 2008).

El caso de *Trichoderma* atacando a los cultivos, también se ha reportado. Por ejemplo, la producción de A*garicus bisporus, A. campestris*, *Auricularia* sp., *Boletus edulis, Lentinula edodes, Pleurotus eous*, entre otros, los cuales son cultivados a gran escala como alimento debido a sus propiedades organolépticas y/o valor nutricional desde tiempos inmemorables, además por su conocido valor medicinal; se ha visto comprometida por *Trichoderma* . El proceso productivo de estos hongos, se ve ampliamente obstaculizado debido a los hongos causantes del "moho verde" como *Trichoderma, Asperguillus* y *Penicillium*, considerándose como competidores por nutrientes, o antagonistas, más que parásitos (Cha, 2005). Los primeros estudios reportaron que *T.viride* era la especie común de *Trichoderma* que se encontraba como colonizador del compost y un subsiguiente inhibidor del crecimiento micelial de los champiñones (Ramírez, 2010). Otras investigaciones citan a *T.koningii* como el organismo causal del moho verde en las camas de *A. bisporus* (Chang y Miles, 2004).

La forma como la literatura ha reportado a *T.harzianum*, biotipos Th 2 y Th4, corresponden a la nueva especie y sus variedades recientemente identificada: *Trichoderma aggressivum* sp. nov., *T. aggressivum* f. *aggressivum* (antes biotipo Th 4) y *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (antes biotipo Th 2), las cuales causan la epidemia del moho verde en siembras comerciales de *Agaricus bisporus* en Norte América y Europa, generando grandes pérdidas económicas. Estas especies están

ampliamente separadas de su pariente más cercano, *T. harzianum*, por lo encontrado en las secuencias de la región ITS-1 del ADNr nuclear y el fragmento de aproximadamente 689 pb del gen del factor de elongación de traducción que codifica proteína (EF-1α). Asimismo, se distinguen más fácilmente de las especies, morfológicamente similares *T.harzianum* y *T.atroviride* (este último también conocido como *Th* biotipo 3) por la velocidad del crecimiento. De éstos, sólo *T. harzianum* crece bien y esporula a 35 °C, mientras que *T. atroviride* es el de más lento crecimiento. *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* y f. *europaeum* son efectivamente indistinguibles morfológicamente a pesar de que tienen tasas de crecimiento ligeramente diferentes a 25 °C y las diferencias micromorfológicos son estadísticamente significativa. Basándose en los hallazgos de este estudio, se expande la descripción de *T. harzianum* y *T. atroviride*; encontrándose una clave de especies de *Trichoderma* comúnmente asociadas con *A.bisporus*. De allí la importancia de poder identificar la especie de *Trichoderma* que ha causado un brote de la enfermedad, ya que la especie indica a menudo la fuente de infección (Samuels *et al.,* 2006).

Muchas especies de *Trichoderma* de esporas verdes son de apariencia similar y existe alguna confusión en la literatura respecto a su identificación. Esto último se hace difícil ya que se reconoce que la mayoría de las descripciones de especies cubren grupos con estados imperfectos o asexuales de *Trichoderma* muy similares, pero que se sabe que son diferentes especies debido a que tienen estados perfectos o sexuales de Ascomicetes diferentes. Desafortunadamente, es difícil, como ayuda para la identificación, hacer que el estado imperfecto produzca el estado perfecto en el laboratorio. El método de cultivar *in vitro* los aislamientos afecta la apariencia de la colonia y hasta las proporciones de diferentes tipos de estructuras que esporulan (Ramírez, 2010).

En este mismo orden de ideas, Harman (2006), señala que la colonia formada por *Trichoderma* en medio PDA, es distinta entre características de una especie. Sin embargo, la aparición de colonias es difícil de describir con la precisión necesaria, para que pueda ser útil en la identificación. Las tasas de crecimiento, por su parte,

puede ser útil para distinguir las especies por lo demás similares, así como la producción de conidios y conidióforos agrupados en fascículos o pústulas suele ser características de una especie. Las fiàlides, por ejemplo pueden aparecer en racimos (*T.polysporum, T.hamatum*) o ellas puede aparecer de manera solitarias (*T. longibrachiatum*). Estas ambigüedades a su vez han permitido la búsqueda y avances en la identificación de especies usando enfoques moleculares, donde se incluyen huellas genéticas y análisis de secuencias; siendo este último, la vía más sencilla y rápida. Esto nos conlleva a identificar el nivel de especie de *Trichoderma* mediante la exploración de zonas genéticas altamente conservadas con el apoyo de técnicas moleculares, las cuales permiten complementar los caracteres morfológicos obtenidos (Samuels *et al.,* 2006).

Sigue habiendo muchas dificultades en la identificación morfológica de *Trichoderma,* debido a la homoplasia y la fenética de los caracteres morfológicos, sobre todo entre las formas anamorfo de *Trichoderma* (Chaverri y Samuels, 2003; Druzhinina *et al.,* 2006). Durante muchos años el género fue descrito por Persoon en 1794, y conectado a su estado sexual por Tulasne y Tulasne en 1865, así, el género siguió sin adiciones y fue común suponer que comprendía una sola especie, *T. viride*. Este concepto resultó en identificaciones engañosas de especies que siguen siendo evidentes en la actualidad. La especie, *T.viride sens stricto*, es una especie relativamente rara, cuya distribución es más o menos restringida a las regiones de Europa y América del Norte, y sin embargo, se cita frecuentemente como un agente de control biológico natural en otros regiones (Jacklist *et al.,* 2006). De manera similar, el ampliamente reportado *T. aureoviride*, por ejemplo, parece tener una distribución limitada en el norte de Europa (Lieckfeldt *et al.,* 2001). Rifai (1969) hizo la primera aproximación para entender la diversidad de *Trichoderma,* al introducir nueve de agregados en el género, pero aclarando que estas especies agregadas podrían incluir múltiples especies no distinguibles por sus caracteres morfológicos. Revisiones posteriores de Bissett (1984, 1991 a, b, c, 1992) y Gams y Bissett (1998), aumentó el número de especies sobre la base de las diferencias morfológicas y hace conexiones entre anamorfo y los estados teleomorfo para incluir también a algunas especies colocadas previamente en el género *Gliocladium*.

Estudios sobre *Hypocrea* han demostrado superposición de las características morfológicas entre las especies en el género anamorfo *Trichoderma*. Chaverri y Samuels (2003) y Jaklitsch (2009), definitivamente muestran que las diferencias morfológicas no son indicadores confiables del grado de divergencia genética entre las especies, así como las observaciones morfológicas no eran suficientemente precisas para la identificación de especies de *Trichoderma*, en Hoyo-Carvajal y Bisset, 2010.

4.6 Métodos para identificar aislamientos de *Trichoderma*

4.6.1 Análisis morfológico

Diferentes laboratorios han utilizado una variedad de medios de cultivo para las observaciones morfológicas de *Trichoderma.* En general, un medio relativamente simples, tal como el agar extracto de malta al 2% (AMA), es útil para la producción de conidios y la observación de complejo ramificación conidióforos; mientras que un medio de cultivo como el agar papa dextrosa (PDA) es útil para observar la producción de pigmentos y obtener suficiente micelio para aislar el ADN (Gams y Bissett, 1998).

Por su parte, la morfología de los conidióforo se observa a partir de conidióforos tomados del borde de pústulas conidiógenas o fascículos, cuando los conidios están madurando (generalmente después de 4-7 días de incubación). La morfología y el tamaño de los conidios se deben observar en la madurez después de aproximadamente 14 días de crecimiento. La identificación preliminar de las especies o agregados de especies sobre la base de características morfologías se puede intentar utilizando claves y descripciones en literatura taxonómica (por ejemplo, Gams y Bisset, 1998). (Bissett 1984, 1991a, b, c, 1992; Gams y Bissett, 1998).

4.6.2 Análisis molecular

El estudio de la frecuencia de monómeros en determinadas moléculas portadoras de información ha demostrado que la distancia evolutiva entre dos especies puede

medirse por las diferencias en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos entre moléculas homólogas de las dos especies. A estas moléculas se les llama cronómetros evolutivos. En especies que se separaron de un antepasado común el número de diferencias en la molécula bajo estudio es proporcional al número de cambios mutacionales estables que se han quedado fijos en el DNA que codifica para dicha molécula. A fin de elegir adecuadamente un cronómetro evolutivo es esencial considerar que a) debe estar distribuido universalmente, b) debe realizar la misma función en ambos organismos estudiados, c) debe poder alinearse adecuadamente y sus regiones homólogas y heterogéneas pueden identificarse plenamente y, por último, d) la secuencia de la molécula elegida deberá cambiar con una frecuencia que guarde relación con la distancia filogenética que se mide; Madigan *et al*., (1999) en Ramírez, 2010.

4.6.2.1 ADN mitocondrial

Las moléculas de DNA mitocondrial (ADNmt) son genomas relativamente pequeños que coevolucionan a su propia tasa evolutiva en relación con el genoma nuclear de los organismos en los cuales ellos están alojados. Particularmente en animales y hongos dichos genomas evolucionan más rápidamente que su contraparte de ADN nuclear. El ADNmt es ampliamente empleado para la determinación de relaciones taxonómicas y filogenéticas entre los grupos de organismos eucarióticos que poseen dicho organelo. Las razones para su popularidad reside en características intrínsecas de esta molécula tales como su reducido tamaño, la alta tasa evolutiva, la falta de bases metiladas, el alto contenido de residuos adeninatimina (AT) y el hecho de ser una molécula haploide donde la mayoría de los alelos poseen la misma función e inclusive poseen regiones universalmente conservadas. Dentro del genoma mitocondrial las secuencias de ARN ribosomal (ARNr) han sido empleadas como herramienta molecular para identificar relaciones filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos. A pesar de las diferencias en tamaños, todos los genomas mitocondriales pertenecientes a hongos examinados hasta la fecha poseen un número similar de genes, incluyendo una serie de genes de ARNr, 23-26 ARN de transferencia (ARNt) y varios genes codificantes de proteínas. La diferencia en

tamaño en relación con los genomas más grandes está determinada principalmente por intrones y regiones ricas en A-T (Uribe *et al*., 2007).

El genoma mitocondrial (ADNmt) tiene un tamaño de 15 a 17 kb y su longitud varía considerablemente entre especies: 20 micrómetros en Neurospora; 25 micrómetros en levaduras; 30 micrómetros en plantas superiores; 5 micrómetros en algunos animales metazoarios (multicelulares). Se considera que la mayoría del ADNmt de hongos y plantas no codifica, ya que el ARNmt contiene intrones (Rentaría, 2007).

4.6.2.2 Genes del RNA ribosomal (ADNr)

La revolución molecular en cuanto a taxonomía de hongos comenzó con la amplificación del ADNr, con la ayuda de la PCR (Hibbet, 2007). Efectivamente, las regiones de ADN mitocondrial y nuclear que tienen un mayor interés tanto en estudios de filogenia como en taxonomía de hongos, son las que codifican para el ARN ribosómico (ADNr) (Iturralde, 2005). El ADNr puede encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y núcleo, y contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce (Rentaría, 2007). La principal razón para el estudio de ADNr es que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas, y que estas copias están repetidas en tándem, facilitando así su amplificación (Calle, 2005). En el ADN ribosómico existen fragmentos con distinto grado de conservación de una longitud cercana a 6Kb, lo que permite realizar estudios a diferentes niveles. Las regiones que se encuentran altamente conservadas nos permiten realizar estudios evolutivos a nivel de géneros y familias y suelen usarse para el diseño de cebadores universales. La heterogeneidad de estas secuencias nucleotídicas ha sido utilizada para clasificar filogenéticamente a los microorganismos (Baschien, 2003; Franco, 2005; Rivera, 2006; Solé, 2002).

Entre las secuencias altamente conservadas de los genes de esta región se encuentran regiones variables, denominadas espaciadores ITS (Internal Transcribed Spacers), cuya función es desconocida (Peintnen *et al*., 2004). La tasa de variabilidad en estas regiones espaciadoras es más elevada que en los genes, pero sus secuencias se

pueden alinear con confianza entre taxones estrechamente relacionados. La región del ADNr incluye el gen 18S que también esta región también se denomina SSU, el espaciador intergénico ITS1, el gen 5.8S, el espaciador ITS2 y el gen 28S (también denominado LSU). Las regiones 18S, 5.8S, 28S están relativamente conservadas entre los hongos, facilitando una base molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles, el gen 5.8S esta conservado evolutivamente como los genes 18S y 28S, pero su tamaño pequeño limita su utilidad en comparaciones filogenéticas. El gen más pequeño, 5S ARNr puede o no estar incluido en la unidad de ADNr dependiendo del grupo taxonómico que se esté analizando. Cuando se transcribe el ADNr que codifica los genes para cada uno de los ARNrs que forman los ribosomas eucariontes, las regiones espaciadoras (ITS), no codificantes, quedan representadas en este transcrito primario, por lo que estas secuencias son removidas por un mecanismo específico de procesamiento del ARN ribosómico y sólo después de estas modificaciones los ARNrs pasan a formar parte del ribosoma. Comparando con los genes los espaciadores ITS1 e ITS2 son mucho más variables porque sus transcriptos son cortados desde el ARNr y descargados en lugar de hacerse parte del ribosoma (Fig. 6) (Herrera 2007; Tedersoo *et al.*, 2006; Guevara 2004).

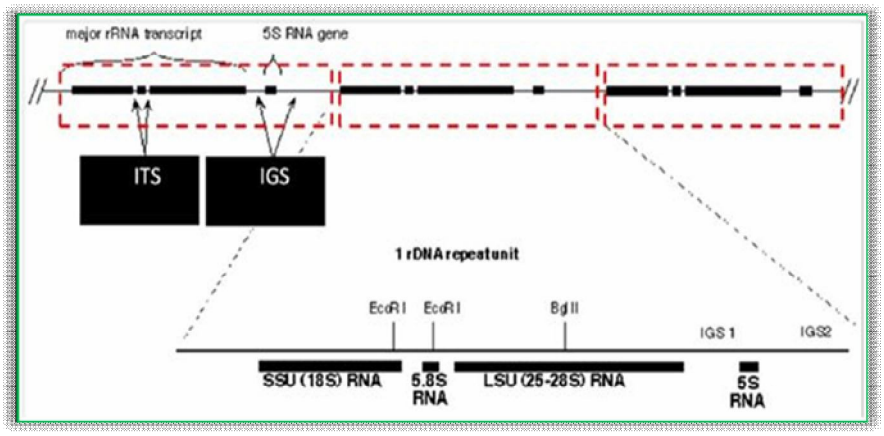


Figura 6. Diagrama de la repetición en tándem de los genes que codifican para los ARNrs donde se muestran las regiones ITS.

4.6.3 Genes de proteínas

4.6.3.1 Factor de Elongación durante la Traducción (TEF)

Este gen codificante para un factor de elongación durante la transcripción de ARN en proteína es un fragmento de casi 2 kb, del cual se pueden usar sus exones o intrones para análisis filogenético. Estos exhiben variabilidades diversas y pueden ser usadas con diferentes fines dependiendo de la resolución necesaria. El fragmento más utilizado y que se conoce como tef1, es aquel que incluye al 4to. Intrón, el 5to. Exón, el 5to. Intrón y parte del 6to exón. Este fragmento tiene una longitud de entre 600 y 650 pb. (Druzhinina, 2005). La información que puede ser obtenida de este fragmento se muestra en la tabla inferior (Fig. 7).

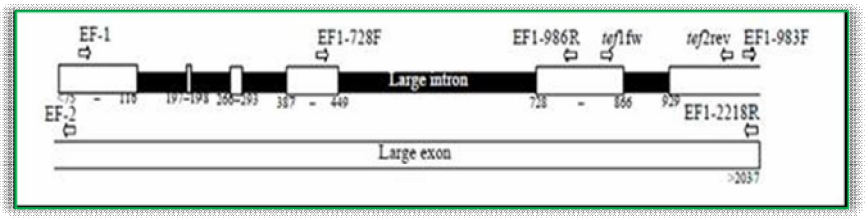


Figura 7. Diagrama del Factor de Elongación durante la Transcripción 1-α. Se muestran los oligonucleótidos usados para la amplificación de los diferentes fragmentos a estudiar.

4.6.4 Otros genes usados en filogenia de *Trichoderma*

También, las porciones codificantes de la endoquitinasa 42 (ech42) y la subunidad 2 de la ARNpolimerasa2 (rpb2) han mostrado significativa variabilidad intra e interespecífica, mientras que otros genes como las regiones D1 y D2 del ADNr 28S, o la subunidad pequeña del ADN ribosomal mitocondrial han exhibido baja resolución (ssu-ADNm). Se han usado fragmentos de los genes codificantes para actina y calmodulina pero también han exhibido una baja resolución cuando se les compara con el fragmento tef1 (Chaverri *et al*., 2003).

4.6.5 Reconstrucción filogenética.

4.6.5.1 Método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA)

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) o Método de agrupamiento pareado sin ponderación usando Medias aritméticas es un protocolo de

agrupamiento simple aglomerativo. Asume una velocidad de evolución constante y no se considera un método de inferencia filogenética si esta asunción no se cumple. Originalmente se usaba para el análisis de datos electroforéticos pero actualmente se usa para la generación de árboles guía para que sean usados para algoritmos de reconstrucción más sofisticados (Fig. 8) (Tovar, 2008).

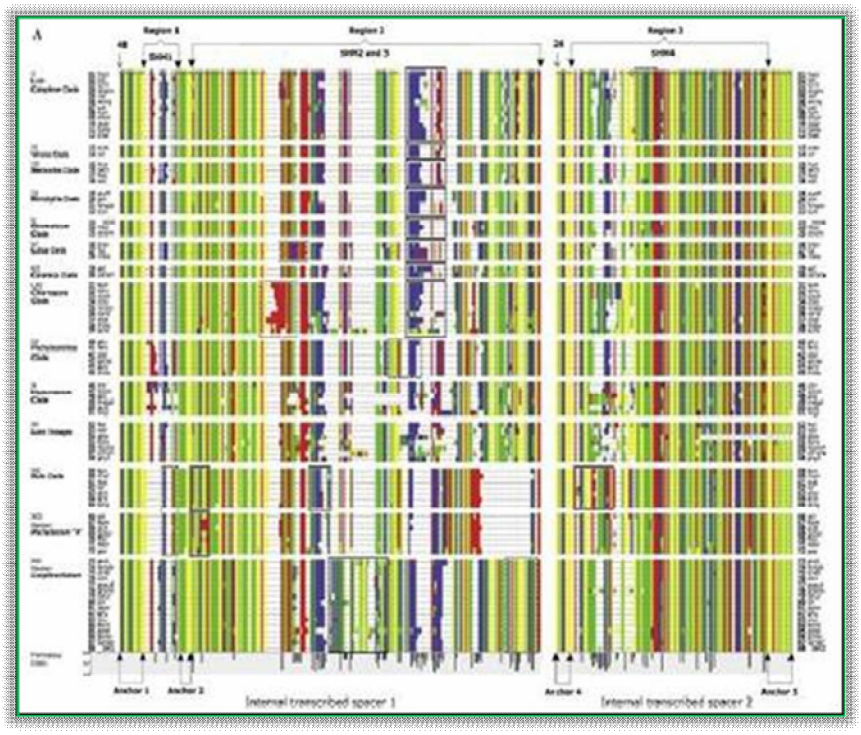


Figura 8. Diagrama que muestra las anclas (GSH) y (SSH) desarrolladas por Druzhinina *et al*., (2005). Los colores indican las bases a las que corresponde la secuencia.

4.6.5.2 Método de agrupamiento de vecinos (Neighborg-Joining Method)

Este método está basado en el criterio de mínima evolución para árboles filogenéticos, es decir, la topología que dé la menor longitud de las ramas del árbol involucrando el menor número de mutaciones posibles que expliquen la filogenia final. Es un método que consume poco espacio informático por lo que es muy eficiente y puede ser usado para resolver grandes grupos de datos superando en este sentido a métodos más exactos para la reconstrucción como Máxima parsimonia o inferencia bayesiana. A diferencia del método UPGMA, no asume una velocidad de

evolución constante y produce arboles sin raíz. La generación de la raíz se hace mediante el uso de un sujeto externo al grupo de análisis. Debido a que es congruente con muchos modelos de evolución puede llegar a generar un árbol con la topología verdadera cuando se le alimentan secuencias de una longitud adecuada (Tovar, 2008).

4.6.5.3 Máxima Parsimonia.

La parsimonia es parte de los métodos de estimación de árboles basado en características. Usa una matriz de características filogenéticas discretas para inferior uno o más árboles óptimos para un grupo de taxones, generalmente especies. El criterio de optimización en el caso de Máxima parsimonia es el uso del menor número de mutaciones para que se explique la topología resultante. Este método es de los de mayor potencia de resolución, sin embargo, requiere una gran potencia informática por lo que generalmente se desestima a favor del método NJ (Ramírez, 2010).

4.6.5.4 Estimación de máxima probabilidad (MLE)

Maximum likelihood estimation (MLE) o estimación de máxima probabilidad es un método que necesita el conocimiento de un modelo estadístico de probabilidad que prediga el comportamiento de una población. Así, el árbol se genera en base al árbol que tenga una mayor probabilidad de explicarlos datos en base al modelo previamente propuesto u obtenido. Esta es la razón por lo cual este método es más complicado que los anteriores, debido a que no siempre se conocen estos modelos. Sin embargo, si el modelo se conoce es un método sumamente efectivo y confiable (Uribe *et al*., 2007).

4.6.5.5 Reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica (GCPSR).

El Reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica (GCPSR, por sus siglas en ingles) fue propuesto por Taylor *et al*., (2000) a fin de resolver especies en base a su genealogía. Propone el uso de diferentes genes y la generación

de filogenias para cada uno de ellos. La comparación de estos arboles mostraría que la topología en la que se separan las especies debe ser la misma o al menos muy similar sin importar el gen que se esté usando para la reconstrucción (Fig. 9) (Calle, 2005).

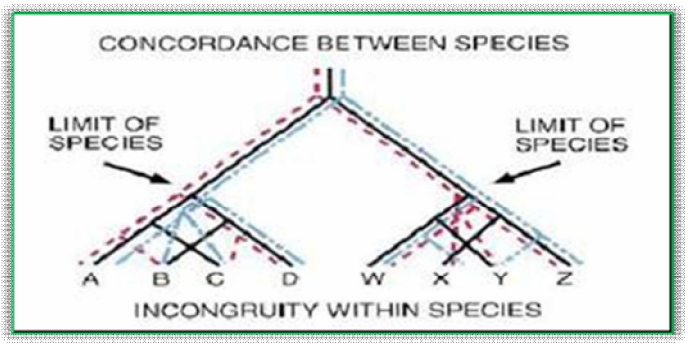


Figura 9. El análisis simultáneo de varios genes muestra topologías similares para especies relacionadas (Taylor *et al*., 2000)

En un principio, se presumió que las secuencias de las regiones ITS del ADNr eran suficientes para la identificación de la mayoría de las especies de hongos. Sin embargo, las secuencias suministradas por el Genbank (base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos), para identificar las especies basado en su secuencia homologas, pueden proporcionar identificaciones erróneas (Lieckfeldt y Seifert, 2000). Kopchinskiy *et al.*, (2005) encontraron numerosos errores de identificación entre las secuencias depositadas en GenBank, donde destaca el hecho de que algunas veces no se incluye todas las especies del género.

Ahora es evidente que una sola base informativa no es suficiente para detectar especies de *Trichoderma* estrechamente relacionadas; lo cual ha sido ilustrado por el GCPSR recientemente, sobre la base del uso de múltiples genes para resolver la filogenia de especies crípticas. Además, en las copias de genes parálogos que codifican el ARN se ha encontrado que algunos géneros de Hypocreales pueden resultar en identificaciones erróneas si se basan en ITS solamente. (O'Donnell, 2000; Lieckfeldt y Seifert, 2000, Chaverry *et al.,* 2003, Hoyos *et al.,* 2009).

Otras herramientas moleculares se han desarrollado para la identificación de *Trichoderma*. Druzhinina *et al.,* (2005) presenta un exclusivo sistema de "código de barras" de *Trichoderma*, sobre la base de las regiones ITS1-ITS2, y el uso de varias regiones de oligonucleótidos como huellas dactilares genética. Estos se almacenan en una base de datos MySQL e integrado con su programa *Trich*OKey para la identificación (www.isth.info). Este programa puede ser utilizado para suplementar métodos tradicionales de identificación. Para otros genes de un loci se ha desarrollado el programa *Tricho*BLAST (Kopchinskiy *et al.,* 2005), que permite la alineación y la comparación de las secuencias de la región ITS1 y 2 y los fragmentos del factor de elongación tef1α y RPB2. Este programa puede ser usado para suplementar otros métodos de identificación de especies de *Trichoderma* (Hoyos *et al.,* 2009).

Como complemento de estos métodos se desarrolló el programa *Tricho*MARK para detectar uno o más fragmentos de la secuencia de estos genes como marcadores filogenéticos. Este último programa es capaz de distinguir los cinco grupos de haplotipos de las especies que tienen secuencias idénticas en la región ITS1 y 2, a saber: *T. tomentosum*/*T. cerinum*, *T. longipile*/*T. crassum*, *T. koningii*/*T. ovalisporum*/*T.muroiana*, *H. lutea*/*H. melanomagna*, y *T. longibrachiatum*/*H. orientalis*/*H. cerebriformis*. En el caso de *H. lixii*/*T. harzianum*, el programa detecta con precisión diferencias intraespecíficas en este grupo, que contiene varias especies putativas filogenéticos. El sitio web de la ISTH (www.isth.info) se prevé también la cartilla de secuencias y protocolos necesarios para la secuenciación de los genes utilizados para la identificación Druzhinina *et al.,* (2005).

4.6.6 Pruebas metabólicas

Estos pueden estar basados en los perfiles de las clases de enzimas particulares, tales como quitinasas o celulasas, aunque otras técnicas de creación de perfiles metabólicos han sido desarrolladas para validar nuevas especies que también pueden potencialmente proporcionar datos sobre las funciones ecológicas de las especies. Los últimos estudios empleados por Biolog ® FF (Biolog Inc., Hayward CA) comprende 96 células que contienen diferente fuentes de carbono y reactivos redox

sensibles a la actividad de la enzima deshidrogenasa succinato del ciclo del ácido cítrico. Fotometría a 590 nm y 750 nm proporcionan información cuantitativa de las medidas de asimilación y el crecimiento (medición de la densidad del micelio) y la actividad en los diferentes sustratos. Los perfiles metabólicos obtenidos pueden ser característicos de especies, y la asimilación de sustratos específicos puede permitir hipótesis sobre los impactos ecológicos de las especies. Por ejemplo, la asimilación de polioles tales como maltitol y adonitol podría indicar la actividad de deshidrogenasas relevantes para sobrevivir en condiciones de sequía (Amicucci *et al.*, 1996; Hoyos *et al.*, 2009). En base a lo anterior, donde se expone a *Trichoderma* como un género con especies criptadas, se han aplicado metodologías complementarias para diferenciar y caracterizar especies del hongo, correlacionando morfología, biogeografía, bioquímica, ecología y, más recientemente, los rasgos filogenéticos.

Por ejemplo, la aplicación del PSC examinó la región ITS1 e ITS2 del ADNr, el factor de elongación 1-α (tef1α), y fragmentos cortos de la actina (ACT1) y calmodulina (CAL1) en secuencias de *H. lixii*/*T. harzianum*, para determinar los siete linajes de *T. harzianum.* Sin embargo, se negaron a reconocer los linajes como especies filogenéticas ya que desde el punto de vista morfológico, no resultaron fácilmente distinguibles. De manera similar, aplicando GCPSR (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition), Samuels *et al.*, (2006), encontraron que *T. koningii* incluye tres linajes bien separados y definidos por los caracteres fenotípicos, y reconoce, además, doce especies taxonómicas y una variedad dentro de los tres linajes: (1) *T.koningii, T.ovalisporum* y los nuevos taxones *T.caribbaeum var. caribbaeum, T.caribbaeum var.aequatoriale, T. dorotheae, T. dingleyae, T. intricatum, T. koningiopsis, T. petersenii y T. taiwanense* (2) las nuevas especies *T. rogersonii y T. austrokoningii,* y (3) la nueva especies anamorfo *T. stilbohypoxyli* (Gardes y Bruns, 1993; Lieckfeldt y Seifert, 2000).

La introducción de herramientas moleculares ha permitido la expansión del número de especies reconocidas de *Trichoderma*. Se han listado 104 especies de

Trichoderma, disponibles en www.isth.info de la International Commission on the Taxonomy of Fungi subcommision on *Trichoderma* and *Hypocrea* (Altschul *et al*., 1990; Gardes & Bruns 1993; Gomes *et al*; 2002; Zervakis *et al*; 2004, Villalobos *et al*; 2005; Druzhinina & Kopchinskiy 2008), y 193 taxas son representadas por las secuencias depositadas en: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29859

Cabrera *et al*., (2000), obtuvieron más de 150 aislamientos de *Trichoderma* en diferentes nichos ecológicos, así como uno de *Hypocrea lixii*, habiéndolos identificado todos, esto fue posible gracias al uso de la técnica de la PCR, que con cebadores oligonucleotídicos para ITS y para el gen de endogluconasa, se obtuvo el análisis genético-molecular de las cepas, llegando a la conclusión de que con mayor frecuencia se aislaron las especies: *T. harzianum, T. koningii, T. asperellum, T. citrinoviride, T. atroviride, T. oblongisporum, T. spirale, T. longibrachiatum* en esa zona de estudio.

En Amér ica Latina y el Caribe, son pocos los estudios de diversidad de *Trichoderma* spp. (Druzhinina *et al*., 2006), a pesar de la gran potencialidad biotecnológica que posee este género. En Venezuela, se ha venido realizando estudios sobre el género *Trichoderma* desde finales de los noventas, lo que ha requerido de la identificación y caracterización de aislamientos de este microorganismo de diferentes lugares geográficos del país, para su posterior masificación y aplicación en condiciones de campo (Rivas *et al*., 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de las pruebas de laboratorio y umbráculo

Las pruebas de patogenicidad, cultivos duales, multiplicación del aislamiento de *R. solani* y de *Trichoderma* spp., fueron llevados a cabo en la Clínica de Enfermedades de Plantas del Departamento de Fitopatología, del Instituto de Botánica de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

Por su parte, la extracción y amplificación del ADN de los aislamientos de *Trichoderma* se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Postgrado de la Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado (UCLA) en el estado Lara, mientras que la secuenciación del ADN, se llevó a cabo en el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) en el estado Miranda.

Microorganismos

Los aislamientos de *Trichoderma* spp fueron suministrados por la Clínica de Enfermedades de Plantas del Instituto de Botánica de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (Cuadro 1); mientras que los esclerocios de *R. solani*, correspondiente al grupo de anastomosis AG1-IA, fueron suministrados por la Fundación para la Investigación DANAC, Venezuela.

Material Vegetal

Se utilizaron semillas certificadas del híbrido de maíz blanco (*Zea mays*) H-3001 donadas por una casa comercial ubicada en el estado Aragua; siendo uno de los materiales más demandados por los productores venezolanos.

Purificación e identificación del patógeno

Los esclerocios de *R. solani* se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2,5% por un tiempo de 2 min. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada esterilizada (ADE) y se secó el material con papel absorbente esterilizado. En condiciones de asepsia se sembró un esclerocio por placa de Petri con medio de cultivo Papa-dextrosa-agar (PDA) (Quintero, *et al*. 1997). La identificación del patógenos se realizó según Tu y Kimbrough (1975), quienes señalan que los criterios que permiten delimitar morfológicamente el género *Rhizoctonia* son: 1. La presencia de una hifa relativamente gruesa, que cuando es joven se ramifica formando ángulo agudo, el cual pasa a ser recto al madurar el hongo; 2. El desarrollo y la ontogenia de los esclerocios. Por otra parte, se siguió lo señalado por Sneh *et al.*, (1996), quienes reportan que las características relevantes del género *Rhizoctonia* son: El ángulo recto o casi recto distintivo que forma un patrón de ramificación *sui generis*, la presencia de septos doliporos, la ausencia de conexión en grapa o fíbula y la constricción de la hifa en el punto de origen.

Pruebas de Porcentaje de Germinación de Semilla

Las semillas del híbrido de maíz H-3001 de Himeca, fueron sometidas primeramente a la prueba de porcentaje de germinación, para lo cual se colocaron dentro de placas Petri conteniendo papel filtro esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada (ADE). En cada una de las cinco placas se colocaron en forma equidistante 10 semillas y luego fueron colocadas en la incubadora a 28 ºC por 7

días. Cumplido el tiempo, se procedió a contar el número de semillas germinadas, expresando el resultado en porcentaje.

Multiplicación de *R. solani*

Para la preparación del inóculo, se desinfectaron los esclerocios suministrados con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos; luego fueron lavados ADE, secados en papel absorbente, y se sembró un esclerocio en cinco placas con agar-papa-dextrosa (PDA) por 7 días en condiciones de laboratorio (22-24ºC).

La reproducción del patógeno se realizó en un sustrato compuesto de 15 g de cascarilla de arroz, previamente lavada y esterilizada. Este sustrato se colocó en frascos de vidrio esterilizados de 100 mL de capacidad, se le agregó 0,75 g de glucosa y 24 mL de ADE, se llevó al autoclave durante 20 minutos a 15 psi de presión. A cada frasco se le colocaron tres esclerocios de *R. solani*, se sellaron y se llevaron a una incubadora hasta formar más esclerocios (Rodríguez, 2000).

Multiplicación de *Trichoderma spp.*

Se colocaron 50 g cascarilla de arroz previamente lavada y esterilizada, en bolsas transparentes, se le agregó 100 mL de ADEy 2,5 g de glucosa, como fuente de carbono para el desarrollo de las especies de *Trichoderma;* a este material se le agregó 5 mL de suspensión de conidios de concentración 1 x 10^6conidios/mL, ajustada con un hematocímetro, usando para ello colonias del hongo con cinco días de edad. Estas bolsas fueron cerradas y almacenadas en una incubadora por 15 día; transcurrido el tiempo de incubación se refrigeraron para conservar la viabilidad de las esporas hasta el momento de la inoculación (Salazar, 2006).

Para asegurar la calidad del inóculo al momento de su uso, se colocó 1 g de cascarilla con el antagonista en un frasco y se agregó 90 mL de ADE y a esta suspensión se le determinó la concentración de conidios/ml con un hematocímetro (Salazar, 2006).

Cuadro 1. Procedencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Nº	Aislamiento	Hospedero	Procedencia
1	05211	Rizósfera maíz	Turmero, estado Aragua
2	M2	Rizósfera maíz	Asent. El Cortijo. Valle de Tucutunemo, estado Aragua
3	M17	Rizósfera maíz	Finca Los Martinez. Montalban estado Carabobo
4	M1	Rizósfera maíz	Asent. El Cortijo. Valle de Tucutunemo, estado Aragua
5	M13	Rizósfera maíz	La Candelaria, El Pao , estado Aragua
6	M11	Rizósfera maíz	San Francisco, El Pao , estado Aragua
7	CLCC05	Rizósfera caraota	Valle de Tucutunemo, estado Aragua
8	05231	Rizósferapalma de sagú	Jardín Country Club - Caracas
9	04017	Rizósfera topocho	Sector La Huerfana, via Magdaleno, estado Aragua
10	05227	Rizósfera palma lucubence	Jardín Country Club – Distrito Capital
11	M12	Rizósfera maíz	La Candelaria, El Pao , estado Aragua
12	M18	Rizósfera maíz	Finca Aguirrito. Montalban estado Carabobo
13	A1	Rizósfera tomate	El Sombrero, estado Guárico

Capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* spp. *in vitro* frente a *R. solani.*

Para la realización de los bioensayos se empleó la técnica de enfrentamiento (antagonista-patógeno) por medio del cultivo dual (Pinzón *et al.*, 1999), el cual consistió en sembrar en placas de Petri con medio PDA, un disco de micelio (5 mm de diámetro) del patógeno diametralmente opuesto con el antagonista. Luego, se incubaron a 28 ºC en oscuridad continua por cinco días, considerándose cinco repeticiones por tratamiento. El testigo estuvo representado por cinco placas con el

mismo medio y condiciones, pero solamente con un disco con micelio del hongo patógeno; las observaciones se realizaron diariamente hasta que las placas formaron esclerocios, contándose el número de éstos, tanto en los enfrentamientos como en los testigos.

Se midió el crecimiento radial (mm/día) de las colonias de los aislamiento cada 24 h con una regla estandarizada en milímetros, hasta producirse el contacto entre las colonias (tres - cinco días); con los datos obtenidos del crecimiento, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento (P.I.C.) de *R. solani* y con el número de esclerocios formados se evaluó el porcentaje de inhibición de la formación de estas estructuras del patógeno (P.I.F.E.); usando la fórmula de J. M. Vincent, empleada por Latiegue (1990).

$$P.\ I.\ C. = \frac{\text{Crecimiento del testigo-Crecimiento del tratamiento x 100}}{\text{Crecimiento del testigo}}$$

$$P.\ I.\ F.E. = \frac{\text{N.E del testigo - N.E del tratamiento x 100}}{\text{N.E del testigo}}$$

N.E: Número de esclerocio.

En este ensayo, se empleó un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones, la unidad experimental estuvo conformada por cada placa de Petri. Se verificaron los supuestos para aplicar el análisis de la varianza (ANAVAR) tanto para el P.I.C como para el P.I.F.E.

Se evaluó el grado de invasión-destrucción de *Trichoderma* spp., sobre la colonia de *R. solani*, teniendo como base un periodo de evaluación de 10 días. Para determinar el grado de invasión-destrucción se empleó la escala que determina cualitativa y cuantitativamente la capacidad antagónica que posee el hongo *Trichoderma* en invadir y destruir la colonia del hongo patógeno, propuesta por Bell *et al.,* 1982 citado por Agamez *et al*., (2009); la cual utiliza índices de antagonismo que van desde 0-4, considerando como índice 3 una capacidad antagónica satisfactoria para

una cepa de *Trichoderma* spp. (Cuadro 2). De igual forma se verificaron los supuestos para aplicar el análisis de la varianza (ANAVAR).

Cuadro 2. Escala de evaluación de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani*.

Índice de Antagonismo	**Capacidad Antagónica**
0	Ninguna invasión del antagonista sobre la colonia de *Rhizoctonia* sp.
1	Invasión y destrucción del 25% de la colonia de *Rhizoctonia* sp.
2	Invasión y destrucción del 50% - 90% de la colonia de *Rhizoctonia* sp.
3	Invasión y destrucción del 100% de la colonia de *Rhizoctonia* sp.
4	Invasión y destrucción del 100% de la colonia de *Rhizoctonia* sp. esporulando sobre ella.

Pruebas de Patogenicidad de *R. solani* sobre el híbrido de maíz H-3001

Para comprobar la patogenicidad del aislamiento de *R. solani*, se utilizaron semillas de maíz certificadas del híbrido H-3001 (probada como libre de contaminación externa o de infección), las cuales fueron sembradas dos por cada bolsa de polietileno con una mezcla de suelo-arena (2:1) previamente esterilizado; para un total de veinte plantas, y se inocularon a los 10 días, colocando un esclerocio entre la vaina de la hoja y el tallo, bordeado de un algodón húmedo (condición favorable al hongo). Igualmente se usaron cinco testigos (controles) en la prueba de patogenicidad, los cuales consistieron en plantas "sanas" (sin síntomas aparentes) tratadas con agua (algodón húmedo) sin el patógeno.

Luego las plantas fueron llevadas a cámara húmeda hasta la aparición de los síntomas; esta cámara estuvo constituida por un armazón de metal de 1 largo x1

ancho x1 alto m, cubierto con plástico transparente y en su interior papel periódico, previamente humedecido**.**

Se tomaron tejidos de las plantas inoculadas que presentaron síntomas característicos de la enfermedad y se realizaron aislamientos con el fin de comprobar la patogenicidad del hongo inoculado (Cardona *et al.,* 1999).

Aislamiento del patógeno

En condiciones de asepsia, se realizaron cortes de hojas y tallos de cuatro mm de diámetro aproximadamente, provenientes de plantas de maíz sintomáticas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2,5% por cinco minutos. Posteriormente se realizó un lavado con ADE y se secó el material con papel absorbente esterilizado, luego se sembraron los trozos de material vegetal en medio PDA y se incubó a 28 +/- 2 ºC por un período de 8 días (Quintero *et al.,* 1997). Para la identificación del patógeno se siguió lo descrito por Tu y Kimbrough (1975) y Sneh *et al.,* (1996).

Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani* en condiciones *in vivo*

Inoculación con *R. solani* y *Trichoderma*

Se utilizaron bolsas de polietileno conteniendo dos kilogramos de suelo-arena (2:1) esterilizada, listas para las pruebas respectivas en condiciones de umbráculo, cuyas condiciones internas durante el período de evaluación fueron de 75 % de humedad relativa y una temperatura promedio de 28 ºC, con una mínima y máxima de 20 y 30 ºC respectivamente, condiciones adecuadas para el normal desarrollo de los microorganismos evaluados.

Para evaluar el comportamiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani*, se realizaron dos orificios en el sustrato de dos centímetros de profundidad aproximadamente, en cada uno se sembró una semilla, y paralelamente se colocó un

gramo de cascarilla de arroz impregnada de suspensión del antagonista seleccionado, a concentración 10^6 conidios/ml, y dos esclerocios del patógeno, para inducir síntomas de la mancha bandeada en maíz (López *et al.*, 2010).

Se dejó un tratamiento denominado testigo absoluto el cual no se inoculó con hongos, y otro denominado testigo enfermo el cual fue inoculado solamente con el fitopatógeno. Se contó con doce tratamientos de 10 repeticiones cada uno, para un total de 120 bolsas. Cada planta conformó la unidad experimental, dispuestas en un diseño completamente aleatorizado. Las semillas seleccionadas fueron sembradas dos por cada bolsa con una distribución homogénea y equidistante, a dos centímetros de profundidad.

Para medir la concentración del inóculo, se tomó un gramo de cascarilla de arroz con el antagonista y se colocó en frasco con 90 mL de ADE y a esta suspensión se le determinó la concentración de conidios/ml con un hematocímetro. La aplicación del antagonista fue cada 15 días, a una concentración de 10^6 conidios/mL.

Los síntomas de la enfermedad se registraron 7 días, después del tratamiento, siendo a partir de ese momento cuando se comenzaron las observaciones; la segunda observación se hizo a los 14 días, la tercera observación se llevó a cabo a los 30 días; y la última a los 60 días; anotando en cada etapa el avance de la enfermedad en cada tratamiento. La incidencia se definió como el porcentaje de plantas enfermas y la reducción de la enfermedad se determinó como el 100*(X-Y/X), donde X es el número de plantas enfermas en el testigo enfermo y Y las plantas enfermas en cada tratamiento, de acuerdo a lo planteado por Hoyos-Carvajal *et al.,* 2008 (Cuadro 3).

Por otra parte, se midieron las variables, altura de la planta (cm), peso húmedo (fresco) y seco de la parte aérea (g), peso húmedo (fresco) y seco de la raíz (g), longitud de la raíz (cm) y volumen de la raíz (mL), para observar el comportamiento agronómico del material de maíz en presencia y ausencia del biocontrolador y el patógeno. Para el ensayo se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, y el análisis de los resultados se realizó por la vía no paramétrica ya que

las variables fueron medidas en escala ordinal, se utilizó la prueba de contraste de medias de Mínimas Diferencias Significativas de Fisher (DMS), usando un nivel de significancia $p \leq 0,05$, prueba recomendada cuando el valor de p es de 0,0001.

Cuadro 3. Tratamientos para la evaluación "*in vivo*" de plantas inoculadas con *Trichoderma* spp., y *R. solani*

Tratamiento	Descripción	Patógeno
1	Testigo absoluto	……
2	Testigo enfermo (X)	*R. solani*
3	*Trichoderma* spp.+ patógeno (Y)	*R. solani*
4	*Trichoderma* spp.	…….

Identificación morfológica de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Se utilizaron aislamientos de tre a cinco días de crecimiento en medio PDA, para la descripción del comportamiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp en condiciones de umbráculo. Para las observaciones macroscópicas se usó una lupa estereoscópica; siendo las características consideradas: crecimiento de la colonia, color del micelio, producción de pústulas, formación de anillos concéntricos, producción de masas de esclerocios agregados y se tomó en cuenta la tinción del medio agarificado.

En cuanto a las observaciones microscópicas se prepararon láminas de azul de lactofenol, y fueron observadas con un microscopio óptico marca Lieder, usándose el lente de inmersión (100X). Se tomaron las dimensiones de las estructuras fúngicas de valor taxonómico; se midió el largo y ancho de 30 conidios, 20 fiálides, 15 clamidosporas. También se tomó en cuenta la forma de las células conidiógenas o fiálides, diámetro y forma de los conidios, y presencia ó ausencia de fiálides intercaladas.

Para la obtención de caracteres macro y microscópicos de *Trichoderma*, se siguió lo expuesto por Gams & Bisett (1998); una vez obtenidos los descriptores se procedió a utilizar el enlace interactivo http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/*Trichoderma* Index.cfm propuesto por Samuels *et al* (2006), para la identificación de especies del género.

Identificación molecular de las especies de *Trichoderma*

Extracción del ADN

El procedimiento a seguir para la extracción del micelio de los aislamientos antagonistas, se hizo mediante modificaciones descritas por Guigon-López *et al* (2010). Se utilizaron colonias puras de cada uno de los aislamientos cultivados durante siete días en medio de cultivo PDA. A partir de éstas se trasladaron tres secciones tomadas con la punta de una micropipeta de cada colonia en 8 frascos que contenían 50 mL de un medio de cultivo líquido caldo papa – dextrosa y se colocaron en agitación continua a 125 rpm y temperatura entre 26 y 28 ºC durante cinco días. El micelio formado se filtró al vacío en un papel de filtro Watman Nº 1, se hizo un lavado con ADE y se secó de nuevo con papel de filtro. El micelio de los aislamientos de *Trichoderma* spp., fueron liofilizados y guardados a -20 ºC hasta el momento de la extracción del ADN. Para ello se utilizó el procedimiento de Dellaporta (1983):

1. Se maceraron en mortero, 0,2 g de micelio de los aislamientos de *Trichoderma* spp., con 750µl de buffer CTAB (2X) hasta obtener mezcla líquida de la muestra, se colocaron 800 µl de esta suspensión en tubos de 1.5 mL y se adicionaron 10 µl de β-mercaptoethanol (Anexo 1). Luego se incubó en baño seco 65°C por 30min, se agitó por inversión continuamente durante la incubación (cada cinco minutos) y se colocaron los tubos en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos.

2. Se adicionó 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (1:24), se mezcló suavemente por inversión del tubo por dos minutos, y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos.

3. Cuidadosamente se pipeteó la fase superior de la suspensión y se transfirió a un tubo de 1.5 mL; se adicionaron 70 µl de NaCL 5M, y se precipitó el ADN con 800 µl de etanolpuro frío, se colocó a -20 ºC durante 60 minutos.

4. Se lavó el pellet de ADN dos veces con 500 µl de Etanol al 70% frío. Se descartó el Etanol y el ADN se secó al aire libre por 30 minutos.

6. Finalmente se resuspendió el ADN en 50 µl de buffer TE pH 7, y se almacenó a -20 ºC (Anexo 2).

Integridad del ADN

La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Anexo 3) en buffer TAE pH 8 (Anexo 4), teñido con 5x Green.

Cálculo de la concentración de ADN extraído.

El cálculo se realiza midiendo la absorbancia de la solución de ADN a 260 nm en un espectrofotómetro BioRad Smartspect ® 3000. La concentración se calcula sabiendo que una unidad de densidad óptica corresponde a 50 µg de ADN/mL. El cociente entre las densidades ópticas medidas a 260 y 280 nm indica la pureza de la muestra. Para una preparación de ADN este valor debe ser de aproximadamente de 1.7 a 1.9, un valor menor indica posible contaminación con proteínas.

Validación de la calidad de ADN a través de su amplificación por ITS

Una vez extraído y cuantificado el ADN se procedió a su validación a través de la amplificación de las regiones ITS, con los cevadores o *primers* ITS1 e ITS4 de

EUROGENT(Cuadro 4),utilizando un total de 30 µl de mezcla de reacción (Cuadro 5).

Cuadro 4. Secuencias nucleotídicas usada para ITS-PCR

Nombre del Primer o Cebador	Secuencia (5`-3`)	Mer	TM	%GC
ITS 1	TCTGTAGGTGAACCTGCGG	19	63.9	57
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	61.5	45

La amplificación fue realizada en un Termociclador MJ Research PTC 200, empleando un ciclo de desnaturalización inicial a 94 ºC por 1 min, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94 ºC, 55 ºC y 72 ºC por 40 s cada uno, y un ciclo final de extensión a 72 ºC por 5 min.

La separación de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa 1,2% en buffer T.A.E. a pH.8. Se cargaron 6µl del producto de amplificación mezclado con 2 µl de SYBR Green I, y 2.5 µl de DNA Ladder 1Kb (patrón de peso molecular), con 100V durante una hora y 30 min y se visualizó el producto de amplificación en el transluminador de luz ultravioleta.

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la amplificación del ADN de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Stock	[Final]	30 µl Reacción
ddH_2O	-	20.9 µl
Buffer taq. 10X	1X	3 µl
$MgCL_2$ 25mM	1.5 mM 2.5 mM	1.8 µl
dNTP mix 10mM	200 µM	0.6 µl

Primer (F+R) 10µM	0.5µM	1.5 µl
DNA (10ng/ µl)	20ng	2 µl
Taq polimerasa	1U	0.2 µl

Preparación de muestras para la secuenciación

Se preparó una solución contentiva de 6µl de muestra de ADN previamente purificada, 1µl de primer ITS 1 (5´- CTTGGTCATTTAGAGGAAGT - 3´). Se colocó 2µl de buffer de secuenciación 5x y 1µl de mezcla de reacción (Big Dye Reaction mix). Posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador bajo el programa de 24 ciclos correspondientes a 96°C por 10 s, 58°C por 5 s y 60°C por 4 min; para finalizar en 4°C. Luego de la amplificación, se le agregó a cada tubo 50µl de etanol 100% y 2µl de acetato de sodio 3M para purificar los productos, se le dio un toque en el vòrtex y se dejó reposar por 15 min. Se centrifugó a máxima velocidad por 20 min, se retirar el sobrenadante y se le agregó 200µl de etanol al 70 %. Nuevamente se centrifugó a máxima velocidad por 5 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar al vacío por 15 min a baja temperatura. Finalmente, se re suspendió en 20µl de Formamida Hi-Di (altamente deionizada) y se le dio un toque en el vòrtex; las secuencias obtenidas son visualizadas en el programa CHROMAS.3.6.10 (Druzhinina, *et al.*, 2005).

Alineamiento de las secuencias de los aislamientos de *Trichoderma* spp. con *T. asperellum*

Los productos amplificados de la región ITS fueron purificados con el Kit AccuPrep®PCR Purificación marca BioNEER para su posterior secuenciación con el Kit BigDye®Terminator V3.1. Todas las secuencias nucleotídicas obtenidas se procesaron con los programas Chromas Pro versión 1.41 y BioEdit (Sequence Alignment Editor), con el fin de generar los consensos de las cadenas hacia adelante y hacia atrás para su comparación. Las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con la secuencia nucleotídica de *T. asperellum* disponible en el registro del Genbank (base de datos del National Center for Biotechnology Information, (NCBI) utilizando la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (*Tricho*BLAST) (Kopchinski*et al.,* 2005; Druzhinina *et al.*, 2006); para determinar la identidad hasta el nivel de especies, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante las herramientas Trichokey 2 disponible en http://www.isth.info/tools/molkey/index.php (Druzhinina *et al*. 2005; Kopchinskiy et al. 2005).

Identificación de especies en el género *Hypocrea/Trichoderma* con el programa TrichOkey 2.0.

Se sometió cada secuencia de ITS obtenida en este estudio al diagnóstico usando TrichOkey, desarrollado por Druzhinina *et al.*, (2005). Como resultado de este análisis, se obtiene la identidad del aislado, siempre que la calidad de la secuencia sea elevada, y la ubicación de las anclas (GSH) 1 y 5 indiquen el inicio de la región ITS1 y fin de la región ITS2. Se usó esta información para editar las secuencias de ITS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, purificación e identificación del patógeno

R. solani formó colonias de color pardo con producción de escaso micelio aéreo, microscópicamente se observaron hifas hialinas, septadas con ramificaciones con ángulo recto (Fig. 14), coincidiendo con lo descrito por Tu y Kimbrough (1975) y Sneh, *et al.,* (1996).

Capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones *in vitro*

Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazaron al fitopatógeno fueron fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes coincidiendo con Elad, *et al*., 1985, Benhamou *et al*. 1995; producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil de acuerdo a lo reportado por Chet *et al*. 1997, Sid Ahmed *et al*. 2000, Sid Ahmed *et al*. 2003) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma*

sobre los hongos fitopatógenos tal como lo señalan Yedidia *et al*. 1999, Ezziyyani *et al.* 2003).

Competencia

Las observaciones diarias del crecimiento de los cultivos duales permitieron determinar que todos los aislamientos de *Trichoderma* spp., fueron estadísticamente diferentes, por lo cual se procedió a realizar la prueba de comparación múltiple de Mínima Diferencia Significativa (MDS) con $\alpha = 0,05$, donde se distinguieron tres grupos en base a la capacidad de inhibición del crecimiento de *R. solani* (Cuadro 6). Los aislamientos M11, M12 y 04017 fueron los que presentaron mayor inhibición del crecimiento del patógeno, sin embargo es notorio el comportamiento del resto de los aislamientos al inhibir el crecimiento del patógeno en más de un 50%. De acuerdo con los resultados de los ensayos de antagonismo *in vitro*, todos los aislamientos utilizados en este estudio poseen actividad antagónica sobre *R. solani*.

El crecimiento del patógeno es detenido cuando el micelio de éste entra en contacto con el micelio de los aislamientos de *Trichoderma* y es en este punto cuando la capacidad del antagonista para sobrecrecer al patógeno fue variable para cada aislamiento (Fig. 10). *R. solani* mostró una alta sensibilidad al control ejercido por los aislamientos de *Trichoderma.*

Por su parte, los resultados del P.I.F.E. mostraron que todos los aislamientos inhibieron la formación de esclerocios con un porcentaje del 100% durante el tiempo de evaluación correspondiente a 15 días. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Veitia *et al* (2000), Montealegre *et al* (2002), Martínez *et al* (1998) y Gonzáles *et al* (2005); quienes enfrentaron *R. solani*en condiciones *in vitro* contra diferentes especies de *Trichoderma.*

Los aislamientos de *Trichoderma* spp., M17, M2, M13, M1, 05227, CLCC05, M18 y 05231 reportaron un índice de antagonismo 2; mientras que A1, 05211, M11, M12 y 04017 mostraron un índice 3, de acuerdo a la escala de Bell *et al* (1982) (Cuadro

7). Lo que expresa el gran potencial de competencia de estos cinco aislamientos, cuya invasión y destrucción de la colonia de *R. solani* fue de 100%, dado fundamentalmente por su velocidad de crecimiento, la cual es superior a la del patógeno, y osciló bajo estas condiciones, entre 0,20 mm/h a 0,80 mm/h en cultivo dual para la totalidad de los aislamientos evaluados. Por su parte, el testigo de *Rhizoctonia* alcanzó su máximo crecimiento a los cuatro días, iniciando la formación de esclerocios a partir de las 120 horas, abarcando el crecimiento micelial toda la placa de petri después de los siete días, coincidiendo con Martínez *et al* (2008), quienes además señalan que aún obteniendo aislamientos con grado 1 y 2, *Trichoderma* mantiene su capacidad de competencia aunque necesite un tiempo mayor para tener un mismo efecto, aspecto importante en la selección de aislamientos con mayor potencial para el control de patógenos del suelo.

En estudios de laboratorio Ezziyyani *et al.,* (2004), señalaron que la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* Rifai mostró un elevado nivel de competencia por el sustrato de respecto a *R. solani*, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *F.oxysporum* Schl., *Sclerotium rolfsii* Sacc. Y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Hernández *et al*. (2006), obtuvieron resultados similares con inhibición del crecimiento radial entre un 40-50% de *R. solani* aislada de Piña.

Cuadro 6. Comparación de medias del Porcentaje inhibición del crecimiento (P.I.C) de los aislamientos de *Trichoderma* sp. contra el aislamientos de *R. solani*

Aislamiento	**%P.I.C.**
M17	61,54 A
M2	62,95 A
M13	63,35 A
M1	64,84 AB
05227	65,46 AB
CLCC05	65,54 AB
M18	66,32 AB

05231	66,91 AB
A1	68,30 BC
05211	68,95 BC
M11	71,97 BC
M12	74,47 BC
04017	77,74 BC

Valores en las columnas seguidos de letras iguales no difieren significativamente entre sí al nivel de α = 0,05 (Prueba de Mínima Diferencia Significativa, MDS).

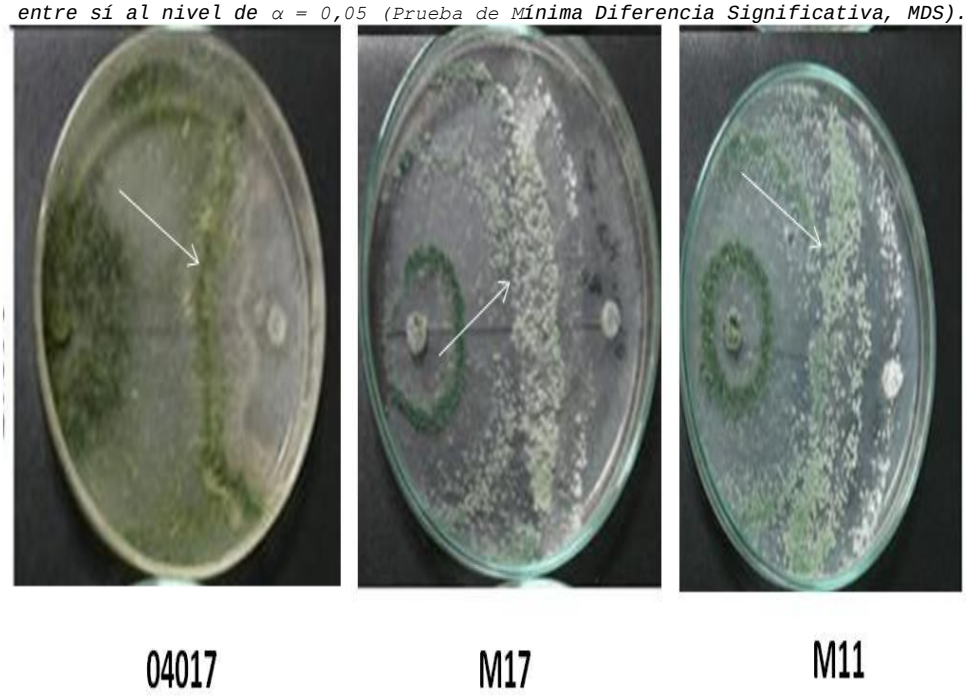


Figura 10. Técnica de enfrentamiento: A la derecha de cada caja, *R. solani*; a la izquierda aislamientos de *Trichoderma*. Tomada a las 72 horas después del inicio de la prueba.

Como se puede observar, en la figura anterior, la expresión de la línea oscurecida en el halo de inhibición localizado en el punto de encuentro entre ambos microorganismos, sugiere la presencia de metabolitos difusibles, y altamente tóxicos de carácter enzímáticos (Celulasa, Quitinasa, Proteasa) acompañado por otros compuestos encargados de la inhibición del crecimiento como ácido harziánico, alamenticinas, peptaiboles, antibióticos, 6-pentil-α-pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperinas, ácido hepteldico y otros (Benítez, *et al.*, 2004; Harman, *et al.*, 2004; Baker, 1988) afirman que la velocidad de crecimiento presentadas por las especies de *Trichoderma* son motivo para la utilización de este microorganismo como antagonista, para el control de fitopatógenos. La competencia por el sustrato indica que al colonizar con mayor rapidez la rizósfera y los espacios del suelo, limita la proliferación del patógeno (Fig. 11).

Mihuta-Grimm y Rowe (1986), probaron con 255 aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos de diferentes zonas, donde el 15% de los mismos fueron efectivos al controlar *Rhizoctonia*; determinando que las cepas aisladas del mismo lugar son más efectivas que las procedentes de otros sitios, coincidiendo con Acevedo y Arcia (1988), quienes señalan la importancia de buscar antagonistas efectivos en cada área geográfica.

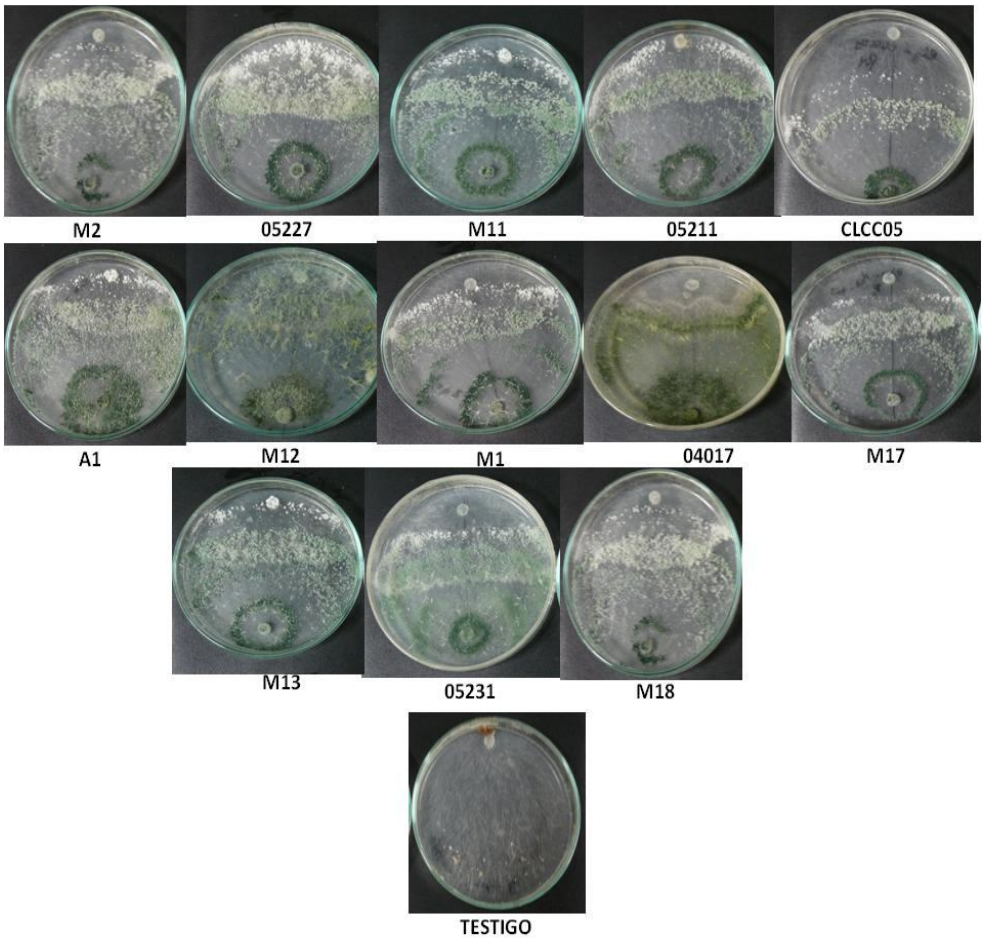


Figura 11. Comportamiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra el aislamiento de *R. solani.in vitro,* a las 72 horas.

Cuadro 7. Comparación de medias del índice de antagonismo de *Trichoderma* spp contra el aislamientos de *R. solani*

Aislamiento	Índice de Antagonismo
M17	2 AB
M2	2 AB
M13	2 AB
M1	2 AB
05227	2 AB

.

CLCC05	2 AB
M18	2 AB
05231	2 AB
A1	3 BC
05211	3 BC
M11	3 BC
M12	3 BC
04017	3 BC

Valores en las columnas seguidos de letras iguales no difieren significativamente entre sí al nivel de α = 0,05 (Prueba de Mínima Diferencia Significativa, MDS).

Micoparasitismo

En las observaciones microscópicas la apariencia de las hifas de *R. solani* en el cultivo dual varió considerablemente respecto a la del testigo. Con la penetración de hifas de *Trichoderma* en hifas del patógeno, se detectó degradación parcial o total (lisis), enrollamiento o estrangulamiento y vacuolización del contenido citoplasmático. Los trece aislamientos en estudio mostraron interacción hifal con el patógeno, constituido por el enrollamiento y posterior degradación y vacuolización del contenido citoplasmático (Fig. 12).

Una vez más se demuestra la particular habilidad parasítica de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a un mismo fitopatógeno. En trabajos realizados por Benhamou y Chet, 1993, reiteran que los daños contra *R. solani* comienzan a observarse cuando ambos hongos entran en contacto y no antes por las sustancias producidas en el avance del antagonista, presentándose invasión y esporulación sobre la colonia de *R. solani* e inhibición de la producción de esclerocios.

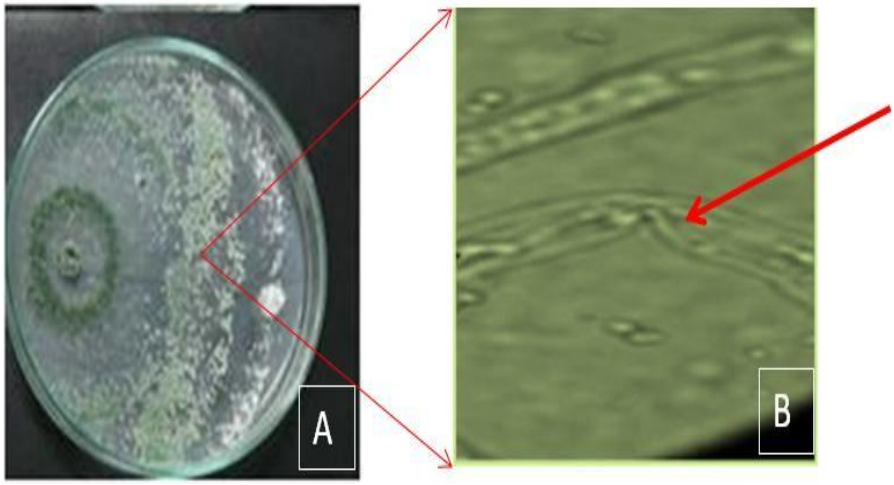


Figura 12. A. Zona de contacto e inhibición del crecimiento micelial del patógeno por parte del aislamiento M11. **B.** Microfotografía de hifas del aislamiento M11invadiendo las hifas de *R. solani* (100x).

En el cultivo dual *in vitro* se pudo observar que la zona de contacto de las colonias del *Trichoderma* 04017 y las de *R. solani*, el primero inhibió el desarrollo del micelio del patógeno. Este comportamiento y efectos de *Trichoderma* sobre *R. solani* en esta investigación, concuerda con un mecanismo de acción que tienen los antagonista, como es el micoparasitismo; coincidiendo con lo descrito por Howell, (2003) quien señala que cuando crece *Trichoderma* y entra en contacto con *R. solani*, las hifas del patógeno son atacadas, enrollándolas y destruyéndolas dejando sólo células vacías. Una razón de este fenómeno deespecificidad pueden ser las interacciones bioquímicasentre hongos, tal como señala Elad *et al.*, (2000), quienes aislaron una lectina de las hifas y del filtradodel cultivo de *R. solani* en medio líquido, y a su vez aislaron galactosa de las paredes de la célula de *Trichoderma* spp., que previene la aglutinación de esta lectina. Cuando 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., se inicia la acción micoparasítica sobre el fitopatógeno (Goldman *et al.*, 1994).

Asimismo la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* ha sido reportada por Gallou *et al.,* 2009; Dos Reis *et al.,* 2007 y Viterbo *et al.,* 2002. Por su parte, Stefanova *et al*; 1999, observaron a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis mientras que Samuels, 1996, señala que el grupo de cepas de *Trichoderma* denominado "Q" que fueron efectivas frente a *R. solani* produjeron gliotoxina.

Estos resultados pueden atribuirse a la selectividad de *Trichoderma* spp., en relación a la mayor o menor producción de enzimas depredadoras de paredes, estrechamente relacionado con la capacidad micoparasítica y a la producción de compuestos antibióticos y fungistático; mecanismos de acción que ejerce este organismo antagónico al interaccionar con un organismo patógeno (Esparza, 2009).

En este estudio, los indicadores P.I.C., P.I.F.E. y el índice de antagonismo, constituyeron las herramientas para la selección de aislamientos promisorios en el control de *R. solani in vivo*, siendo ellos A1, 05211, M11, M12 y 04017.

Capacidad antagonista de los aislamientos de *Trichoderma* spp., frente a *R. solani* en condiciones de umbráculo

Prueba de patogenicidad del aislamiento de *R. solani*

La prueba para comprobar la patogenicidad de *R. solani,* dio como resultado que todas las plantas inoculadas con el patógeno mostraron síntomas similares a los causado por la enfermedad mancha bandeada; coloración pálida y, algunas muertas, menor crecimiento, síntomas similares a estrés hídrico y a déficit nutricional. Después de realizar los aislamientos correspondientes, las colonias aisladas coincidieron con la del patógeno inoculado, concluyendo que *R. solani* es patogénico en plantas del hibrido de maíz H-3001 de Himeca (Fig. 13). La identificación del patógeno coincidió con lo descrito por Tu y Kimbrough (1975) y Sneh *et al.,* (1996), quienes destacan que la formación de los ángulos rectos entre hifas del micelio es la característica más distintiva de *R. solani* (Fig. 14).



Figura 13. Síntomas de *R. solani* en maíz H-3001

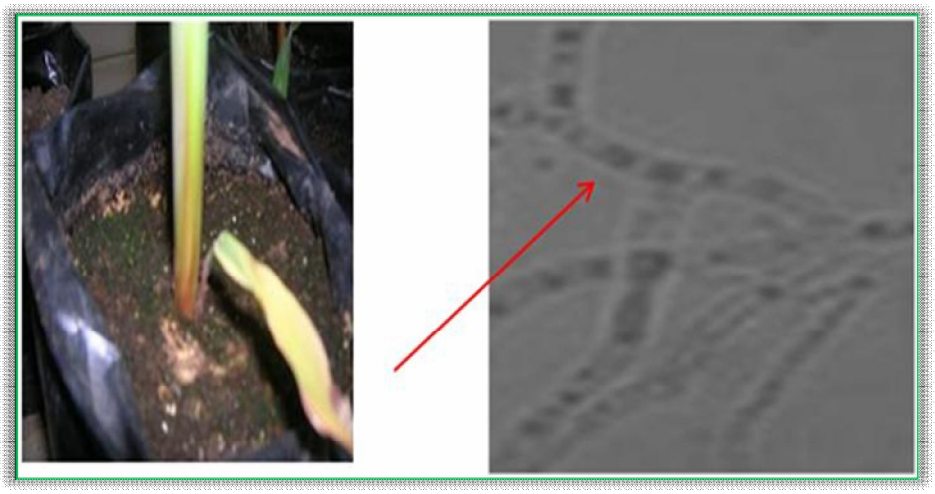


Figura 14. Hifas de *R. solani*, obsérvese ángulo recto. (100x).

Evaluación de los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani* en umbráculo

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. seleccionados para la evaluación en condiciones de umbráculo, correspondieron a A1, M11, M12, 04017 y 05211, debido a que mostraron el mayor potencial de control de *R. solani*, bajo condiciones *in vitro.*

Cuadro 8. Incidencia y reducción de rizoctoniosis frente a *Trichoderma* spp., en plantas de maíz en condiciones de umbráculo.

Trat.	Descripción	Incidencia (%)	Grupo[f]	Reducción de la enfermedad (%)	Grupo[f]
1	T. absoluto	0,00	A	100	A
2	T. enfermo	80	B	12	B
3	A1 + patógeno	23,50	C	70,625	C
5	M11 + patógeno	20,25	C	74,6875	C
7	M12 + patógeno	16,55	C	79,3125	C
9	05211 + patógeno	16,45	C	79,4375	C
11	04017 + patógeno	23,25	C	70,9375	C

Valores en las columnas seguidos de letras iguales no difieren significativamente entre sí al nivel de α = 0,05 (Prueba de Mínima Diferencia Significativa, MDS).

De acuerdo a la prueba de mínima diferencia significativa (MSD) con α = 0,05, para el porcentaje de incidencia de la enfermedad, hubo una alta diferencia significativa entre T1 y T2; por su parte los tratamientos T3, T5, T7, T9 y T11 presentaron una incidencia de la enfermedad entre 16 – 23%, altamente significativa con respecto a T2. El porcentaje de reducción de la enfermedad por parte de los tratamientos T3, T5, T7, T9 y T11, fue mayor a 70%, altamente significativa con respecto a T2, donde la reducción de la enfermedad fue de 12%; siendo los tratamientos T7 y T9 los que obtuvieron los mayores porcentajes de reducción de la rizoctoniosis en casi 80% (Cuadro 8).

Evaluación de promoción de crecimiento vegetal

La prueba de mínima diferencia significativa (MSD) para las variables altura de la planta, peso fresco y seco del área foliar, el tratamientoT1 no mostró diferencia significativa con respecto a T2. Observándose que para esas mismas variables los tratamientos T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 y T12 presentaron diferencias altamente significativas comparadas con los testigos. De los valores obtenidos por los tratamientos T3, T5, T7, T9, y T11 se infiere que aún en presencia del patógeno,

los aislamientos de *Trichoderma* spp., permitieron que las plantas alcanzaran un mejor desarrollo vegetativo, en comparación al testigo absoluto (T1) y el testigo enfermo (T2); con $\alpha = 0,05$) (Fig. 15) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de medias de las variables altura, peso fresco y peso seco de la planta.

Tratamiento	Descripción	Altura (cm)	Grupo[f]	Peso Fresco	Grupo[f]	Peso Seco	Grupo[f]
1	T. absoluto	106,78	AB	41,93	AB	23,25	AB
2	T. enfermo	98,56	A	38,44	A	21,89	A
3	A1 + patógeno	128,5	CD	81,76	D	33,27	CD
4	A1	125,7	CD	82,26	D	34,94	CD
5	M11 + patógeno	132,9	D	82,11	D	29	BC
6	M11	128,1	CD	77,24	CD	31,28	CD
7	M12 + patógeno	131,5	D	76,25	CD	28,49	BC
8	M12	126,4	CD	75,56	CD	38,71	CD
9	05211 + patóg.	114,5	BC	69,52	CD	30,67	CD
10	05211	117,5	BC	61,4	CD	28,48	BC
11	04017 + patóg.	127,7	CD	74,84	CD	20,5	A
12	04017	126,3	CD	69,3	CD	32,24	CD

Valores en las columnas seguidos de letras iguales no difieren significativamente entre sí al nivel de $\alpha = 0,05$ (Prueba de Mínima Diferencia Significativa, MDS).

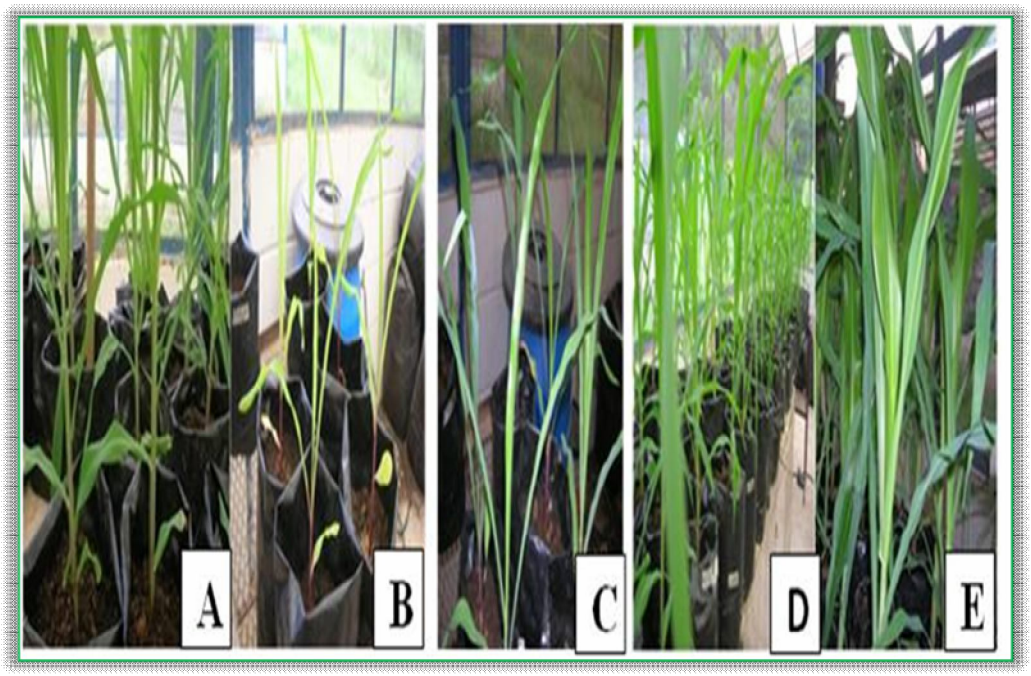


Figura 15. Desarrollo vegetativo de las plantas de maíz H-3001, con los diferentes tratamientos. A: T1; B y C: T2; D: T3, T5; E: T7, T9

En cuanto al peso fresco, se observó que hubo diferencia altamente significativa de los T3-T12, siendo T3, T5 y T7 los que obtuvieron los mayores valores para esta variable, notándose una vez más que el antagonista supera al patógeno en esta relación. Por otra parte, es notorio el bajo peso seco de T11 en comparación con T3-T10 y T12, tanto que se asemeja a T2.

Los tratamientos T4, T6, T8, T10 y T12 mostraron los mejores resultados en cuanto a la longitud, peso húmedo y seco y volumen de las raíces de las plantas durante el ensayo si se compara con T1 y T2 (Cuadro 10). Igual tendencia se observa en T5, donde la planta muestra un buen desarrollo del sistema radical (Fig. 16 E). Esto indica que no solo la capacidad antagónica describe el comportamiento de los aislamientos promisorios, sino que además, pudiera estar mostrando mecanismos estimuladores sobre el desarrollo de la planta en la interacción *Trichoderma* - planta en rizósfera, bajo las condiciones de estudio.

Cuadro 10. Comparación de media de las variables longitud, peso fresco, peso seco y volumen radicular de la planta.

Trat.	Longitud	Grupo[f]	Peso Fresco (gr)	Grupo[f]	Peso Seco (gr)	Grupo[f]	Volúmen (cm3)	Grupo[f]
1	53,2	ABC	20,22	AB	5,34	AB	29,44	A
2	37,9	A	19,25	AB	4,25	ABC	13,33	ABC
3	55,5	ABC	22,3	AB	5,32	A	41,3	BCD
4	45,4	AB	25,22	ABC	6,25	AB	45,4	BCD
5	52,9	ABC	20,25	AB	5,62	A	42,45	BCD
6	46,3	BC	23,55	ABC	5,89	AB	48,3	CD
7	56,3	ABC	20,15	AB	5,09	A	36,1	BCD
8	48,8	ABC	24,22	ABC	5,89	AB	49,8	D
9	65	C	22,14	AB	5,15	A	30	ABC
10	49,22	ABC	26,55	ABC	6,32	AB	31,5	ABCD
11	45,4	ABC	20,22	AB	4,32	ABC	28,6	AB
12	46,7	BC	19,28	AB	5,02	A	42,5	BCD

Valores en las columnas seguidos de letras iguales no difieren significativamente entre sí al nivel de $\alpha = 0,05$ *(Prueba de Mínima Diferencia Significativa, MDS).*

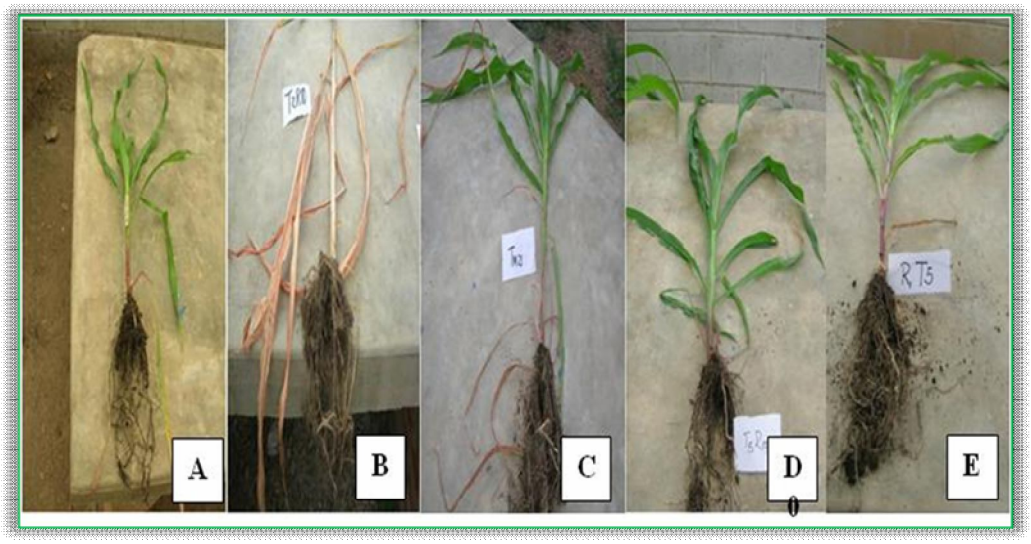


Figura 16. Desarrollo vegetativo de las plantas de maíz H-3001, con los diferentes tratamientos. A: T1; B y C: T2; D: T3; E: T5

La estimulación del crecimiento observada en las plantas tratadas con suspensiones de conidios de *Trichoderma* spp., está en correspondencia con lo obtenido por Paez, 2006, quien obtuvo en estudios preliminares con *Trichoderma* para la estimulación del crecimiento sobre plantas de fríjol, que los aislamientos seleccionados estimularon la germinación y produjeron un aumento en la altura de las plantas entre el 70 y 80%, y una ganancia en peso de un 60% aproximadamente, presumiéndose un incremento en los rendimientos de este cultivo. Un ensayo similar realizado sobre pasto estrella demostró que la ganancia en peso seco con algunos aislamientos de *Trichoderma* es cercana al 23% y en longitud de las raíces y de estolones este incremento es de un 30%.

Asimismo, Tovar (2008) y López *et al*., (2010), obtuvieron resultados similares y establecieron que *Trichoderma* produce sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas, que actúan como catalizadores o estimuladores de los tejidos meristemáticos primarios (los que tienen potencial de formar nuevas raíces) en las partes jóvenes de éstas, acelerando su reproducción celular, logrando que las plantas alcancen un desarrollo más rápido que aquellas plantas que no han sido tratada con dichos microorganismos. Por su parte Hoyos-Carvajal *et al*., (2008),

señalan que tal fenómeno puede atribuirse al control realizado por determinados microorganismos sobre algunos patógenos ó a la producción de metabolitos estimuladores del crecimiento vegetativo por parte de éstos, o la acción simultánea de ambos factores.

En estudios realizados por Harman, (2006), con maíz indican que las raíces colonizadas por *Trichoderma* spp**.** requieren un 40% menos de fertilizantes nitrogenados con relación a las raíces que no se encuentran colonizadas. Conociendo que dicho cultivo demanda mucho Nitrógeno, existe la posibilidad real que las aplicaciones de este conjunto químico, sean disminuidas, reduciendo así los costos de aplicación y una mejora apreciable del medio ambiente. El empleo del *Trichoderma* puede beneficiar a los productores agrícolas en sus propósitos de lograr cosechas más sanas y con mayor productividad (Páez, 2006).

Identificación morfológica de la especie de los aislamientos de *Trichoderma,* a tres y cinco días de crecimiento del cultivo.

Las características morfológicas de los aislamientos de *Trichoderma* A1, M11, M12, 05211 y 04017, tanto micro como macroscópica, para su respectiva identificación, se recolectaron en base a lo descrito por Gams & Samuels, 1996; y luego fueron introducidas en la clave interactiva para la identificación de especies disponible en http://www.isth.info/biodiversity/index.php, donde fue posible identificar tres de los cinco aislamientos, debido a que algunas mediciones de ciertas estructuras no coincidieron con los caracteres de algún taxón registrado en el enlace.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante esta herramienta, se obtuvo que dos de ellos A1 y M11 pertenecen a la Sección *Trichoderma, T. koningiopsis*; mientras que 04017 pertenece a la Sección *Longibrachiatum, T. ghanense*; por su parte M12 y 05211 no coincidieron con algún taxón del enlace (Fig. 17).

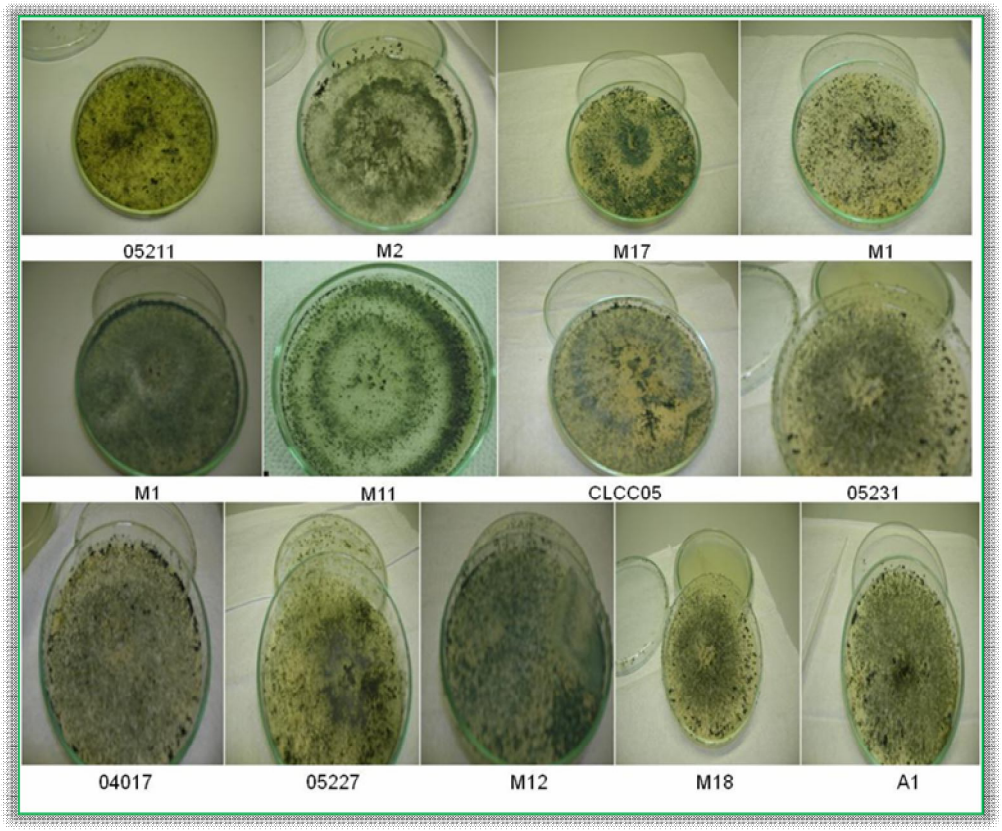


Figura 17. Características de la colonia de los 13 aislamientos de *Trichoderma* spp en condiciones *in vitro*

Aislamiento A1

La colonia en medio PDA a las 72 horas y a 28ºC, presentó un crecimiento rápido, micelio algodonoso, sin pigmentación del medio, ni formación de pústulas. El micelio aéreo es lanoso y de color blanco. El reverso de la placa no presentó coloración. La colonia desprendía olor a coco. No generó pústulas al crecer sobre el medio. Conidióforo con ramificación abierta, fiálides intercaladas, lageniforme (6,8 a 8,2 x 2 a 2,5) µm, punto medio (2,9 a 3,5) µm conidios de forma ligeramente elipsoidales a cilíndricos, de color verde oliva, de longitud (3,9 x 2,46) µm, clamidosporas terminales e intercaladas, unicelulares y solitarias, de forma globosa a subglobosa con paredes lisas, hialina sus dimensiones son (9,2 a 10,3 x 6,2 a 7,1) µm; y de acuerdo a la clave correspondió a *T. koningiopsis* (Fig. 18).

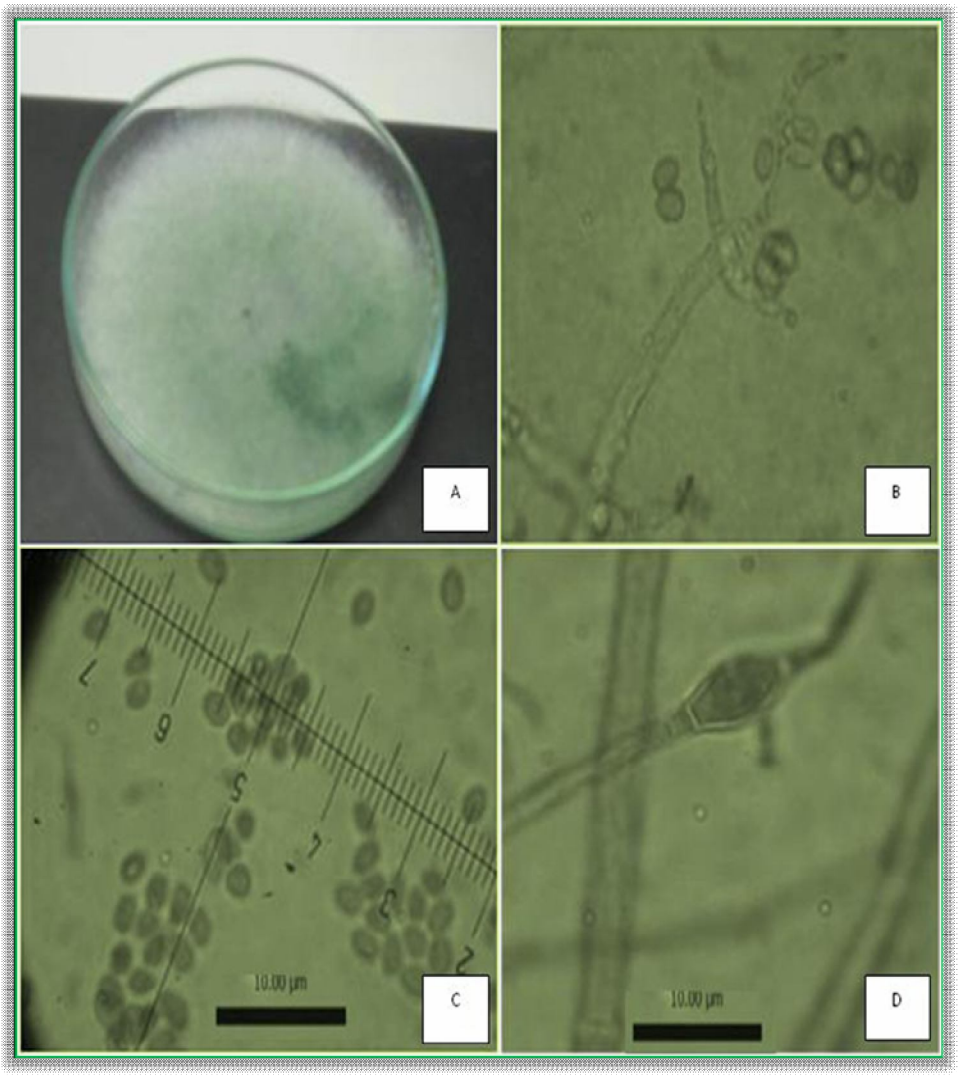


Figura 18. A. Crecimiento de *T. koningiopsis* en PDA a los 3 días. **B.** Fiálides. C. Conidios elipsoidales. D. Clamidosporas intercalada

Aislamiento M11

La colonia en medio PDA a las 72 horas y a 28ºC, presentó crecimiento rápido, micelio algodonoso, sin pigmentación del medio, ni formación de pústulas. Presentó conidióforo con ramificación abierta, fiálides intercaladas, lageniforme (4 a 7 x 2 a 2,5) µm, conidios de forma globosa, de color verde oliva, de longitud (3,16 x 3,16)µm, presenta clamidosporas terminales, intercaladas, unicelulares, solitarias, de forma globosa a subglobosa con paredes lisas, hialina sus dimensiones son de (8,21 a 9,5 x 6,21 a 8,1)µm; y de acuerdo a la clave pertenece a *T. koningiopsis* (Fig. 19).

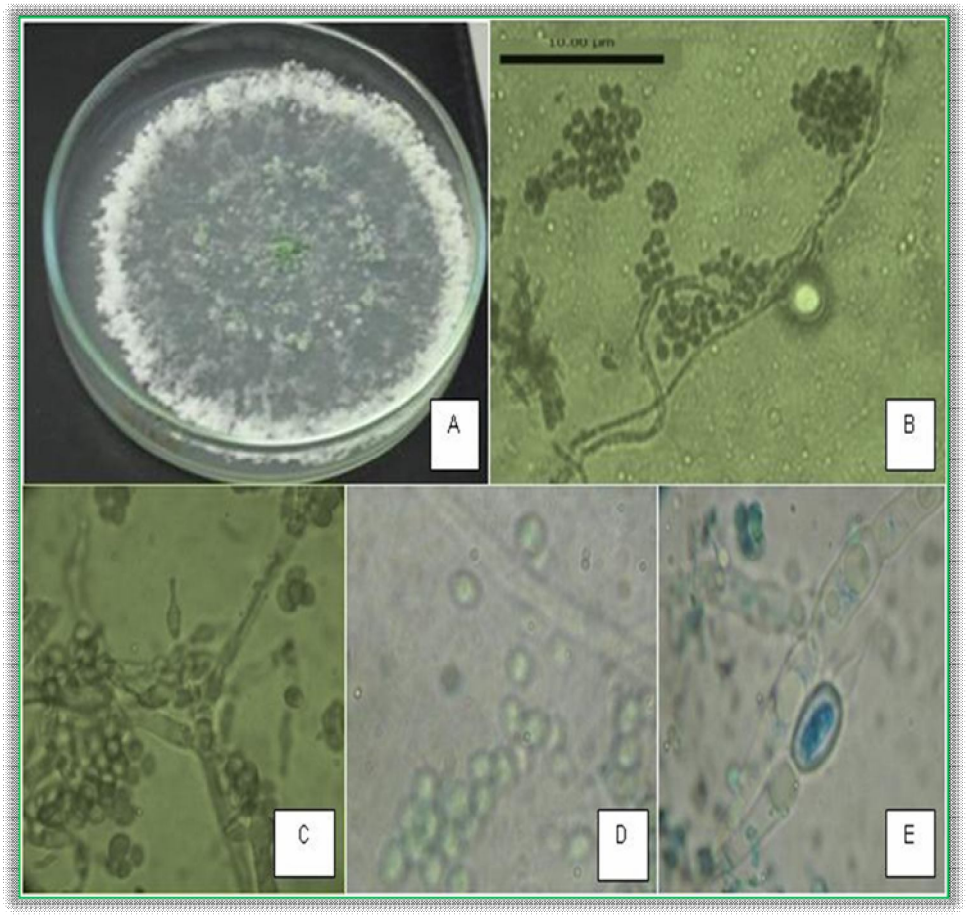


Figura 19. A. Crecimiento de *T. koningiopsis* en PDA a los 3 días. **B.** Masa de conidios. **C.** Fiálides **D.** Conidios elipsoidales. **E.** Clamidosporas terminales.

Aislamiento M12

La colonia en medio PDA a las 72 horas y a 28ºC, presentó crecimiento rápido, micelio algodonoso, sin pigmentación del medio, sin formación de pústulas, ni anillos concéntricos. Conidióforo poco ramificado, simple con ramificación abierta, fiálides de forma lageniforme (9 a 26 x 3 a 3,5)µm, conidios ligeramente elipsoidales, lisos, forma ovoide, de color verde oliva y longitud (2,8 x 2,22)µm, presenta clamidosporas terminales, intercaladas y en cadena de forma globosa a subglobosa sus dimensiones son de (5,70 a 6.55 x 4,70 a 5,66) µm, este aislamiento no correspondió con algún taxón disponible en el enlace (Fig. 20).

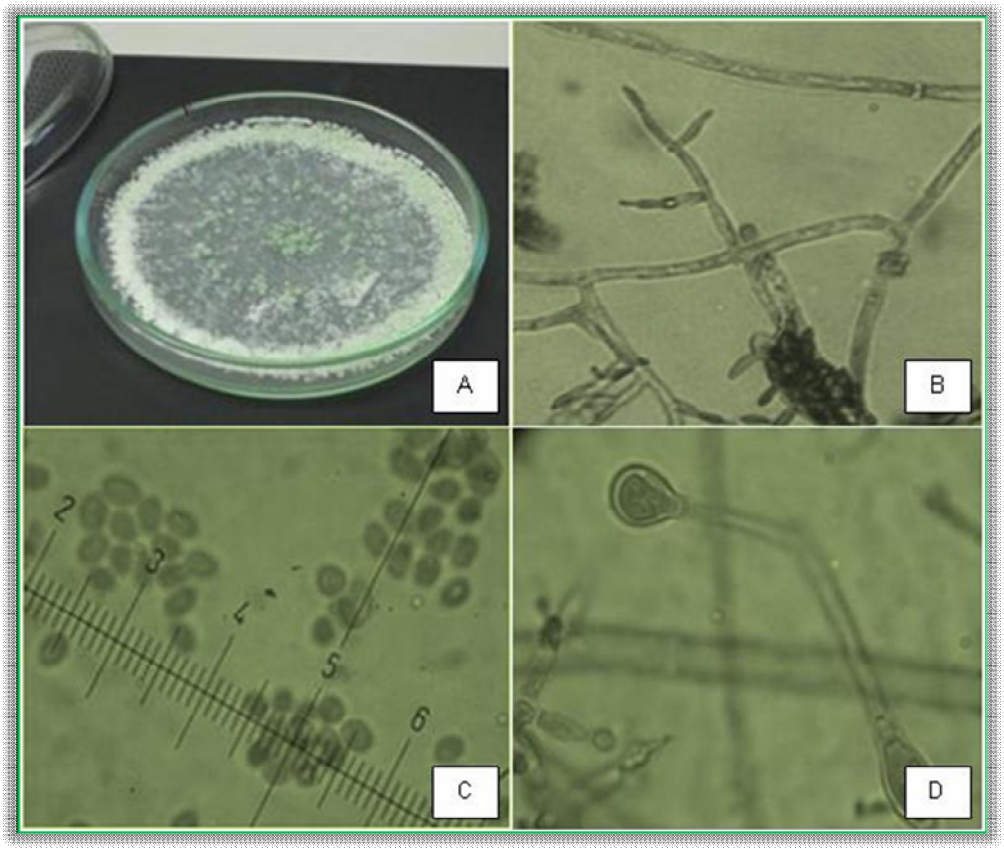


Figura 20. A. Crecimiento de M12 en PDA a los 3 días. **B.** Fiálides. **C.** Conidios elipsoidales. **D.** Clamidosporas intercalada y terminales.

Aislamiento 05211

La colonia en medio PDA a las 72 horas y a 28ºC, presentó crecimiento rápido, micelio algodonoso, sin pigmentación del medio, ni formación de pústulas. Conidióforo con un patrón complejo, fiálides intercaladas, ampuliforme (6,6 a 8,6 x 2 a 3)µm, punto medio (2,5 a 3,1)µm, conidios elipsoidales, lisos y ligeramente rugosos, de color verde oliva y de longitud (3,5 x 2,5)µm, no presenta clamidosporas; este aislamiento no correspondió con algún taxón disponible en el enlace (Fig. 21).

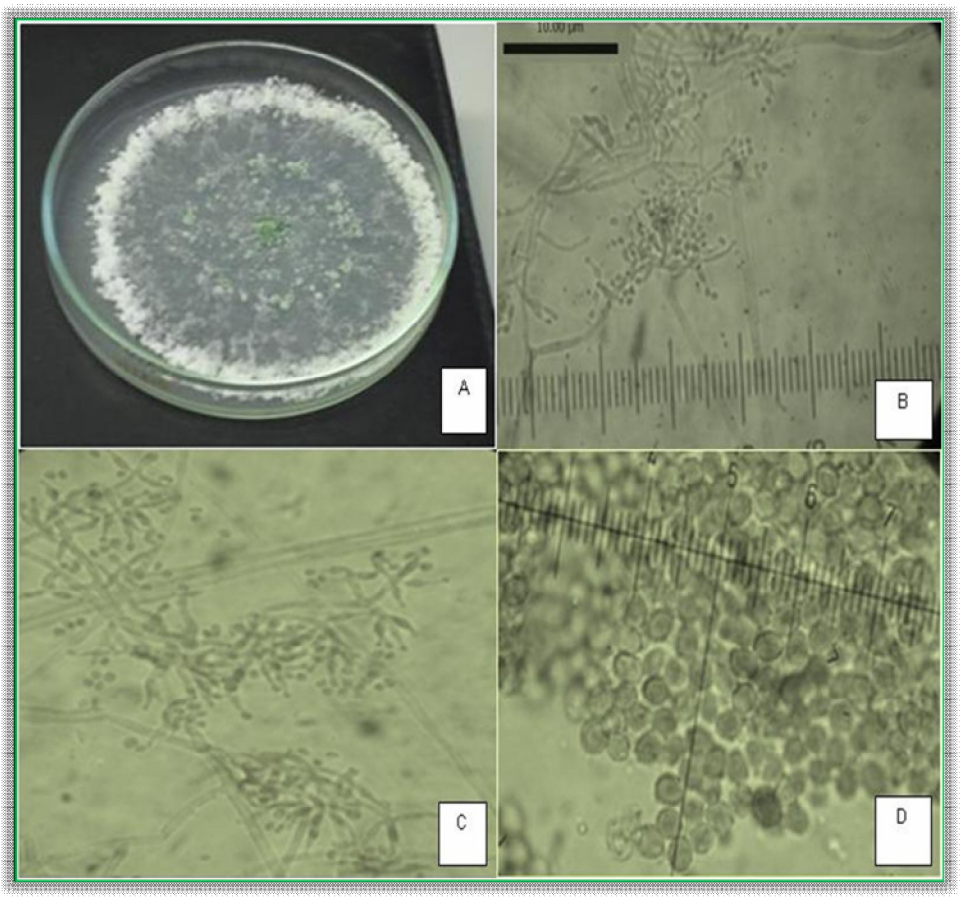


Figura 21. A. Crecimiento del aislamiento 05211 en PDA a los 3 días. B. Fiálides ampuliformes C. Fiálides intercaladas D. Conidios elipsoidales.

Aislamiento 04017

Micelio algodonoso, crecimiento rápido, hay pigmento en el medio amarillo, no hay formación de pùstulas. Conidióforo poco ramificado, simple con ramificación abierta, El eje principal del conidióforo (2,5-4,0) µm de ancho, fiálides que surge directamente de las ramas secundarias de ampuliformes a lageniformes, más o menos curvas (6 a 8 x 2 a 2,5) µm, conidios verde ligeramente elipsoidales, lisos, (4,5 a 5 x 2,05 a 2,5)µm, no presenta clamidosporas; perteneciente a *T. ghanense* de acuerdo a esta clave (Fig. 22).

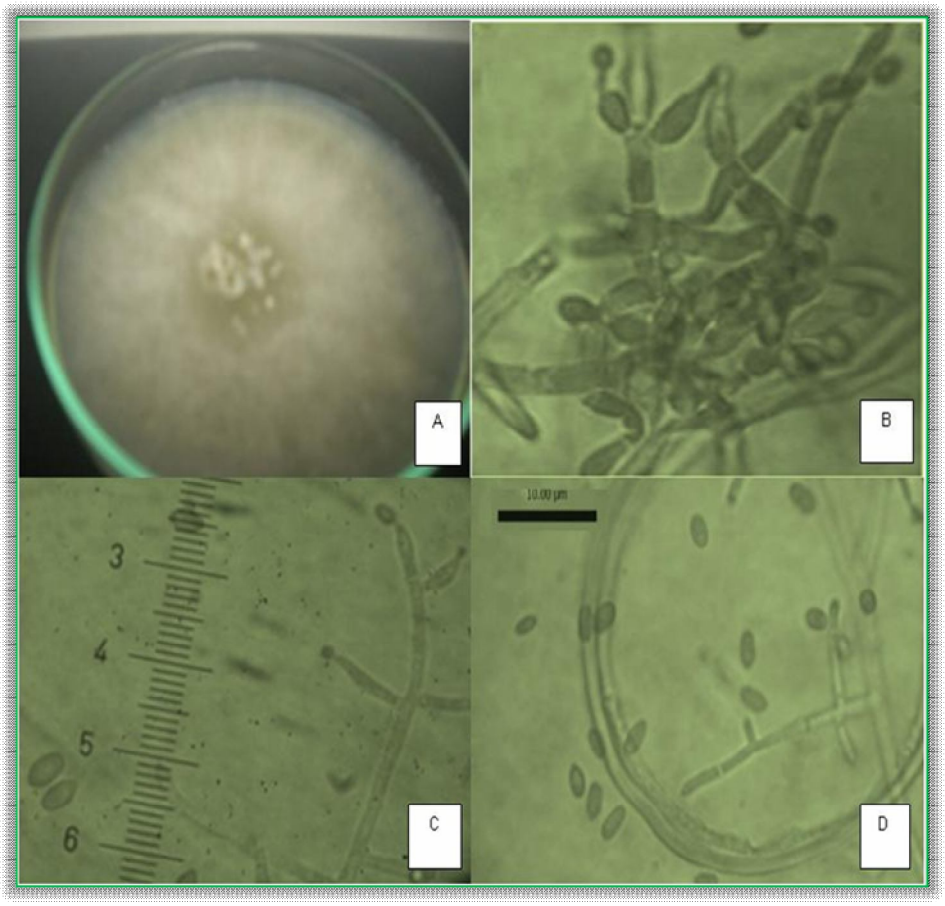


Figura 22. A. Crecimiento de *T. ghanense* en PDA a los 3 días. **B.** Fiálides ampuliformes **C.** Fiálides lageniformes **y D.** Conidios elipsoidales.

Identificación molecular de las especies de *Trichoderma*

Integridad del ADN

Tanto la calidad como la cantidad de ADN de los aislamientos de *Trichoderma*, produjeron bandas claras y nítidas (Fig. 23); propiedades necesarias para garantizar parte del éxito de la amplificación del ADN en la técnica de PCR (Mukherjee*et al.*, 2002).

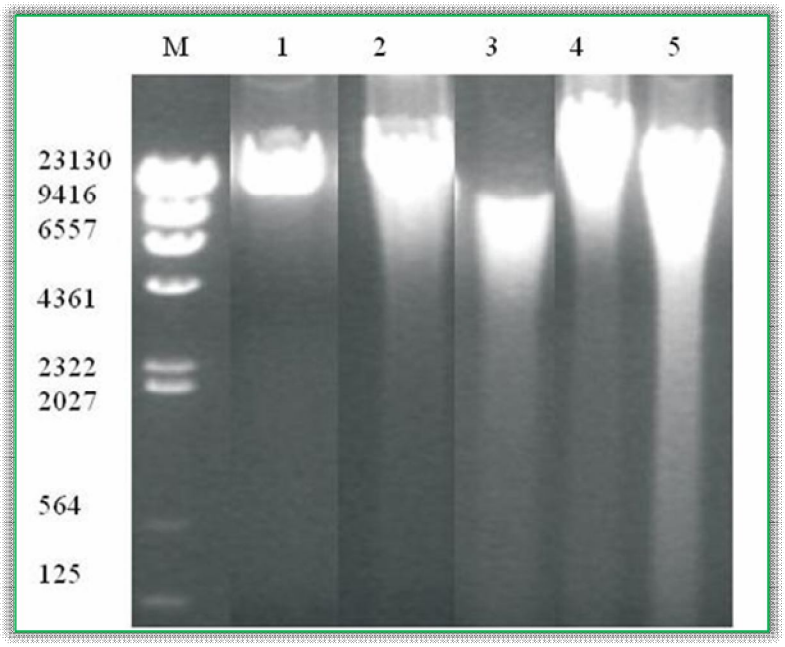


Figura 23. Análisis del ADN de los aislamientos seleccionados de *Trichoderma* spp. Línea M: marcador de ADN de bajo peso molecular. Línea 1: A1. Línea 2: M11. Línea 3: M12. Línea 4: 05211. Línea 5: 04017.

Amplificación por PCR de fragmentos ITS

La amplificación de la región ITS del ADNr con los *primers* ITS1 e ITS4, alcanzó un tamaño de producto amplificado, de 600 pb (Fig. 24). Los resultados coinciden con Mukherjee *et al.*, (2002), quienes trabajaron en la identificación y variabilidad genética de aislamientos de *Trichoderma*. Estos resultados están también en concordancia con los estudios realizados por Ospina *et al.*, (1999) y Venkateswarlu *et al.*, (2008), quienes determinaron que la amplificación del ADNr tiene un fragmento de aproximadamente 600 a 750 pb por ITS-PCR en *Trichoderma*.

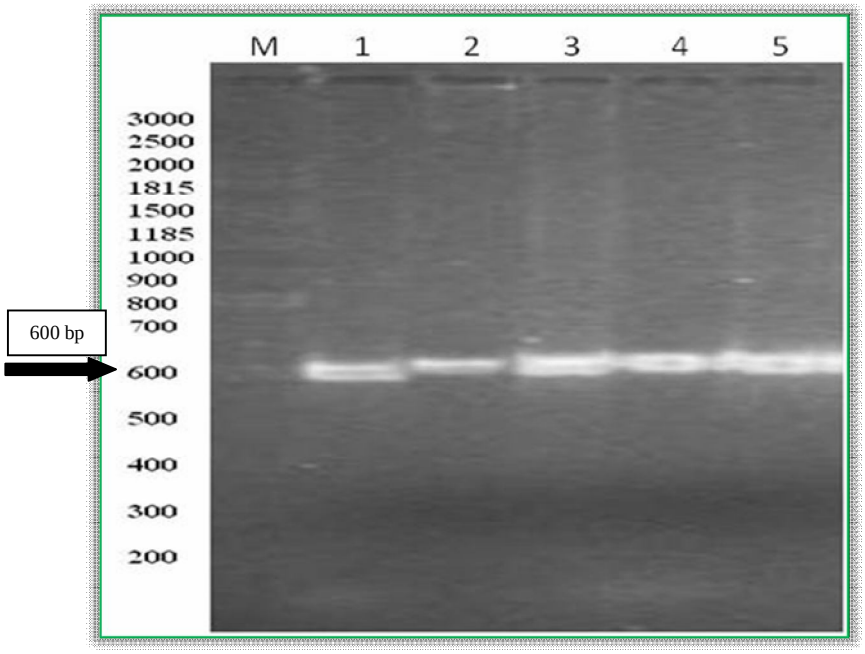


Figura 24. PCR de la amplificación de la región ITS1-ITS2 de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Línea M: marcador de ADN de bajo peso molecular. Línea 1: A1. Línea 2: M11. Línea 3: M12. Línea 4: 05211. Línea 5: 04017.

Análisis de similitud BLAST-NCBI

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas que se encuentran registradas en el GenBank a través de la herramienta BLAST disponible en la red. Los hallazgos encontrados son resumidos en las Tablas 7 y 8. El análisis de las secuencias de nucleótidos realizado mediante BLAST muestra una homología del 98 y 99% con la cepa *T. asperellum*, disponible en el registro de la base de datos del NCBI Genbank (Anexo 5). El alineamiento de secuencias múltiples que incluyó la región ITS1-TS2, permitió observar la variación entre *T. asperellum* y los aislamientos evaluados. Posteriormente el análisis de las secuencias mediante *TrichO*key 2 (http://www.isth.info/tools/blast/index.php), mostró que todos los aislamientos estuvieron apropiadamente localizados entre la sección *Trichoderma* y *Longibrachiatum.*

Las cepas A1, M11, M12 y 05211 presentaron una homología de alto nivel comparadas con las secuencias correspondientes a *T.koningiopsis* Sección *Trichoderma,* Grupo *viride*; mientras que la cepa 04017 presentó una alta homología con las secuencias reportadas para la Sección *Longibrachiatum,* Grupo *Longibrachiatum, T. ghanense.* Debido a la alta homología obtenida con la secuenciación genética, se considera que *T. koningiopsis* y *T. ghanense*, son las especies utilizadas en este estudio (Fig. 25 y 26) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Identificación de la especies de los aislamientos de *Trichoderma* mediante la amplificación de la región ITS1- ITS2

Aislamiento (Código)	**Identificación**	**Localización**	**Homología %**	**Confiabilidad**	**Anclas de 5**
A1	*Trichoderma koningiopsis*	Rizósfera Tomate	99	Alta	4
M11	*Trichoderma koningiopsis*	Raíz maíz	98	Alta	4
M12	*Trichoderma koningiopsis*	Raíz maíz	99	Alta	4
05211	*Trichoderma koningiopsis*	Raíz maíz	98	Alta	4
04017	*Trichoderma ghanense*	Rizósfera topocho	99	Alta	4

Cuadro 12. Distribución de los aislamientos de *Trichoderma* por sección, grupo y por especies.

Aislamiento (Código)	**Sección**	**Grupo**	**Especie**
A1	*Trichoderma*	*viride*	*koningiopsis*
M11	*Trichoderma*	*viride*	*koningiopsis*
M12	*Trichoderma*	*viride*	*koningiopsis*
05211	*Trichoderma*	*viride*	*koningiopsis*
04017	*Longibrachiatum*	*Longibrachiatum*	*ghanense*

Como puede observar en el Cuadro 12, la incidencia de los elementos del grupo *Trichoderma* es elevada, sobre todo de la especie *T. koningiopsis* (4 de 5 islamientos); encontrándose un aislamiento del grupo *Longibrachiatum* (04017), del cual deberá explorarse su capacidad como agente de biocontrol.

En cuanto a la especie recién reportada *T. ghanense,* deberá ahondarse en su estudio e iniciarse estudios de biocontrol y caracterización más profundos que conduzcan al alcance del reconocimiento como especie nueva en nuestro país.



Figura 25. Reporte del software TrichOkey donde se indica la ubicación de las anclas de la secuencia de ITS de los aislamientos 05211, A1, M12 y M11y la sección a la que pertenece.

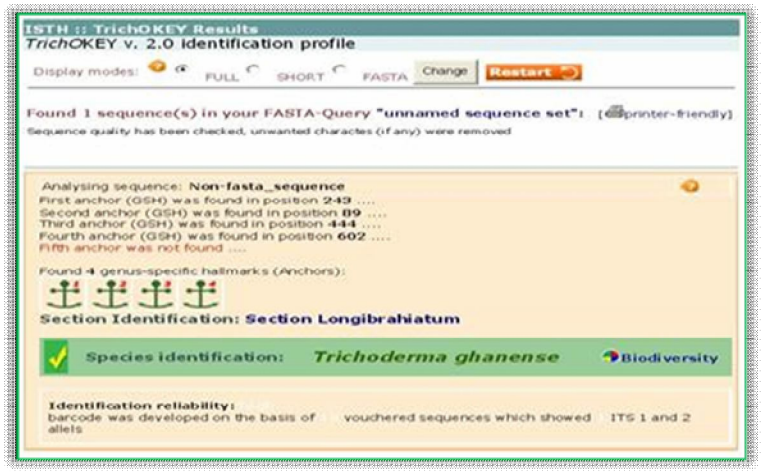


Figura 26. Reporte del software TrichOkey donde se indica la ubicación de las anclas de las secuencias de ITS del aislamiento 04017 y la sección a la que pertenece.

Alineamiento múltiple de las secuencias

Se incluyó una secuencia del GenBank (*T. asperellum*, AN EU021220) como referencia; para alinear las secuencias de los aislamientos 05211, 04017, A1, M12 y M12 con esta especie muy bien estudiada.

Las posiciones están determinadas considerando que la secuencia empieza con el inicio de la secuencia ACCTGCGGAGGGATCATTA anchor 1, Druzhinina *et al*., 2005). Estos detalles pueden verse en la figura 27. De aquí puede observarse que si bien la mayor parte de la secuencia de ITS de los aislamientos 05211, 04017, A1, M12 y M11 es igual a la secuencia de *T.asperelum*, presenta ciertas diferencias con respecto de esta; por lo cual se puede concluir que está emparentada con la especie de referencia sin ser particularmente ésta.

Resultados similares encontraron Jiménez *et al.,* (2008), quienes apoyados en la gran diversidad del género en todas las regiones del país, caracterizaron 12 aislamientos de *Trichoderma* spp., colectados en bulbos, rizósfera, y esclerocios de plantas de ajo afectadas por *Sclerotium cepivorum*, Berk; amplificando la región ITS del ADNr con iniciadores ITS1- ITS2 e ITS1-ITS4 digerido con las enzimas Hinf I, Hae III, Hpa II y Msp I. Obteniendo dos cepas de *T. harzianum*; dos de *T. koningiopsis*, una de *T. pseudokoningii*, una de *T. atroviride*; y tres de *T. harzianum*, proveniente de los estados Trujillo, Lara y Aragua, respectivamente. La segunda agrupó a dos aislamientos de *T. harzianum*, de Táchira y Portuguesa. La tercera la conformó un aislamiento de *T. longibrachiatum*, del estado Trujillo. Siendo estas especies las más encontradas en las regiones señaladas, coincidiendo con los esultados obtenidos en este estudio donde el 80% de los aislamientos identificados correspondieron a *T. koningiopsis*, provenientes del norte del país.

Rivas *et al.,* (2010), también evaluaron la capacidad de aislamientos de *Trichoderma* spp., para controlar *in vitro* a *Crinipellis perniciosa*, agente causal de la "escoba de bruja" en cacao. Ellos identificaron, mediante el análisis de las secuencias espaciadoras transcritas internas 1 y 2 (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal (ADNr), un

total de seis especies diferentes, siendo *T. harzianum* la más abundante, (63,1%), seguida por *T. virens* (15,7%), *T. brevicompactum*, (13,1%), *T. theobromicola /T. koningiopsis* / *T. ovalisporum*, *T. asperellum* (2,6%), *T. pleurotum* (2,6%), y *T. koningiopsis* (2,6%).

En cuanto a *T. ghanense*, es ampliamente conocido por su distribución en Canadá, Colombia, Francia, Nigeria, Nueva Guinea, Filipinas, U.S.A. (Carolina del Norte, Virginia) y Perú (Samuels et al.2006). En Venezuela, no ha sido reportada anteriormente, siendo esta vez el reconocimiento de la especie controlando *R. solani* en maíz, bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Ambos, *T. koningiopsis* y *T. ghanense,* han sido reportadas como agentes de control biológico de plantas infestadas con diferentes hongos patógenos del suelo que afectan a las plantas (Howell, 2003; Verma *et al*, 2007.), debido a una combinación de micoparasitismo y producción de metabolitos. Estos resultados además, coinciden con los obtenidos por Stefanova *et al.*, 1999, quienes evaluaron el micoparasitismo de cuatro aislamientos de *Trichoderma* spp. definidos como promisorios para el control de diversos hongos de suelo, entre ellos *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium spp*.

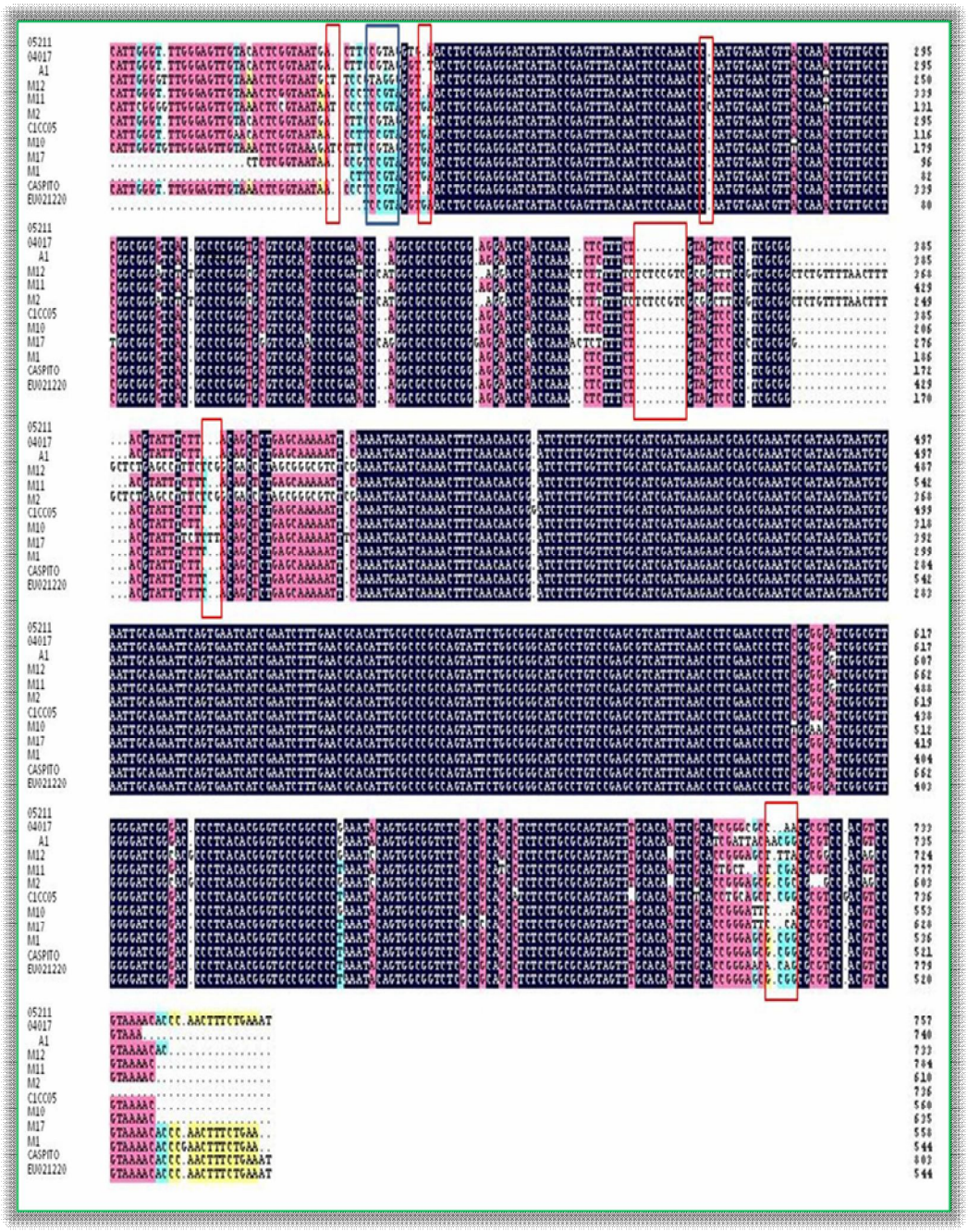


Figura 27. Comparación por alineamiento de las secuencias de 05211, 04017, A1, M12 y M11, con respecto a *T. asperelum*. Los recuadros rojos indican cambios en las secuencias de los aislamientos y la especie de referencia; el recuadro azul indica el inicio del alineamiento entre los aislamientos y *T asperelum.*

La ubicación taxonómica de las cepas en estudio es importante ya que representa el punto de partida que permitirá un mejor diseño de experimentos posteriores a fin de evaluar su actividad biológica bajo diferentes condiciones de crecimiento y determinar los mecanismos de acción que desarrollan. Esta información en conjunto permitirá una mejor selección de los organismos que pueden ser susceptibles de un mejor aprovechamiento en el biocontrol de patógenos de las plantas.

CONCLUSIONES

Los trece aislamientos de *Trichoderma* 05211, M2, M17, M1, M13, M11, CLCC05, 05231, 04017, 05227, M12, M18 y A1, inhibieron el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, en más de un 50% de la superficie de la placa de petri donde se encontraban ambos hongos.

Los aislamientos de *Trichoderma* AI, M11, M12, 05211 y 04017 inhibieron el crecimiento de *R. solani in vitro* y redujeron la enfermedad en condiciones de umbráculo, convirtiéndolos en aislamientos potenciales en el control rizoctoniosis en maíz.

Los mecanismos de acción predominantes de los aislamientos AI, M11, M12, 05211 y 04017, estuvieron representados por competencia, micoparasitismo, antibiosis y una subsecuente promoción del desarrollo vegetativol.

Los aislamientos A1, M11 fueron identificados taxonómicamente a nivel de especie, en base a sus características morfológicas como *T. koningiopsis*, mientras que el aislamiento 04017 correspondió a *T. ghanense*; entre tanto M12 y 05211 no fueron identificados por esta vía.

Los aislamientos A1, M11, M12 y 05211 fueron identificados taxonómicamente a nivel de especie, en base a sus características moleculares como *T. koningiopsis* y 04017 como *T. ghanense*.

T. koningiopsis y *T. ghanense* reportaron índices de antagonismo entre 2 y 3 contra *R. solani* en condiciones *in vitro* y redujeron la enfermedad en más de 70% en condiciones de umbráculo.

La incidencia de especies del grupo *Trichoderma* dentro del género *Trichoderma* en la región central de Venezuela es elevada. Durante el presente estudio se

identificaron 4 aislamientos pertenecientes aeste grupo, lo que representó una mayor distribución

T. ghanense representa una especie dentro del grupo *Longibrachiatum* no reportada con anterioridad. Aunque la evidencia de este hecho es bastante extensa es necesario que se profundicen los estudios taxonómicos a fin de lograr el reconocimiento de especie nueva.

RECOMENDACIONES

Validar la eficacia de los aislamientos de *Trichoderma* identificados (A1, M11, M12, 05211 y 04017) en condiciones de campo, preferiblemente en lotes cercanos al lugar donde fueron aislados.

Determinar los metabolitos secundarios que participan en la relación endofítica de los aislamientos identificados y la planta de maíz.

Realizar búsqueda y estudio de aislamientos de *Trichoderma* con alta actividad antagónica sobre diversos patógenos, sin generalizar o extrapolar su eficacia a un amplio rango de hongos.

Realizar ensayos de confrontación de los aislameientos A1, M11, M12, 05211 y 04017 contra otros hongos fitopatógenos y ensayos de producción de enzimas hidrolíticas para determinar el potencial biotecnológico de estos nuevos aislados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo, R., A. Arcia. 1988. Control de *Sclerotium cepivorum* por *Trichoderma* en macetas. (Resumen). Fitopatologia Venezolana. 1(1):34.

Agamez, E.; J. Barrera, L. Oviedo. 2009. Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* spp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. Acta Biológica Colombiana. Vol.14 no.3 Bogotá.

Agrios, G. 1998. Fitopatología. Editorial Limusa. México. p. 435.

Altschul, S, W. Gish, W. Miller, E. Myers, W. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 5:403–410

Amicucci, A., A. Zambonelli, C.Guidi y V. Stocchi. 2001. Morphological and molecular characterization of *Pulvinula constellatio* ectomycorrhizae. FEMS. Microbiology Letters 194: 121-125.

Arcia, A. 2002. Control biológico de patógenos en plantas. En 1ras Jornadas de Actualización de Manejo Integrado de Artrópodos y Enfermedades Plagas. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

Arisan-Atac, I., E. Heidenreich, y C. Kubicek. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. FEMS Microbiol Lett 126: 249-255.

Baker, R. 1988. Improved *Trichoderma* spp. for Promoting Crops Productivity. Trends in Biotechnology 7:34-38.

Baschien, C. 2003. Development and evaluation of rRNA targeted *in situ* probes and phylogenetic relationships of freshwater fungi.Universidad de Berlin. Diplom- Biologín.

Benítez, T., A. Rincón, M. Limón y A. codón. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7:249-260.

Barnett, C. y B. Hunter.1998. Illustred genera of imperfect fungi. 4 edición. Minneapolis. Editorial Burguess Publishing.120 págs.

Bengtson, G., K. Boddeker, W. Hanssen, y H. Urbash. 1992. Recovery of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by pervaporation. Biotechnology Techniques, 1:23-26.

Benhamou, N., e I. Chet. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultraestructure and Gold Cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathol. 83(10):1062-1071.

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. Canadian Journal of Botany. Vol. 62, No. 5, pp. 924-931, ISSN 1480-3305.

Bissett, J. 1991[a]. A revision of the genus *Trichoderma* II. Intrageneric classification. Can. J. Bot. 69:2357 – 2372.

Bissett, J. 1991[b]. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasium. Can. J. Bot. 69:2373 – 2414.

Bissett, J. 1991[c]. A revision of the genus *Trichoderma* IV. Aditional notes on section Longibrachiatum. Can. J. Bot. 69:2418 – 2420.

Cabrera, F, R.Tuxbatova, D. Abuzyarova, A. Halilulina, L. Karimova, E. Rafailova, A. Shishkin y F. Alimova. 2000. Características de las cepas fúngicas del género *Trichoderma* aisladas en la región del Volga de la Federación Rusa.

Cabrera, S. 1998. Informe Técnico: cultivo maíz, ciclo 1998. Asociación de Productores Rurales del estado Portuguesa. ASOPORTUGUESA. 20 pp.

Calle, J. 2005. Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Tesis para el grado de Maestro en Ciencia en Agronomía. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico.

Cardona, R., H. Rodríguez, y H. Nass. 1999. Manchas bandeadas en maíz causadas por *Rhizoctonia* solani en el estado Portuguesa, Venezuela. Fitopatol. V.12 (2): 32-33.

Cardoza, R., M. Hermosa, J. Vizcaíno, L. Sans, E. Monte y S. Gutiérrez. 2005. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En Microorganism for industrial enzymes and biocontrol. Reseachs Signpost, Kerala, India. Pp.1-22.

Cardoza, R., J. Vizcaíno, M. Hermosa, E. Monte y S. Gutiérrez. 2006. Transformation of four *Trichoderma* strains mediated by *Agrobacterium* or based in the isolation of protoplast. A comparison of the phenotypic and genetic stability of the transformants isolated by these procedures. J Microbiol 44: 383-395.

Carling, D., R. Baird, R. Gitaitis, K. Brainard, y S. Kuninaga. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 92:893-899.

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.

Cha, J. 2005. Manejo de Plagas y Enfermedades. Manual del cultivador de Hongos 1. Parte II: Hongos Ostras. MushWorld.

Chang, S. y P. Miles. 2004. Mushroom: Cultivation, nutritiona value, medicinal effect, and environmental impact. CRC. Press. Florida. USA.

Chaverri, P., G. Samuels y E. Stewart. 2001. *Hypocrea virens* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. Mycologia 93: 1113-24.

Chaverri, P., L. Castlebury, G. Samuels, y D. Geiser. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 27, No. 2, pp. 302-313, ISSN 1055-7903.

Chen, Z., H. Silva y D. Klessig, 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science, Vol. 262, 1883-1886.

Chet, I, e I. Hadar. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships (Wicklow DT & Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.

Daoubi, M., C. Pinedo-Rivilla, M. Rubio, M. Hermosa, E. Monte, J. Aleu y I. Collado. 2009. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma spp*. Tetrahedron 65: 4834-4840.

DeBach, P. 1977. Luchabiológica contra los enemigosde las plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 399 p.

DeBach, P. y D. Rosen.1991. Biological control by natural enemies. 2nd edn.Cambridge: Cambridge University Press.

Degenkolb, T., R. Dieckmann, K. Nielsen, T. Gräfenhan, Ch. Theis., D. Zafari, P. Chaverri, , A. Ismaiel, H. Brückner, H. Von Döhren, U. Thrane, O. Petrini, y G. Samuels. 2008. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. Mycol Progress 7:177-219.

De León, C. 2004. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. CIMMYT. México. 118 p.

Dellaporta, S., J. Wood y B. Hick. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology. Rep. 1:19-21.

Dennis, L, y J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction. Trans Br Mycol Soc. 57:363-369.

Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.

Dodd, S., E. Lieckfeldt y G. Samuels. 2003. *Hypocrea atroviridis* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. Mycologia 95: 27-40.

Dos Reis, A., C. Menezes, S. Do Nascimento, C.Ulhoa, y L. Lopes. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. Biotechnology Letters 29: 1189-1193.

Druzhinina, I., A. Kopchinskiya, M. Komońa, J. Bissettb, G. Szakacsc y C. Kubicek. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and Hypocrea.Fungal Genetics and Biology. 42: 10, 813-828

Druzhinina, I. y C. Kubicek. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and Hypocrea: from aggregate species to species clusters. Journal of Zhejiang University. Science. Vol. 6B, No. 2, (October 2004), pp. 100-112, ISSN 1009-3095.

Druzhinina, I, A. Kopchinski y C. Kubicek. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience 47:55-64.

Durman, S., A. Menéndez y A. Godeas.2003. 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.

Durrant, W. y J. Dong. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review, No.42, 185-209.

Echagüe, M., M. Kiehr, R. Zuain y R. Delhey. 2008. Podredumbre de raíces de maíz, causada por *Rhizoctonia solani* en el oeste de la provincia de Buenos Aires. 1° Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de resúmenes, pág. 122.

Ehler, L. 1990. Introduction Strategies in Biological Control of Insects.Critical Issues in Biological Control. Mackauer. Eds. Intercept. Andover, Hants. Pp 111-134.

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.

Elósegui, O. 2006. Métodos Artesanales de Producción de Bioplaguicidas a partir de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas. Cuidad de la Habana, Cuba.

Esparza, L. 2009. Efectividad in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en aislados de *Phythopthora parasítica* D. obtenidos de plantas de Jamaica. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias. México.

Esposito, E. y M. Da Silva. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma* . Crit. Rev. Microbiol. 24, 89–98.

Ezziyyani, M, M. Requena, C. Pérez Sánchez, C. Egea Gilabert y M. Candela. 2003. Mecanismos de biocontrol de la «tristeza» del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal.

Ezziyyani, M., S. Pérez, M. Requena, L. Rubio y M. Candela. 2004. Biocontrol por *streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum anuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.

FAO. 2010. Perspectivas de cosechas y situación alimentaría. Nº 1. Febrero 2010. Breve información sobre la situación mundial de la oferta y la demanda de cereales. Disponible en: http://www.fao.org/ docrep/011/ai480s/ai480s03.htm

Fernández, F. 2004. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas.

Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 62:96-100. Costa Rica, 2001.

Fontana, H. y C. González. 2000. Enfermedades del maíz en Venezuela. Capítulo 6: Protección y sanidad vegetal, del libro: Maíz en Venezuela. Compilaciones del trabajo realizado por Gino Malaguti (Ingº Agrº, Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

Franco, A. 2005. Estudio fisiológico y molecular de especies Ocratoxigénicas.Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

Galdames, R.; O. Martínez y Herrera E. 2001. Relaciones genéticas entre especies de *Trichoderma* basadas en dos herramientas moleculares y patrones de

compatibilidad micelial. INIA, CRI - Carillanca Casilla 58-D, Temuco – Chile.

Gallou, A., S. Cranenbrouck, S. Declerck. 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato measurement of *Trichoderma* spp. growth at different temperatures. Thermochimical Acta 509: 40–45.

Gams, W. y J. Bissett. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma* in: *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 1 pp. 3-31Gams Bissett (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics (Kubicek CP & Harman GE, eds.). Taylor & Francis, London: 3 –34.

Gardes, M. y T. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2: 113-118.

Goldman, G.H., C. Hayes y G.E. Harman. 1994. Molecular andcellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. TrendsBiotechnol. 12, 478-482.

Goldman, G., C. Pellizzon, J. Malnerney y M. Golman. 1998. *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En *Trichoderma* and *Gliocladium* (vol.1). Kubicek C. P. y Harman G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 209-224.

Gomes, E., M. Kasuya, E. De Barros, A. Borges y M. Araújo. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. Genetics and Molecular Biology, 25, 4, 477-483.

González, C., A. Salgado, M. Puertas, E. Suárez, y R. Blaya. 1999. Actividad antagónica de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani* Sor. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16: 167-173

Gonzales, M. L. Castellanos, M. Ramos, G. Pérez. 2005. Efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del Frijol. Fitosanidad. 9(1):37-41.

González, I., D. Infante, B. Peteira, B. Martínez, Y. Arias, N. González, I. Miranda. 2011. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. ii. Expresión de actividad glucanasa. Rev. Protección Veg. v.26 n.1 La Habana.

Grondona, I., R. Hermosa, M. Tejada, M. Gomis, D., P. Mateos, P. Bridge, E. Monte, y I. García-Acha. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Appl Environ Microbiol 63: 3189-3198.

Guédez, C., C. Castillo, L. Cañizales y R. Olivar. 2009. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. ACADEMIA Vol. VII. (13) 50 – 74. Trujillo – Venezuela.

Guevara, G, F. Garza y E.Cázares. 2004. Estudio del ITS nuclear en algunas espécies del género *Cantharellus* de México. Ciencia UANL. Vol VII, No. 003.

Guigón-López, C. Guerrero-Prieto, V. Vargas-Albores, F. Carvajal-Millan, E. Ávila-Quezada, G.D. Bravo-Luna, L. Ruocco, M. Lanzuise, S. Woo, S. y M. Lorito. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28:87-96.

Hammerschmidt, R. y R. Smith. 2000. A survey of plant defense responses to pathogens. In: Induced plant defenses against pathogens. 55-71 p.

Harman, G. 2003. *Trichoderma harzianum, T. viridis, T. koningii, T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). Disponible en: http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7.

Harman, G., C. Howell, A. Viterbo, I. Chet, y M. Lorito. 2004. *Trichoderma species* opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2: 43-56.

Harman, G. (2006). "Descripción de mecanismos y aplicaciones de *Trichoderma* spp." Phytopathology 96: 190–194.

Hermosa, M., I. Grondona, E. Iturriaga, J. Díaz-Mínguez, C. Castro, E. Monte e I. García-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl Environ Microbiol 66: 1890-1898.

Hermosa, M, I. Grondona, J. Díaz-Mínguez, E. Iturriaga, y E. Monte. 2001. Development of a strain specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Curr Genet 38: 343-350.

Hernández, M., P. Sierra, A. Carr. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonista de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de Piña. (*Ananas comosis* L. Merr). En memorias del Taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana.

Herrera, P. 2007. Aislamiento de *Tulasnella* spp. (Basidiomycota) a partir de raícesde cuatro especies de orquídeas epifitas.Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.

Hibbett, D. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi.Mycological Research. 111: 509-547.

Howell, C. y R. Stipanovic. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* induced cotton seedling diseases by *Gliocladium virens*: Antibiosis. Phytopathology 85:469–472.

Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(1): 4-10.

Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet y S. Orduz. 2008. 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., S. Orduz y J. Bissett. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. Biological Control. Vol. 51, No. 3, (July 2009), pp. 409–416, ISSN 1049-9644.

Hoyos-Carvajal, L. y J. Bissett. 2010. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. The Dynamical Processes of Biodiversity – Case Studies of Evolution and Spatial Distribution. Fungal Genetics and Biology. Vol. 46. No. 9, (April 2009), pp. 615–631, ISSN 1087-1845.

Infante D., B. Martínez, N. González y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. V.24 n.1 La Habana – Cuba.

Iturralde, J. 2005. Identificación genética de hongos. Sociedad Micológica de Madrid. España.

Jarvis, W.1998. Control de enfermedades en cultivos de invernadero. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 334 pp.

Jiménez, M., M. Arcia, A. Hernández, C. Ramis y N. Méndez. 2008. Caracterizacion molecular de 12 aislamientos de *Trichoderma* sp. mediante digestión de amplificación específica de la transcrita región espaciadora interna del adn ribosomal (rADN-ITS). Presentado en el III Congreso Venezolano de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola.

Jiménez-Díaz, I., O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, G. Crovetto, J. Vilchez, A. Navalon, C. Verge y J. de Ferrer. 2010. New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils. Chemosphere 80: 248-255.

Katayama, A. y F.Matsumura. 1993. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. Environ. Toxicol.Chem.12, 1059–1065.

Keszler, A., E. Forgacs, L. Kotai, J. Vizcaíno, E. Monte y I. García-Acha. 2000. Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. J Chromatogr Sci 38: 421-424.

Komon-Zelazowska, M., J. Bissett, D. Zafari, L. Hatvani, L. Manczinger, S. Woo, M. Lorito, L. Kredics, C. Kubicek, y I. Druzhinina. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. Appl Environ Microbiol 73: 7415-7426.

Kopchinskiy. A., M. Komon, C. Kubicek e I. Druzhinina. 2005. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and Hypocrea identifications. Mycol Res.109:658–660.

Kraus, G., I. Druzhinina, W. Gams,; J. Bissett, D. Zafary, G.Szakacs, A. Koptchinski, H. Prillinger, y R. Zare. 2004. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. Mycologia 96: 1059-1073.

Kubicek, C., J. Bissett, I. Druzhinina, C. Kullnig-Gradinger, y G. Szakacs. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. Fungal Genet Biol 38: 310-319.

Kuhls, K., E. Lieckfeldt, T. Bomk. 1999. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. Medical Mycology. 37:25-33.

Kullnig-Gradinger, C., R. Mach, M. Lorito y C. Kubicek. 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. Appl Environ Microbiol 66: 2232-2234.

Latiegue, A.1990. *Trichoderma harzianum*. Rifai. como antagonista de *Sclerotium rolfsii* Sacc., agente causal de pudrición basal de la caraota (*Phaseolus vulgaris*L.). UCLA. Barquisimeto. 61 p.

Lieckfeldt, E., G. Samuels, H. Nirenberg y O. Petrini. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? Appl Environ Microbiol 65: 2418-2428.

Lieckfeldt, E. y K. Seifert. 2000. An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the Hypocreales. Studies in Mycology. Vol. 45, No. 1, pp. 35-44, ISSN 0166-0616.

López, Y., J. Pineda, A. Hernández y D. Ulacio. 2010. Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, y desarrollo radical y crecimiento de plantas de maíz. Bioagro 22(1):87-42

Lorito, M., S. Woo, I. Garcia, G. Colucci, G. Harman, J. Pintor-toro,E. Filippone, S. Mucciflora, C. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun y F. Scala. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 95: 7860-7865.

Lynch, J., K. Wilson, M. Ousley y J. Whipps. 1991. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. Letters in Applied Microbiology 12, 56–61.

Martínez, B, Y. Reyes, D. Infante, E. González, H. Baños y A. Cruz. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Rev Protección Veg.; 23(2):118-125.

Martínez, D., R. Berka, B. Henrissat, M. Saloheimo, M. Arvas, S. Baker, J. Chapman, O. Chertkov, P. Coutinho, D. Cullen, E. Danchin, I. Grigoriev, P. Harris, M. Jackcon, C. Kubicek, C. Han, I. Ho, L. Larrondo, A. de Leon, J. Magnuson, S. Merino, M. Misre, N B. Nelson, N. Putnam, Robbertse, , A. Salamov, M. Schmoll, A. Terry, A. Thayer, C. Westerholm-Parvine, Y. Schoch, R. Yao, M. Barabote, M. Nelson, C. Detter, B Druce, C. Kuske, G. Xie, P. Richardson, , D. Rokhsar, S. Lucas, E. Rubin y N. Dunn-Coleman. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nat Biotechnol 26: 553-560.

Martínez. T. 1998. Uso de *Trichoderma* para el Control Biológico de Organismos Patógenos de Plantas. En Memorias del Simposium sobre Agricultura Orgánica y de baja residualidad; Cuauhtémoc, Chih. México.

Minuta-Grimm, L. y C. Rowe. 1986. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. Phytopathology 76(3):306-

Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma:* between biotechnology and microbial ecology. Int Microbiol 4: 1-4.

Montealegre, J., C. Santander, R. Herrera, X. Besoaín y L. Pérez. 2002. Utilización de microorganismos bioantagonistas para el control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate. Fitopatología. 37(1):89-90.

Montero-Barrientos, M., R. Hermosa, R. Cardoza, S. Gutiérrez, C. Nicolás y E. Monte. 2010. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. J Plant Physiol 167: 659-665.

Mora, F. 1996. Combate biológico de *Rhizoctonia solani* mediante el empleo de *Rhizobium legumibosarum* biovar *phaseoli* en el campo. Agronomía Mesoamérica 7(2): 23-30.

Muiño, B., L. Pérez, A. Pollanco, I. Ponciano, M. Lorenzo, E. Martín, M. González, R. Arébalo, M. Rodríguez e Y. Santana. 2007. El monitoreo y manejo de la resistencia a los fungicidas en Cuba. Fitosanidad 11 (3):91-100. La Habana.

Mukherjee, P., A. Verma y J. Latha. 2002. PCR fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collection-a need for re-identification of these economically importance fungi. Science Correspondence, 83(4): 372-374.

Mukherjee, M., R. Hadar, P. Mukherjee y B. Horwitz. 2003. Homologous expression of a mutated-tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens* J. Appl Microbiol 95: 861-867.

Muthumeenakshi, S., P. Mills, A. Brown, y D. Seaby. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. Microbiology 140: 769-777.

Obregon, M. 2001. Evaluación in vitro del poder antagónico de *Trichoderma harzianum* Rifai con respecto al hongo fitopatógeno *Sclerorium cepivorum*Berkeley causante de la enfermedad "Torbó en cebolla". In: XLVII Reunión Anual del PCCMCA Resúmenes. San José, Costa Rica. p.19.

O'Donnell, K., H. Kistler, B. Tacke y H. Casper. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proeedings of National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 97, No. 14, (January 2000), pp. 7905–7910, ISSN 1091-6490.

Ogoshi, A., R.J. Cook and E.N. Bassett, 1990. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing rootrot of wheat and barley in the Pacific Northwest. Phytopathology, 80: 784-788.

Ospina, M., D. Royse, X. Chen y P. Romaine. 1999. Molecular Phylogenetic analysis of biologic control strains of *T. harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. Associated with mushroom green mold. Phytopathol., 89(4): 313-317.

Páez, O. (2006). Uso agrícola de *Trichoderma*. Disponible en: http://www.soilfertility. com/Trichoderma /espagnol/index.shtml

Peintnen, U., J. Moncalvo y R.Vilgalys. 2004. Toward a better understanding of the infrageneric relationships in *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycota). Mycologia ,96(5):1042-1058.

Peltola, J., Ritieni A., Mikkola R., Grigoriev P., Po´csfalvi G., Andersson M. y Salkinoja-Salonen1M. (2004). Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. Applied and Environmental Microbiology p. 4996–5004 Vol. 70, No. 8.

Perdomo R., A. Hernández, A. González, J. Pineda, J. Aljezones. 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kan, causante de la mancha bandeada en maíz. Intercadencia 006, 32:37. 40.

Pérez Consuegra, N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Cuba 296 p.

Pineda, J.; A. Hernández, A. González, V. Barrientos, H. Ness y E. Gil. 2008. Técnica de inoculación rápida y eficiente para la evaluación de materiales de maíz (*Zea mayas* L.) ante *Rhizoctonia solani* Kan. Bioagro 17:2.

Pinzón L., R. Salgado y G. Martínez. 1999. Antagonismo entre diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxisporum*.F.SP. Dianche (PRIL. & DELL). Sandy. & Han. Fitopatol Colombo. 1999; 23:7-11

Quintero, E. y L. Urdaneta. 1997. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control del hongo*Macrophoma* sep., agente causal de la pudrición apical del fruto del Guayabo (*Psidium guajava* L.). Rev. Facultad de Agronomía. Vol. 14. Pag. 233-244.

Rangel, A., K. Salgado, E. Sauceda y L. Márraga. 2010. Control Biològico: Una forma efectiva y ecológica para el combate de plagas.

Ramírez, A. 2010. Recursos Genéticos de "Hongos del Maguey" (*Pleurotus* sp.) de la región central de México: Caracterización y selección de genotipos con potencial para la producción rural. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias del Colegio de Postgrado del Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.

Rentaría, M. 2007. Herramientas Moleculares. Breve revisión de los marcadoresmoleculares. Cap. 18. Pag. (541-566).

Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Res Mycol.; 116:1-56

Rivas, M. y Pavone D. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad

biocontroladora sobre Crinipellis pernicosa (STAHEL) SINGER. Interciencia, vol. 35, núm. 10, pp. 777-783. Asociación Interciencia Caracas, Venezuela.

Rivera, G. 2006. Bacterias presentes en el sistema vascular de algunos cítricos en Puerto Rico. Tesis doctoral. Recinto Universitario de Mayaguez. Universidad de Puerto Rico.

Rivero D. 2008. Identificación y control in vitro con quitinasa y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (Oryza sativa L.). Rev Protección Vegetal. 23 (1): 67.

Rodríguez, V. 2000. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofíticos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (Damping off) en plantas de tomate.

Rodríguez, S., I. Dorantes, J. Velasco y R. Cerrato. 2004. Impacto de la fumigación con bromuro de metilo en tipos morfológicos de amebas desnudas de un suelo agrícola TERRA Latinoamericana, Vol. 22, Núm. 2, pp. 197-205. Universidad Autónoma Chapingo. México

Rubio, M., M. Hermosa, E. Keck y E. Monte. 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. Microb Ecol 49: 25-33.

Salazar L. 2006.Caracterización isoenzimática de aislamientos de *Trichoderma* spp., procedentes de los estados Aragua y Guárico, y su efectividad para el control de la marchitez del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) causada por *Fusarium oxysporum* f. sep. *lycopersici* bajo condiciones in vitro e in vivo. Trabajo de Tesis de Grado para optar al título de Msc. en Agronomía. UCV-FAGRO.

Samuels, G. 1996. *Trichoderma:* a review of biology and systematic of the genus. Mycol Res. 100 (8): 923- 935.

Samuels, G., S. Dodd, W. Gams, L. Castlebury y O. Petrini. (2002).*Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially produced by *Agaricus bisporus*. Mycologia 94: 146-170.

Samuels, G., S. Dodd, B. Lu, O. Petrini, H. Schroers, I. Druzhinina. 2006. The *Trichoderma* koningii aggregate species.Studies in Mycology 56: 67–133.

Seaby, D. 1989. Further observations on *Trichoderma*. The Mushroom Journal. 197: 147-151.

Segovia, V. y Y. Alfaro. 2009. El maíz: un rubro estratégico para la soberanía agroalimentaria de los venezolanos. Agronomía Trop. 59(3): 237-247.

Shaban, G. y H. El-Komy. 2001. Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. In Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. Mycopathologia 151: 139-146.

Shafiquzzaman, S. 2007. Phylogenetic Relationships of *Trichoderma harzianum* Based onthe Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region -1 of the rDNA.Journal of Applied Sciences Research, 3(9): 896-903.

Sid Ahmed, A., C. Pérez Sánchez y M. Candela. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European Journal of Plant Pathology 106: 817-824.

Sid Ahmed, A, C. Pérez Sánchez, M. Ezziyyani y M. Candela. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* treatments on systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* and its relation with capsidiol accumulation. In: Biocontrol agents: Mode of action and interaction with other means of control. Sevilla. Publicaciones Universidad de Sevilla, pp. 265-269.

Singh, A., R. Rohilla, U, Singh, S. Savary, L. Willocquet y E. Duveiller. 2002. An improved inoculation technique for sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Can. J. Plant Pathol. 24: 65-68.

Sivasithamparam, K., y E. Ghisalberti. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma and Gliocladium*. En *Trichoderma* and *Gliocladium* (vol.1). Kubicek, C.P. y Harman, G. E. (eds.). Taylor and Francis, Londres. pp.139-191.

Smith, W.1995. Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochlorine (Xenobiotic) degradation. Ecotoxicol Environ Saf 32: 179-183.

Sneh, B., S.Jabaji-hare, S.Neate y G. Dijst. 1996. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Papers from the Second International Symposium of *Rhizoctonia* Heldin Noorwijkerhout, Netherlands. June 27-30.

Solé, M. 2002. Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden *Onygenales*.Tesis doctoral. Unidad de Microbiología. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Rovira y Virgili.

Stasz, T., K. Nixon, G. Harman, N. Weeden, y G. Kuter. 1989. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozymes polymorphism. Mycologia 81: 391-403.

Stefanova, M., A. Leiva, L. Larriganaga y M. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía.16:509-516.

Szekeres, A., B. Leitgeb, L. Kredics, Z. Antal, L. Hatvani, L. Manczinger y C. Vagvolgyi. 2005. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. Acta Microbiol Immunol Hung 52: 137-168.

Taylor, J., D. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, , D. Geiser, D. Hibbett y M. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet. Biol. 31, 21–32.

Tedersoo, L., T. Suvi, E. Larsson y U. Koljalg. 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. Mycological Research. 110: 734- 748.

Tijerino, A. 2010. Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen Tbtri5 de *Trichoderma brevicompactum*. Memoria presentada para optar al grado de Doctor en la Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Genética. Pp. 193

Tovar, J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista "*in vivo*" de aislamientos de *Trichoderma* spp. Frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Tesis de Maestría de la Pontificia Universidad Saveriana. Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogota D.C.

Tronsmo, A. y G. Harman.1998. Coproduction of chitinolytic enzymes and biomass for biological control by *Trichoderma harzianum* on median containing chitin. Biological Control, 2, 272-277.

Trujillo, J. 1991. Metodologíadel control biológico. Memorias del II Curso de ControlBiológico, SMCB-UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah, México. pp. 43-46.

Tu, C. y J. KIMBROUGH. 1975. Morphology, develpment and cytochemistry ofthe hyphae and sclerotia of species in the *Rhizoctonia* complex. Can. J. Botany, 53: 2282-2296.

Uribe, D. y G. Khacha. 2007. Analysis and applications of the molecular typification of the mitochondrial genome of *Beauveria bassiana*. Revista Colombiana de Entomología .33:38-45

Veitia, M., V. García, D. Izquierdo, A. Porra, W. Wong. 2000. Control de *Rhizoctonia* en Albahaca blanca (*Ocimun bacilicum* L.) con *Trichoderma harzianum* cepa- 34. Fitosanidad, 4(1-2):67-70.

Venkateswarlu, R., K. Reddi, E. Reddy y P. Sudhakar. 2008. Molecular characterization of *Trichoderma* spp. Used against *Fusarium* wilt with PCR based RAPD and ITS-PCR. J. Mycol. Plant Pathol., 38(3): 569-563.

Verma, M. K. Satinder, R. Tyagi, R. Surampalli y J. Valero. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Bioch. Eng. J. 37:1–20.

Villagra, L. (2007). Evaluación de *Trichoderma* spp. y azoxystrobin (amistar 50 wp) en el controlde *Sclerotinia* spp., en lechuga (*Lactuca sativa*) bajo condiciones deinvernadero.

Villalobos, A., M. Escobar, G. Guzmán y L. Guzmán-Dávalos. 2005. Extracción de ADN y amplificación de secuencias de ITS en *Psilocybe* (Agaricales, Fungi). Avances en la Investigación Científica en la CUCBA.

Villegas, M. 2005.*Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius Biotecnología. Colombia. Disponible en: http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php.

Vinale. F., K. Sivasithamparam, E. Ghisalberti, R. Marra, S. Woo y M. Lorito. 2008. *Trichoderma* -plantpathogen interactions in soil agro-ecosystems. Soil Biol Biochem 40: 1-10.

Viterbo, A., M. Montero, O. Ramot, D. Friesem, E. Monte, A. Llobell, e I. Chet. 2002. Expression regulation of theendochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). Current Genetics 42: 114–122.

Vyas, S. y L. Vyas. Integrated control of dry root of soybean. In: Modern fungicides and antifungal compounds. Intercept, Andover, pp 564-572.

Yedidia, I., N. Benhamou e I. Chet. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65: 1061-1070.

Zamir, D. e I. Chet. 1985. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. Can J. Bot 31: 578-580.

Zeilinger, S. y M. Omann. 2007. *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. Gene Reg Syst Biol.; 1:227-234.

Zervakis, G., J. Moncalvo y R. Vilgalys. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciationof the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. Microbiology 150 (3): 715-726.

ANEXOS

Anexo 1. Buffer de extracción CTAB (2x)

Reactivo	Concentración solución madre	Concentración final
Tris – HCL(pH: 8)	1000 mM	100mM
NaCL	5000 mM	2100mM
EDTA (pH:8)	500 mM	150mM
PVP	-	2%
CTAB	-	2%
β-Mercaptoethanol	-	140mM

Se agregó agua hasta 500 ml y se autoclavò. Se adicionaron 30 µl de 2-β mercaptoetanol y se agitó suavemente e incubó por 30 minutos a 65 ºC.

Anexo 2. Buffer TE pH: 7

Reactivo	Concentración solución madre	Concentración final
Tris – HCL(pH:8)	1000 mM	10 mM
EDTA pH:8	500 mM	1 mM

Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa.

1. Se preparó el gel de agarosa 0.8% en buffer T.A.E pH.8.
2. Se cargó con 2.5 µl de Marcador Molecular (DNA ladder 100pb) y 2 µl de 5x Green.
3. Se cargó 10µl de cada muestra en las celdas, evitando derramar la muestra en el buffer de corrida (TAE pH: 8), para evitar mezclas de éstas.
4. Se separación de las moléculas se obtuvo con 80V durante 30min.
5. Se colocó el gel en una bandeja con solución de tinción (bromuro de ethidio1µg/ml), durante 10 minutos en agitación.
6. Se retiró la solución de tinción, y se colocó en agua destilada durante 10min.
7. Se visualizaron las bandas en transluminador de luz UV y se calculó la concentración de ADN para su posterior análisis.

Anexo 4. Buffer TAE. pH: 8

Reactivo	**Concentración solución madre**	**Concentración final**
Tris base (pH:7)	2000 mM	400mM
Acetato de sodio	500 mM	50 mM
EDTA (pH:8)	500 mM	7.7 mM

Anexo 5. Alineamiento múltiple de las secuencias

Resultados de identificación molecular de muestras de *Trichoderma* a través de TrichOkey.

Se incluyó una secuencia del GenBank (*T. asperellum,* AN EU021220) como referencia.

Muestra A1: *Trichoderma koningiopsis* (based on 20 vouchered sequences which showed 1 ITS 1 and 2 allels). Identification reliability: high

SEQ A1 *Trichoderma koningiopsis*

ORIGIN

```
1       CATTACTTAT CGCATTTCGC TGCGTTCTTC ATCGATGCCA GAACCAAGAG ATCCGTTGTT
61      GAAAGTTTTG ATTCATTTTG AATTTTTGCT CAGAGCTGTA AAGAAATACG TCCGCGAGGG
121     GACTACAGAA AGAGTTTGGT TGGTTCCTCC GGCGGGCGCC TGGTTCCGGG GCTGCGACGC
181     ACCCGGGGCG TGACCCCGCC GAGGCAACAG TTTGGCAACG TTCACATTGG GTTTGGGAGT
241     TGTAAACTCG GTAATAACCC TCCGTAGGTA ACCTGCGGAG GGATCATTAC CGAGTTTACA
301     ACTCCCAAAC CCAATGTGAA CGTTACCAAA CTGTTGCCTC GGCGGGGTCA CGCCCCGGGT
361     GCGTCGCAGC CCCGGAACCA GGCGCCCGCC GGAGGAACCA ACCAAACTCT TTCTGTAGTC
421     CCCTCGCGGA CGTATTTCTT TACAGCTCTG AGCAAAAATT CAAAATGAAT CAAAACTTTC
481     AACAACGGAT CTCTTGGTTC TGGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG
541     TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACATTGCGCC CGCCAGTATT
601     CTGGCGGGCA TGCCTGTCCG AGCGTCATTT CAACCCTCGA ACCCCTCCGG GGGATCGGCG
661     TTGGGGATCG GGACCCCTCA CACGGGTGCC GGCCCCTAAA TACAGTGGCG GTCTCGCCGC
721     ATCCTCTCCT GCGCAGTAGT TTGCACAACT CGCACTGCTC TCGACGCGTC CACGTCCGTA
781     AAAC
```

Muestra M11: *Trichoderma koningiopsis* (based on 20 vouchered sequences which showed 1 ITS 1 and 2 allels). Identification reliability: high

SEQ M11 *Trichoderma koningiopsis*

ORIGIN

```
1       CTCTCGGTAA TAACCGTCCG TAGGTGAACC TGCGGAGGGA TCATTACCGA GTTTACAACT
61      CCCAAACCCA ATGTGAACGT TACCAAACTG TTGCCTCGGC GGGGTCACGC CCCGGGTGCG
121     TCGCAGCCCC GGAACCAGGC GCCCGCCGGA GGAACCAACC AAACTCTTTC TGTAGTCCCC
181     TCGCGGACGT ATTTCTTTAC AGCTCTGAGC AAAAATTCAA AATGAATCAA AACTTTCAAC
241     AACGGATCTC TTGGTTCTGG CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAATGTGA
301     ATTGCAGAAT TCAGTGAATC ATCGAATCTT TGAACGCACA TTGCGCCCGC CAGTATTCTG
361     GCGGGCATGC CTGTCCGAGC GTCATTTCAA CCCTCGAACC CCTCCGGGGG ATCGGCGTTG
421     GGGATCGGGA CCCCTCACAC GGGTGCCGGC CCCTAAATAC AGTGGCGGTC TCGCCGCAGC
481     CTCTCCTGCG CAGTAGTTTG CACAACTCGC ACCGGGAGCG CGGCGCGTCC ACGTCCGTAA
```

```
541     AACACCCAAC TTTCTGAA
```

Muestra M12: *Trichoderma koningiopsis* (based on 20 vouchered sequences which showed 1 ITS 1 and 2 allels). Identification reliability: high

SEQ M12 *Trichoderma koningiopsis*

ORIGIN

```
1       TCCGGGGCTG CGACGCACCC GGGGCGTGAC CCCGCCGAGG CAACAGTTTG GTAACGTTCA
61      CATTGGGTGT TGGGAGTTGT AAACTCGGTA AAGATCCTTC CGTAGGGTGA ACCTGCGGAG
121     GGATCATTAC CGAGTTTACA ACTCCCAAAC CCAATGTGAA CGTTTCCAAA CTGTTGCCTT
181     GGCGGGGTCA CGCCCCGGGT GGGTCGCAAC CCCGGAACCC AGGGCGCCCG CCGGGAGGAA
241     CCCACCAAAA CTCTTTTCTG TAGTCCCCCT CGCGGGACGT ATTTTCTTTT ACAGCTCTGA
301     GCAAAAATTT CAAAATGAAT CAAAACTTTC AACAACGGAT CTCTTGGTTC TGGCATCGAT
361     GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT
421     CTTTGAACGC ACATTGCGCC CGCCAGTATT CTGGCGGGCA TGCCTGTCCG AGCGTCATTT
481     CAACCCTCGA ACCCCTCTGG AAGATCGGCG TTGGGGATCG GGACCCCTCA CACGGGTGCC
541     GGCCCCTAAA TACAGTGGCG GTCTCCCCCC AGCCTCTCCT GCGCAGTAGT TTGCACAACT
601     CGCACCGGGA TTCCACGCGT CCACGTCCGT AAAAC
```

Muestra 05211: *Trichoderma konongiopsis* (based on 20 vouchered sequences which showed 1 ITS 1 and 2 allels). Identification reliability: high

SEQ 05211 *Trichoderma koningiopsis*

ORIGIN

```
1       CCAAGAGATC CGTTGTTGAA AGTTTTGATT CATTTTGAAT TTTTGCTCAG AGCTGTAAGA
61      AATACGTCCG CGAGGGGACT ACAGAAAGAG TTTGGTTGCT TCCTCCGGCG GGCGCCTGGT
121     TCCGGGGCTG CGACGCACCC GGGGCGTGAC CCCGCCGAGG CAACAGTTTG GTAACGTTCA
181     CATTGGGTTT GGGAGTTGTA CACTCGGTAA TGACTTCCGT AGGTGAACCT GCGGAGGGAT
241     CATTACCGAG TTTACAACTC CCAAACCCAA TGTGAACGTT ACCAAACTGT TGCCTCGGCG
301     GGGTCACGCC CCGGGTGCGT CGCAGCCCCG GAACCAGGCG CCCGCCGGAG GAACCAACCA
361     AACTCTTTCT GTAGTCCCCT CGCGGACGTA TTTCTTACAG CTCTGAGCAA AAATTCAAAA
421     TGAATCAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCTGGCA TCGATGAAGA ACGCAGCGAA
481     ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAATTC AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACATT
541     GCGCCCGCCA GTATTCTGGC GGGCATGCCT GTCCGAGCGT CATTTCAACC CTCGAACCCC
601     TCCGGGGGAT CGGCGTTGGG GATCGGGACC CCTCACACGG GTGCCGGCCC CGAAATACAG
661     TGGCGGTCTC GCCGCAGCCT CTCCTGCGCA GTAGTTTGCA CAACTCGCAC CGGGCGCCAA
721     CGCGTCCACG TCCGTAAAAC ACCCAACTTT CTGAAATGTT GACCTCGGAT CAGGT
```

Muestra 04017: *Trichoderma ghanense* (based on 14 vouchered sequences which showed 1 ITS 1 and 2 allels). Identification reliability: high

SEQ 04017 *Trichoderma ghanense*

ORIGIN

```
1       AACAGAGCCG CGACGGAAGC CGCGACGGAG AGAAAAAAGA GTTTGGTTGG TCCTCCGGCG
61      GGCGCCATGG GATCCGGGGC TGCGACGCGC CCGGGGCAGA GATCCCGCCG AGGCAACAGA
121     TTGGTAACGT TCACATTGGG GTTTGGGAGT TGTAAACTCG GTAATGCTTC CGTAGGGGGT
181     ACCTGCGGAG GGATCATTAC CGAGTTTACA ACTCCCAAAC CCCAATGTGA ACGTTACCAA
241     TCTGTTGCCT CGGCGGGATC TCTGCCCCGG GCGCGTCGCA GCCCCGGATC CCATGGCGCC
301     CGCCGGAGGA CCAACCAAAC TCTTTTTTCT CTCCGTCGCG GCTTCCGTCG CGGCTCTGTT
361     TTAACTTTGC TCTGAGCCTT TCTCGGCGAC CCTAGCGGGC GTCTCGAAAA TGAATCAAAA
421     CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCTGGCA TCGATGAAGA ACGCAGCGAA ATGCGATAAG
481     TAATGTGAAT TGCAGAATTC AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCGCCA
541     GTATTCTGGC GGGCATGCCT GTCCGAGCGT CATTTCAACC CTCGAACCCC TCCGGGGGGT
601     CGGCGTTGGG GATCGGCACG CCCTCACACG GGTGCCGGCC CCGAAATCCA GTGGCGGTCT
661     CGCCGCAGCC TCTCCTGCGC AGTAGTTTGC ACACTCGCAC CGGGAGCTTT ACGCGGCCAC
721      AGCCGTAAAA CAC
```