

ACTIVIDADES DE BIOCONTROL DE *TRICHODERMA* FRENTE A ASCOMICETOS FITOPATÓGENOS

Trichoderma Biocontrol Activity Against Plant Pathogenic Ascomycetes

Aurora PÉREZ; Rosa HERMOSA; Enrique MONTE

Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agraria (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca. Campus de Villamayor, Río Duero 12, C.P. 37185 Salamanca, España

Correo electrónico: emv@usal.es

RESUMEN: Algunas especies de *Trichoderma* son usadas como agentes de biocontrol porque pueden reducir la severidad de enfermedades en plantas mediante la inhibición de patógenos por varios mecanismos de acción. *Fusarium oxysporum* (FO) y *Botrytis cinerea* (BC) son dos hongos relevantes económicamente, pues ocasionan importantes pérdidas en más de 200 cultivos a nivel mundial.

Para analizar el potencial antagonista de *Trichoderma* frente a estos patógenos se utilizaron 6 cepas de distintas especies, representando la diversidad genética existente en el género, y diferentes ensayos *in vitro* realizados en dos medios de cultivo (PDA y MM). Se evaluó habilidad micoparasítica y actividad antifúngica de volátiles y metabolitos secretados. La mayor capacidad micoparasítica se observó en la cepa *T. parareesei* T6 frente a FO en PDA. Los volátiles producidos en MM por las 6 cepas inhibieron un 50-60% el crecimiento de FO, sin diferencias significativas entre cepas, pero no mostraron actividad frente a BC. Los metabolitos secretados por *T. virens* T87 en PDA o MM dieron los mayores valores de inhibición del crecimiento de ambos patógenos.

Los resultados muestran que el potencial de biocontrol de *Trichoderma* spp. depende del genotipo, el patógeno al que se enfrenta y de las condiciones de cultivo.

Palabras clave: *Trichoderma*; micoparasitismo; antibiosis; *Fusarium*; *Botrytis*.

ABSTRACT: Several *Trichoderma* spp. are used as biocontrol agents because they can reduce the disease severity in plants by inhibiting pathogens through different mechanism of action. *Fusarium oxysporum* (FO) y *Botrytis cinerea* (BC) are economically relevant fungi since they cause important losses in more than 200 crops worldwide.

To analyse the antagonistic potential of *Trichoderma* against these two pathogens, we used 6 strains from different species, representing the genetic diversity existing in this genus, and different in vitro assays performed in two culture media (PDA y MM). The mycoparasitic ability and antifungal activity of volatiles and metabolites secreted by *Trichoderma* were tested. *Trichoderma parareesei* T6 showed the highest mycoparasitism against FO on PDA. Volatiles produced by these six strains on MM cultures reduced the FO growth in ca. 50-60% without significant differences among strains, but they had not activity against BC. The secreted metabolites of *T. virens* T87 on PDA or MM showed the highest growth inhibition values in both pathogens.

These results indicate that the biocontrol potential of *Trichoderma* spp. depends on the genotype, the target pathogen and the culture conditions.

Key words: *Trichoderma*; micoparasitism; antibiosis; *Fusarium*; *Botrytis*.

1. INTRODUCCIÓN

Fusarium oxysporum and *Botrytis cinerea* constituyen, entre los hongos ascomicetos, dos de las especies como mayor importancia agrícola, ya que pueden atacar a más de 200 cultivos, entre ellos vid, tomate, pimiento o judía, donde causan grandes pérdidas económicas a nivel mundial.

Trichoderma es un género de hongos filamentosos que incluye especies usadas como agentes de control biológico (ACB) en agricultura. La mayoría de las cepas producen conidios y clamidosporas, y el estado sexual solo se encuentra en algunas especies dentro de *Hypocrea* (Druzhinina *et al.*, 2011). Las diferencias morfológicas no son suficientes para diferenciar especies dentro de este género que en la actualidad, con criterios moleculares, agrupa a más de 200 especies (Atanasova, 2014). Las especies de *Trichoderma* pueden utilizar diferentes mecanismos de acción para antagonizar hongos, oomicetos y ciertos nematodos patógenos de plantas (Lorito *et al.*, 2010), como son:

- Competición: La omnipresencia de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo es una prueba de su excelencia competidora por espacio y nutrientes (Hermosa *et al.*, 2004).
- Micoparasitismo: Este hongo localiza al patógeno en la distancia, se enrosca en sus hifas y es capaz de expresar secuencialmente metabolitos y enzimas degradadoras de pared celular como glucanasas, quitinasas y proteasas, capaces abrir poros en la hifa del patógeno y degradar su contenido citoplasmático (Lorito *et al.*, 2010).
- Antibiosis: Desde que se describió la actividad antibiótica de *Trichoderma* en el siglo pasado, se han identificado cientos de metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles, producidos por las especies de este género (Hermosa *et al.*, 2014), que son capaces de inhibir el crecimiento de otros organismos sin que medie contacto físico entre ellos.

En los últimos años, también se ha descrito la capacidad de algunas cepas de *Trichoderma* spp. para inducir respuestas positivas en la planta, ya que favorecen su crecimiento e inducen resistencia frente a estreses bióticos y abióticos en la misma (Shoresh *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012). En este sentido, algunos metabolitos de *Trichoderma*, además de actividad antifúngica, pueden actuar como moléculas señalizadoras en el diálogo de estos hongos con la planta (Vinale *et al.*, 2008; Malmierca *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue analizar *in vitro* el potencial antagonista de varias cepas de *Trichoderma*, que representan la variabilidad genética existente en el género, frente a dos hongos de gran importancia agrícola como son *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*. A su vez, se determinó si el medio de cultivo utilizado para realizar los ensayos afectaba a las actividades detectadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Microorganismos utilizados*

Las seis cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 1. Como patógenos se utilizaron la cepa B05.10 de *B. cinerea*, aislada de un campo de vid, y la cepa de CECT2866 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aislada originalmente de tomate.

TABLA 1. Cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en este estudio.

Código	Especie*	Colección	Origen/Fuente	Origen geográfico
T6	<i>T. parareesei</i>	IMI113131	Aire	Desconocido
T7	<i>T. hamatum</i>	IMI224801	Alimento de ganado	India
T11	<i>T. atroviride</i>	IMI352941	Suelo	Francia
T25	<i>T. asperellum</i>	IMI296237	Suelo	Colombia
T34	<i>T. harzianum</i>	CECT2413	Suelo	EE. UU.
T87	<i>T. virens</i>	TAMU29-8	C. Kenerley	EE. UU.

*Según criterios moleculares (Hermosa *et al.*, 2004), para la cepa T6 (Rubio *et al.*, 2014).

IMI: *International Mycological Institute*, Egham, Reino Unido.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot (Valencia), España.

NBT: NewBiotechnic S.A., Sevilla, España.

TAMU: Universidad de Texas A&M.

Los hongos se crecieron de forma rutinaria en placas Petri conteniendo patata dextrosa agar (PDA, Sigma-Aldrich) a 28 °C y se conservaron a 4 °C, para cortos periodos de tiempo, o a -80 °C en glicerol al 30%.

3.2. Ensayos de antagonismo en cultivo dual

Cada cepa de *Trichoderma* se enfrentó, separadamente, a *B. cinerea* y *F. oxysporum* en placas conteniendo medio PDA o medio pobre en nutrientes (MM, Penttilä *et al.*, 1987). Cilindros de agar de 0,5 cm de diámetro, procedentes de colonias de crecimiento activo de las distintas cepas de *Trichoderma* y del fitopatógeno, se colocaron en el medio de cultivo a una distancia de 5,5 cm, se incubaron a 28 °C durante 5 días. Paralelamente, placas inoculadas solo con el antagonista se incubaron bajo idénticas condiciones y se utilizaron como control. Se tomaron fotografías a las 120 horas de incubación y se valoró el comportamiento de cada cepa de *Trichoderma* frente a cada patógeno.

Para determinar la actividad antifúngica de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de las cepas de *Trichoderma*, se realizó un ensayo similar al descrito antes, pero utilizando placas Petri con tabique de separación en su parte central y así impedir que ambos hongos entraran en contacto. A las 72 horas, se midió el diámetro de colonia de los patógenos en placas problema y control (patógeno enfrentado consigo mismo).

3.3. Ensayo antifúngico sobre membrana

Discos de micelio de 0,5 cm de la cepa *Trichoderma* se inoculó en el centro de una placa Petri conteniendo medio PDA o MM sobre una membrana de celofán

o de diálisis con un tamaño de poro de 14 kDa y se incubaron a 28 °C durante 36 horas. Posteriormente se retiró la membrana y se sembró un disco de 0,5 cm de un cultivo del patógeno. Como control, el patógeno se inoculó en un medio donde no se había cultivado previamente una cepa de *Trichoderma*. Las placas se incubaron a 28 °C durante varios días y se midió el diámetro de la colonia del patógeno. Los resultados del ensayo se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno por las diferentes cepas de *Trichoderma*, en celulosa y en celofán, referidos al crecimiento en las placas control, a las que se le dio un valor del 100%.

3.4. Análisis de datos

Para cada cepa de *Trichoderma*, patógeno y medio de cultivo, se realizaron ensayos por triplicado y se incluyeron los correspondientes controles de los experimentos. Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se sometieron a un análisis de varianza tipo ANOVA y los valores medios se compararon con el test de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando el *software* «Statistica 10» (Statsoft Inc.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad antagonista de *Trichoderma* spp.

Tras 120 horas de cultivo dual en medio PDA, las cepas T6 y T25 habían sobrecrecido completa o parcialmente, respectivamente, la colonia de *F. oxysporum*, mientras que T7, T34 y T85 únicamente rodearon la colonia de este patógeno (Figura 1). Sin embargo, la cepa T6 no sobrecreció la colonia del patógeno y la cepa T11 mostró habilidades micoparasíticas frente a este patógeno cuando los ensayos se realizaron en MM.

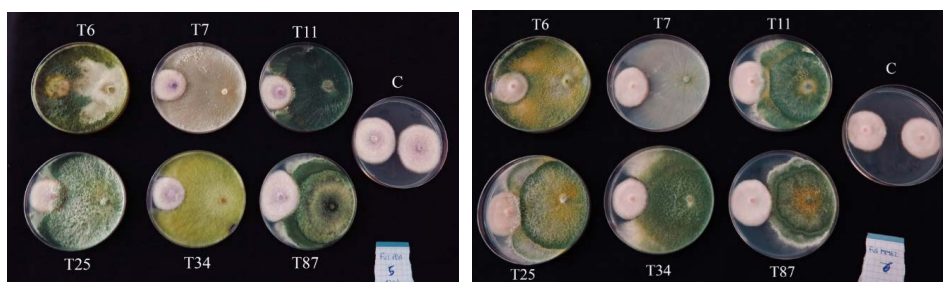


FIGURA 1. Cultivo dual de *Trichoderma* spp. y *F. oxysporum* tras 120 horas de crecimiento a 28 °C en A) medio PDA, y B) medio MM.

Ninguna de las seis cepas de *Trichoderma* ensayadas fue capaz de sobrecrecer a la cepa de *B. cinerea* usada como diana tras 120 horas de incubación en los medios PDA y MM. La cepa T6 redujo el tamaño de la colonia del patógeno, pero solo en los ensayos en PDA, e incluso fue este último el que inhibió el crecimiento de la cepa T87 de *Trichoderma*, tanto en los cultivos en PDA como en MM. Los resultados obtenidos frente a ambos patógenos y en ambos medios de cultivo, indican que la cepa *T. parareesei* T6 presenta mayor potencial antagonista frente a *F. oxysporum* y frente a *B. cinerea* que las otras cinco cepas ensayadas. Ello está de acuerdo con un trabajo reciente que muestra la capacidad de *T. parareesei* para micoparasitar a *F. oxysporum* (Pérez *et al.*, 2015). Al menos *in vitro*, T6 presenta mejor potencial de biocontrol que 5 cepas de *Trichoderma* previamente seleccionadas como ACB.

Las diferencias observadas en los medios PDA y MM para la cepa T11 y el patógeno *F. oxysporum* muestran que su habilidad antagonista se incrementa en un medio de cultivo pobre en nutrientes, y podrían ser indicativas de que bajo esas condiciones de estrés nutricional la cepa T11 secreta más metabolitos y/o hidrolasas que contribuyen a su micoparasitismo sobre este patógeno, como se ha descrito previamente en algunos estudios con *Trichoderma* spp. (Lorito *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2014).

4.2. Actividad antifúngica de los VOCs de *Trichoderma* spp.

Los VOC producidos por las seis cepas de *Trichoderma* spp. en medio PDA no redujeron significativamente el crecimiento de las colonias de *F. oxysporum* y *B. cinerea*. Sin embargo, los VOCs producidos en medio MM redujeron entre un 50-60% el crecimiento de *F. oxysporum* y no se detectaron diferencias significativas entre las cinco cepas de *Trichoderma* ensayadas. Llama la atención que los VOCs producidos por las cepas T7, T25, T34 y T87 en medio MM incrementaron significativamente el tamaño de la colonia de *B. cinerea*. Estos resultados ponen de manifiesto que los compuestos volátiles producidos por un microorganismo dependen en gran medida del medio de cultivo en el que se crezca (Hermosa *et al.*, 2014). En la literatura micológica existen referenciados más de 250 VOCs producidos por hongos (Morath *et al.*, 2012), muchos de los cuales tienen olores característicos y se producen durante el metabolismo primario y secundario, y estos compuestos pueden ser responsables del éxito en biocontrol de algunas especies de *Trichoderma*.

4.3. Actividad antifúngica de los compuestos secretados por *Trichoderma* spp.

La actividad antifúngica de las seis cepas de *Trichoderma* spp. detectada en ensayos de membrana, con tamaños de poro diferentes, frente a los dos patógenos diana utilizados en este trabajo se presenta como porcentaje de inhibición de su crecimiento expresado respecto al crecimiento en la condición control (Tabla 2).

Tras 72 horas de incubar *F. oxysporum* en medios de cultivo PDA y MM que contenían todos los compuestos secretados por las cepas T6 o T25 de *Trichoderma* (celofán) o solo los compuestos de bajo peso molecular (membrana de diálisis), no se detectó inhibición del crecimiento de este patógeno. Los mayores porcentajes de inhibición de este patógeno se observaron, en ambos medios, con compuestos de las cepas *T. virens* T87 y *T. harzianum* T34. Los resultados muestran qué compuestos de peso molecular inferior a 14 kDa tienen mayor actividad antifúngica frente a *F. oxysporum*. Y los porcentajes obtenidos para compuestos de las cepas T34 y T87 en ambos medios indicarían que la influencia del medio de cultivo depende de la cepa de *Trichoderma* spp. testada.

Los compuestos de bajo peso molecular producidos por T11 y T87 en PDA inhibieron completamente el crecimiento de *B. cinerea*. A su vez, los producidos en MM por T87 también inhibieron un 100% el crecimiento de este patógeno. Los menores porcentajes de inhibición de *B. cinerea* se obtuvieron en medio MM donde previamente se habían crecido las cepas T6, T7 o T25. Por tanto, los compuestos secretados por las cepas de *Trichoderma* con actividad frente a *B. cinerea* cambiaron según el medio de cultivo.

TABLA 2. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (Fus) y *B. cinerea* (Bot) por seis cepas de *Trichoderma* spp. en ensayos realizados en los medios PDA y MM sobre membranas de diálisis con tamaño de poro 14 kDa y membranas de celofán.

	PDA				MM			
	Dialisis		Celofán		Dialisis		Celofán	
	Fus	Bot	Fus	Bot	Fus	Bot	Fus	Bot
T6	0	27,3	0	20,4	0	0	0	0
T7	19,7	54,9	25,0	53,3	9,7	8,0	6,4	3,0
T11	37,5	100	34,4	100	22,6	15,8	22,6	30,7
T25	0	46,7	0	43,3	0	13,0	0	13,0
T34	68,7	69,1	68,8	67,1	54,8	52,5	58,1	44,7
T87	75,0	100	53,1	100	58,1	100	71,0	100

5. CONCLUSIONES

Aunque el micoparasitismo se describió como una propiedad ancestral en el género *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2011), los resultados obtenidos en tres ensayos de antagonismo diferentes (micoparasitismo en cultivo dual, actividad de metabolitos secretados y actividad de volátiles) muestran que el mayor o menor peso que tenga cada mecanismo de acción como ACB frente a los fitopatógenos depende de la cepa de *Trichoderma* spp. utilizada, es decir, de su genotipo, del patógeno al que se enfrenta y de las condiciones ambientales, que como en este caso son estudios *in vitro*, sería el medio de cultivo en el que se realicen los ensayos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Atanasova L, Druzhinina IS & Jaklitsch WM. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. En: Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll, M, editores. *Trichoderma: biology and applications*. Vol. 1. 1.^a ed. CABI; 2013. p: 10-43.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, *et al.* *Trichoderma: the genomics of opportunistic success*. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(10):749-759.
- Hermosa R, Cardoza RE, Rubio MB, Gutiérrez S & Monte E. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. En: Gupta VK, Schmoll, M., Herrera-Estrella A, Druzhinina I, Upadhyay RS & Tuohy M, editores. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Vol. 1. 1.^a ed. Elsevier: Holanda. 2014; p. 125-137.
- Hermosa R, Keck E, Chamorro I, Rubio MB, Sanz L, Vizcaíno JA, *et al.* Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Res*. 2004; 108(8):897-906.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I & Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 2012; 158(1):17-25.
- Lorito M, Woo SL, Harman GE & Monte E. Translational research on *Trichoderma*: from omics' to the field. *Annu Rev Phytopathol*. 2010; 48:395-417.
- Malmierca MG, Barua J, McCormick SP, Izquierdo-Bueno I, Cardoza RE, Alexander NJ, *et al.* Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environ Microbiol*. 2015; 17(4):1103-1118.
- Morath SU, Hung R & Bennett JW. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis in their biotechnological applications. *Fungal Biol Rev*. 2012; 26(2-3):73-83.
- Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E & Knowles JA. Versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*. 1987;61(2):155-164.
- Pérez E, Rubio MB., Cardoza R, Gutiérrez S, Bettiol W, Monte E & Hermosa R. The importance of chorismate mutase in the biocontrol potential of *Trichoderma parareesei*. *Front Microbiol*. 2015;6:1181.

- Rubio B, Quijada N, Pérez E, Domínguez S, Monte E & Hermosa R. Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(6):1864-1873.
- Shoresh M, Harman GE & Mastouri F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol.* 2010; 48:21-43.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL., Marra R, Barbetti MJ, Li H, *et al.* A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2008;72(1-3):80-86.

