

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE
DIFERENTES CEPAS DE *TRICHODERMA* SPP. PARA EL
COMBATE DE *FUSARIUM* SPP. EN EL CULTIVO DE
TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de Maestría
Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de
Cultivos

DANIELA RODRÍGUEZ GARCÍA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2016

DEDICATORIA

A pesar de que vivo en un país que ondea su bandera llena de promesas de paz y libertad, la desventaja de ser mujer no conoce fronteras, el camino para llegar a este punto no ha sido fácil, pero he de agradecer a mi madre quien desde siempre me ha enseñado que debo luchar y ser autosuficiente, de no dejar de combatir por lo que quiero, a soñar en grande , con su ejemplo de fortaleza y empeño, alimentó mi espíritu y esta tesis es solo fruto de todo esto. Durante este largo proceso tuve la bendición de ser madre y vivir esa alegría de esta gran responsabilidad, mi hijo fue ese último impulso que no me dejó momento para desvanecer, en mi trabajo por alcanzar mi propósito, espero ser un pilar para él, que vea en mí el ejemplo que yo tuve y que sepa que mi legado será el arma más poderosa que pueda tener la humanidad: la educación, por eso les dedicó mi tesis a mis dos grandes fortalezas: mi madre Flor García Solano y mi hijo Darien Bermúdez Rodríguez.

“A los terroristas les asusta la educación. No quieren que las mujeres accedan a la educación porque entonces las mujeres tendrán más poder”

Malala Yousafzai

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a Dios por la realización y culminación de mis estudios de posgrado y por poner en mi camino a muchas personas que de una u otra forma colaboraron para la realización de mi trabajo entre ellas a Marena Chavarría Vega, quién me apoyó y fue mi compañera de tesis desde ayudarme con las aplicaciones hasta estar nerviosa el día de la defensa.

Al comité asesor de tesis, a mi tutora la señora Amy Wang Wong quién al final se convirtió en una gran amiga y consejera. Al señor Óscar Castro Zúñiga porque sin la conversación inicial que tuvimos donde nos conocimos, no hubiera tenido un tema de tesis tan interesante e influyente con mi trabajo. A la señora Priscila Chaverri Echandi le agradezco grandemente sus valiosos comentarios y sugerencias, los cuales fueron relevantes para concluir mi trabajo.

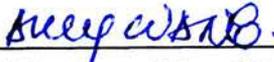
A mi maravillosa familia, unas personas extraordinarias a las que admiro, quiero y respeto profundamente como mi madre, hermanos y sobrinos. Al señor David Bermúdez Rodríguez, quién me toleró y me apoyó en momentos muy difíciles a pesar de mi estrés y cansancio por la realización de este trabajo.

Está tesis no podría haber sido realizada y escrita sin la generosa ayuda de incontables personas que han compartido conmigo sus conocimientos y competencias. Extiendo a todos ustedes mi profundo aprecio.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos”



PhD. Mauricio Montero Astúa
**Decana o Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



Msc. Amy Wang Wong
Directora de Tesis



Msc. Oscar Castro Zúñiga
Asesor



PhD. Priscila Chaverri Echandi
Asesora



PhD. Gerardina Umaña Rojas
Representante del Director

Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Daniela Rodríguez García
Candidata

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación	iv
Índice de contenido	v
Resumen general.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Índice de cuadros.....	xi
Introducción general.....	1
CAPÍTULO I.....	5
Revisión Bibliográfica.....	5
1. Biología del género <i>Trichoderma</i>.....	5
1.1 Morfología.....	5
1.1 Sistemática.....	6
2. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> como agente de combate biológico	8
2.1 Micoparasitismo.....	8
2.2 Antibiosis.....	10
2.3 Competencia con el patógeno.....	11
2.4. Promoción del crecimiento de las plantas.....	12
2.5. Inducción de mecanismos de resistencia en planta.....	13
3. Aplicación del género <i>Trichoderma</i> como biocontrolador.....	15
3.1 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico de <i>Fusarium</i> spp.....	16
CAPÍTULO II.....	19
EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. FRENTE A <i>FUSARIUM</i> SPP. EN EL CULTIVO DE TOMATE.....	19
RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUCCIÓN.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Ubicación.....	22
Aislamiento e identificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y del patógeno <i>Fusarium</i> spp.....	22
Caracterización molecular de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp...	23
Pruebas de antibiosis a nivel de laboratorio.....	25

RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	39
Literatura citada	44
CAPÍTULO III	51
RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE INOCULADAS CON DIFERENTES CEPAS DE <i>TRICHODERMA</i> SP. EN EL COMBATE DE <i>FUSARIUM OXYSPOURUM</i> A NIVEL DE INVERNADERO	51
RESUMEN	51
ABSTRACT	52
INTRODUCCIÓN	53
MATERIALES Y MÉTODOS	54
Ubicación.....	54
Cepas utilizadas.....	54
Ensayo invernadero.....	55
Inoculación de los hongos.....	56
Diseño experimental y análisis de datos.....	56
RESULTADOS	58
DISCUSIÓN	62
Literatura citada	65
CAPÍTULO IV	69
DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL BIOCONTROL DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. SOBRE <i>FUSARIUM OXYSPOURUM</i> EN EL CULTIVO DE TOMATE A NIVEL DE CAMPO	69
RESUMEN	69
ABSTRACT	70
INTRODUCCIÓN	71
MATERIALES Y MÉTODOS	72
Ubicación.....	72
Cepas de hongos.....	72
Prueba a nivel de campo.....	73
Inoculación del antagonista.....	74
Diseño experimental y análisis de datos.....	75
RESULTADOS	76
DISCUSIÓN	81

Literatura citada.....	85
DISCUSIÓN GENERAL.....	91
Literatura citada.....	97

Resumen general

El objetivo general de este trabajo fue determinar la efectividad de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. para el combate de *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate. Se realizaron tres ensayos diferentes para comprobar el potencial de antibiosis de cepas nativas e importadas de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp. en condiciones de laboratorio, a nivel de invernadero y en el campo. En el primer ensayo, se obtuvo mediante la caracterización morfológica y pruebas moleculares la identificación de las especies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. asperelloides* y *T. guizhouense*), mientras que, el patógeno se identificó como *F. oxysporum*. En general, se encontraron diferencias morfológicas y genéticas entre las cepas nativas y las importadas en productos comerciales del hongo *Trichoderma* spp. Sin embargo, las pruebas *in vitro* muestran diferencias en la capacidad antagónica frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, ya que se observó variabilidad en la efectividad de las especies de *Trichoderma*, siendo mejor *T. asperellum* y *T. asperelloides* que *T. guizhouense* para combatir este patógeno. En el segundo y tercer ensayo, a nivel de invernadero y campo, se demostró, de acuerdo a las variables evaluadas: a) número de hojas, b) porcentaje de clorosis, c) porcentaje de hojas marchitas, d) incidencia, y e) biomasa seca, que las diferentes especies de *Trichoderma* utilizadas para el combate biológico de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate ejercen una buena respuesta biológica directa al mejorar el vigor y robustez de las plantas, e indirecta al disminuir la infección por este fitopatógeno. Además, que se logró corroborar que *T. asperellum* y *T. asperelloides* combaten mejor a *F. oxysporum* en cultivos de tomate que la especie *T. guizhouense*.

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II.....	19
EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. FRENTE A <i>FUSARIUM</i> SPP. EN EL CULTIVO DE TOMATE.....	19
Figura 1. Aislamiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en medio de cultivo papa dextrosa a los ocho días.....	29
Figura 2. Relación filogenética de especies de <i>Trichoderma</i> nativas e importadas en productos comerciales con base en la secuencia del factor de elongación 1 α (<i>tef</i>) gen (<i>eEF1a1</i>).....	32
Figura 3. Relación filogenética de especies de <i>Trichoderma harzianum</i> nativas e importadas en productos comerciales con base en la secuencia del factor de elongación 1- α (<i>TEF1</i>) gen (<i>eEF1a1</i>).....	33
Figura 4. Radios de crecimiento del antagonista (A) y del patógeno (B), correspondientes a cultivos duales de los diferentes aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	36
Figura 5. Grado de micoparasitismo (MICMO) correspondiente a cultivos duales de los distintos aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	37
Figura 6. Grado de micoparasitismo (MICMO) correspondiente a cultivos duales de los distintos aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	37
Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), correspondiente a cultivos duales de los diferentes aislamientos de especies de <i>Trichoderma</i> de productos comerciales importados y nativos frente al patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> , al octavo día de evaluación.....	38
CAPÍTULO III.....	51
RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE INOCULADAS CON DIFERENTES CEPAS DE <i>TRICHODERMA</i> SP. EN EL COMBATE DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> A NIVEL DE INVERNADERO.....	51
Figura 1. Escala del porcentaje de clorosis y marchitez según los síntomas presentes en plantas de tomate.....	59

Figura 2. Promedio del número de hojas y la longitud de raíz de plantas de tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp. nativas e importadas.....	60
Figura 3. Promedio de la biomasa seca total y la altura de las plantas de tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. nativas e importadas.....	61
CAPÍTULO IV	69
DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL BIOCONTROL DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. SOBRE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> EN EL CULTIVO DE TOMATE A NIVEL DE CAMPO	69
Figura 1. Promedio del porcentaje de incidencia de plantas de tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> a nivel de campo tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. nativas e importadas.....	77
Figura 2. Medianas del grado de severidad de plantas de tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> a nivel de campo tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. nativas e importadas.....	78
Figura 3. Plantas de tomate afectadas por el patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> a los 68 dds.....	79
Figura 4. Promedio del número de hojas y longitud de raíz de plantas de tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. nativas e importadas.....	80
Figura 5. Promedio de la biomasa seca total y la altura de las plantas de tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. nativas e importadas.....	81

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO II.....	19
EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. FRENTE A <i>FUSARIUM</i> SPP. EN EL CULTIVO DE TOMATE.....	19
Cuadro 1. Escala para evaluación de la capacidad antagónica según Ezziyyani <i>et al.</i> (2004).....	27
Cuadro 2. Identificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. nativas e importadas presentes en los productos evaluados con base en la secuencia parcial del gen TEF según Gen Bank	30
Cuadro 3. Resumen de la identificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. nativas e importadas presentes en los productos evaluados.....	34
CAPÍTULO III.....	51
RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE INOCULADAS CON DIFERENTES CEPAS DE <i>TRICHODERMA</i> SP. EN EL COMBATE DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> A NIVEL DE INVERNADERO.....	51
Cuadro 1. Tratamientos de <i>Trichoderma</i> spp. evaluados en suelo inoculado con <i>Fusarium oxysporum</i> y sembrado con plantas de tomate.....	55
Cuadro 2. Escala modificada para la evaluación del porcentaje de clorosis y marchitez en las hojas de las plantas de tomate afectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> (Marlatt <i>et al.</i> 1996).....	57
Cuadro 3. Medianas de las variables evaluadas mediante escalas y porcentaje de incidencia de plantas de tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> tratadas con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> sp. nativas e importadas.....	58
CAPÍTULO IV.....	69
DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL BIOCONTROL DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. SOBRE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> EN EL CULTIVO DE TOMATE A NIVEL DE CAMPO.....	69
Cuadro 1. Tratamientos con <i>Trichoderma</i> spp. que fueron evaluados en el cultivo de tomate para determinar su efecto sobre el patógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	73

Cuadro 2. Escala modificada para la evaluación de la severidad mediante el porcentaje de clorosis y marchitez en las hojas de las plantas de tomate afectadas por *Fusarium oxysporum* (Marlatt *et al.* 1996)..... 75

Introducción General

En la actualidad, no se conoce de algún método eficiente que por sí solo disminuya significativamente la enfermedad de la marchitez causada por *Fusarium* spp. en tomate, por lo tanto, se han realizado grandes esfuerzos por combatirla y en estos momentos se aplica un manejo integrado en diversos países, en el que se incluyen la poda fitosanitaria, fertilización al suelo, reguladores de crecimiento y aspersiones de fungicidas (Jiménez y Sanabria 1997a y b; Agrios 2005; Caravaca 2008).

En Costa Rica, la producción de tomates por año alcanza las 58 560 toneladas métricas/año (López 2012). Por otra parte, las importaciones de agroquímicos de acción biocida para el año 2015 en Costa Rica fueron del total: un 34% en fungicidas, un 29% de insecticidas-nematicidas, un 27% de herbicidas y fumigantes con un 10% (Ramírez 2015). Por lo que el impacto en el uso de agroquímicos es, dañino para los organismos vivos que comparten el ecosistema, al considerar la mortalidad de organismos o la disminución de una especie en un ecosistema o la contaminación de aguas subterráneas en períodos de tiempo (De la Cruz 2004).

El combate biológico se presenta como una alternativa que puede ser eficaz, económica y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso indiscriminado de agroquímicos. En el combate biológico de enfermedades se aplican microorganismos antagonistas en el sitio de infección, de forma preventiva o curativa, ya que interfieren con la supervivencia de los microorganismos fitopatógenos (Agrios 2005).

El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable, dado que es eficaz, de fácil producción a gran escala, la mayoría son especies cosmopolitas y presentan gran capacidad de parasitar, competir por nutrientes o producir compuestos que resultan antagonísticos para una gran variedad de hongos fitopatógenos, entre los que se encuentran los géneros *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., entre muchos otros (Montealegre *et al.* 2005; Chérif y Benhamou 1990; Córdoba 2003; Hibar *et al.* 2005, 2006). Por lo anterior, se requiere detectar la presencia y diversidad de cepas nativas, con el propósito de evaluarlas como agentes potenciales de combate biológico y determinar su especificidad con respecto al patógeno blanco a combatir (Papavizas 1985; Nelson 1991).

Por otra parte, los hongos utilizados como biocontroladores pueden inducir resistencia en las plantas afectadas por estrés debido a diferentes factores tanto bióticos, tales como enfermedades, y abióticos como la sequía y la salinidad. Además, aumentan la eficiencia en el uso de nitrógeno, mediante la capacidad de estos hongos de producir compuestos de óxido nítrico (NO), lo cual permite reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados, reduciendo la contaminación por nitratos en las aguas y la contaminación del aire (Han y Lee 2005; Kloepper *et al.* 2004).

Los informes de la especificidad de las especies de *Trichoderma* en la eficacia del combate de *Fusarium oxysporum* son contradictorios, y la mayoría se refieren a la eficiencia de los ensayos *in vitro* o en invernadero bajo condiciones controladas, y por lo tanto, dichos resultados no se pueden generalizar a todas las especies y cepas aisladas de *Trichoderma* (Ploetz 2004). Zhang *et al.* (2004) estudiaron el efecto inhibitorio de 150 aislamientos de *Trichoderma* spp. proveniente de 40 suelos diferentes y otros materiales, de los cuales 39

mostraron eficacia en la inhibición de *Fusarium oxysporum* en experimentos de cultivo dual *in vitro*. La eficacia estuvo relacionada al micoparasitismo, inhibición enzimática y lisis. Sin embargo, se ha encontrado que existen diferencias en los resultados dependiendo de la cepa en cuanto a la efectividad del combate (González *et al.* 2004). Por otra parte, en un ensayo con plantas de jitomate, la cepa utilizada no proporcionó una protección adecuada contra *Fusarium oxysporum* (Fernández *et al.* 2007).

Otro factor que se debe tener en cuenta, es que existen mecanismos generales relacionados con la respuesta de la planta a la inoculación con microorganismos benéficos como *Trichoderma*, sin embargo, se producen variaciones naturales. Por ejemplo, algunas especies de *Trichoderma* inducen el crecimiento, además de la respuesta sistémica inducida (RSI) en las plantas (Harman *et al.* 2008), mientras que otras no, lo cual va a depender de la especie de planta o el cultivar (Alfano *et al.* 2007; De Souza 2008).

Actualmente, en Costa Rica no se tiene información certera de si las diferentes cepas de *Trichoderma* aisladas de los mismos sitios de cultivo, así como las importadas de otros cultivos o países, presentan la misma eficiencia y especificidad en el combate de las especies del género *Fusarium*. Además, existen interrogantes acerca de si existe alguna relación específica entre la cepa de *Trichoderma* que se utilice para el combate de *Fusarium* spp., o que si en última instancia, todas tienen potencial de antibiosis.

El objetivo general fue determinar la efectividad de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. para el combate de *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate. Por lo tanto, se realizaron tres ensayos diferentes para comprobar el potencial de antibiosis de cepas nativas e importadas

de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp.: en condiciones de laboratorio, a nivel de invernadero y finalmente, a nivel de campo.

CAPÍTULO I

Revisión Bibliográfica

1. Biología del género *Trichoderma*

1.1. Morfología

El género mitospórico *Trichoderma* (*Hypocrea*, Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae), agrupa más de 100 especies y este número está aumentando rápidamente (Druzhinina *et al.* 2010). Este género presenta conidióforos muy ramificados, están tabicados y sus células contienen más de un núcleo. Los conidios son globosos o subglobosos, con pared normalmente lisa y con un solo núcleo, la mayoría de las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y emiten grandes cantidades de conidios verdes formados a partir de células conidiógenas enteroblásticas fialídicas (Kirk *et al.* 2008). De acuerdo a las condiciones nutricionales o frente a la desecación, se producen unas estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, las cuales se forman sobre el micelio, son globosas, con pared rugosa y más gruesa que la de los conidios, y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Lewis y Papavizas 1984). El número de cromosomas por núcleo va de 3 a 7 y el tamaño del genoma de 30,5 a 38,8 Mb, los cuales varían según la especie (Goldman *et al.* 2002).

1.2. Sistemática

Para caracterizar cepas de *Trichoderma*, inicialmente se emplearon los estudios morfológicos posteriormente se aplicaron características fisiológicas y/o bioquímicas (Grondona *et al.* 1997). En la actualidad, se está imponiendo el uso de técnicas moleculares, como perfiles RFLP, perfiles RAPD-PCR, secuencias de distintas zonas del genoma o marcadores SCAR tanto para la identificación de cepas como para la sistemática del género, así también como la metagenómica (Muthumeenakshi *et al.* 1994; Arisan-Atac *et al.* 1995; Hermosa *et al.* 2000, 2001; Rubio *et al.* 2005; Gupta *et al.* 2014).

Los datos de secuencias obtenidos de las regiones ITS y de genes como el que codifica el factor de elongación de la transcripción I (TEF1), el ADNr 18S, el ADNr 28S o la endoquitinasa 42 (*ech42*), han permitido establecer nuevos taxones (Kullnig-Gradinger *et al.* 2000; Kubicek *et al.* 2003), describir nuevas especies como *Trichoderma asperellum* (Lieckfeldt *et al.* 1999) o *Trichoderma pleurotum* (Komon-Zelazowska *et al.* 2007). Por otra parte, se han identificado que la especie *Trichoderma harzianum*, posee el estado teleomórfico, el cual corresponde a *Hypocrea lixii* (Chaverri *et al.* 2003), pero además, dentro del complejo de *Trichoderma harzianum* se han descrito o re-identificado 14 nuevas especies (Chaverri *et al.* 2015); también en el caso de *T. asperellum* se han segregado dos nuevas especies como *T. asperelloides* y *T. yunnanense* (Samuels *et al.* 2010).

Actualmente, solo se están aceptando cuatro secciones dentro del género *Trichoderma*: Pachybasium (*T. harzianum* y *T. virens*, estas dos especies constituyen las principales

especies empleadas en el combate biológico); *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*), *Longibrachiatum* (*T. longibrachiatum* y *T. saturnisporum*) e *Hypocrea* (estados anamórficos de *Hypocrea*) (Samuels 1996; Hermosa *et al.* 2004). Se debe tener presente que el número de especies contenido en cada una de las secciones depende de los cambios continuos que sufre su sistemática.

Sin embargo, los métodos de filogenética molecular emplean pruebas para comparar hipótesis sobre el número de especies en la sección *Trichoderma* y ahora, está claro que existen más especies. Actualmente, hay 100 taxa (especies, formas y variedades) de *Trichoderma* e *Hypocrea*, las cuales tienden a ser incluidas en análisis filogenéticos. Algunos anamorfos/teleomorfos importantes son *T. reesei/H. jecorina*, los cuales son la primera fuente de la enzima celulasa, y tres especies de control biológico: *T. virens/H. virens*, *T. harzianum/H. lixii*, y *T. stromaticum/H. stromatica*. Se considera que un único gen no es considerado suficiente para caracterizar especies de *Trichoderma* e *Hypocrea* y las nuevas especies están siendo identificadas utilizando genes múltiples, incluyendo los de actina, calmodulina, endoquitinasa y el factor de traslación-elongación (Jaklitsch y Kubicek 2008; Druzhinina *et al.* 2010; Samuels 2006).

Cada una de las 83 especies está representada en el GenBank por secuencias de al menos la región ITS de ADNr, y están caracterizados por secuencias de genes que codifican proteínas del factor de traslocación-elongación 1- α (*tef*) (Jaklitsch *et al.* 2006; 2005; Samuels 2006; Kredics *et al.* 2014). En internet se puede encontrar una clave interactiva de la Subcomisión sobre *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH, <http://www.isth.info/>) para la identificación de varias

especies de *Trichoderma* basada en ITS y genes múltiples, incluyendo una pequeña parte de *tef* (Samuels 2006; Jaklitsch *et al.* 2008).

2. Mecanismos de acción de *Trichoderma* como agente de combate biológico

Weindling (1932) describió la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* (ahora *T. viride*), hace más de 70 años. Hasta el momento, se han descrito cinco mecanismos de acción de *Trichoderma*: (1) micoparasitismo, (2) antibiosis, (3) competencia, (4) promoción del crecimiento y/o (5) inducción de resistencia en la planta hospedadora. Estos mecanismos no son excluyentes entre sí, y la importancia relativa de cada uno de ellos aún no está bien establecida, aunque parece que depende de la cepa de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones edáficas y ambientales (Hjeljord y Tronsmo 1998; Howell 2003; Harman *et al.* 2004a; Shores *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2014).

2.1. Micoparasitismo

Se define el micoparasitismo como la relación que un organismo establece con un hongo huésped de manera que se beneficia del mismo, obteniendo nutrientes sin aportarle nada a cambio y, en ocasiones, causando su muerte. Cuando ocurre esto último se habla de micoparásitos necrotróficos para diferenciarlos de los biotróficos, que mantienen su relación con células vivas durante largos periodos de tiempo (Agrios 2005; Olmedo y Casas 2014).

Los eventos que conllevan al micoparasitismo son complejos y tienen lugar de una manera ordenada. En primer lugar, *Trichoderma* localiza al patógeno y comienza a crecer por tropismo hacia él (Lu *et al.* 2004). Esta detección a distancia se debe, al menos parcialmente, a la expresión secuencial de enzimas que degradan la pared celular de los hongos, sus siglas en inglés CWDEs (*Cel Wall Degrading Enzymes*). Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones de inducción de CWDEs, parece seguro que una exoquitinasa extracelular, que se produce de forma constitutiva en pequeñas cantidades, podría estar implicada en este proceso. Esta exoquitinasa provoca la liberación de algunos oligómeros de la pared del hongo. Estos compuestos son los que inducen la expresión de endoquitinasas tóxicas (Brunner *et al.* 2003; Harman 2006) que, al ser liberadas por *Trichoderma*, se difunden y comienzan el ataque al hongo patógeno antes de que se haya producido el contacto físico (Zeilinger *et al.* 1999; Viterbo *et al.* 2002b).

Una vez que los hongos están en contacto, *Trichoderma* puede enrollarse alrededor de las hifas del hongo patógeno y formar estructuras especializadas de tipo apresorio, las cuales podrán penetrar en el interior de su adversario. La unión parece estar mediada por la interacción entre carbohidratos de la pared celular de *Trichoderma* y lectinas del patógeno (Inbar y Chet 1996; Rocha-Ramírez *et al.* 2002). Una vez en contacto, *Trichoderma* produce varias CWDEs y antibióticos, como los peptaiboles (Schirmböck *et al.* 1994; Degenkolb *et al.* 2003), que generarían agujeros en la pared celular. Finalmente, *Trichoderma* digiere el contenido intracelular del hongo, proceso que va acompañado de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del hospedante (Benhamou y Chet 1996). En algunos casos, también se observa la esporulación de *Trichoderma* tras la digestión del otro hongo (Elad *et al.* 1984).

Es importante mencionar que el mecanismo micoparasítico de *Trichoderma* integra la acción de diversas CWDEs (Elad *et al.* 1982; Papavizas 1985; Chet *et al.* 2002; Sanz *et al.* 2004), entre las cuales se encuentran quitinasas, β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas y proteasas. Debido a que la quitina y el β -1,3-glucano son los principales componentes estructurales de la pared celular de hongos, se ha propuesto que las enzimas claves en este proceso son las quitinasas y las β -1,3-glucanasas (Elad *et al.* 1982; Papavizas 1985; De la Cruz *et al.* 1993). Por otra parte, se tienen en cuenta otras enzimas que hidrolizan otros componentes minoritarios de las paredes fúngicas (proteínas, β -1,6-glucanos, α -1,3-glucanos) (Viterbo *et al.* 2002a; Sanz *et al.* 2005; Suárez *et al.* 2005; Olmedo y Casa 2014).

2.2. Antibiosis

La actividad antibiótica de *Trichoderma* fue detectada por primera vez por Weindling (1932) y desde entonces se han descrito numerosos antibióticos producidos por las especies de este género. La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por el producto metabólico de otro, sin que medie contacto físico entre ellos (Agrios 2005). Muchas cepas de *Trichoderma* liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles, que producen este efecto de antibiosis (Cardoza *et al.* 2005; Webster y Weber 2007; Shores *et al.* 2010).

El papel de estos compuestos en el antagonismo es fundamental, ya que mutantes de *T. virens* deficientes en la producción de gliotoxina pierden totalmente la capacidad de inhibir a *Rhizoctonia solani* (Howell y Stipanovic 1995). Los mecanismos de antagonismo que *Trichoderma* utiliza no son independientes, sino que interactúan unos con otros. Un ejemplo

de este sinergismo se ha observado en el efecto antifúngico sobre varios géneros de hongos fitopatógenos como *Botrytis*, *Fusarium* o *Alternaria*, que se incrementa, tras una aplicación conjunta de antibióticos y CWDEs de *Trichoderma* (Lorito *et al.* 1996).

2.3. Competencia con el patógeno

La competencia se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, ya sea sustrato, nutrientes, o espacio; es decir, mientras que, alguno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia entre organismos es que haya escasez de un elemento (Carballo y Guaharay 2004). Sin embargo, las características del agente de control biológico favorecen este tipo de antagonismo, como la plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Infante *et al.* 2009).

La ubicuidad de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo (Hermosa *et al.* 2004) es una prueba de que es un buen competidor por el espacio y por requerimientos nutricionales. Aparece en casi todos los suelos y también en hábitats naturales que contienen grandes cantidades de materia orgánica, donde se comporta como un excelente descomponedor de material vegetal y fúngico. Además, muchas especies del género *Trichoderma* muestran una gran versatilidad metabólica que les permite crecer utilizando un amplio abanico de fuentes de nitrógeno y carbono (Grondona *et al.* 1997). Por otra parte, la capacidad para colonizar la rizosfera de las plantas es un punto clave en este proceso, ya que

un agente de combate biológico que no sea capaz de crecer en la rizosfera no podrá competir por el espacio y los nutrientes de ese ecosistema (Howell 2003).

Por ejemplo, la competencia por el espacio es el mecanismo atribuido a la protección de los racimos de uvas contra la “podredumbre gris” causada por *B. cinerea*, ya que este patógeno no puede instalarse sobre los capuchones florales de vides que han sido colonizados por *T. harzianum* (Dubos *et al.* 1982). En la bibliografía se pueden encontrar otros casos en los que se alude a la competencia por los nutrientes como responsable directa del efecto antagonista de *Trichoderma* (Howell y Stipanovic 1995; Handelsman y Stabb 1996; Lo *et al.* 1996).

Sin embargo, es difícil determinar si *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista solamente mediante la competencia o si, por el contrario, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competencia se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman 2000).

2.4. Promoción del crecimiento de las plantas

Se ha comprobado la capacidad de ciertas cepas de *Trichoderma* para estimular el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento de la productividad (Harman *et al.* 2004b), demostrándose que algunas cepas del género *Trichoderma* pueden regular los niveles de auxina en la rizosfera y estimulan el crecimiento de las plantas y, por ende, protegen el sistema radical e inducen la defensa sistémica frente al ataque de patógenos (Björkman 2004). Por ejemplo, plantas de pepino inoculadas con la

cepa de *T. harzianum* (T-203), mostraron un incremento del 75-95% en el sistema radical, y un aumento de la superficie foliar del 80% (Yedidia *et al.* 2001).

Por otra parte, *Trichoderma*, a lo largo del proceso de interacción con la planta, proporciona resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico y cambios en el estado nutricional (Howell 2003). Se ha descrito que algunas cepas de *Trichoderma* poseen la capacidad de solubilizar metales como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre, convirtiéndolos en nutrientes asimilables por las plantas (Altomare *et al.* 1999).

2.5. Inducción de mecanismos de resistencia en planta

Se ha comprobado que la asociación directa de *Trichoderma* con las raíces de la planta, estimula los mecanismos de defensa de la misma (Yedidia *et al.* 1999), lo que conlleva una resistencia contra una amplia gama de microorganismos fitopatógenos, incluso nematodos (Harman *et al.* 2004b). Esta resistencia inducida no es específica de un determinado tipo de planta y puede ser localizada o sistémica, preparándola para ejercer una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de patógenos (Conrath *et al.* 2002). La respuesta incluye la secreción de peroxidasas, la síntesis de fitoalexinas, la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis o “PR”, la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell 2006) o el aumento de los niveles de ácido salicílico (Martínez *et al.* 2001) y ácido jasmónico (Segarra *et al.* 2007).

Un estudio evaluó el mecanismo de interacción entre *Trichoderma* y las plantas de soja (*Glycine max* L.), el cual indicó que las moléculas elicitoras secretadas por el hongo son

detectadas por células de las plantas a través de cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} citosólico, por lo que las células vegetales son capaces de discriminar señales que se originan en la interacción de uno o dos hongos y modular la respuesta de defensa (Navazio *et al.* 2007).

La infección de *Trichoderma* se inicia con la germinación de las esporas y colonización de la superficie de las raíces, y la posterior penetración en las primeras capas de células de la epidermis (Yedidia *et al.* 1999; Zeilinger *et al.* 1999; Harman *et al.* 2004a; Woo *et al.* 2006). En esta etapa de la interacción *Trichoderma*-planta, muchos genes, como los que codifican hidrofobinas, son necesarios para la adherencia a las raíces (Benítez *et al.* 2004; Rosado *et al.* 2007). Por medio de resultados transcriptómicos se ha podido comprobar que algunas cepas de *Trichoderma* inducen de forma activa cambios sistémicos en la fisiología y la resistencia de la planta a los patógenos, modulando la expresión de genes relacionados con el estrés y el metabolismo de la misma (Alfano *et al.* 2007).

En los últimos años se está analizando el papel que juega *Trichoderma* en su relación con la planta y el patógeno, desde el punto de vista de la producción de moléculas que podrían actuar como elicitores de la respuesta de defensa en plantas (Vinale *et al.* 2008). Además, se han aislado genes del tipo *avr*, similares a los que poseen los patógenos avirulentos, o del tipo de transportadores ABC, relacionados con la resistencia de *Trichoderma* a moléculas tóxicas que secretan las plantas o los hongos fitopatógenos (Harman *et al.* 2004a; Woo *et al.* 2006; Martínez *et al.* 2001; Schuster y Schmoll 2010).

3. Aplicación del género *Trichoderma* como biocontrolador

El uso principal en el comercio mundial de *Trichoderma* se deriva de su alta capacidad de producción de enzimas; la especie *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) es el organismo celulolítico más extensamente empleado en el mundo (Kovoivula *et al.* 2002), los cuales indican que de las 11 familias de celulasas conocidas, se han encontrado cinco producidas por *Trichoderma*, principalmente en aislamientos de *T. reesei*; claro está que la producción de celulasas se puede encontrar en otras especies de este género (Watanabe *et al.* 2006). La producción de celulasas tiene aplicaciones en la industria textil, papelera (blanqueamiento de pulpas), alimenticia (panificadora, cervecera, alimentos para animales, entre otros), farmacéutica y recientemente, en producción de biocombustibles de tercera generación. *Trichoderma* es también un degradador eficiente de heteropolisácaridos (polisácaridos no celulósicos), como el xilano de importancia en la industria papelera (Watanabe *et al.* 2006); además, algunas cepas son agentes de bioremediación, porque degradan pesticidas del ambiente (Tang *et al.* 2009), remueven metales pesados (Akhtar *et al.* 2009) y degradan cianuro (Ezzi y Lynch 2005).

Una de las aplicaciones que más interés despierta es la utilización de diferentes especies de *Trichoderma* como agentes de control biológico en agricultura para el combate de enfermedades de plantas producidas por microorganismos patógenos (Monte 2001; Benítez *et al.* 2004; Harman *et al.* 2004a). Con frecuencia, se informa sobre la producción de sustancias con actividad antifúngica de especies de *Trichoderma* como: el ácido fenílico, 6-pentil- α -pirona, viridofunginas y harzianopiridona; antisépticos tales como: antraquinona, harzianodiona y gliotoxina. Además, reguladores de crecimiento en plantas (cicloneodiol,

harzianopiridona y 6-pentil- α -pirona); péptidos antimicrobianos e incluso compuestos fitotóxicos como el viridiol; otros con usos potenciales en farmacopea, como los antitumorales e inmunomoduladores (harzianodiona y gliotoxina) (Supothina *et al.* 2007; Vinale *et al.* 2006; Xiao-Yan *et al.* 2006).

T. harzianum, *T. viride* y *T. virens* son las especies de *Trichoderma* más citadas en combate biológico (Papavizas 1985; Chet 1987). Actualmente, *T. harzianum*, solo o en combinación con otras especies de *Trichoderma*, está siendo utilizada en preparaciones comerciales para el combate de numerosas enfermedades de plantas producidas por hongos. Estas formulaciones se aplican directamente al suelo, a las semillas (“coating”) o, mediante diferentes sistemas de riego, a plántulas para trasplante en semilleros y en cultivos establecidos (Grondona *et al.* 2001).

3.1 *Trichoderma* spp. como agente de control biológico de *Fusarium* spp.

El marchitamiento por *Fusarium* es una de las enfermedades más comunes y perjudiciales en el cultivo de tomate, especialmente cuando es intensivo y se utilizan variedades susceptibles. La enfermedad es más destructiva en los climas cálidos y en suelos arenosos de las regiones templadas. Las plantas infectadas no se desarrollan, se marchitan rápidamente y finalmente mueren. De vez en cuando, se pueden observar plantaciones enteras de tomate dañadas seriamente o inclusive pérdidas totales antes de que se realice la cosecha del cultivo (Agrios 2005).

Los síntomas aparecen por primera vez en la nervadura con un ligero aclaramiento de los

foliolos jóvenes más externos. Posteriormente, las hojas más viejas muestran epinastia causada por la caída de los pecíolos. Las plantas infectadas en la etapa de plántula, por lo general, después de que aparecen los primeros síntomas, se marchitan y mueren pronto (Agrios 2005).

En plantas con estados fisiológicos más avanzados, ocurre una clorosis de las nervaduras de sus hojas antes de que se produzca el achaparramiento y epinastia foliar, luego un amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de sus hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de sus hojas y finalmente, su muerte. Estos síntomas suelen aparecer solo en uno de los costados del tallo y avanzan hacia la parte superior de la planta hasta que destruye el follaje y ocasiona la muerte del tallo (Agrios 2005).

El biocontrol de fitopatógenos de suelo con especies de *Trichoderma* ha sido objeto de estudio desde 1930 debido a la gran diversidad de especies y cepas que han sido utilizadas con este propósito, ya sea directamente al suelo o en el tratamiento de las semillas (Pérez *et al.* 2009). Los resultados muestran que *T. harzianum* induce la producción de enzimas líticas (1-3 B-glucanasa y quitinasa) en las células de las paredes de los patógenos *R. solani*, *Pythium aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum* (Sivan y Chet 1989). Las especies de *Trichoderma* son capaces de combatir ascomicetes, basidiomicetes y oomicetes (Monte 2001; Benitez *et al.* 2004), y recientemente, también se ha informado de su efecto sobre nematodos (Dababat *et al.* 2006; Kyalo *et al.* 2007; Goswami *et al.* 2008).

Existen informes sobre diversos intentos en el biocontrol de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* causantes de marchitez en diferentes hospedantes (Sandoval *et al.* 1996), además, se ha informado de la eficacia de *Trichoderma harzianum* (cepa A34) en el combate de *Fusarium* spp. en frijol y claveles, así como de diferentes especies de hongos en tomate, tabaco y frijol (Sandoval y López 2000; 2001).

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO *IN VITRO* DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE *TRICHODERMA* SPP. FRENTE A *FUSARIUM* SPP. EN EL CULTIVO DE TOMATE

RESUMEN

El objetivo del ensayo fue determinar la efectividad de cepas nativas (Asper-CR y Guiz-CR) e importadas (Guiz-USA y Aspe-Col) de *Trichoderma* spp. en el combate de *Fusarium* spp., aislado de plantas enfermas de tomate. Mediante la caracterización morfológica y pruebas moleculares se identificaron tres especies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. asperelloides* y *T. guizhouense*), mientras que el patógeno se identificó como *F. oxysporum*. Se utilizó la técnica de cultivo dual para evaluar los radios de crecimiento del antagonista (RCA) y del patógeno (RCP), el micoparasitismo y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Los valores promedios de los RCA fueron 26,5; 39,3; 41,2 y 32,1 mm para Aspe-Col, Asper-CR y Guiz-CR respectivamente y 42,75 mm para el testigo de cada cepa. En cuanto al micoparasitismo, se obtuvo que Aspe-Col y Asper-CR presentaron invasión completa de la colonia de *F. oxysporum*, con esporulación. La Asper-CR invadió la colonia del patógeno, pero sin esporulación y finalmente, la Guiz-USA solo logró invadir un cuarto de la superficie de la colonia del patógeno. También se determinó el PICR, se encontraron diferencias significativas entre cepas donde las más efectivas fueron Asper-CR y Aspe-Col con 67% y 63% de inhibición respectivamente. En conclusión, si se encontraron diferencias morfológicas y genéticas entre las cepas nativas y las importadas en productos comerciales del hongo *Trichoderma* spp. Las pruebas *in vitro* muestran que existe capacidad antagónica frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, siendo mejor *T. asperellum* y *T. asperelloides*.

ABSTRACT

The effectiveness of native (Asper-CR y Guiz-CR) and exotic (Guiz-USA and Aspe-Col) strains of *Trichoderma* spp. against *Fusarium* spp. isolated from diseased tomato plants was tested. By means of morphological and molecular analyses *Trichoderma asperellum*, *T. asperelloides*, *T. guizhouense* and the pathogen *Fusarium oxysporum* were identified. Values of radial growth of the antagonist (RGA), mycoparasitism and percentage of radial growth inhibition (PRGI) were estimated by dual culture technique. Mean RGA values of 25.6, 39.3, 41.2 and 32.1 mm were obtained for Guiz-USA, Aspe-Col, Asper-CR and Guiz-CR, respectively; while for the control strain was 42.75. Colonies of *F. oxysporum* were completely invaded by Aspe-Col and Guiz-CR with sporulation. Asper-CR colonized the pathogen culture without sporulation and Guiz-USA partially (25%) invaded the surface of the pathogen's culture. Differences in PRGI were significant among *Trichoderma* strains. The most effective strains were Asper-CR (67%) and Aspe-Col (63%). Native and exotic strains of the fungus *Trichoderma* spp. from commercial products show genetic and morphological differences. **In conclusion**, in-vitro tests showed antagonistic activity against the pathogen *Fusarium oxysporum* based on the observed variability in effectiveness of *Trichoderma* spp. with *T. asperellum* and *T. asperelloides* showing a better effect compared to *T. guizhouense*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, no se conoce de algún método eficiente que por sí solo disminuya significativamente la enfermedad de la marchitez causada por *Fusarium* spp. en diferentes cultivos. Se han realizado grandes esfuerzos por combatirla y en estos momentos varios países aplican un manejo integrado, en el que se incluyen la poda fitosanitaria, fertilización al suelo, reguladores de crecimiento y aspersiones con fungicidas (Jiménez y Sanabria 1997a y b; Agrios 2005; Caravaca 2008). Esta última opción es la más utilizada y el uso indiscriminado provoca problemas de contaminación ambiental y en general, desequilibrio ecológico.

El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable, dado que es eficaz, fácil de producir a gran escala, la mayoría son especies cosmopolitas y presentan gran capacidad de parasitar, compiten por nutrientes o producen compuestos que resultan antagonistas para una gran variedad de hongos fitopatógenos tales como los géneros *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., entre otros (Montealegre *et al.* 2005; Chérif y Benhamou 1990; Córdoba 2003; Hibar *et al.* 2005, 2006; Gupta *et al.* 2014).

Actualmente, en Costa Rica no se tiene información certera si las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de los mismos sitios de cultivo, así como las importadas de otros cultivos o países, presentan la misma eficiencia y especificidad en el combate de las especies del género *Fusarium*. Además, aún se tienen interrogantes acerca de la existencia de alguna relación específica antagonista entre *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., o si en última instancia, todas las cepas tienen potencial de antibiosis. Es por esto que, se requiere detectar

la presencia y conocer la diversidad de cepas nativas, con el propósito de evaluarlas como agentes potenciales de combate biológico y comprobar su especificidad con respecto al patógeno a combatir (Papavizas 1985; Nelson 1991). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar el potencial de antibiosis de cepas nativas e importadas de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp. en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, del Centro de Investigaciones agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Aislamiento e identificación de las cepas de *Trichoderma* spp. y del patógeno *Fusarium* spp. Se emplearon productos comerciales preparados con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de Estados Unidos (THU-1) y Colombia (THC-2); así como dos cepas nativas de Costa Rica pertenecientes a la Universidad de Costa Rica (THM-3, San Carlos y THM-4, Cartago).

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. a partir de los productos comerciales se realizaron mediante el método de diluciones seriadas en caja Petri, para lo cual se tomó una muestra de 1 gr del producto y se diluyó en 10 mL (proporción 1/10 p/v) de agua destilada estéril hasta obtener diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} . De la última dilución, se extrajo una alícuota de 0,1 mL y se distribuyó homogéneamente sobre una caja Petri que contenía medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Éstas se incubaron a 25 ± 1 °C por 5-6 días en oscuridad y luego 4 días con

luz día en una incubadora Digisystem DK-500. Se utilizaron 10 cajas Petri por cada producto comercial. De cada aislamiento para la identificación se utilizó el método descrito por Gilchrist *et al.* (2005), y las claves de identificación propuestas por Samuels *et al.* (2013) y Ellis (2006).

Los aislamientos de *Fusarium* spp., se realizaron a partir de muestras de plantas enfermas de tomate que presentaban marchitez, necrosamiento basal del tallo y de las axilas de las ramas laterales inferiores. Las plantas se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de suelo presente en el tallo y raíz, de estos tejidos se hicieron disecciones de 0,5 cm de la zona de avance de la enfermedad, cada trozo se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2,5% por 2 min y posteriormente, se realizó cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Luego, cada trozo se fraccionó en secciones de aproximadamente 0,25 cm y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Los aislamientos obtenidos se purificaron mediante la técnica de punta de hifa descrita por Chairman *et al.* (1978), la cual consiste en seleccionar la punta de una hifa solitaria, cortarla, y transferirla a una caja Petri. Se usó medio de cultivo Komoda (Komoda 1975), que luego se dejó incubar por dos o tres días.

Las diferentes cepas obtenidas, se identificaron morfológicamente con base en el protocolo del *Fusarium* Research Center de la Universidad de Pennsylvania, desarrollado por Burges *et al.* (1994) y Gilchrist *et al.* (2005) y las claves taxonómicas de Booth (1971), Arikan *et al.* (2001), y Seifert (1996).

Caracterización molecular de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. Esta parte del estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC de la

Facultad de Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Costa Rica. Se realizó la extracción del ADN de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y de los aislamientos de *Fusarium* spp. se tomó un disco 5 cm de diámetro a partir de cajas Petri con medio de cultivo PDA de 3-5 días de crecimiento de los hongos. Luego los discos de micelio se secaron con toallas de papel absorbente. Posteriormente, el disco de micelio se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL para la extracción de ADN. La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit de aislamiento de ADN Genómico de Puregene™.

Posteriormente, para *Trichoderma* spp. se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento de 0,9 kb del extremo 5' del factor de elongación 1- α (TEF1) del gen (*eEF1a1*) que contiene tres intrones que fueron amplificados utilizando el par de primers *tef71f* (CAAAATGGGTAAGGAGGA(G/C)AAGAC) y el *tef997R* (CAGTACCGGC(A/G)GC(A/G)AT(A/G)AT(G/C)AG) (Shoukouhi y Bissett 2009), luego se hizo una electroforesis para corroborar el resultado de la amplificación y por último, el producto de PCR obtenido se limpió empleando el kit de purificación para PCR QIAquick® (QIAGEN), se envió a secuenciar a la empresa Macrogen Inc., en Seúl, Corea.

Para el caso de los aislamientos de *Fusarium* spp. se efectuó el protocolo para el PCR para amplificar la región del gen TEF, utilizando el imprimador de inicio *ef1* (5'-TGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3) y el imprimador de reversa *ef2* (5'GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') (O'Donnell *et al.* 1998; Geiser *et al.* 2004) y a los productos amplificados del hongo se les efectuó una electroforesis en gel de

agarosa. Finalmente, se realizó la secuenciación por la empresa MacroGen Inc., en Seúl, Corea.

Las secuencias obtenidas para cada imprimador ya sea de los antagonistas como del patógeno, se analizaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 (Hall 1999) y se obtuvo la secuencia consenso. Las secuencias se compararon con las secuencias publicadas en la base de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica en USA (NCBI), mediante la opción BLASTn search (Altschul *et al.* 1997).

La información del ADN de la región del factor de elongación 1- α (TEF1) del gen (*eEF1a1*) de las cepas de *Trichoderma* spp. e incluidas las secuencias de aislamientos de especies de *Trichoderma* del Banco de Genes (Gen Bank), las mismas fueron alineadas con el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994). El alineamiento fue corregido manualmente en el programa BioEdit. El análisis filogenético de las secuencias se hizo con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013); según el criterio de Máxima Verosimilitud, el modelo Kimura 2-parameter y un análisis de 2000 réplicas de Bootstrap. Se incluyó la secuencia de *Trichoderma aggressivum* CBS 100.525 (AF534614) como grupo externo (raíz) en el análisis filogenético de las especies del complejo de *Trichoderma harzianum*. Las secuencias de la región del factor de elongación -1 α (TEF) utilizadas fueron las mismas que empleo Chaverri *et al.* (2015) en su análisis filogenético del Complejo de *T. harzianum*.

Pruebas de antibiosis a nivel de laboratorio. Se utilizó la técnica del papel celofán modificada (Dennis y Webster 1971), para seleccionar aquellas cepas de *Trichoderma* spp.

que presentaron capacidad antagónica *in vitro*, al inhibir o retardar el crecimiento del micelio de *Fusarium* spp. Se cortaron tiras de 2,0 cm de ancho por 8,5 cm de largo de papel celofán, las cuales se esterilizaron antes de colocarlos bajo condiciones asépticas dentro de la caja Petri, sobre el medio de cultivo PDA; posteriormente, en un extremo de la caja de Petri se colocó un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio de *Fusarium* spp. de 8 días de edad y se dejó desarrollar durante 3 días por su crecimiento lento. Luego en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio de *Trichoderma* spp. (nativos o comerciales) de la misma edad, a una distancia aproximada de 5 cm entre ellos (Howell 2003). También se cultivó, por separado, cada antagonista y patógeno, se colocó un disco de agar de 4 mm de diámetro de micelio en el centro de la caja Petri, los cuales correspondieron a los testigos y se incubaron bajo las condiciones antes descritas.

Luego se incubaron a 25 ± 1 °C por 5-6 días en oscuridad y luego 4 días con luz de día en una incubadora Digisystem DK-500. Se midió cada 24 h el crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos, hasta observar el traslape de hifas de ambos hongos en el papel celofán. En este momento el papel se retiró y observó al microscopio (Biológico Binocular, Modelo Xsz 206 B) con aumento de 40x, para determinar si se presentaba hiperparasitismo.

Para evaluar la capacidad antagónica o antagonismo de aislamientos nativos o foráneos de *Trichoderma* spp. se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990), para lo cual en cada tratamiento, se depositó en un extremo de cajas Petri con PDA un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo de colonias fungosas de 8 días de edad de *Fusarium* spp., y se dejaron desarrollar durante 3 días por su crecimiento lento. Posteriormente, en el otro extremo de la caja se depositaron discos de 5 mm de *Trichoderma* spp. Luego se incubaron a 25 ± 1 °C por

5-6 días en oscuridad y luego 4 días con luz de día en una incubadora Digisystem DK-500. Se midió cada 24 h el crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos.

Se comprobó de distintas formas: a) se midió el grado de micoparasitismo, mediante la escala propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004) (Cuadro 1). Además, se evaluó: a) la competencia por nutrientes y espacio, la cual se obtuvo con los radios de crecimiento de cada patógeno y antagonista en cultivo dual, junto con sus respectivos testigos, utilizando un calibrador “Pie de rey”, y b) por el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), con la fórmula utilizada por Ezziyyani *et al.* (2004), $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$, donde R1 es el radio mayor (radio patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

Cuadro 1. Escala para evaluar del grado de micoparasitismo según Ezziyyani *et al.* (2004)

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

El análisis estadístico que se utilizó fue un análisis de varianza (Anova) y prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) con el programa estadístico Infostat versión 6.12, bajo un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones que constaban de

un plato Petri como unidad experimental, y cuatro réplicas biológicas por cepa de *Trichoderma* spp. Se midió las siguientes variables: radio de crecimiento del antagonista (RCA), radio de crecimiento del patógeno (RCP), micoparasitismo (MICMO) y PICR.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de las cepas de *Trichoderma* spp. y del patógeno *Fusarium* spp. Las cepas THU-1 (Estados Unidos) y la cepa nativa THM-4 se identificaron dentro del complejo de *Trichoderma harzianum* (Figura 1). Estas cepas crecieron muy rápido en medio de cultivo PDA mostrando un aspecto polvoso. Al inicio, las colonias presentan una coloración blanco amarillento que luego se torno verde. Al microscopio, se observaron fiálides terminales en un verticilo o solitarias de forma ampuliformes, por lo general fuertemente constreñidos por debajo de la punta, y más largas que las fiálides subterminales con un conidio sucesivo en la extremidad y conidias de forma globosa a subglobosa de color verde olivo; características que concuerdan con las descritas por Chaverri *et al.* (2015) para *T. guizhouense*.

Las cepas THC-2 (Colombia) y la cepa nativa THM-3 al ser inoculadas en medio de cultivo PDA, crecieron formando anillos concéntricos, los primeros en formarse son de color verde oscuro, mientras que en los márgenes el micelio es blanco, y no se observó pigmentación amarilla. Al microscopio se observaron fiálides en forma de candelabro producidos en las puntas de las hifas, ligeramente más grandes en el medio y levemente constreñida en la base, con conidias subglobosas a elipsoidales de color verde oscuro; con clamidosporas

normalmente abundantes y subglobosas. De acuerdo con lo descrito por Samuels *et al.* (2010; 2013) las cepas THC-2 y THM-3 pertenecen a *Trichoderma asperellum* (Figura 1).

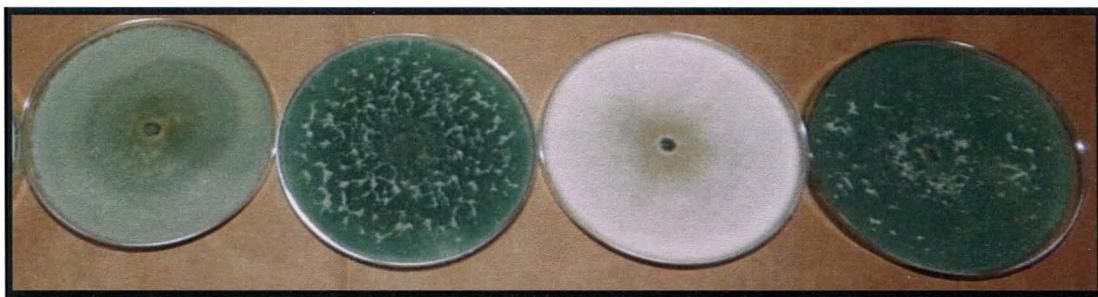


Figura 1. Aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo papa dextrosa a los ocho días. De izquierda a derecha: *T. guizhouense* (THU-1); *T. asperelloides* (THM-3); *T. asperellum* (THC-2) y *T. guizhouense* (THM-4).

A partir de plantas enfermas de tomate se aislaron dos cepas de *Fusarium* spp., los cuales se caracterizaron porque las colonias crecieron en el medio de cultivo, formando un micelio aéreo blanco, que posteriormente adquirió, en uno de los aislamientos, una coloración púrpura (F1), mientras que el otro aislamiento presentó esporodocios de coloración salmón (F2). Ambas cepas presentaron conidióforos monofiálides cortos, simples, laterales en el micelio aéreo, más tarde en forma de racimos densamente ramificados. Los macroconidios eran fusiformes, principalmente de tres septos y abundantes microconidios elipsoidales, no septados en su mayoría. Las clamidosporas eran terminales o intercalares e hialinas. Estas características concuerdan con las descritas por Burges *et al.* (1994) y Gilchrist *et al.* (2005) y las claves taxonómicas de Booth (1971), Arikan *et al.* (2001), y Seifert (1996) con *F. oxysporum*.

Por otra parte, se seleccionó la cepa F1 de *F. oxysporum* para llevar a cabo los siguientes ensayos debido a que la cepa F2, presentó problemas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo utilizados.

Caracterización molecular de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. Las secuencias de la región del factor de elongación 1- α (TEF1) obtenidas de las diferentes cepas aisladas de *Trichoderma* de los productos nativos e importados se alinearon con secuencias encontradas en el Banco de Genes (Gen Bank) (Cuadro 2), identificándose THU-1 y THM-4 con un 97% de similitud con *T. harzianum*. Mientras que en el caso de THC-2 tuvo un 99% de similitud con *T. asperellum* y el mismo porcentaje obtuvo THM-3 con *T. asperelloides* (Cuadro 3).

Cuadro 2. Identificación de las cepas de *Trichoderma* spp. nativas e importadas presentes en los productos evaluados con base en la secuencia parcial del gen TEF según Gen Bank

Producto	Similitud (%)	Identidad	Accesión Gen Bank
THU-1	97	Complejo <i>T. harzianum</i>	EF191330
THC-2	99	<i>T. asperellum</i>	KP262481
THM-3	99	<i>T. asperelloides</i>	KP696458
THM-4	97	Complejo <i>T. harzianum</i>	EF191330

Por lo que al realizar el análisis filogenético basado en los fragmentos de *tef* (figura 3) se demuestra que las cepas THU-1 y THM-4 con un valor de Bootstrap del 100% son idénticas formando un grupo monofilético dentro del complejo de *T. harzianum*. Por otra parte, en el

árbol se muestra que existe una relación entre las especies de *T. asperellum* y *T. asperelloides* con un Bootstrap de 87%, sin embargo, con un Bootstrap de 99% está un grupo de *T. asperellum* donde se encuentra la cepa THC-2 y con un Bootstrap del 100% el grupo de *T. asperelloides* y algunos aislamientos de *T. asperellum* que no se han reclasificado.

Además, se realizó otro análisis filogenético para determinar la correcta clasificación de las cepas de *Trichoderma* que en el primer análisis se agruparon dentro del complejo de *T. harzianum*, para lo cual se obtuvo que corresponden a la nueva especie identificada como *Trichoderma guizhouense* (Figura 3 y Cuadro 3).

En el caso de las cepas aisladas de *Fusarium* spp. al comparar las secuencias obtenidas de la región del gen TEF con otras en el Banco de Genes, para la cepa F1 con una similitud del 99% se identifica como *F. oxysporum* (Accesión KF574861) y para la cepa F2 se obtuvo una similitud del 98% al igual con *F. oxysporum* (Accesión KJ648634).

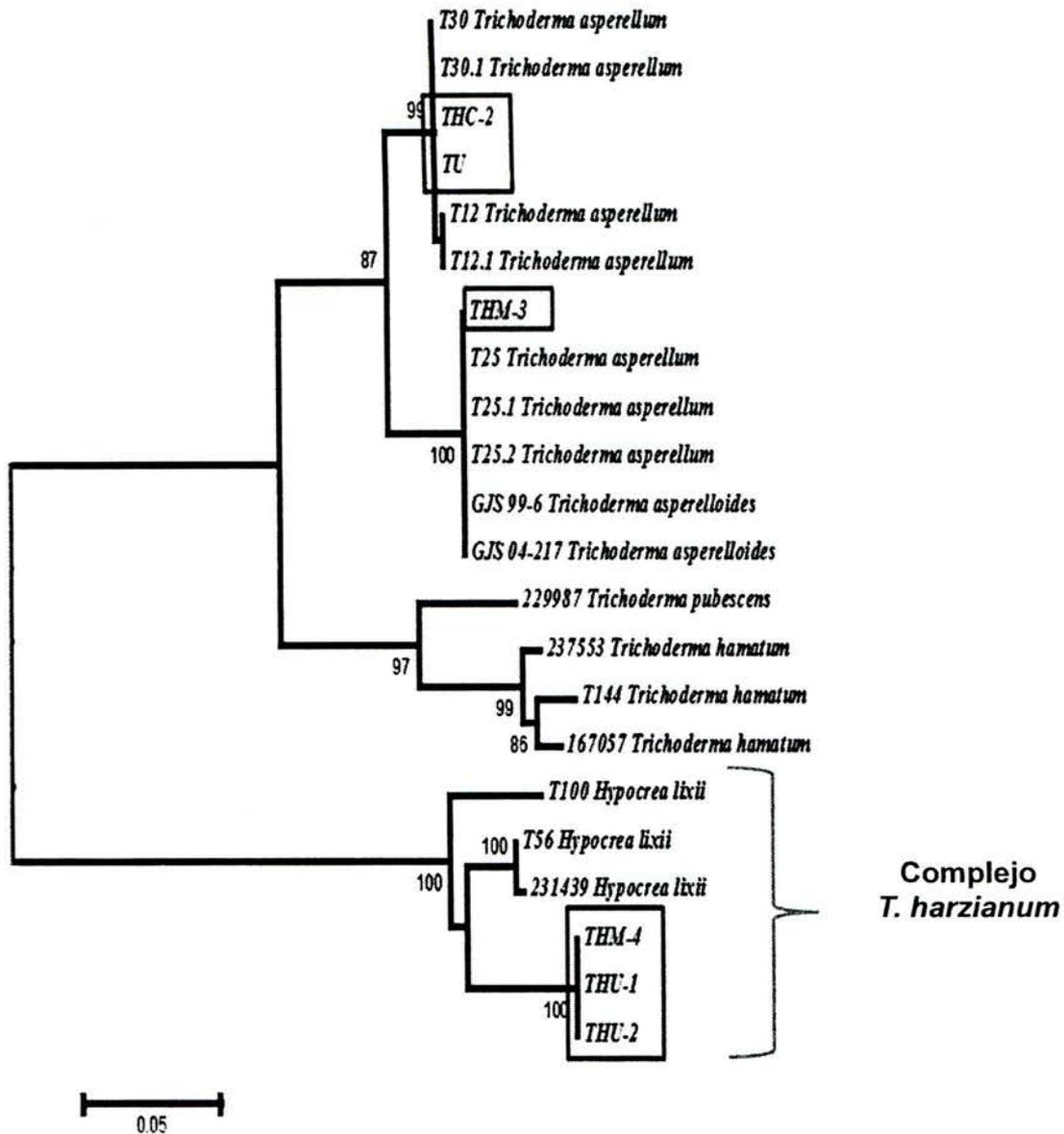


Figura 2. Relación filogenética de especies de *Trichoderma* nativas e importadas en productos comerciales con base en la secuencia del factor de elongación 1α (*tef*) gen (*eEF1a1*). Árbol construido con el programa MEGA 6 software, método Máxima Verosimilitud (ML), modelo Kimura 2-parameter y 2000 réplicas de Bootstrap. Valores de Bootstrap se indican en los nodos.

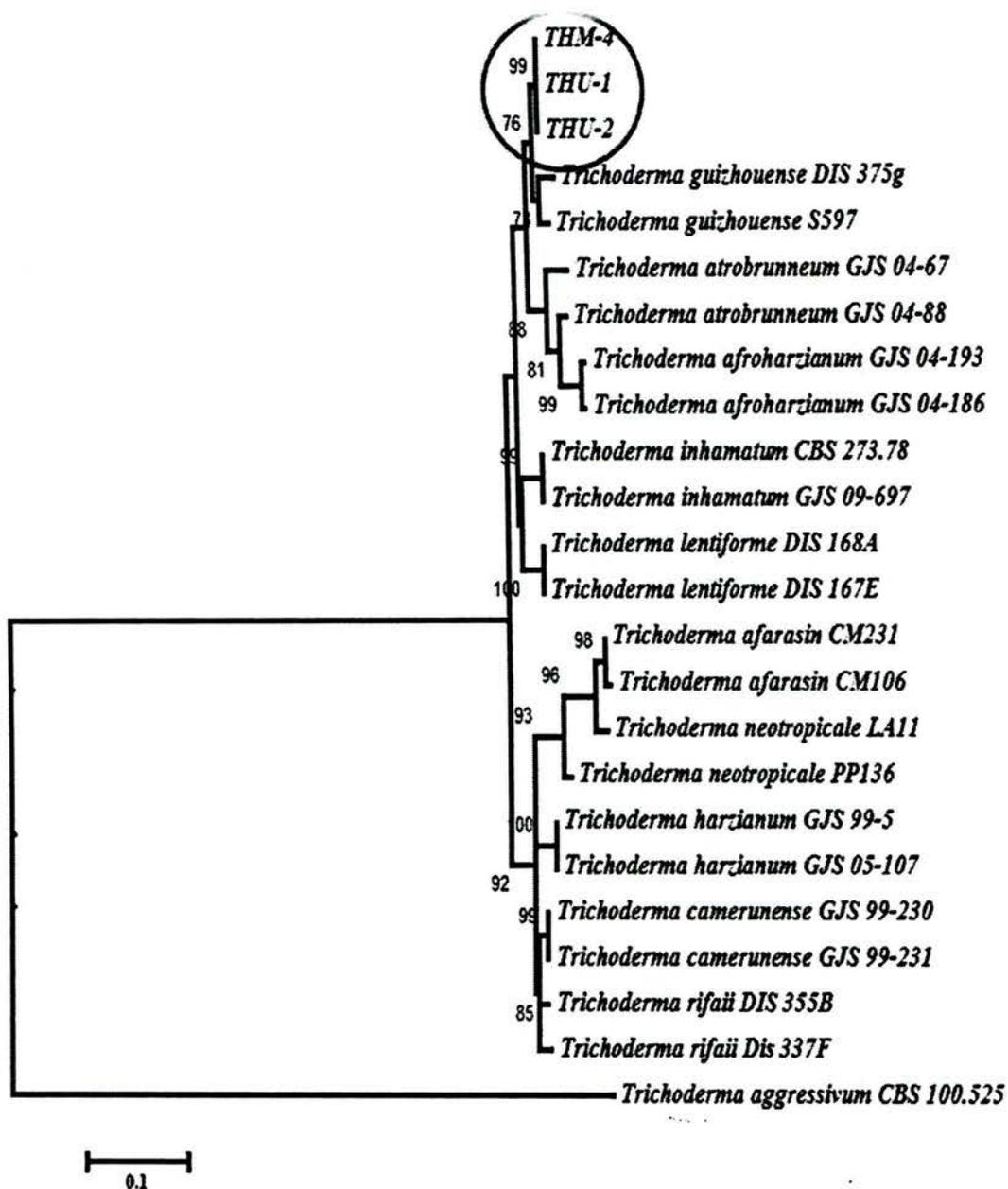


Figura 3. Relación filogenética de especies de *Trichoderma harzianum* nativas e importadas en productos comerciales con base en la secuencia del factor de elongación 1- α (TEF1) gen (eEF1a1). Árbol construido con el programa MEGA 6 software, método Máxima Verosimilitud (ML), modelo Kimura 2-parameter y 2000 réplicas de Bootstrap. Se incluyó de raíz a *T. aggressivum*. Valores de Bootstrap se indican en los nodos.

Cuadro 3. Resumen de la identificación de las cepas de *Trichoderma* spp. nativas e importadas presentes en los productos evaluados

Cepa	Producto	Identificación	Siglas
THU-1	Estados Unidos	<i>T. guizhouense</i>	Guiz-USA
THC-2	Colombia	<i>T. asperellum</i>	Aspe-Col
THM-3	Costa Rica	<i>T. asperelloides</i>	Asper-CR
THM-4	Costa Rica	<i>T. guizhouense</i>	Guiz-CR

Pruebas de antibiosis a nivel de laboratorio. Al realizarse la confrontación *in vitro* de las diferentes cepas aisladas de productos comerciales importados (Guiz-USA y Aspe-Col) y nativas (Asper-CR y Guiz-CR) de *Trichoderma* spp. frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, éstas presentaron **radios de crecimiento (RCA) superiores al patógeno (RCP)**. Observándose que el primer **contacto entre hifas del antagonista y el patógeno** fue de 3 a 4 días en la mayoría de las cepas **a excepción de la cepa Guiz-USA** que fue entre 5 a 8 días. Sin embargo, con el papel celofán solo con la cepa Guiz-USA se logró observar el traslape de hifas de ambos hongos, ya que **para las demás cepas de *Trichoderma* spp.** en la mayoría de los casos el antagonista no permitió que el patógeno creciera lo suficiente para alcanzar la mitad de la caja Petri, donde se encontraba el papel celofán.

Los mayores radios de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sp. fueron Aspe-Col (Colombia), Asper-CR y Guiz-CR (nativas) con 39,3, 41,2 y 32,1 mm respectivamente

(Figura 4A). Cabe destacar que las cepas del antagonista llegaron a tener un radio de crecimiento muy cercano al de los respectivos tratamientos testigos, de manera que a los ocho días del ensayo en todos los casos lograron cubrir totalmente la superficie de la caja Petri con 42,75 mm de radio (100%).

Por otra parte, los radios de crecimiento del patógeno (Figura 4B) en casi todos los tratamientos estuvieron por debajo del testigo que alcanzó un crecimiento de 25,05 mm; no obstante, el tratamiento que contenía la cepa Guiz-USA (proveniente de Estados Unidos) tuvo poco efecto sobre el desarrollo del patógeno con un RCA de 23,95 mm cercano al testigo (Figura 4B) y el menor RCA (Figura 4A).

Al observar las figuras 5 y 6 de la prueba de micoparasitismo existiendo diferencias significativas ($P \leq 0,0001$), se muestra que las cepas Aspe-Col y Guiz-C, lograron alcanzar el grado 4, la Asper-CR obtuvo un 3,6, logrando una invasión total de la superficie de la colonia del patógeno y esporular sobre ella; mientras que la Guiz-USA solo obtuvo 1 grado, invadiendo un 1/4 de la superficie de la colonia de *F. oxysporum*.

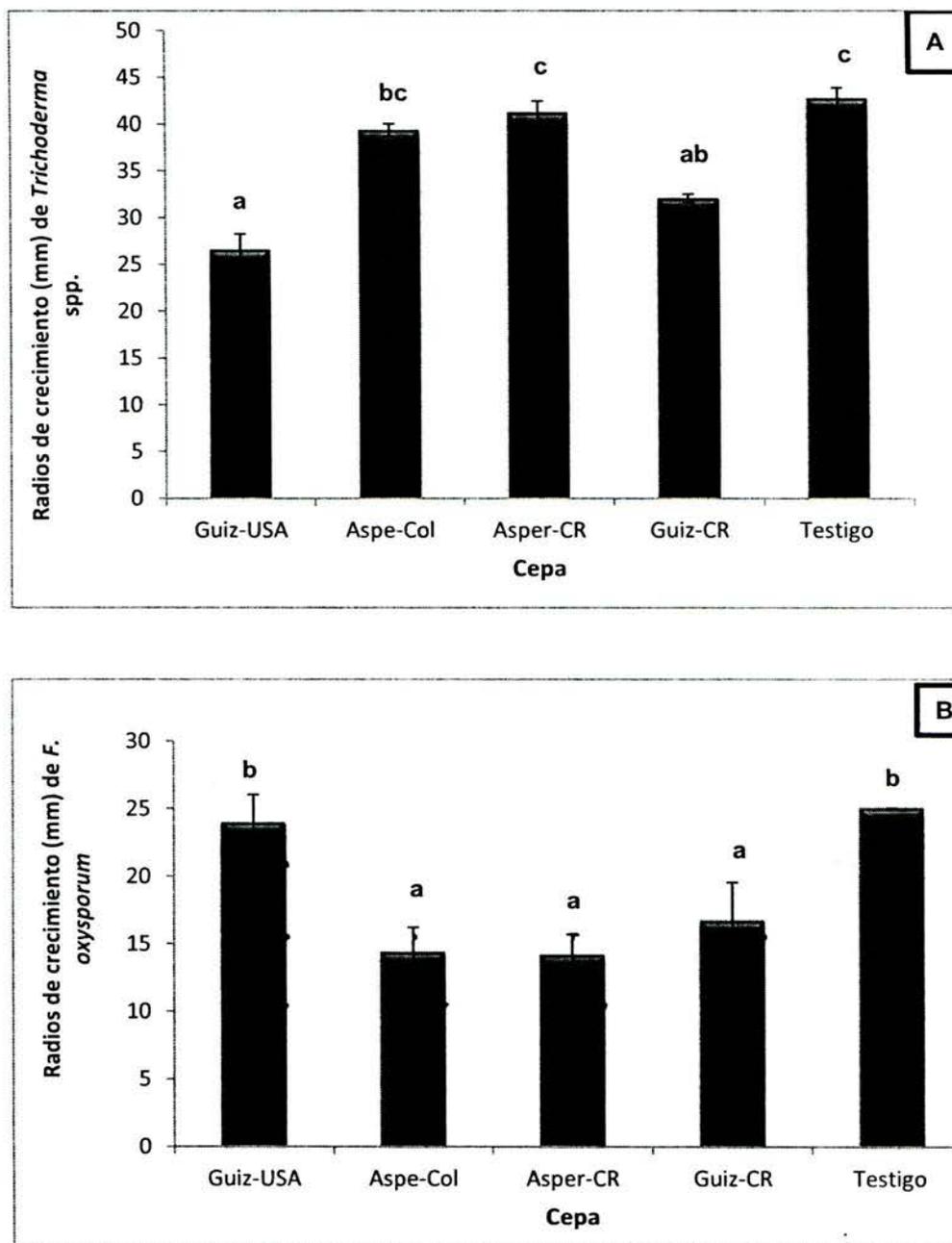


Figura 4. Radios de crecimiento del antagonista (A) y del patógeno (B), correspondientes a cultivos duales de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp., frente a *Fusarium oxysporum*, al octavo día de evaluación. Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey $P=0.05$. Las barras verticales representan el error estándar. Todos los testigos alcanzaron el máximo crecimiento.

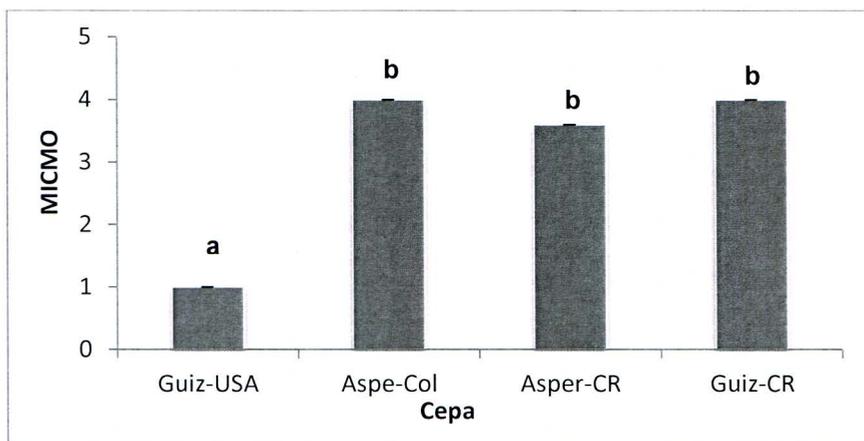


Figura 5. Grado de micoparasitismo (MICMO) correspondiente a cultivos duales de los distintos aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum*, al octavo día de evaluación. Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey $P=0.05$. Las barras verticales representan el error estándar.

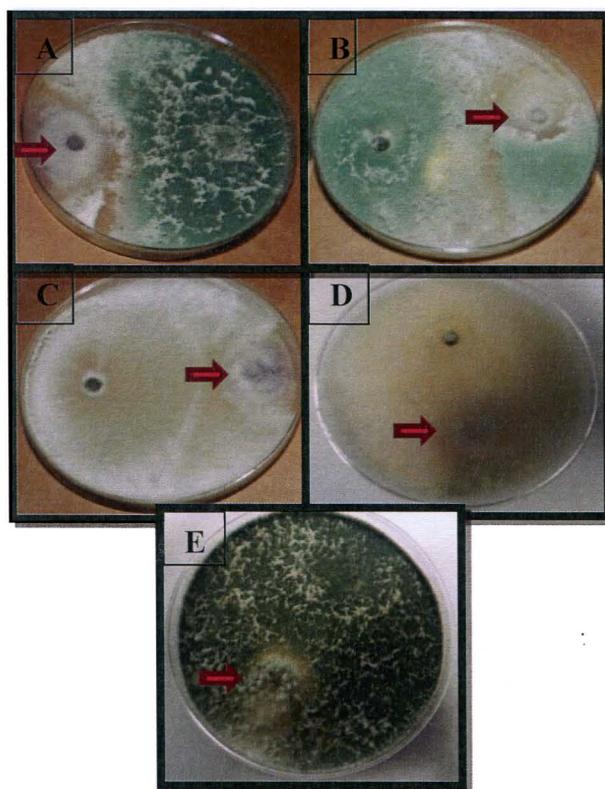


Figura 6. Cultivos duales de los distintos aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* para graficar el grado de micoparasitismo (MICMO) correspondiente, según la escala de capacidad antagónica: (A) 0= ninguna invasión, (B) 1= Invasión de 1/4, (C) 2= Invasión de 1/2, (D) 3= Invasión total, (E) 4= Invasión total con esporulación sobre ella (Ezziyyani *et al.* 2004). Flechas rojas indican al patógeno.

Al determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), la mayoría de los tratamientos lograron superar el 50% de inhibición del crecimiento radial del patógeno *F. oxysporum* (Figura 7). Se encontró diferencias significativas entre cepas ($P \leq 0.0001$), donde las más efectivas fueron Asper-CR, Aspe-Col, Guiz-CR con 67%, 63%, 59% de inhibición respectivamente, mientras que con el Guiz-USA solo alcanzó un 44%.

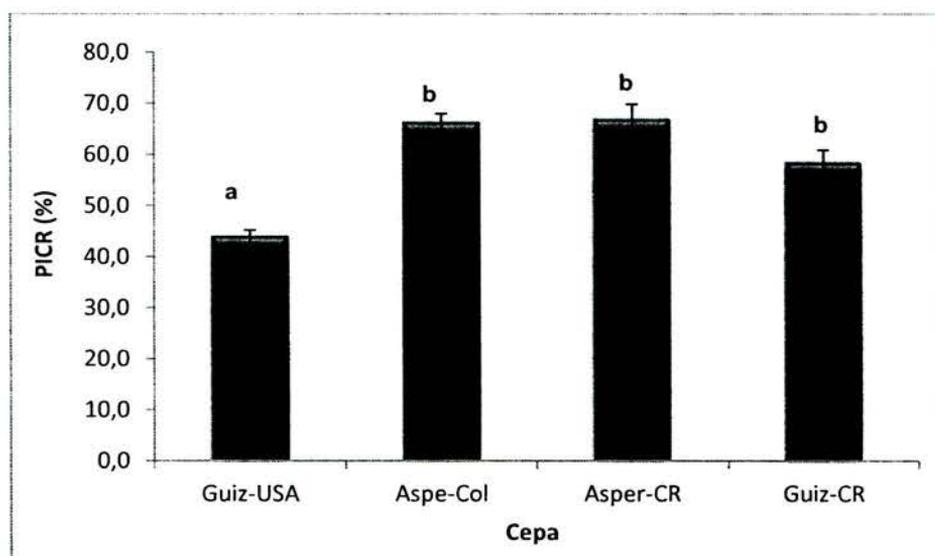


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), correspondiente a cultivos duales de los diferentes aislamientos de especies de *Trichoderma* de productos comerciales importados y nativos frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, al octavo día de evaluación. Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey $P < 0.05$. Las barras verticales representan el error estándar.

DISCUSIÓN

Trichoderma es un grupo monofilético (Kullnig *et al.* 2002), con teleomorfos en el género *Hypocrea* o relacionados con Hypocreales. Estudios sobre la conexión entre teleomorfos – anamorfos tiende a demostrar características morfológicas traslapadas entre especies en los anamorfos del género *Trichoderma* (Chaverri y Samuels 2003). En consecuencia, las diferencias morfológicas no son indicadores fiables del grado de divergencia genética entre las especies y observaciones morfológicas, solas no son suficientes para la identificación precisa de las especies.

En este estudio se identificaron las diferentes cepas aisladas de productos comerciales importados, así como, dos cepas aisladas de cultivos en Costa Rica, por lo tanto la cepa Guiz-USA y la cepa nativa, proveniente de Cartago, Guiz-CR se identificaron como *Trichoderma guizhouense*, la cual es una especie del complejo *Trichoderma harzianum*, la cual fue descrita por Chaverri *et al.* (2015). Además, es importante tomar en cuenta que el producto utilizado de Estados Unidos (Guiz-USA) dice contener *T. harzianum*, sin embargo, según este trabajo la especie no correspondía, lo cual al comparar con el estudio realizado por Chaverri y colaboradores (2015), quienes al revisar la taxonomía de las especies del complejo de *Trichoderma harzianum* empleando el factor de elongación 1- α (TEF1) y analizar cepas de productos comerciales utilizados para biocontrol, determinaron que la mayoría de estos productos presentan una errónea identificación de la especie de *Trichoderma* que se están utilizando, ya que productos como el Promot dice contener *T. harzianum* cuando en realidad

es *T. guizhouense* u otros productos que utilizan la cepa T22 de “*T. harzianum*” y en realidad es *T. afroharzianum*.

Además, de las características moleculares evaluadas para determinar especies de *Trichoderma* es importante la parte de ecología y distribución geográfica de especies, ya que se considera que *Trichoderma harzianum* se encuentra en Europa y Norte América, con un reporte en Colombia por Hoyos *et al.* (2009), en hábitats en su mayoría de suelo (Al-Sadi *et al.* 2015), también del compost de setas y en ocasiones endófitos en tallos y posiblemente es fungícola. Mientras que *T. guizhouense* es posiblemente cosmopolita y se encuentra en África (Camerún, Ghana), Europa (Croacia, Grecia, Italia y España) y Asia (Indonesia, Japón). El hábitat es similar a *T. harzianum* (Chaverri *et al.* 2015).

En el caso de las cepas Aspe-Col y la cepa nativa Aspe-CR (San Carlos) según la morfología se identificaron como *Trichoderma asperellum* (Figura 1), sin embargo, al realizar los análisis moleculares de las secuencias del factor de elongación 1- α (TEF1) se identificó la cepa nativa THM-3 como *T. asperelloides* (Figura 2). En un estudio realizado por Samuels *et al.* (2010) nombran a esta nueva especie segregándola a partir de *T. asperellum*, donde aclara que esta especie nueva puede no ser diferenciada por su fenotipo, biología o biogeografía. Además, que las características morfológicas son muy similares entre las dos especies, pero es más común encontrar a *T. asperellum*. Es por ello que aún todavía se encuentren aislamientos de *T. asperellum* que no se hayan re-identificado como *T. asperelloides*, como se observa en el árbol de las relaciones filogenéticas (Figura 3) o que no existe todavía una buena separación de los linajes, ya que posiblemente *T. asperelloides* derivó de *T. asperellum*. La diversidad sugiere que *T. asperellum* se originó por

recombinación, mientras que *T. asperelloides* parece ser clonal. Debido a estos estudios recientes en la taxonomía de muchas especies de *Trichoderma* es que muchos productos utilizados a nivel mundial han tenido que ser estudiados para reclasificar las especies que se están realmente aplicando en los cultivos, por ejemplo el producto de la India, TNAU que contiene *T. viride* es *T. asperelloides* (Mukherjee *et al.* 2013).

En cuanto a las pruebas de antagonismo *in vitro* se pudo observar que variaron los tiempos para el contacto entre hifas de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y las de *F. oxysporum*; aunque al patógeno se le dio tres días de ventaja por su lento crecimiento, demostró mayor agresividad el antagonista *Trichoderma* spp. Al comparar con otros estudios estos resultados son muy similares a los reportados por Michel (2001), quién encontró valores al primer contacto entre cepas nativas de *Trichoderma* spp. y *F. oxysporum* (Fo) de 3 a 6 días y con *F. subglutinans* (Fs) de 3 a 10; mientras que, Solano (2004) de 3 a 4 días con *F. oxysporum* y de 2 a 3 con *F. subglutinans*. De la misma manera Michel y colaboradores (2005b), reportaron entre 5 y 7 días para el contacto de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Según, Michel y colaboradores (2009) indican que entre menor sean los días al contacto, es mayor la agresividad que existe por parte del hongo antagonista y menor la resistencia del fitopatógeno. La colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, ya que se reduce o se detiene el desarrollo del micelio por completo del otro hongo (Dennis y Webster 1971).

En cuanto a los radios de crecimiento de las colonias tanto del patógeno como de las cepas del antagonista, se logró encontrar diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) entre las cepas de *Trichoderma* spp. nativas y las importadas de otros países frente al patógeno *F. oxysporum*,

el mayor antagonismo corresponde a las cepas Aspe-Col (*T. asperellum*) y Asper-CR (*T. asperelloides*) y la cepa de *T. guizhouense* (Guiz-CR) (Figura 3 A y B), estos resultados son similares a los presentados en un estudio de confrontación *in vitro* de cepas de *T. harzianum* vs. *F. solani* realizado por Suárez *et al.* (2008). Este mayor crecimiento por parte de las cepas de *Trichoderma* podría deberse a que presentan una mayor tasa de incorporación de nutrientes, metabolismo y un crecimiento superior a *F. oxysporum*, utilizando distintos mecanismos como secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xilasas y muchas veces las proteasas, las cuales pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiéndole al antagonista aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos disponibles (Zeilinger y Oman 2007; Vinale *et al.* 2008; Rojan *et al.* 2010).

De acuerdo a la clasificación del micoparasitismo mediante la escala (Figura 4 y 5) se demuestra que a nivel de laboratorio tanto *Trichoderma asperellum*, *T. asperelloides* como *T. guizhouense* pueden ejercer su antagonismo frente a *Fusarium oxysporum*, pero que existen diferencias entre cepas de la misma especie *T. guizhouense* como es el caso de Guiz-USA (grado 1) y Guiz-CR (grado 4). Si comparamos con otros estudios que emplearon una escala de clasificación de antagonismo similar a la de este estudio de Bell y colaboradores (1982), donde 1=*Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, 2= *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio, 3= *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro, 4= el patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* y 5= el patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa la superficie total del

medio. Michel (2005a) reportaron contra Fs y Fo clases de antagonismo 1, 2 y 3; obteniendo menor número de cepas con antagonismo 1 con Fo. En otro ensayo se clasificó el antagonismo de 20 cepas de *Trichoderma* contra Fo y todas resultaron ser clase 1 (Michel 2005b), lo cual corresponde al grado 4 de este ensayo según la escala de Ezziyyani y colaboradores (2004). Mientras que, esas mismas cepas de *Trichoderma* contra *Sclerotium rolfsii* Sacc., solo 3 fueron clase 1 y 2, y en las demás cepas, el patógeno fue más agresivo.

Se debe tener presente que el complejo proceso de micoparasitismo consiste de muchos eventos desde el reconocimiento del hospedero, el ataque y la subsecuente penetración y muerte. Durante el proceso, *Trichoderma* secreta enzimas que degradan la pared celular del otro hongo. Además, por la secreción de exoenzimas hidrolíticas disminuyen el crecimiento y la actividad del patógeno (Vinale *et al.* 2008; Brunner *et al.* 2003; Harman 2006; 2008).

Al determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), la mayoría de los tratamientos lograron superar el 50% de inhibición del crecimiento radial del patógeno *F. oxysporum* (Figura 6). Aunque *Trichoderma guizhouense* es menos efectiva para combatir al patógeno, la cepa nativa (Guiz-CR) presenta más eficacia que la importada. Según Ploetz (2004), la especificidad de las especies de *Trichoderma* en la eficacia del combate de *Fusarium oxysporum* son contradictorios, y la mayoría se refieren a la eficiencia de los ensayos *in vitro* o invernadero bajo condiciones controladas, y por lo tanto, dichos resultados no se pueden generalizar a todas las especies y cepas aisladas de *Trichoderma*. Además, el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. pueden deberse a que liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles, que producen un efecto de antibiosis (Cardoza *et al.* 2005; Webster y Weber 2007; Shores *et al.* 2010).

En conclusión, se encontraron diferencias morfológicas y genéticas entre las cepas nativas de Costa Rica y las importadas en productos comerciales para el hongo *Trichoderma* spp., por lo tanto, es necesario realizar otros estudios moleculares que permitan obtener mayor respuesta a las posibles diferencias genéticas intra-específicas para este género. Mientras que, en las pruebas *in vitro* existen diferencias en la capacidad antagonica de las diferentes especies de *Trichoderma* frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, ya que las cepas de *T. asperellum*, *T. asperelloides* y la cepa nativa de *T. guizhouense* mostraron ser más agresivas en el combate del patógeno, independiente de su procedencia, por lo que se podría ampliar el estudio con más aislamientos.

Literatura citada

- Al-Sadi A., Al-oweisi F., Edwards S., Al-Nadabi H., Al-Fahdi A. 2015. Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. BMC Microb. 15(147): 2-11.
- Agrios G. 2005. Plant pathology. 5ta ed. Elsevier Academic Press. UK. 948 pp.
- Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Miller W., Lipman D. 1997. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids. Res. 25: 3389-3402.
- Arikan S., Lozano M., Paetznick V., Rex J. 2001. *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agent Chemother 45: 327-30.

- Bell D., Well H., Markham C. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. CAB, CMI. England. pp. 46-49, 157-159.
- Brunner K., Peterbauer C. K., Mach R. L., Lorito M., Zeilinger S., Kubicek C. P. 2003. The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43: 289-295.
- Burges B., Ummerell S., Bullock K., Gott J., Backhouse P. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. University of Sydney and Botanic Gardens, Department of Crop Science, *Fusarium* Research Laboratory, Sydney, Australia. 191 p.
- Caravaca P. 2008. Boletín 1: Tomate de Costa Rica. Subgerencia de Desarrollo Agropecuario, Dirección General Mercadeo y Agroindustria. [En línea]. Consultado: 15 de febrero, 2011. (<http://www.mercanet.cnp.go.cr>).
- Cardoza R. E., Hermosa M. R., Vizcaíno J. A., Sanz L., Monte E., Gutiérrez S. 2005. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. pp. 1-22. En: E. Mellado, J. Barredo. (eds). *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol*. Research Signpost, Kerala, India. 320 p.
- Chairman E., Bird G., Fisher K., Hickey K., Lewis F., Line R., Rickard S. 1978. Methods for evaluating plant fungicides, nematocides and bactericides. The American Phytopathological Society. USA. 141 p.
- Chaverri P., Samuels G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (*Ascomycota*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*): species with green ascospores. *Stud. Micol.* 48: 1-116.
- Chaverri P., Branco F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb T., Samuels G. 2015. Systematic of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycología* 107(3): 558-590.

- Chaverri P., Samuels G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud. Mycol.* 48, 1–116.
- Chérif M., Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80:1406-1414.
- Córdoba M. 2003. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Trichozam® (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral® (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate. Tesis. Universidad Zamorano, Honduras. 43 p.
- Dennis C., Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III: Hyphal interactions. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 363-369.
- Ellis D. 2006. The University of Adelaide Australia. Mycology [En línea]. Consultado: 22 de agosto, 2011. Disponible en http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions.
- Ezziyani M., Pérez S., Requena M., Rubio L., Candela M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Ann. de Biol.* 26: 69-78.
- Geiser D., Jiménez M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T., Zhang N., Kulda G., O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Europ. J. Plant. Pathol.* 110: 473-479.
- Gilchrist L., Fuentes C., Martínez R., López E., Duveiller R., Singh M., Henry I., García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2 edición. México, D. F.: CIMMYT. 260 p.
- Gupta V., Schmoll M., Herrera A., Upadhyay R. Druzhinina I., Tuohy M. 2014. *Biothecnology and biology of Trichoderma*. Elsevier. Estados Unidos. 549 p.

- Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Series* 41: 95-98.
- Harman G. E. 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman G. E., Bjorkman T., Ondik K., Shores M. 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outl. Pest. Manag.* 19:24–29.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El-Mahjoub M. 2005. Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 9:163-171.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Hamada W., El-Mahjoub M. 2006. Bio-fungicides as an alternative for tomato *Fusarium* crown and root rot control. *Tunisian J. Plant. Protec.* 1: 19-29.
- Howell C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant. Dis.* 87:4–10.
- Hoyos L., Orduz S., Bissett J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from neotropic regions. *Fung. Genet. Biol.* (45):615-631.
- Jiménez C., Sanabria A. 1997a. Evaluaciones *in vitro* de siete fungicidas para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Fitop. Venez.* 10 (1):32- 37.
- Jiménez C., Sanabria A. 1997b. Control biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Fitop. Venez.* 10(1):38-42.
- Komoda H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant. Res.* 8: 114-125.

- Kullnig C., Szakacs G., Kubicek C. 2002. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* – a multigene approach. *Mycol. Res.* 106, 757– 767.
- Michel A., Rebolledo O., Lezama R., Ochoa M., Mesina J., Samuels G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Rev. Mex. Fitop.* 19:154-160.
- Michel A., Otero M., Rebolledo O., Lezama R., Ariza R., Barrios A. 2005a. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Rev. Chapingo, Serie Horticultura* 11:273-278.
- Michel A., Reyes A., Otero M., Rebolledo O., Lezama R. 2005b. Potencial Antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. *Rev. Mex. Fitop.* 23:284-291.
- Michel A., Otero M., Solano L. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.). *Rev. Mex. Fitop.* 27 (1): 18-26.
- Montealegre J., Herrera R., Velásquez J., Silva P., Besoain X., Pérez L. 2005. Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarization. *J. Biotech.* 8 (3): 249-257.

- Mukherjee P., Mukherjee A., Kranthi S. 2013. Reclassification of *Trichoderma viride* (TNAU), the most widely used commercial biofungicide in India, as *Trichoderma asperelloides*. *Open Biotech. J.* 7: 7-9.
- Nelson E.B. 1991. *Handbook of Applied Mycology*. New York, USA. pp. 327- 355.
- O'Donnell K., Kistler H., Cigelnik E., Ploetz R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. of the Nat. Acad. of Scien. of the USA.* 95: 2044–2049.
- Papavizas G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biological control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 332-349.
- Ploetz R. C. 2004. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96:653-656.
- Rojan J., Tyagi R., Prévost D., Brar S., Pouleur S., Surampalli R. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop. Prot.* 29: 1452-1459.
- Samuels G., Chaverri P., Farr D., McCray E. 2013. *Trichoderma* online, systematic mycology and microbiology Laboratory, ARS, USDA. [En línea] Revisado el 28 de julio, 2013. En: taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.
- Samuels G., Ismaiel A., Bon M., Respini S., Petrini O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycología* 102(4): 944-966.
- Seifert K. 1996. Fuskey. *Fusarium* interactive key. Agriculture and agifood Canada. [En línea]. Consultado: 20 de agosto, 2010. Disponible en <http://www.ctu.edu.vn/colleges/agri/gtrinh/fuskey.pdf>.

- Shoresh M., Harman G., Mastouri F. 2010. Induce systematic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21-43.
- Shoukouhi P., Bissett J. 2008. PReferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1). <http://www.isth.info/methods>.
- Solano P. 2004. Control biológico de la escoba de bruja del mango con *Trichoderma* spp. Tesis de Licenciatura. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Centro de Estudios Profesionales. México. 82 p.
- Suárez C., Fernández R., Valero N., Gámez R., Páez A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Rev. Colom. Biotec.* 10(2): 35-43.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molec. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Thompson J., Higgins D., Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.* 22: 4673-4680.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E., Marra R., Woo S., Lorito M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1-10.
- Webster J., Weber R. 2007. *Introduction to Fungi*. 3^{er} ed. Cambridge University Press. UK. 841 pp.
- Zeilinger S., Oman, M. 2007. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regul. Syst. Biol.* 1: 227-234.

CAPÍTULO III

RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE INOCULADAS CON DIFERENTES CEPAS DE *TRICHODERMA* SP. EN EL COMBATE DE *FUSARIUM OXYSPORUM* A NIVEL DE INVERNADERO

RESUMEN

El objetivo del ensayo fue evaluar la respuesta biológica de plantas de tomate inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el combate de *Fusarium oxysporum* a nivel de invernadero. Se utilizaron las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de productos comerciales de Estados Unidos (Guiz-USA) y de Colombia (Aspe-Col) y las nativas (Asper-CR y Guiz-CR). También se aisló la cepa de *F. oxysporum* de plantas de tomate enfermas. Se utilizaron plantas de tomate de la variedad Montaña, se realizó un almácigo que luego se transplantó a macetas en el invernadero y se les aplicó el inóculo de *F. oxysporum* (5×10^6 esporas/mL) y al siguiente día se inocularon los tratamientos con *Trichoderma* spp. (12×10^9 esporas/mL). Las variables analizadas fueron: a) número de hojas, b) porcentaje de clorosis, c) porcentaje de hojas marchitas, d) incidencia, e) longitud de raíz y f) biomasa seca. Según los resultados obtenidos, al tratar las plantas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum*, con los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp., se obtuvieron porcentajes de incidencia de 0% con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR), 53,3% con *T. guizhouense* (Guiz-USA) y un 40% para Guiz-CR, mientras que, en el testigo la incidencia fue de un 96%. Las plantas que se inocularon con las diferentes cepas de *Trichoderma* mostraron un mejor desarrollo, ya que presentaron una cantidad de hojas significativamente mayor ($P < 0.0001$) que el tratamiento testigo. En el caso de la longitud de raíz, las plantas tratadas con la cepa nativa de *T. asperelloides* mostraron una longitud significativamente mayor de 39,0 cm. en promedio, en comparación con la cepa de Colombia que obtuvo un 24,4 cm. de longitud. En conclusión, se demostró que las diferentes especies de *Trichoderma* utilizadas para el combate biológico de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate ejercen una buena respuesta biológica directa al mejorar el vigor y robustez de las plantas, e indirecta al disminuir la infección por este fitopatógeno.

ABSTRACT

The present study evaluates the biological response of tomato plants inoculated with *Trichoderma* spp. strains against the pathogen fungus *Fusarium oxysporum* in greenhouse conditions. Strains of *Trichoderma* spp. obtained from commercial products from abroad (Guiz-USA and Aspe-Col), as well as, local strains (Asper-CR and Guiz-CR) were tested. Strains from the pathogen fungus *F. oxysporum* were isolated from infected plants (variety “montaña”) and inoculated (5×10^6 spores ml^{-1}) in seedlings from the same tomato variety grown in nursery conditions. Inoculated seedlings with *F. oxysporum* were transplanted to individual gardening pots and kept in greenhouse conditions. Those seedlings were inoculated again the following day with *Trichoderma* spp. (12×10^9 spores ml^{-1}). The following variables were measured in adult plants: a) number of leaves, b) percent of leaf chlorosis, c) percent of withered leaves, d) incidence, and e) dry accumulated biomass. Tomato plants inoculated with *Trichoderma* treatment showed a better development than control plants. Plants treated with *Trichoderma* strains significantly ($P < 0.0001$) developed more leaves. However, there were no significant differences between treatments containing the same species of *Trichoderma*, but between different species. Plants inoculated with local *T. asperelloides* strains were in average significantly taller (39.0 vs. 24.4 cm) than plants inoculated with *T. asperellum* strains from Colombia. Incidence in inoculated plants with *F. oxysporum* was null in treatments with *T. asperellum* (Aspe-Col) and *T. asperelloides* (Asper-CR) but it amounted to 53.3% in *T. guizhouense* (Guiz-USA) and 40% in Guiz-CR. Incidence in the control treatment was 96%. In conclusion, different *Trichoderma* species used in biological control of *Fusarium oxysporum* in tomato plants had a direct positive response by increasing plant vigor and robustness, and indirect by reducing the infection by the plant pathogen.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los vegetales más ampliamente consumidos en el mundo, representa el 14% de la producción mundial, con 120 663 000 toneladas por año (Moreno *et al.* 2009). En Costa Rica, se producen 58 560 toneladas métricas al año, registrándose un consumo aproximado de 20 Kg. por persona por año, por lo tanto, es un producto importante en la dieta de los costarricenses (López 2012).

La marchitez vascular del tomate, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se encuentra distribuida en todo el mundo causando grandes pérdidas en el cultivo. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de al menos seis años. Es favorecido por temperaturas cálidas asociadas a alta humedad relativa. El hongo penetra en la planta a nivel del suelo ya sea por el tallo o por las raíces superficiales y luego es trasladado por haces vasculares a toda la planta (Shoresh *et al.* 2010).

Las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos causan pérdidas severas en la agricultura (Rey *et al.* 2000); estas mermas consisten en la reducción de la calidad y/o la cantidad de la cosecha obtenida (Monte 2001). La forma tradicional para el combate de las enfermedades en cultivos es la aplicación de productos químicos, pero debido a su composición resultan tóxicos e inespecíficos, ya que además de eliminar los organismos fitopatógenos, dañan la flora del suelo (Vinale *et al.* 2008). Por ello, es necesaria la búsqueda de alternativas orientadas al manejo de agentes antagonistas que sean eficientes y compatibles con el ambiente (Cupull *et al.* 2003).

Trichoderma spp. como algunos otros microorganismos empleados para el combate de enfermedades, no solo actúa sobre los fitopatógenos; también puede tener efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, lo cual, en última instancia, reduce los efectos de la enfermedad (Harman 2006; Woo *et al.* 2006; Hoyos 2011). Diversas especies de *Trichoderma* spp. son utilizadas en la agricultura para el manejo de fitopatógenos, ya que limitan el desarrollo de hongos dañinos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* (González *et al.* 2005). Los mecanismos empleados por *Trichoderma* spp. son la competencia, la antibiosis o el hiperparasitismo; en este último caso, se adhiere a las hifas de los fitopatógenos por medio de estructuras especializadas llamadas apresorios y libera enzimas (glucanasas, quitobiosas y quitinasas) y antibióticos (viridina, gliotoxina, gliovirina y peptaiboles) (Howell 2003; Stewart y Hill 2014).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta biológica de plantas de tomate inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el combate de *Fusarium oxysporum* a nivel de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. EL ensayo se realizó en el invernadero del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Cepas utilizadas. Se utilizaron cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de productos comerciales de Estados Unidos (Guiz-USA) y de Colombia (Aspe-Col) y las nativas (Asper-CR y Guiz-

CR), además de una cepa de *Fusarium oxysporum* aislada de plantas de tomate enfermas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos de *Trichoderma* spp. evaluados en suelo inoculado con *Fusarium oxysporum* y sembrado con plantas de tomate

Tratamiento	<i>Fusarium oxysporum</i> (5×10^6 esporas/ mL)	<i>Trichoderma</i> spp. (12×10^9 esporas/mL)
Guiz-USA	F-01	<i>T. guizhouense</i>
Aspe-Col	F-01	<i>T. asperellum</i>
Asper-CR	F-01	<i>T. asperelloides</i>
Guiz-CR	F-01	<i>T. guizhouense</i>
(Testigo)	F-01	-

Ensayo invernadero. Se llevó a cabo con plantas de tomate de la variedad Montaña. Las semillas fueron sembradas en sustrato Peat Moss (previamente esterilizado) en bandejas de plástico negro con capacidad para 100 plántulas. La bandeja permaneció durante tres días en un cuarto oscuro, para inducir la germinación y posteriormente, se trasladó al invernadero durante 21 días.

El suelo que se utilizó para la siembra de las plantas de tomate en macetas de 375 cm^3 de volumen fue traído de la Finca Guadalupe, el cual fue esterilizado a una temperatura de 121°C durante 60 minutos en una autoclave por dos días consecutivos, para eliminar la mayoría de organismos vivos. El transplante se realizó 25 días después de la siembra del almácigo.

Inoculación de los hongos. El inóculo de *F. oxysporum* se elaboró licuando, durante tres segundos, el contenido de 7 cajas Petri de cultivo puro de las cepas de *F. oxysporum* sembradas en PDA, y fue diluido en 1L de agua estéril. Seguidamente, con ayuda de una pipeta Pasteur se extrajo una alícuota de la solución previamente agitada y se realizó el conteo de conidias utilizando un hematocitómetro y un microscopio de luz con magnificación de 40X, para determinar la concentración de conidias por mililitro, la cual fue de 5×10^6 esporas/mL.

El suelo contenido en cada maceta fue inoculado con 100 ml del inóculo de *F. oxysporum* tres días antes del transplante, el que se mantuvo con una humedad constante en las macetas para facilitar la colonización del patógeno. En el momento del transplante de las plantúlas, con una espátula, se realizaron 5 incisiones en el suelo cerca de las raíces de las plantas ocasionándose lesiones para facilitar la entrada al patógeno.

Al día siguiente del transplante de las plantúlas de tomate a las macetas, se llevaron a cabo las inoculaciones de los tratamientos con *Trichoderma* spp., para lo cual se aplicaron 20 ml de una suspensión de 12×10^9 esporas/ml por maceta (Cuadro 2).

Diseño experimental y análisis de datos. Se usó un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento (la unidad experimental fue de 5 plantas por repetición), tanto para la incidencia de la enfermedad, como para la altura y biomasa seca total. Los resultados de altura y biomasa seca se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el programa estadístico Infostat

versión 6.12. Las variables que se evaluaron de acuerdo a escalas se analizaron por medio de una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis, $P < 0.05$) utilizando el programa estadístico Infostat versión 6.12.

Las variables que fueron analizadas a los 68 días después de sembradas las plantas (dds), fueron las siguientes:

- a) Número de hojas
- b) Porcentaje de clorosis en las hojas (Cuadro 2)
- c) Porcentaje de hojas marchitas (Cuadro 2)

Cuadro 2. Escala modificada para la evaluación del porcentaje de clorosis y marchitez en las hojas de las plantas de tomate afectadas por *Fusarium oxysporum* (Marlatt *et al.* 1996)

Escala	Porcentaje (%)	Intensidad de la enfermedad
0	0	No presentan síntomas.
1	10-25	Clorosis leve, marchitamiento de la planta en el 1/3 inferior
2	25-50	Clorosis moderada y marchitamiento de la planta en los 2/3 inferior
3	50-80	Clorosis severa, marchitez de la planta en los 3/3
4	85-100	Muerte de la planta

RESULTADOS

De acuerdo con el cuadro 3, se puede observar que al tratar las plantas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum*, con los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sp., se logró un buen combate del patógeno, ya que se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la evaluación de la incidencia de la enfermedad de acuerdo con los tratamientos evaluados, es decir un 0% con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR), para los tratamientos con *T. guizhouense* fue de un 60% (Guiz-USA) y un 40% para Guiz-CR, mientras que en el testigo la incidencia fue de un 93%. Además, como se muestra en el cuadro 3 y figura 1, en cuanto a las variables clorosis y marchitamiento, los mejores tratamientos fueron el Aspe-COL y el Asper-CR, mientras que, el testigo obtuvo un porcentaje de entre un 50-80% (grado 3), ya que las plantas de tomate mostraban un daño severo.

Cuadro 3. Medianas de las variables evaluadas mediante escalas y porcentaje de incidencia de plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. nativas e importadas

Tratamientos	Clorosis y marchitez* (°)	Incidencia** (%)
GUIZ-USA	2bc (52,60)	60bc
ASPE-COL	0a (16,50)	0a
ASPER-CR	0a (16,50)	0a
GUIZ-CR	1b (37,47)	40b
Testigo	3c (66,93)	93c

*Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ($P < 0.0001$), valores entre paréntesis de los rangos de la prueba. Escala del porcentaje de clorosis y marchitez: 0= 0%, 1= 10-25%, 2= 25-50%, 3= 50-85% y 4= 85-100%. Escala del grado de severidad: 0= sana, 1= daño moderado, 2= daño leve y 3= daño severo.

** Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey ($P < 0.0001$).

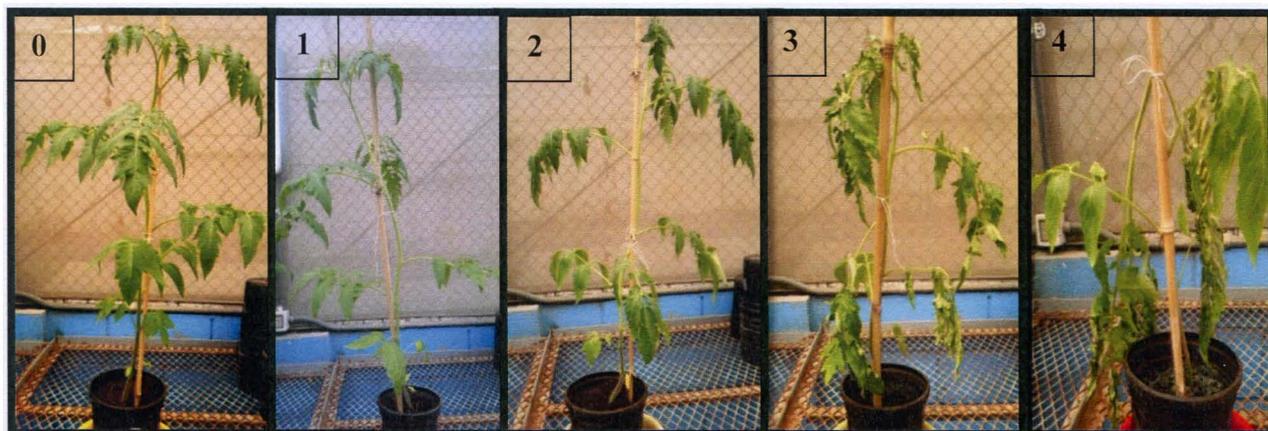


Figura 1. Escala del porcentaje de clorosis y marchitez según los síntomas presentes en plantas de tomate: **0**= 0%, **1**= 10-25%, **2**= 25-50%, **3**= 50-85% y **4**= 85-100%.

Según los resultados obtenidos del número de hojas por planta (Figura 2), se puede observar que no hubo diferencias significativas entre tratamientos que contenían la misma especie de *Trichoderma*, ya sea *T. guizhouense*, *T. asperelloides* o *T. asperellum*, pero sí entre especies, donde *T. asperelloides* y *T. asperellum* tiene, en promedio, el mayor número de hojas por planta (Asper-CR con 26,3 y 24,6 para Aspe-Col). En el caso de la longitud de raíz (Figura 2), las plantas tratadas con la cepa nativa *T. asperelloides* (Asper-CR) mostraron una longitud de raíz significativamente mayor (promedio de 39,0 cm.) en comparación con la cepa de Colombia que obtuvo un 24,4 cm. de longitud. Además, las dos cepas de *T. guizhouense* (Guiz-USA y Guiz-CR) obtuvieron en promedio 15,0 cm. de longitud de raíz, lográndose observar diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos y el testigo.

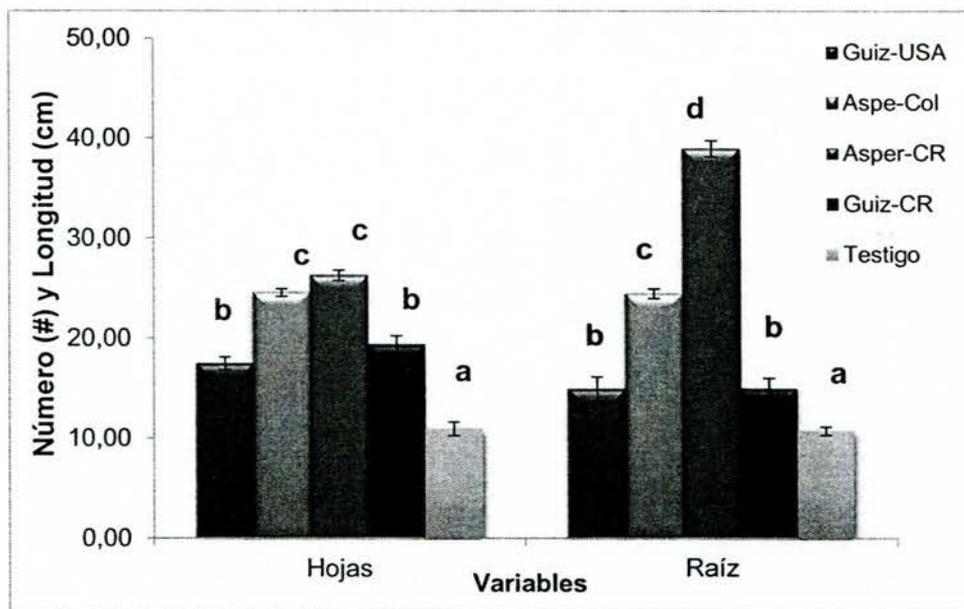


Figura 2. Promedio del número de hojas y la longitud de raíz de plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. nativas e importadas. Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey ($P < 0.0001$) entre la variable analizada. Las barras verticales representan el error estándar.

Una variable de crecimiento evaluada fue la biomasa seca total por planta (Figura 3), donde se observan diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos y el testigo. Los mayores pesos secos se obtuvieron con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR) con 62,5 g y 68,6 g en promedio, mientras que los tratamientos Guiz-USA y Guiz-CR (*T. guizhouense*) presentaron en promedio 42,1 g y 50,7 g y el testigo con el menor promedio de biomasa seca (21,2 g).

Por otra parte, la variable altura (Figura 3) mostró que el tratamiento Asper-CR de *T. asperelloides* (cepa nativa) obtuvo la mayor altura de las plantas con un promedio de 103,3

cm, seguida por la cepa de Colombia (Aspe-Col) con un 92,6 cm. Los dos tratamientos con *T. guizhouense* (Guiz-USA y Guiz-CR) mantuvieron en promedio alturas muy similares: 79,1 cm. y 77,9 cm., mientras que las plantas testigos fueron las de menor tamaño, con un promedio de 42,4 cm., evidenciando que sí existen diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre las plantas de tomate que son tratadas con las diferentes especies de *Trichoderma* aunque éstas se encuentren infectadas por *Fusarium oxysporum* (Figura 3).

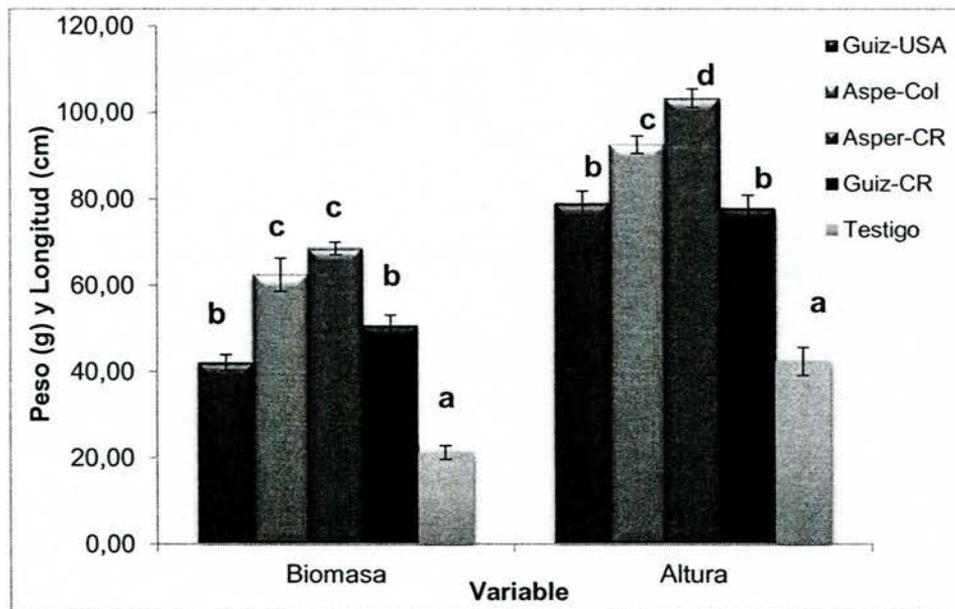


Figura 3. Promedio de la biomasa seca total y la altura de las plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. nativas e importadas. Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey ($P < 0.0001$) entre la variable analizada. Las barras verticales representan el error estándar.

DISCUSIÓN

Trichoderma tiene varios mecanismos de combate biológico. En el caso del mecanismo de competición, se ha demostrado que al inocular suelo con esporas de *T. harzianum* se suprime la infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, ya que generalmente se consideran a las especies de *Trichoderma* competidores agresivos, debido a su rápido crecimiento y colonización de sustratos, excluyendo a patógenos como *Fusarium* spp. (Ozbay y Newman 2004). En este ensayo al tratar las plantas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum*, con los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sp., se logró un buen combate del patógeno, obteniéndose porcentajes de incidencia de la enfermedad de 0% con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR). Así mismo, al evaluar las variables de severidad como clorosis y marchitamiento se demostró la ausencia de síntomas para estos dos tratamientos.

La estimulación de crecimiento y los incrementos en productividad de cultivos asociados a inoculaciones con *Trichoderma* se han observado en un amplio número de especies de plantas. *Trichoderma* puede competir en la rizosfera con otros organismos por su propiedad de establecer interacción con la planta en tres niveles: 1) colonizar la rizosfera, el rizoplasma y tejidos internos de las raíces, y puede ser luego encontrado en estructuras aéreas; 2) competir directamente con microorganismos por toma de nutrientes y producir metabolitos secundarios y 3) puede detoxificar los productos nocivos de otros microorganismos y del ambiente (Hoyos 2011). Las plantas de tomate que se inocularon con las diferentes cepas de *Trichoderma* mostraron un mejor desarrollo, ya que presentaron una cantidad de hojas

significativamente mayor que el tratamiento testigo, se observó que los tratamientos que contenían la misma especie de *Trichoderma* no se diferenciaron, pero sí entre especies ya sea *T. harzianum*, *T. asperelloides* o *T. asperellum*, donde *T. asperellum* y *T. asperelloides* tienen, en promedio, el mayor número de hojas por planta.

En el caso de la longitud de raíz, las plantas tratadas con la cepa nativa *T. asperelloides* (Asper-CR) mostraron una longitud de raíz significativamente mayor en comparación con los demás tratamientos. Es importante recalcar que ciertas especies de *Trichoderma* poseen una estrecha asociación con raíces de plantas y son endófitos comunes en estas (Viterbo y Chet 2006; Brotman *et al.* 2008; Hoyos 2011) logrando ser un agente eficiente de control biológico de hongos en rizosfera y/o estimulan el crecimiento de plantas por producción de metabolitos o solubilización de nutrientes (Woo *et al.* 2006). La inoculación de las raíces de plantas con *Trichoderma* resulta en cambios en el desarrollo de las mismas, tales como raíces profundas y más robustas y una mayor cantidad de raíces secundarias, lo cual proporciona una mayor área para absorción de nutrientes (Shoresh *et al.* 2010).

Las plantas de tomate tratadas con *Trichoderma* spp. mostraron una mejor apariencia en el desarrollo y vigor en comparación con las plantas testigos. Se ha demostrado que las aplicaciones de *Trichoderma* spp. llevan a incrementos en el contenido de peso seco, el almidón, el azúcar total y soluble y a reducir el contenido de azúcar en las hojas de diferentes plantas (Adams y De-Lij 2007; Lamba *et al.* 2008, Shores y Harman 2008b; Shores *et al.* 2010). Por otra parte, *Trichoderma* sp. reduce la enfermedad causada por patógenos en el

sitio de inoculación al estimular la resistencia inducida localizada o sistémica, o según la inoculación, la resistencia sistémica inducida mediada por las rutas de señalización del ácido jasmónico y el etileno (Shoresh *et al.* 2010, Hoyos 2011). Según Vinale *et al.* (2008) la inducción de resistencia por algunos aislamientos de *Trichoderma* sobre las plantas es similar al elicitado por las rizobacterias, que aumentan el sistema de defensa pero no involucra la producción directa de proteínas relacionadas con la patogénesis.

De acuerdo con diferentes estudios, *Trichoderma* acelera el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios, los cuales aumentan el volumen, la altura, así como el peso de la planta (Moity 1982; González *et al.* 1999; Gravel *et al.* 2007; Shoresh y Harman 2008 a, b). Esto concuerda con los datos observados, pues en los diferentes tratamientos con las cepas de *Trichoderma*, se incrementó la altura de la planta y la biomasa producida. Este hongo secreta fitohormonas como el ácido indol acético que estimula la germinación, el crecimiento y desarrollo radicular, mejora la asimilación de nutrientes, lo que influye en el crecimiento vegetativo de cultivos como papa, tomate, maíz y cafetos (Windham *et al.* 1986; Cupull *et al.* 2003; Harman *et al.* 2004a y b; Harman 2006; Gravel *et al.* 2007; Vinale *et al.* 2008; Sánchez 2009). La inoculación de plantas con *Trichoderma* sp. incrementa la absorción de nutrientes induciendo el crecimiento de las plantas, ya que cuenta con la habilidad de solubilizar una amplia gama de nutrientes para las plantas, tales como fósforo y micronutrientes incluyendo hierro, cobre, zinc y manganeso, haciéndolos disponibles para la planta (Shores *et al.* 2010).

En conclusión, se demostró que las diferentes especies de *Trichoderma* utilizadas para el combate biológico de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate ejercen una buena respuesta

biológica directa al mejorar el vigor y robustez de las plantas, e indirecta porque se disminuye la infección por este fitopatógeno. Sin embargo, es importante retomar que algunas especies de *Trichoderma* pueden ser mejores controladores biológicos que otras.

Literatura citada

- Adams P., De-Lij A. 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microb. Ecol.* 54 (2):306–13.
- Brotman Y., Briff E., Viterbo A., Chet I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant. Physiol.* 147: 779-789.
- Cupull S., Andréu R., Pérez N., Delgado P. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Centro Agrícola* 30 (1): 89-97.
- González S., Maruri G., González A. 2005. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Rev. UDO. Agríc.* 5 (1): 45-47.
- González S., Rodríguez L., Arjona C., Puerta A., Fonseca M. 1999. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizósfera de solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. *Invest. Agra. Prod. Prot. Veg.* 14: 297-306.

- Gravel V., Antoun H., Tweddell R. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39: 1968-1977.
- Harman G. E. 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004a. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
- Harman G., Petzoldt R., Comis A., Chen J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147-53.
- Howell C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant. Dis.* 87:4-10.
- Hoyos L. 2011. Enfermedades de plantas: control biológico. Ecoe Ediciones: Universidad Estatal de Colombia. Colombia. 232 p.
- Lamba P., Sharma S., Munshi G., Munshi S. 2008. Biochemical changes in sunflower plants due to seed treatment/spray application with biocontrol agents. *Phytoparasitica* 36:388-99.
- López L. 2012. Venta de tomate en fresco genera cerca de 30 mil millones de colones a la economía. Consultado el 17 de enero, 2014. [En línea].

<http://prensamag.blogspot.com/2012/09/venta-de-tomate-en-fresco-genera-cerca.html>

- Marlatt M., Correll J., Kaufman P. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* sp. f. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant. Dis.* 80:1336-1342.
- Moity T. 1982. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in Pea and Bean rhizospheres. *Phytopathology* 72 (1): 121-125.
- Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between agricultural biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiol.* 4: 1-4.
- Moreno C., Castillo F., González A., Bernal D., Jaimes Y., Chaparro M., González C., Rodríguez F., Restrepo S., Cotes A. 2009. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiol. Molec. Plant. Pathol.* 74: 111–120.
- Ozbay N., Newman S. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7(4): 478-484.
- Rey M., Delgado J., Rincón A., Limón M. Benítez T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S31-S36.
- Sánchez M. 2009. Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativos del norte de Tamaulipas. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, 187 p.

- Shoresh M., Harman G. 2008a. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant. Physiol.* 147:2147–2163.
- Shoresh M., Harman G. 2008b. The relationship between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes. *Plant. Signal. Behav.* 3: 737-739.
- Shoresh M., Harman G., Mastouri F. 2010. Induce systematic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21-43.
- Stewart A., Hill R. 2014. Biocontrol and plant growth promotion. Pp. 415-428. En: Gupta *et al.* (eds.). *Biothecnology and biology of Trichoderma*. Elsevier. Estados Unidos. 549 p.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E., Marra R., Woo S., Lorito M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1–10.
- Viterbo A., Chet I. 2006. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant. Pathol.* 7: 249-258.
- Windham M., Elod Y., Baker R. 1986. Mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518-521.
- Woo S. L., Scala F., Ruocco M., Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96:181-185.

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL BIOCONTROL DE CEPAS NATIVAS E IMPORTADAS DE *TRICHODERMA* SPP. SOBRE *FUSARIUM OXYSPORUM* EN EL CULTIVO DE TOMATE A NIVEL DE CAMPO

RESUMEN

El objetivo del ensayo fue determinar la efectividad de aislamientos de cepas nativas e importadas de *Trichoderma* spp. para el combate de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de tomate a nivel de campo. El ensayo se llevó a cabo en la Finca Guadalupe ubicada en Birrisito de Cartago. Los aislamientos de hongos utilizados en este estudio fueron dos cepas de *T. guizhouense* (Guiz-USA y Guiz-CR), *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR). Inmediatamente después de la siembra se realizó la primera inoculación. Para esto, se diluyó 500 mL de una suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. (12×10^9 esporas/mL) en 17,5 L, aplicándose 4 L de agua/m². Éstas se repitieron cada 15 días durante el primer mes y luego una vez al mes por los dos meses siguientes. De acuerdo al muestreo realizado a los 68 dds. en la variable de número de hojas, se destaca el tratamiento Asper-CR con un promedio de 106 hojas como el mejor. En cuanto a la longitud de raíz, la misma Asper-CR obtuvo un promedio de 75 cm. Al evaluar la incidencia de la enfermedad se observó que fue menor en los tratamientos con *T. asperellum*: Aspe-Col (17.5%) y el *T. asperelloides*: Asper-CR (20%). En cuanto a la clorosis y marchitez, los tratamientos Aspe-Col y Asper-CR presentaron una mediana de 0, significando en la escala de evaluación, plantas sanas. Por último, se evaluó la biomasa seca total por planta. Los mayores pesos secos se obtuvieron con los tratamientos Aspe-Col (192,6 g) y Asper-CR (187,4g). El tratamiento Asper-CR (*T. asperelloides*) y el Guiz-CR (*T. guizhouense*) obtuvieron en promedio las mayores alturas por planta. En conclusión, se evidencia el efecto biocontrolador que tienen algunos aislamientos de *Trichoderma* para combatir a *Fusarium oxysporum*; así como mejorar el crecimiento y vigor de las plantas.

ABSTRACT

The effectiveness of *Trichoderma* spp. isolates obtained from native and imported strains to control *Fusarium oxysporum* in tomato plants was evaluated under field conditions. The trial was carried out at Guadalupe farm, located in Birrisito, Cartago province, Costa Rica. Isolates of *T. guizhouense* (Guiz-USA and Guiz-CR) and *T. asperellum* (Aspe-Col) and *T. asperelloides* (Asper-CR) were used for this study. Immediately after transplant, 500 mL of a 12×10^9 spores mL⁻¹ suspension of *Trichoderma* spp. was diluted in 17,5 L of water and this 4 L was applied to a square meter. Inoculations were done biweekly during the first month and once per month the following two months. After 68 days, plants under Asper-CR treatment showed the highest leaf production (average of 106 leaves) and root length (average of 75 cm). Treatments Aspe-Col and Asper-CR showed the lowest pathogen incidence (17.5% and 20%, respectively). The effects of chlorosis, wilting and severity of infection on treatments Aspe-Col and Asper-CR showed a median equal to zero, meaning healthy plants. Finally, dry biomass per plant was higher for plants under treatments Aspe-Col (192.6 g) and Asper-CR (187.4 g). Plants under treatments Asper-CR y Guiz-CR obtained in average the highest height. In conclusion, it is noticeable the effect as biological control agent of some *Trichoderma* strains against *Fusarium oxysporum*, while improving plant vigor and growth.

INTRODUCCIÓN

Fusarium oxysporum es una especie de hongo cosmopolita que habita tanto el suelo como la rizosfera que incluye cepas no patógenas como patógenas. El hongo puede sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo a través de la producción de clamidosporas (Leslie y Summerell 2006). Las especies fitopatógenas causan traqueomicosis (marchitez por *Fusarium*) o pudre de raíz y talluelo en un gran número de especies de plantas de importancia económica (Beckman 1987; Marzano *et al.* 2013).

Los métodos más efectivos para el combate de la enfermedad causada por *F. oxysporum* es el uso de cultivares resistentes (Fravel *et al.* 2003). Sin embargo, es posible, por mutaciones espontáneas al azar o parasexualidad, que emerjan nuevas razas del patógeno, las cuales superan la resistencia del hospedero (Cai *et al.* 2003). Algunos fungicidas sistémicos podrían combatir la enfermedad, pero solo parcialmente (Amini y Sidovich 2010). Los fumigantes de suelo son efectivos en la erradicación del inóculo residente pero tienen costos muy elevados en lo concerniente a la seguridad humana y el medio ambiente. La rotación de cultivos puede lograr el mismo resultado, pero el método no es económicamente rentable, donde la agricultura es intensiva y altamente especializada (Scott *et al.* 2012).

El combate biológico con el antagonista *Trichoderma* spp. ha demostrado ser una alternativa al combate químico de diversos patógenos de plantas (Harman *et al.* 2004b). En particular, se ha encontrado que algunas especies de *Trichoderma* son efectivas en el combate de enfermedades de corona y pudre de raíz en muchos cultivos (Verma *et al.* 2007). Sin embargo, se ha encontrado que el nivel de combate de diversas cepas de *Trichoderma* spp.

sobre *F. oxysporum* es inadecuado o inconsistente (Nel *et al.* 2006). Se conoce que, en particular, una cepa de *Trichoderma*, puede ser diferencialmente efectiva contra diversos fitopatógenos (Harman *et al.* 1989). Además, Howel (2003) explica que *Trichoderma* presenta una variedad de mecanismos de acción que podrían jugar de diferentes maneras cuando interaccionan con los patógenos y con la planta.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la efectividad de aislamientos de cepas nativas e importadas de *Trichoderma* spp. para el combate de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de tomate a nivel de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El ensayo se llevó a cabo en la Finca Guadalupe ubicada en Birrisito de Cartago, la cual consta de aproximadamente 2,80 hectáreas cultivadas con tomate de la variedad Montaña y según el historial de la finca ha presentado durante muchos años problemas con *Fusarium oxysporum*.

Cepas de hongos. Los aislamientos de hongos utilizados en este estudio fueron de productos comerciales preparados con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. En el caso de las cepas de *T. guizhouense* una es proveniente de Estados Unidos (Guiz-USA) y la otra es una cepa nativa de la Universidad de Costa Rica (Guiz-CR), la cepa de *T. asperellum* provenía de un producto comercial de Colombia (Aspe-Col); y segunda cepa nativa es *T. asperelloides* perteneciente a la Universidad de Costa Rica (Asper-CR).

Prueba a nivel de campo. Al inicio del ensayo se cuantificó la concentración del patógeno con un muestreo previo a la preparación del terreno para la siembra de las plántulas de tomate. Posterior a la preparación del suelo, se marcaron lotes al azar de un área aproximada de 5x5 m² donde se realizaron los diferentes tratamientos con las cepas de *Trichoderma* spp., por lo que se contó con 5 repeticiones por tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos con *Trichoderma* spp. que fueron evaluados en el cultivo de tomate para determinar su efecto sobre el patógeno *Fusarium oxysporum*

Tratamiento	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma</i> spp. (12x10 ⁹ esporas/mL)
Guiz-USA	F-01	<i>T. guizhouense</i>
Aspe-Col	F-01	<i>T. asperellum</i>
Asper-CR	F-01	<i>T. asperelloides</i>
Guiz-CR	F-01	<i>T. guizhouense</i>
(Testigo)	F-01	-

El almacigo de las plantas de tomate con semillas de la variedad Montaña, se preparó en bandejas de plástico negro con capacidad para 100 plántulas, se utilizó como sustrato Peat Moss previamente esterilizado. Las bandejas permanecieron durante tres días en un cuarto oscuro, para inducir la germinación y después de 15 días, se trasladaron al campo, donde las plántulas se sembraron a una distancia de 0,5 m entre plantas y 1,20 m entre hileras.

Inoculación del antagonista. La primera aplicación de *Trichoderma* spp. se realizó inmediatamente después de la siembra. Para esto, se diluyó 500 mL de una suspensión de 12×10^9 esporas/mL, en 17,5 L de agua y se aplicó a cada lote de cada tratamiento (4 L/lote aproximadamente), utilizando el método convencional de aplicación con bomba de espalda de 18 L, dirigido al sistema radical haciendo un cubrimiento del suelo alrededor de las plantas de tomate. Las aplicaciones se repitieron cada 15 días durante el primer mes y luego una vez al mes por los dos meses siguientes del cultivo según cada tratamiento. Los muestreos se realizaron cada 15 días después del inicio de las aplicaciones de los diferentes tratamientos, se tomaron 10 plantas de tomate con un patrón de muestreo en zig-zag por tratamiento, para evaluar el progreso en el combate de *Fusarium* spp. determinándose severidad (Cuadro 2) e incidencia de la enfermedad.

Por otra parte, a los 68 días después de la siembra (dds) se tomó una muestra de 40 plantas de tomate con un patrón de muestreo en zig-zag por tratamiento. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- a) Número de hojas
- b) Porcentaje de clorosis en las hojas (Cuadro 3)
- c) Porcentaje de hojas marchitas (Cuadro 3)

Cuadro 2. Escala modificada para la evaluación de la severidad mediante el porcentaje de clorosis y marchitez en las hojas de las plantas de tomate afectadas por *Fusarium oxysporum* (Marlatt *et al.* 1996)

Escala	Porcentaje (%)	Intensidad de la enfermedad
0	0	No presentan síntomas.
1	10-25	Clorosis leve, marchitamiento de la planta en el 1/3 inferior
2	25-50	Clorosis moderada y marchitamiento de la planta en los 2/3 inferior
3	50-80	Clorosis severa, marchitez de la planta en los 3/3
4	85-100	Muerte de la planta

Diseño experimental y análisis de datos. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA), tanto para determinar la incidencia de la enfermedad, la altura y biomasa seca total. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el programa estadístico Infostat versión 6.12.

Las variables que se evaluaron de acuerdo a escalas se analizaron por medio de una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis, $P < 0.05$) utilizando el programa estadístico Infostat versión 6.12.

RESULTADOS

En el muestreo previo se encontró una concentración de 2×10^7 UFC/ mL del patógeno *Fusarium oxysporum*. Según los resultados obtenidos en los muestreos realizados periódicamente, se observó que la incidencia aumentó con el tiempo (Figura 1); sin embargo, a los 60 días, dos de los tratamientos se mantuvieron por encima del 50% y otros dos permanecieron por debajo de ese porcentaje. Los tratamientos con *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR) fueron los mejores con un 30% y un 20% respectivamente, mientras que el tratamiento testigo alcanzó un 81% de incidencia.

Por otra parte, a los 68 dds (Figura 1) al evaluar la incidencia de la enfermedad causada por *F. oxysporum* en plantas de tomate tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp., se observa una menor incidencia en los tratamientos con *T. asperellum*, Aspe-Col con un 17.5% y *T. asperelloides* (Asper-CR) con un 20%; mientras que los tratamientos con *T. guizhouense*, Guiz-CR y Guiz-USA presentaron un 32,5% y un 67,5% respectivamente. La mayor incidencia fue en el tratamiento testigo con un 75%. Por lo tanto, se puede decir que el combate biológico fue bastante efectivo, ya que entre los tratamientos aplicados con *Trichoderma* sp. se observaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el porcentaje de incidencia de la enfermedad y que podríamos tener una buena alternativa de manejo de *F. oxysporum* en plantaciones de tomate, con los tratamientos Aspe-Col y Asper-CR.

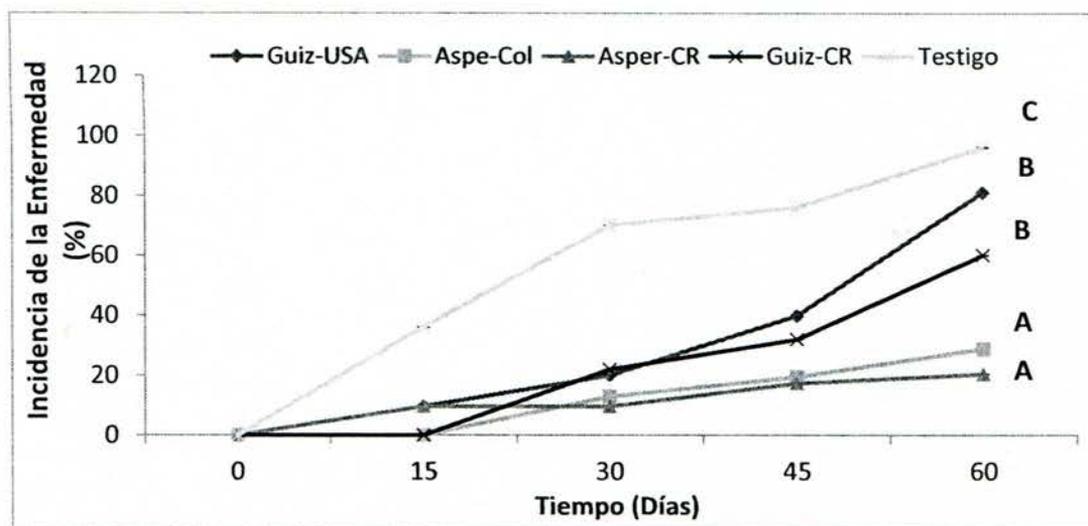


Figura 1. Promedio del porcentaje de incidencia de plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* a nivel de campo tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp.

*Las barras verticales representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey $P=0.05$ aplicadas solo a los 68 dds.

Al evaluar la severidad en plantas de tomate que fueron tratadas con las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. ya sean nativas o importadas (Figura 2) se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, observándose en la mayoría, que los daños fueron leves presentando clorosis leve, marchitamiento de la planta en el 1/3 inferior, incluso a los 60 días a excepción de los tratamientos Guiz-USA que presentó una mediana grado 2 (daño moderado), y el testigo, con una mediana grado 3 (daño severo) donde no existen diferencias entre ellas.

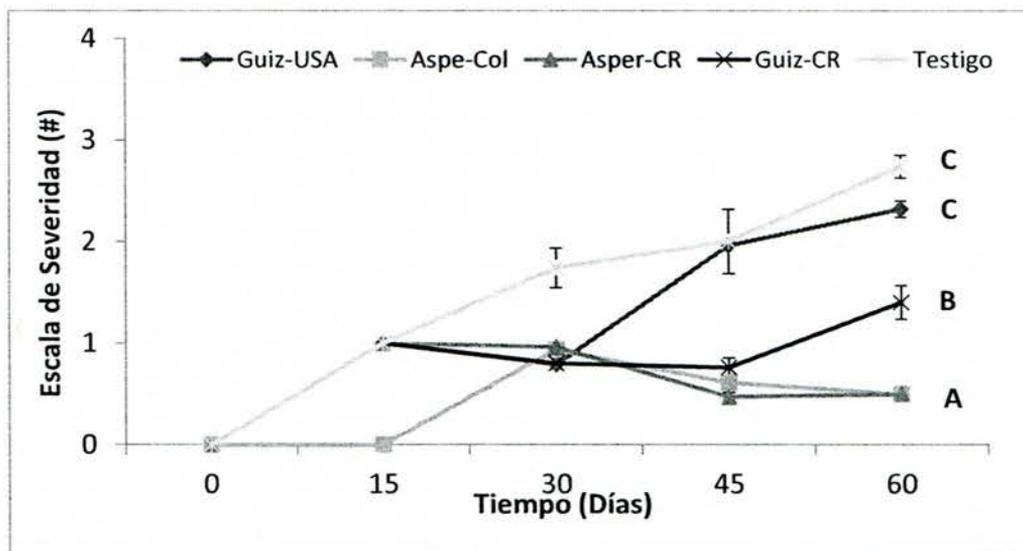


Figura 2. Medianas del grado de severidad de plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* a nivel de campo tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp.

*Las barras verticales representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para prueba no paramétrica (Kruskal Wallis, $P < 0.05$) solo a los 68 dds.

En cuanto a la clorosis y marchitez a los 68 dds. (Figura 2 y 3) los tratamientos que presentaron un grado de 0,2 de acuerdo a la escala, lo cual significa plantas sanas, fueron los tratados con *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR). Para el caso de los tratamientos con *T. guizhouense* las plantas mostraron, para el tratamiento Guiz-USA con grado 2 (25-50%), mientras que, las plantas en el tratamiento Guiz-CR mostraron clorosis y marchitez entre un 10% y un 25%. Finalmente, en el testigo el daño fue severo, se observó entre un 85% y un 100% (grado 4).

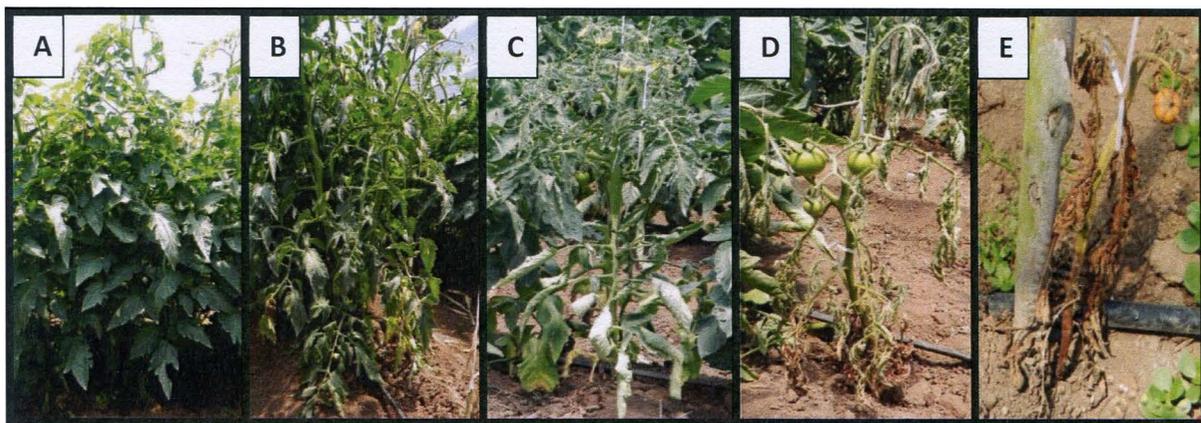


Figura 3. Plantas de tomate afectadas por el patógeno *Fusarium oxysporum* a los 68 dds.

Escala del porcentaje de clorosis y marchitez: A= 0%, B= 10-25%, C= 25-50%, D= 50-85% y E= 85-100%. Escala del grado de severidad: A= sana, B= daño moderado, C= daño leve y Dy E= daño severo.

Al evaluar las diferentes variables en cada uno de los tratamientos a los 68 dds. se observaron diferencias significativas ($P < 0.0001$), en el número de hojas, destacándose el tratamiento Asper-CR como el mejor, con un promedio de 106,3 hojas, mientras que, los demás obtuvieron 24,8 Guiz-CR; 49,8 Aspe-Col; 51,3 Guiz-CR y el testigo con la menor cantidad de hojas por planta (promedio 21). En cuanto a la variable longitud de raíz (Figura 4), se obtuvo la mayor longitud radical con el tratamiento Asper-CR con un promedio de 75 cm, mientras que los demás tratamientos obtuvieron 30 cm Guiz-CR, 36 cm Guiz-USA y 41 cm Aspe-Col y el testigo 23 cm de longitud de raíz en promedio.

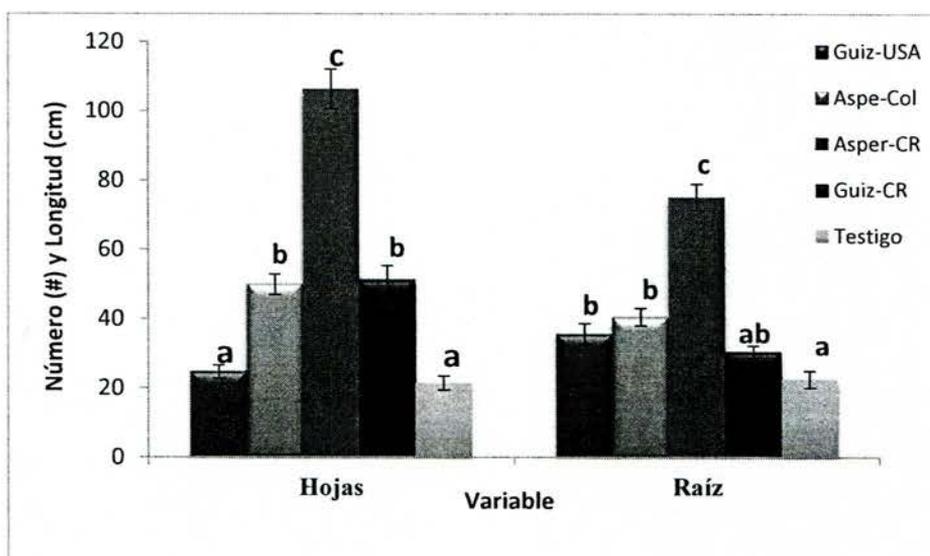


Figura 4. Promedio del número de hojas y longitud de raíz de plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp.

*Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey $P=0.05$. Las barras verticales representan el error estándar.

Por último, se evaluó la biomasa seca total por planta (Figura 5), donde se observan diferencias significativas ($P<0.0001$) entre los tratamientos y el testigo. Los mayores pesos secos se obtuvieron con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR) con 192,6 g y 187,4 g en promedio, mientras que los tratamientos Guiz-USA y Guiz-CR (*T. guizhouense*) presentaron en promedio 124,8 g y 151,9 g y el testigo con el menor promedio de biomasa seca (108,5 g). Por otra parte, la variable altura (Figura 5) mostró que el tratamiento Asper-CR de *T. asperelloides* obtuvo la mayor altura de las plantas en comparación con los demás tratamientos y el testigo, evidenciando que sí existen diferencias significativas ($P<0.0001$) entre las plantas de tomate que son tratadas con las diferentes especies de *Trichoderma* aunque éstas se encuentren infectadas por *Fusarium oxysporum* (Figura 4). Las plantas de tomate de los diferentes tratamientos mostraron, en su

mayoría, una mejor apariencia en el desarrollo y vigor en comparación con las plantas testigos.

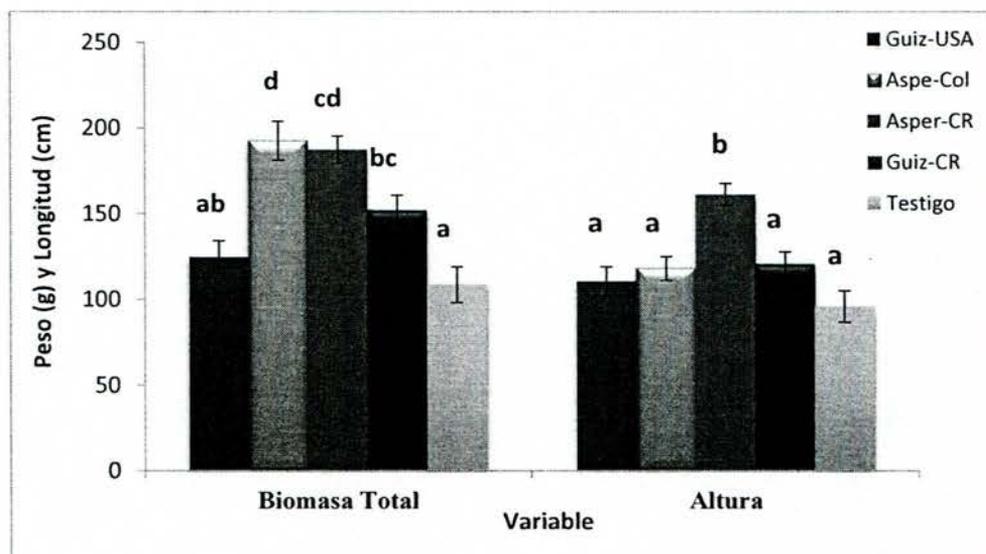


Figura 5. Promedio de la biomasa seca total y la altura de las plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* tratadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp.

*Letras diferentes indican diferencias significativas para Tukey $P=0.05$, según cada variable evaluada. Las barras verticales representan el error estándar.

DISCUSIÓN

Al realizar los ensayos de campo, se pueden presentar limitaciones propias de los sistemas biológicos, pues al basarse en la aparición aleatoria de la enfermedad, es necesario acudir a los antecedentes de incidencia de la enfermedad en el área de estudio (uniformidad o dispersión, incidencia, severidad, tipos de síntomas en el hospedante), por lo que se realizan los muestreos para determinar la concentración del patógeno *Fusarium oxysporum*.

El empleo de algunos microorganismos para el biocontrol de enfermedades, como el caso de *Trichoderma*, no solo tiene acción sobre los patógenos; sino que, proporcionen efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, lo cual, en última instancia, reduce los efectos de la enfermedad. Al realizar inoculaciones de *Trichoderma* spp. en el cultivo de tomate se corroboró, a través del tiempo, que la incidencia y la severidad de la enfermedad ocasionada por *F. oxysporum* se logró mantener en niveles bajos, menores al 50% (Figuras 1 y 2). En el caso del tratamiento testigo, las plantas presentaron una sintomatología que varió desde un leve amarillamiento a clorosis y marchitamiento muy severo pasando por necrosis interna y en algunos casos, ocasionó la muerte, lo cual es similar con los resultados obtenidos por Marlatt *et al.* (1996), quienes describen los síntomas como amarillamiento y marchitamiento, obstrucción de tejido vascular y posteriormente la muerte de la planta.

Estos resultados nos permiten decir que las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. pueden considerarse una alternativa para el combate de *F. oxysporum*. Se ha demostrado que algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. reducen la enfermedad causada por patógenos en el sitio de inoculación (resistencia inducida, localizada, sistémica) o según la inoculación (resistencia sistémica inducida) (Hoyos 2011; Dean *et al.* 2012), ya que induce la activación en la planta de genes relacionados con estrés biótico o abiótico (Alfano *et al.* 2007). Según Vinale *et al.* (2008), la inducción de resistencia por algunos aislamientos de *Trichoderma* es similar al elicitado por las rizobacterias, que aumentan el sistema de defensa pero no involucra la producción directa de proteínas relacionadas con la patogénesis.

Además, al evaluar las diferentes variables de respuesta de la planta a los 68 dds. los resultados demuestran que hay un mejor desarrollo de las plantas en la mayoría de los tratamientos (Figura 4), ya que presentan una mayor cantidad de hojas en comparación con el tratamiento testigo. En cuanto a la longitud de raíz, las plantas en la mayoría de los tratamientos mostraron un mejor desarrollo foliar que radical, a excepción del tratamiento Guiz-USA (*T. guizhouense*); mientras que el tratamiento Guiz-CR (*T. guizhouense*) no mostró diferencias con el testigo. Ciertas especies de *Trichoderma* poseen una estrecha asociación con las raíces de las plantas o son endófitos comunes de estas (Sette *et al.* 2006; Manesh *et al.* 2006; Hoyos *et al.* 2009), por lo tanto, son consideradas agentes eficientes de combate biológico de hongos en la rizosfera y/o estimulan el crecimiento de plantas por la producción de metabolitos o solubilización de nutrientes (Woo *et al.* 2006, Hoyos 2011; Salazar *et al.* 2011).

La estimulación de crecimiento y los incrementos en productividad de cultivos asociados a inoculaciones con *Trichoderma* se han observado en un amplio número de especies de plantas como clavel, rábanos, tomate, lechuga, maíz y frijol, entre otros (Gravel *et al.* 2007; De Souza *et al.* 2008; Hoyos *et al.* 2009; Gwan y Knudsen 2013, Gupta *et al.* 2014b). Se ha encontrado que aislamientos de *Trichoderma* contribuyen al crecimiento longitudinal de las raíces de maíz y algunos pastos, haciendo que estos cultivos sean más resistentes a la sequía y enfermedades, además, se ha observado que en el caso del maíz, requiere un 40% menos de fertilizantes nitrogenados con relación a las plantas que no están inoculadas (testigo) (Harman 2000; 2004b).

En los resultados de biomasa seca total y altura de las plantas de tomate, se obtuvo como mejores tratamientos los de *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR), aunque en la variable altura la mayoría de los tratamientos estuvieron muy similares en tamaño. Se ha demostrado que las aplicaciones de *Trichoderma* spp. llevan a incrementos en el contenido de peso seco, el almidón, el azúcar total y soluble y a reducir el contenido de azúcares solubles en las hojas de diferentes plantas (Adams y De-Lij 2007; Lamba *et al.* 2008, Shores y Harman 2008 a y b; Shores *et al.* 2010).

Varios estudios han demostrado que diversas cepas de *T. harzianum* presentan la habilidad de promover el crecimiento de las plantas, a través del incremento en la absorción de nutrientes, estimulando los factores de crecimiento tales como IAA y GA₃ y disminuyendo los niveles de etileno debido a la colonización de la raíz (Harman 2011; Chowdappa *et al.* 2013). El incrementar los niveles de IAA y GA₃ es un mecanismo directo por el cual los agentes biocontroladores promueven el crecimiento de las raíces y el tallo y el área foliar en plantas de tomate (Chowdappa *et al.* 2013).

Por otra parte, se esperaba que las cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de Costa Rica ejercieran un mejor combate del patógeno *F. oxysporum*, ya que dichas especies se encuentran ampliamente distribuidas y en la mayoría de suelos su concentración es abundante, sin embargo, podemos ver que en este estudio *T. asperelloides* (Asper-CR) mostró mejores resultados de combate lo cual podría estar relacionado con mayor especificidad con el hospedero y las condiciones del sitio de cultivo favorecieron su adaptación como es el caso en las diferencias de las cepas de *T. guizhouense* nativa e importada. Además, hay estudios

que reportan que *T. asperelloides* y *T. harzianum* presentan tolerancia a los agroquímicos y específicamente a fungicidas como el Captan, sin afectar los parámetros de actividad biológica como el crecimiento y el parasitismo contra *Fusarium* spp. (Chaparro *et al.* 2011), lo cual fue beneficioso para el cultivo de tomate en donde se realizó este estudio, porque se realizan siembras constantes sin rotación de cultivos con una amplia aplicación de agroquímicos. Según Gupta *et al.* (2014a) *T. asperelloides* suprime la generación de óxido nítrico elicitado por el patógeno necrotrófico *F. oxysporum* en las raíces de *Arabidopsis*, evitando de esta forma el desarrollo de la enfermedad.

En conclusión, los microorganismos benéficos como es el caso *Trichoderma* spp. puedan convertirse en una verdadera alternativa al uso de agroquímicos en plantaciones de tomates para combatir enfermedades como la marchitez ocasionada por *F. oxysporum*; pero además, que contribuyan con la defensa general y que mejoren la absorción de nutrientes de la planta.

Literatura citada

- Adams P., De-Lij A. 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial. Ecol.* 54(2):306–13.
- Alfano G., Lewis M., Cakir C., Bos J., Miller S., Madden L., Kamoun S. Hoitink H. 2007. Systemic modulation of genes expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97:429-437.

- Amini J., Sidovich D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. J. Plant Prot. Res. 50: 172–178.
- Beckman C. 1987. The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press. Estados Unidos. pp. 51-59.
- Cai G., Gale L., Schneider R., Kistler H., Davis R., Elias K., Miyao E. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93: 1014–1022.
- Chaparro A., Hoyos L., Orduz S. 2011. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. Agricul. Scien. 2(3): 301-307.
- Chowdappa P., Mohan S., Jyothi M., Upreti K. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. Biol. Control. 65:109-117.
- De Souza J.T., Bailey B.A., Pomella A., Erbe E., Murphy C. 2008. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. Biol. Control 46:36–45.
- Dean R., Van Kan J., Pretorius Z., Hammond K., Di Pietro A., Spanu P., Rudd J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. Foster G. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant. Pathol. 13(4):414-430.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol. 157: 493–502.
- Gravel V., Antoun H., Tweddell R. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biol. Biochem. 39: 1968-1977.

- Gupta K., Mur L., Brotman Y. 2014a. *Trichoderma asperelloides* suppresses nitric oxide generation elicited by *Fusarium oxysporum* in Arabidopsis roots. *Mol Plant Microbe Interact.* 27(4):307-14.
- Gupta V., Schmoll M., Herrera A., Upadhyay R. Druzhinina I., Tuohy M. 2014b. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier. Estados Unidos. 549 p.
- Gwan T., Knudsen G. 2013. Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *pisi*. *App. Soil. Ecol.* 68: 57-60.
- Harman G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research in *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant. Dis.* 84:377-393.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004a. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
- Harman G., Petzoldt R., Comis A., Chen J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147–53.
- Harman G., Taylor A., Stasz T. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant. Dis.* 73: 631–637.
- Harman G.E. 2011. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol.* 647–649.
- Howell C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant. Dis.* 87:4–10.

- Hoyos L. 2011. Enfermedades de plantas: control biológico. Ecoe Ediciones: Universidad Estatal de Colombia. Colombia. 232 p.
- Hoyos L., Orduz S., Bissett J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from neotropic regions. *Fung. Genet. Biol.* 46:615-631.
- Lamba P., Sharma S., Munshi G., Munshi S. 2008. Biochemical changes in sunflower plants due to seed treatment/spray application with biocontrol agents. *Phytoparasitica* 36:388–99.
- Leslie J., Summerell B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Estados Unidos. pp. 25-27.
- Manesh B., Nalini M., Tejesvi M., Prakash H., Kini K., Subbiah V., Shetty H. 2006. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. *Can. J. Microbiol.* 52:427-435.
- Marlatt M., Correll J., Kaufman P. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* sp. f. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant. Dis.* 80:1336-1342.
- Marzano M., Gallo A., Altomare C. 2013. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biol. Control.* 67: 397-408.
- Nel B., Steinberg C., Labuschagne N., Viljoen A. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *Fusarium* wilt of banana. *Plant. Pathol.* 55: 217–223.

- Salazar L., Sanabria N., Aponte G., Alcano M., Herrera R., Colmenares D., Espinoza M., Alemán L., Magaña S. 2011. Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *Bioagro* 23(3):185-190.
- Scott J., Gordon T., Kirkpatrick S., Koike S., Matheron M., Ochoa O., Truco M., Michelmore R. 2012. Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. *Calif. Agr.* 66: 20–24.
- Sette L., Passarini M., Delarmelina C., Salati F., Duarte M. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J. Microbiol. Biot.* 22:1185-1195.
- Shoresh M., Harman G. 2008a. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant. Physiol.* 147:2147–2163.
- Shoresh M., Harman G. 2008b. The relationship between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes. *Plant, Signal. Behav.* 3: 737-739.
- Shoresh M., Harman G., Mastouri F. 2010. Induce systematic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21-43.
- Verma M., Satinder K., Tyagi R., Surampalli R., Valero J. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37: 1–20.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E., Marra R., Woo S., Lorito M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1–10.

Woo S. L., Scala F., Ruocco M., Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96:181-185.

DISCUSIÓN GENERAL

Para la realización de los diferentes ensayos se aislaron cepas de *Trichoderma* spp. provenientes de productos comerciales importados en el país, los cuales cuentan con los registros otorgados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería para ser utilizados en varios cultivos. El primer producto, indica que contiene una mezcla de *T. koningii* y *T. harzianum*. Por lo anterior, se realizaron aislamientos con el fin de corroborar la presencia de ambas especies de *Trichoderma*, sin embargo, solamente se logró aislar una cepa, que de acuerdo a la caracterización morfológica y la identificación molecular se determinó que es *T. guizhouense* (Guiz-CR). En cuanto al segundo producto comercial importado (Aspe-Col), proveniente de Colombia, el cual si está registrado como fungicida microbiológico, presenta como contenido a *T. lignorum*. Al realizarse el aislamiento del hongo para su caracterización morfológica y análisis molecular se identificó como *Trichoderma asperellum*.

De acuerdo a la caracterización morfológica mencionada anteriormente, las cepas nativas corresponden a *T. asperelloides* (Asper-CR) la cual fue aislada de muestras de suelo colectadas de áreas boscosas de San Carlos y *T. guizhouense* (Guiz-CR), de áreas en barbecho en Cartago, las cuales pertenecen al Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad de Costa Rica. El patógeno fue identificado como *Fusarium oxysporum*.

Al realizarse la confrontación *in vitro* de las diferentes cepas aisladas de productos comerciales importados (Guiz-CR y Aspe-Col) y nativas (Asper-CR y Guiz-CR) de *Trichoderma* frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, éstas presentaron radios de

crecimiento (RCA) superiores al patógeno (RCP). Según los resultados obtenidos existen diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) entre las cepas de *Trichoderma* nativas y las importadas frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, el mayor antagonismo corresponde a las cepas Aspe-Col (*T. asperellum*) y Asper-CR (*T. asperelloides*).

De acuerdo con los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), la mayoría de los tratamientos lograron superar el 50% de inhibición del crecimiento radial del patógeno *F. oxysporum* (Capítulo I, Figura 4), por lo tanto, existen diferencias en la capacidad antagónica de las diferentes especies de *Trichoderma*, ya que las cepas de *T. asperellum* y *T. asperelloides* mostraron ser más efectivas en el combate de *Fusarium oxysporum*, independiente de su procedencia. Aunque *T. guizhouense* es menos efectiva, la cepa nativa presenta más eficacia que la importada. El antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. puede deberse a que liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles, que producen un efecto de antibiosis (Cardoza *et al.* 2005; Webster y Weber 2007; Shores *et al.* 2010).

A nivel de invernadero, al inocular con las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. las plantas infectadas con *Fusarium oxysporum*, se observó un mejor desarrollo de las plantas, ya que presentaron una mayor cantidad de hojas que el tratamiento testigo. Los tratamientos que contenían la misma especie de *Trichoderma* no se diferenciaron, pero sí entre especies, donde *T. asperellum* y *T. asperelloides* tienen, en promedio, el mayor número de hojas por planta, al igual que una mayor longitud de raíz. Es importante recalcar que ciertas especies de *Trichoderma* poseen una estrecha asociación con raíces de plantas y son endófitos comunes

en estas (Viterbo y Chet 2006; Brotman *et al.* 2008; Hoyos 2011) logrando ser un agente eficiente de control biológico de hongos en rizosfera y/o estimulan el crecimiento de plantas por medio de la producción de metabolitos o solubilización de nutrientes (Woo *et al.* 2006). La inoculación de las raíces de plantas con *Trichoderma* resulta en cambios en el desarrollo, tales como raíces profundas y más robustas y una mayor cantidad de raíces secundarias, lo cual proporciona una mayor área para absorción de nutrientes (Shoresh *et al.* 2010).

Los porcentajes de incidencia de la enfermedad obtenidos fueron de 0,2% con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (Aspe-Col) y *T. asperelloides* (Asper-CR). En cuanto a las variables de porcentaje de clorosis y marchitez (0%) y la severidad de la enfermedad (grado 0) (Capítulo II, Cuadro 3 y Figura 2) los tratamientos Aspe-Col y el Asper-CR fueron los mejores. *Trichoderma* tiene varios mecanismos de combate biológico. En el caso del mecanismo de competencia, se ha demostrado que al inocular suelo con esporas de *T. harzianum* se suprime la infestación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, ya que generalmente se consideran a las especies de *Trichoderma* competidores agresivos, debido a su rápido crecimiento y colonización de sustratos, excluyendo a patógenos como *Fusarium* spp.

La biomasa seca total por planta y la altura (Capítulo II, Figura 3) mostraron los mayores promedios en los tratamientos con *T. asperelloides* y *T. asperellum*, siendo el tratamiento con Asper-CR (cepa nativa) el más elevado. En cuanto a los tratamientos con *T. guizhouense* los resultados son un poco más del doble que los obtenidos con los testigos. Las plantas de tomate mostraron una mejor apariencia en el desarrollo y vigor en comparación con las

plantas testigos. Se ha demostrado que las aplicaciones de *Trichoderma* spp. llevan a incrementos en el contenido de peso seco, el almidón, el azúcar total y soluble y a reducir el contenido de azúcar en las hojas de diferentes plantas (Adams y De-Lij 2007; Lamba *et al.* 2008, Shores y Harman 2008a y b; Shores *et al.* 2010).

Al realizar los ensayos de campo, se pueden presentar limitaciones propias de los sistemas biológicos, pues al basarse en la aparición aleatoria de la enfermedad, es necesario acudir a los antecedentes de incidencia de la enfermedad en el área de estudio (uniformidad o dispersión, incidencia, severidad, tipos de síntomas en el hospedante), por lo que se realizan los muestreos para determinar la concentración del patógeno *Fusarium oxysporum*. Según los resultados obtenidos a los 68 días después de sembrado el cultivo de tomate en campo, al evaluar las diferentes variables como el número de hojas (Capítulo III, Figura 3) se muestra un mejor desarrollo de las plantas cuando éstas son tratadas con *Trichoderma* spp., ya que presentan un número significativamente mayor de hojas ($P < 0.0001$) en comparación con el tratamiento testigo. Se destacan el tratamiento Asper-CR (*T. asperelloides*) con un promedio de 106 hojas como el mejor y el testigo con la menor cantidad (promedio 21). En cuanto a la variable de longitud de raíz, los mejores resultados se obtuvieron con la cepa nativa de *T. asperelloides* (Asper-CR) con un promedio de 75 cm. de longitud de raíz. Ciertas especies de *Trichoderma* poseen una estrecha asociación con las raíces de las plantas o son endófitos comunes de estas (Sette *et al.* 2006; Manesh *et al.* 2006; Hoyos *et al.* 2009), por lo tanto, son consideradas agentes eficientes de control biológico de hongos en la rizosfera y/o estimulan el crecimiento de plantas por la producción de metabolitos o solubilización de nutrientes (Woo *et al.* 2006, Hoyos 2011; Salazar *et al.* 2011).

Por otra parte, se esperaba que las cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de Costa Rica ejercieran un mejor combate del patógeno *F. oxysporum*, ya que dichas especies se encuentran ampliamente distribuidas y en la mayoría de suelos su concentración es abundante, sin embargo, podemos ver que en este estudio *T. asperelloides* (Asper-CR) mostró mejores resultados de combate lo cual podría estar relacionado con mayor especificidad con el hospedero y las condiciones del sitio de cultivo favorecieron su adaptación como es el caso en las diferencias de las cepas de *T. guizhouense* nativa e importada. Además, hay estudios que reportan que *T. asperelloides* y *T. harzianum* presentan tolerancia a los agroquímicos y específicamente a fungicidas como el Captan, sin afectar los parámetros de actividad biológica como el crecimiento y el parasitismo contra *Fusarium* spp. (Chaparro *et al.* 2011), lo cual fue beneficioso para el cultivo de tomate en donde se realizó este estudio, porque se realizan siembras constantes sin rotación de cultivos con una amplia aplicación de agroquímicos. Según Gupta *et al.* (2014a) *T. asperelloides* suprime la generación de óxido nítrico elicitado por el patógeno necrotrófico *F. oxysporum* en las raíces de *Arabidopsis*, evitando de esta forma el desarrollo de la enfermedad.

Durante los últimos 10 años, se han licenciado en todo el mundo más de 80 productos para regulación biológica de enfermedades de plantas, un porcentaje grande de estos han sido desarrollados para cultivos de invernadero. Los productos formulados como las especies de *Trichoderma* son, en su mayoría, para regulación de patógenos del suelo y para enfermedades foliares primarias. Y si bien la oferta y el uso de productos de regulación biológica está aumentando, todavía representan solamente cerca del 1% de las ventas de insumos agrícolas (Hoyos 2011).

En conclusión, a nivel *in vitro* se encontraron diferencias morfológicas y genéticas entre las cepas nativas de Costa Rica y las importadas en productos comerciales para el hongo *Trichoderma* spp. Las pruebas *in vitro* indican que hay diferencias en la capacidad antagónica frente al patógeno *Fusarium oxysporum*, siendo mejor *T. asperelloides* y *T. asperellum*. En el ensayo de invernadero se demostró que las diferentes especies de *Trichoderma* utilizadas para el combate biológico de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate ejercen una buena respuesta biológica indirecta al mejorar el vigor y robustez de las plantas, y directa al disminuir la infección por este fitopatógeno. A nivel de campo logré corroborar la efectividad como biocontrolador que tienen algunos aislamientos de *Trichoderma* para combatir *Fusarium oxysporum*.

Literatura citada

- Adams P., De-Lij A. 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial. Ecol.* 54(2):306–13.
- Agrios G. 2005. *Plant pathology*. 5ta ed. Elsevier Academic Press. UK. 948 pp.
- Akhtar K., Khalid A., Akhtar M. 2009. Ghauri a removal and recovery of uranium from aqueous solutions by Ca-alginate immobilized *Trichoderma harzianum*. *Bioresour. Techn.* 100: 4551-4558.
- Alfano G., Lewis M., Cakir C., Bos J., Miller S., Madden L., Kamoun S. Hoitink H. 2007. Systemic modulation of genes expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97:429-437.
- Altomare C., Norvell W. A., Bjorkman T., Harman G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *App. Environ. Microbiol.* 65: 2926-2933.
- Arisan-Atac I., Heidenreich E., Kubicek C. P. 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.
- Benhamou N., Chet I. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 405-416.
- Benítez T., Rincón A. M., Limón M. C., Codon A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7: 249-260.

- Björkman T. 2004. Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. *Plant. Grow. Regul.* 43: 89-92.
- Brunner K., Peterbauer C. K., Mach R. L., Lorito M., Zeilinger S., Kubicek C. P. 2003. The NagI N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* 43: 289-295.
- Caravaca P. 2008. Boletín 1: Tomate de Costa Rica. Subgerencia de Desarrollo Agropecuario, Dirección General Mercadeo y Agroindustria. [En línea]. Consultado: 15 de febrero, 2011. (<http://www.mercanet.cnp.go.cr>).
- Carballo M., Guaharay F. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. 1ª Ed. CATIE, Serie técnica manual técnico N° 53. Managua. 232 p.
- Cardoza R. E., Hermosa M. R., Vizcaíno J. A., Sanz L., Monte E., Gutiérrez S. 2005. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. pp. 1-22. En: E. Mellado, J. Barredo. (eds). *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol*. Research Signpost, Kerala, India. 320 p.
- Chaverri P., Castlebury L. A., Samuels G. J., Geiser D. M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet. Evol.* 27:302-313.
- Chérif M., Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80:1406-1414.
- Chet I. 1987. *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: I. Chet (ed). *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. J. Willey y Sons, Nueva York, EE.UU. pp. 137-160.

- Chet I., Benhamou N., Haran S. 2002. Mycoparasitism and lytic enzymes. pp.153-172. In: C. P. Kubicek, G. E. Harman. (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium* (vol. 2). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. 278 p.
- Conrath U., Pieterse C. M., Mauch-Man B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends. Plant. Sci.* 7:210-216.
- Córdoba M. 2003. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Trichozam® (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral® (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate. Tesis. Universidad Zamorano, Honduras. 43 p.
- Dababat A., Sikora R., Hauschild R. 2006. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Commun Agric App. Biol. Sci.* 71:953–961.
- De la Cruz E., Ruepert C., Wesseling C., Monge P., Chaverri F., Castillo L., Bravo V. 2004. Los plaguicidas de uso agropecuario en Costa Rica: impacto en la salud y el ambiente. Informe de consultoría para Área de Servicio Agropecuario y Medio Ambiente de la Contraloría General de la República. Heredia: IRET, Universidad Nacional Autónoma.
- De la Cruz J., Rey M., Lora J. M., Hidalgo-Gallego A., Domínguez F., Pintor-Toro J. A., Llobell A., Benítez T. 1993. Carbon source control on β -glucanase, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch. Microbiol.* 159:316-322.
- De Souza J.T., Bailey B.A., Pomella A., Erbe E., Murphy C. 2008. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biol. Control.* 46:36–45.

- Degenkolb T., Berg A., Gams W., Schlegel B., Grafe U. 2003. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Pept. Sci.* 9: 666-678.
- Druzhinina I., Kubicek C., Komoń-Zelazowska M., Mulaw T., Bissett J. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *MBC. Evol. Biol.* 10 (94): 1-14.
- Dubos B., Jailloux F., Bulit J. 1982. Protection du vignoble contre la pourriture grise: les propriétés antagonistes du *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea*. *Colloques de l'INPA* 11: 205-219.
- Elad Y., Barak R., Chet I. 1984. Parasitism of esclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil. Biol. Biochem.* 16: 381-386.
- Elad Y., Chet I., Hennis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28: 719-725.
- Ezzi M., Lynch J. 2005. Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enz. Microbiol. Technol.* 36: 849-854.
- Fernández E., Acosta M., Ponce F., Pinto V. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Mex. Fitop.* 25 (001):35-42.
- Gams W., Gräfenhan T. 2006. Keynote Lecture: Highlights of progress and remaining problems in the taxonomy of *Trichoderma*. 4th ISTH Meeting, Viena (Austria). [En línea]. Consultado: 23 de setiembre, 2010. (<http://www.isth.info/meetings/tgm2006.php>).

- Goldman G. H., Pellizzon C. H., Marins G. H., McInerney J. O., Goldman M. H. S. 2002. *Trichoderma* spp. genome and gene structure. pp. 209-224. En: C. P. Kubicek, G. E. Harman. (eds). *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. 278 p.
- González R., Montealegre J., Herrera R. 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. Cien. Inv. Agr. 31 (1): 21-28.
- Goswami J., Pandey R., Tewari J., Goswami B. 2008. Management of root knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. J. Environ. Sci. Health. B. 43:237–240.
- Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M. D., Mateos P. F., Bridge P. D., Monte E., García-Acha I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. App. Environ. Microbiol. 63: 3189-3198.
- Grondona I., Morales R., Hermosa M. R., Redondo J., Rico C., Monte E. 2001. Biological control of *Rhizoctonia solani* in traditional-sowed and transplanted sugarbeet. J. Plant. Pathol. 83: 483-485.
- Gupta V., Schmoll M., Herrera A., Upadhyay R. Druzhinina I., Tuohy M. 2014. Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Elsevier. Estados Unidos. 549 p.
- Han H., Lee K. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effects on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. Res. J. Agric. Biol. Sci. 1:205–15.
- Handelsman J., Stabb E. V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. Plant. Cell. 8:1855-1869.

- Harman G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research in *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant. Dis.* 84:377-393.
- Harman G. E. 2006. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004a. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev Microbiol.* 2:43-56.
- Harman G., Petzoldt R., Comis A., Chen J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147–53.
- Harman G. E, Bjorkman T., Ondik K., Shores M. 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outl. Pest. Manag.* 19:24–29.
- Hermosa M. R., Grondona I., Diaz-Minguez J. M., Iturriaga E. A., Monte E. 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.
- Hermosa M. R., Grondona I., Iturriaga E. A., Diaz-Minguez J. M., Castro C., Monte E., García-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *App. Environ. Microbiol.* 66: 1890-1898.
- Hermosa M. R., Keck E., Chamorro I., Rubio B., Sanz L., Vizcaino J. A., Grondona I., Monte E. 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.* 108: 897-906.

- Hibar K., Daami-Remadi M., Hamada W., El-Mahjoub M. 2006. Bio-fungicides as an alternative for tomato *Fusarium* crown and root rot control. *Tunisian J. Plant. Prot.* 1: 19-29.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El-Mahjoub M. 2005. Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 9:163-171.
- Hjeljord L., Tronsmo A. 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. pp. 131-153. En: G. E. Harman, C. P. Kubicek. (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium* (vol. 2). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. 278 p.
- Howell C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant. Dis.* 87:4–10.
- Howell C. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178-180.
- Howell C. R., Stipanovic R. D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85: 469-472.
- Hoyos L. 2011. Enfermedades de plantas: control biológico. Ecoe Ediciones: Universidad Estatal de Colombia. Colombia. 232 p.
- Hoyos L., Orduz S., Bissett J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from neotropic regions. *Fung. Genet. Biol.* 46: 615-631.
- Inbar J., Chet I. 1996. The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408: 229-231.

- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Prot. Veg.* 24 (1): 14-21.
- Jaklitsch W., Komon M., Kubicek C. 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia* 97 (6): 1365-1378.
- Jaklitsch W., Komon M., Kubicek C., Druzhinina I. 2006. *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* 98(3): 499-513.
- Jaklitsch W., Kubicek C. 2008. Three European species of *Hypocrea* with reddish brown stromata and green ascospores. *Mycologia* 100 (5): 796-815.
- Jiménez C., Sanabria A. 1997a. Evaluaciones *in vitro* de siete fungicidas para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Fitop. Venez.* 10 (1):32- 37.
- Jiménez C., Sanabria A. 1997b. Control biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Fitop. Venez.* 10(1):38-42.
- Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., Stalpers J. A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. CAB International, Wallingford, Reino Unido. 690 p.
- Kloepper J., Ryu C., Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259–66.
- Komon-Zelazowska M., Bissett J., Zafari D., Hatvani L., Manczinger L., Woo S., Lorito M., Kredics L., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *App. Environ. Microbiol.* 73: 7415-26.
- Kovoivula A., Linder M., Teeri T. 2002. Degradation of polyssacharides and related macromolecules. Pp. 1-24. En: Kubicek C., Harman G. (Eds.). *Trichoderma* and

- Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications. Taylor y Francis Ltd. Londres. 278 p.
- Kredics L., Hatvani L., Naeimi S., Köemöczi P., Manczinger L., Vágvölgyi C., Druzhinina I. 2014. Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. Pp. 3-40. En: Gupta *et al.* (Eds.). *Biothecnology and biology of Trichoderma*. Elsevier. Estados Unidos. 549 p.
- Kubicek C. P., Bissett C., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. M., Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fung. Genet. Biol.* 38: 310–319.
- Kuhls K., Lieckfeldt E., Samuels G. J., Kovacs W., Meyer W., Petrini O., Gams W., Borner T., Kubicek C. P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 7755-7760.
- Kullnig C., Szakacs G., Kubicek, C. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol. Res.* 104, 1117–1125.
- Kyalo G., Affokpon A., Coosemans J., Coynes D. 2007. Biological control effects of *Pochonia chlamydosporia* and *Trichoderma* isolates from Benin (West-Africa) on root-knot nematodes. *Commun. Agric. App. Biol. Sci.* 72:219–223.
- Lamba P., Sharma S., Munshi G., Munshi S. 2008. Biochemical changes in sunflower plants due to seed treatment/spray application with biocontrol agents. *Phytoparasitica* 36:388–99.

- Lewis J. A., Papavizas G. C. 1984. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* 74: 1240-1244.
- Lieckfeldt E., Samuels G. J., Nirenberg H. I., Petrini O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species?. *App. Environ. Microbiol.* 65: 2418-2428.
- Lo C. T., Nelson E. B., Harman G. E. 1996. Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant. Dis.* 80: 730-741.
- Lorito M., Woo S. L., Donzelli B., Scala F. 1996. Synergistic, antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants. pp. 3034-3041. En: R. A. A. Muzzarelli.(Ed). *Chitin Enzymology* (vol. 2). Attec Edizioni, Italia. 5205 p.
- Lu Z., Tombolini R., Woo S., Zeilinger S., Lorito M., Jansson J. K. 2004. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *App. Environ. Microbiol.* 70: 3073-3081.
- Manesh B., Nalini M., Tejesvi M., Prakash H., Kini K., Subbiah V., Shetty H. 2006. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. *Can. J. Microbiol.* 52:427-435.
- Martínez C., Blanc F., Le Claire E., Besnard O., Nicole M., Baccou J. C. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulose from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant. Physiol.* 127: 334-344.

- Muthumeenakshi S., Mills P. R., Brown A. E., Seaby D. A. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiol.* 140: 769-777.
- Navazio L., Baldan B., Moscatiello R., Zuppini A., Woo S. L., Mariani P., Lorito M. 2007. Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant. Biol.* 7: 41-45.
- Nelson E.B. 1991. *Handbook of Applied Mycology*. New York, USA. pp. 327- 355.
- Olmedo V., Casas S. 2014. Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. Pp. 429-454. En: Gupta *et al.* (eds). *Biothecnology and biology of Trichoderma*. Elsevier. Estados Unidos. 549 p.
- Papavizas G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biological control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 332-349.
- Pérez L., Batlle A., Chacón J., Montenegro V. 2009. Eficacia de *Trichoderma harzianum* A34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá de los bananos en Cuba. *Fitosanidad* 13(4): 259-263.
- Ploetz R. C. 2004. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96:653-656.
- Ramírez F. 2015. Importación de plaguicidas en Costa Rica: Periodo 2012-2013. Bases de datos del Área de Diagnóstico del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

- Rocha-Ramírez V., Omero C., Chet I., Horwitz B. A., Herrera-Estrella A. 2002. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tgal* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot. Cell.* 1: 594-605.
- Rosado I. V., Rey M., Codón A. C., Govantes J., Moreno-Mateos M. A., Benítez T. 2007. QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fung. Genet. Biol.* 44: 950-964.
- Rubio M. B., Hermosa M. R., Keck E., Monte E. 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., Sanabria N., Aponte G., Alcano M., Herrera R., Colmenares D., Espinoza M., Alemán L., Magaña S. 2011. Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones in vitro e in vivo. *Bioagro* 23(3):185-190.
- Samuels G. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100: 925-935.
- Samuels G. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96: 195-206.
- Sandoval I., López M. 2000. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* cepa A34 sobre *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad* 4(3-4):69-72.
- Sandoval I., López M. 2001. Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. pseudokoningii* sobre diferentes hongos fitopatógenos. *Fitosanidad* 5(1):41-44.
- Sandoval I., López M., Bonilla T., Tomás Y. 1996. Hongos que atacan al clavel y antagonismo in vitro con *Trichoderma* spp. *Fitosanidad* 2(3-4):41-43.

- Sanz L., Montero M., Grondona I., Vizcaíno J. A., Llobell A., Hermosa R., Monte E. 2004. Cell-wall degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr. Genet.* 46: 277-286.
- Sanz L., Montero M., Redondo J., Llobell A., Monte E. 2005. Expression of an alpha-1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS. J.* 27(2): 493-499.
- Schirmböck M., Lorito M., Wang Y. L., Hayes C. K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G. E., Kubicek C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *App. Environ. Microbiol.* 60: 4364-4370.
- Schuster A., Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 87: 787-799.
- Segarra G., Casanova E., Bellido D., Odena M. A., Oliveira E., Trillas I. 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* T34. *Proteomics* 7: 3943-52.
- Sette L., Passarini M., Delarmelina C., Salati F., Duarte M. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J. Microbiol. Biot.* 22:1185-1195.
- Shoresh M., Harman G. 2008b. The relationship between increased growth and resistance induced in plants by root colonizing microbes. *Plant. Signal. Behav.* 3: 737-739.
- Shoresh M., Harman G., Mastouri F. 2010. Induce systematic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21-43.

- Sivan A., Chet I. 1989. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant. Dis.* 71:587-692.
- Supothina S., Isaka M., Wongs O. 2007. Optimization of culture conditions for production of the antitubercular alkaloid hirsutellone by *Trichoderma gelatinosum* BCC 7579. *App. Microbiol.* 44: 531-537.
- Tang J., Liu L., Hua S., Chen Y., Chen J. 2009. Improved degradation of organophosphate dichlorvos by *Trichoderma atroviride* transformants generated by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Bioresour.e Tech.* 100: 480-483.
- Vinale F., Marra R., Scala F., Ghisalberti E., Lorito M., Sivasithamparam K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *App. Microbiol.* 43: 143-148.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E., Marra R., Woo S., Lorito M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10.
- Viterbo A., Chet I. 2006. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant. Pathol.* 7: 249-258.
- Viterbo A., Montero M., Ramot O., Friesem D., Monte E., Llobell A., Chet I. 2002a. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr. Genet.* 42: 114-122.
- Viterbo A., Ramot O., Chemin L., Chet I. 2002b. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuw.* 81:549-556.

- Watanabe N., Akiba T., Kanai R., Harata K. 2006. Structure of an orthorhombic form of xylanase II from *Trichoderma reesei* and analysis of thermal displacement. *Acta Crystallogr.* 62: 784-792.
- Webster J., Weber R. 2007. *Introduction to Fungi*. 3^{er} ed. Cambridge University Press. UK. 841 pp.
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22: 837- 845.
- Woo S. L., Scala F., Ruocco M., Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96:181-185.
- Xiao-Yan S., Qing- Tang S., Shu-Tao X., Xiu-Lan C., Cai-Yun S., Yu-Zhong Z. 2006. Broad- spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 119-125.
- Yedidia I., Benhamou N., Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *App. Environ. Microbiol.* 65: 1061-1070.
- Yedidia I., Srivastva A. K., Kapulnik Y., Chet I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant. Soil.* 235: 235-242.
- Zeilinger S., Galhaup C., Payer K., Woo S. L., Mach R. L., Fekete C., Lorito M., Kubicek C. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fung. Genet. Biol.* 26: 131-140.

Zhang Y., Liu K., Xiang M., Liu R. 2004. Studies on the control of *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* with *Trichoderma*. J. Agric. Life Scien. 30(4):406-406.