

Inhibición *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa comercial T22

In vitro inhibition from native isolates of *Trichoderma* against commercial strain T22

Jesús Ortiz – Martínez*, Gabriela Hernández – Ramírez**, Marisol Cruz – Tobón*,
Katia Angélica Figueroa – Rodríguez*, Benjamín Figueroa – Sandoval***,
Francisco Hernández – Rosas****

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar 14 aislamientos nativos del género *Trichoderma* (Tn) obtenidos de la rizósfera del cultivo de caña de azúcar de acuerdo con su efecto de inhibición *In vitro* en cultivos duales contra la cepa comercial de *Trichoderma harzianum* (T22). Los aislamientos nativos con mayor índice de inhibición fueron los denominados Palma (T12) y Hubero (T11), con un valor de 2, mientras que T01, T04, T05 y T08 presentaron un valor de 1. Además, el mayor porcentaje de inhibición fue causado por el aislamiento T03, con una media de $92.32 \pm 2.64\%$, sin diferencias estadísticas con los nativos T07, con un valor inhibición de $88.99 \pm 1.46\%$, T01 $87.93 \pm 2.28\%$, y T12; 87.71 ± 3.16 . En este caso, los aislamientos T07 y T12 mostraron capacidad inhibitoria con mayores atributos para su selección como agentes de control biológico. Al evaluar la tolerancia *In vitro* de los aislamientos nativos de *Trichoderma* a la actividad del agua (a_w), se observó efecto significativo sobre el desarrollo micelial de los aislamientos de *Trichoderma* nativo evaluados. Los aislamientos T03 (7919.3 ± 932.53) y T12 (6388.2 ± 623.40) presentaron el mejor desarrollo radial. Estos resultados sugieren que los aislamientos T03 y T12 podrían desarrollarse mejor bajo condiciones de estrés hídrico. Por lo anterior, concluimos que los aislamientos T07 y T12, son los mejores candidatos como agentes inhibidores y se sugiere evaluarlos *In vitro* o invernadero contra el agente causal de la enfermedad del muermo rojo en caña de azúcar (*Colletotrichum falcatum*).

Palabras clave: Control Biológico, tolerancia, competencia, estrés hídrico, actividad de agua.

Abstract

The objective of this work was to evaluate 14 native *Trichoderma* genus isolates (Tn) obtained from the rhizosphere of sugarcane plantations in accordance with their inhibitory *in vitro* effect on dual cultures against a commercial strain of *Trichoderma harzianum* (T22 strain). The native isolates with the highest inhibition levels were the named Palma (T12) and Hubero (T11), with a type value 2, although the T01, T04, T05 and T08 presented activity type 1. The highest percentage of inhibition of the strain T22 was caused by the isolate T03 (average of $92.32 \pm 2.64\%$), with no statistical difference ($P > 0.05$) from the natives isolates T07 (inhibition average of the $88.99 \pm 1.46\%$), T01 (average $87.93 \pm 2.28\%$), and T12 (average $87.71 \pm 3.16\%$). In this case, T07 and T12 isolates showed inhibitory capacity in more attributes for selection as biological control agents. In assessing tolerance *in vitro* native isolates of *Trichoderma* to water activity (a_w), we observed significant effect on mycelia growth of native *Trichoderma* isolates evaluated. In addition, isolates T03 (average 7919.3 ± 932.53) and T12 (average 6388.2 ± 623.40) had the best radial development. These results suggest that the isolates T03 and T12 could develop better under water stress conditions. Therefore, we conclude that the isolates T07 and T12 are the best candidates

* Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Km. 348 carretera Federal Córdoba – Veracruz, Congregación Manuel León, Amatlan de los Reyes, Ver. CP 94946. Tel: (+52) 2717166000.

** Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca; Av. Veracruz esq. Héroes de Puebla s/n Col. Pemex. Tierra Blanca, Veracruz. México CP. 95180

*** Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí, Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. CP. 78600.

**** Autor de correspondencia: fhrosas@colpos.mx

as inhibitory agents and we suggest evaluating under *in vitro* condition or in greenhouse against with the causal agent of the red rot disease from the sugarcane (*Colletotrichum falcatum*).

Key words: Biological Control, tolerance, competitive, water stress, water activity.

Recibido: octubre 7 de 2012

Aprobado: junio 15 de 2013

Introducción

El género *Trichoderma* ha sido utilizado por su eficacia en el control biológico de enfermedades del sistema radicular entre las que destacan hongos fitopatógenos como: *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* y *Verticillium* (Bell *et al.*, 1982; Joshi *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Además, las especies del género *Trichoderma* pueden actuar a través de la combinación de diferentes mecanismos de acción como antibiosis, competencia, micoparasitismo e inducción de resistencia a la planta, incrementando la respuesta de crecimiento y tolerancia al estrés (Infante *et al.*, 2009; Yedidia *et al.*, 2001). Estos mecanismos de acción dependen de la producción de sustancias inhibitorias de los diferentes aislamientos del antagonista, de la interacción planta-patógeno-antagonista y de las condiciones ambientales que prevalezcan en el agroecosistema (Páez y Sanabria, 2007). Este género también es conocido por producir antibióticos como la tricodermina, trico-dermol, tricotoxina, harzianum A y harzianolido. De acuerdo a Zivkovic *et al.* (2010) dichos antibióticos fueron los causantes de la inhibición de *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*, agentes causales de la antracnosis en frutales. En el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*: Poaceae), la enfermedad conocida como muermo rojo o “cáncer”, causado por *Colletotrichum falcatum* provoca graves pérdidas en la cosecha y se distribuye ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales (Kumar *et al.*, 2010). Durante la temporada de lluvias, se favorece el desarrollo de este patógeno cuando la temperatura oscila entre 25 y 30 °C, además, por dicha presencia se han alcanzado pérdidas en peso de la caña entre 29 y 83%, en la reducción de jugo de 24 a 90% y en el rendimiento de azúcar aproximadamente de 31 a 75% (Munir *et al.*, 1986, Flores, 1997).

Por otra parte, se ha reportado el uso efectivo de *T. harzianum* cepa T22 contra la antracnosis causada por *C. graminicola* en plantas de maíz (Harman *et al.*, 2004). Sin embargo, para que este agente de control sea implementado exitosamente en el agroecosistema caña, es esencial realizar un estudio bioecológico donde se plante la hipótesis en la que los aislamientos nativos de

Trichoderma de la rizósfera de caña, utilizados en esta investigación presentarán una mejor adaptación que las cepas comerciales como T22 bajo las condiciones prevalencias dentro del microambiente de este cultivo como son: temperatura que oscila entre 20 y 50 °C y humedad relativa de 50 o más de 80%, aunado a la supresión que ejercen las aplicaciones constantes de fertilizantes y agroquímicos que conforman un ambiente de estrés y competencia constante de otros microorganismos nativos de la rizósfera de este cultivo. Por lo tanto, el empleo de cepas comerciales como la cepa T22, pudiera generar competencia o inhibición contra los organismos nativos, o simplemente, no prosperar su propagación dentro de la microbiota de la rizósfera de la caña, como sucede con algunas especies del género *Trichoderma* (Hu y St. Leger, 2002; Robinson-Boyera *et al.*, 2009). Sin embargo Bjorkman *et al.*, (1998) reportó que *T. harzianum* promueve el desarrollo de la planta sometidas a condiciones de estrés, como la capacidad de la cepa T22 de *T. harzianum* para mitigar los daños del estrés abiótico en semillas y plántulas de jitomate (Mastouri *et al.*, 2010). Por lo anterior, es importante conocer la capacidad de desarrollo de los aislamientos nativos de *Trichoderma* bajo diferentes condiciones de actividad del agua (a_w). Es por esto que el desarrollo este trabajo fue iniciar un estudio bioecológico *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* de la rizósfera de caña de azúcar, seleccionar el aislamiento nativo con respuesta inhibitoria contra la cepa T22 de *T. harzianum* y finalmente, evaluar la tolerancia de los aislamientos al estrés hídrico en medios de cultivo con baja actividad de agua (a_w).

Materiales y métodos

Aislamientos

En la presente investigación se seleccionaron 14 aislamientos nativos, proporcionados por la colección del Laboratorio de Biotecnología Microbiana (BIOMA) del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, México, de cultivos de caña de azúcar de los ingenios localizados en los estados de Veracruz (VER) y San Luis Potosí (S.L.P), México seleccionados con base en su desarrollo en medio cultivo artificial (PDA) (tabla 1).

Tabla 1. Aislamientos nativos del género *Trichoderma*, clave y origen

Aislamiento	Clave	Origen		
		Ingenio	Población	Estado
Tn 7	T01	San Miguel del Naranjo	El Naranjo	S.L.P
Tn 12	T02	San Miguel del Naranjo	El Naranjo	S.L.P
Tn 13	T03	San Miguel del Naranjo	El Naranjo	S.L.P
Tn 14	T04	San Miguel del Naranjo	El Naranjo	S.L.P
Tn 16	T05	San Miguel del Naranjo	El Naranjo	S.L.P
Tn MS2	T06	Central Motzorongo	Tierra Blanca	VER
Tn MS3	T07	Tres Valles	Tres Valles	VER
Tn MS4	T08	Central Motzorongo	Tierra Blanca	VER
Tn MS5	T09	Tres Valles	Tres Valles	VER
Tn MS8	T10	Tres Valles	Tres Valles	VER
Tn H	T11	El Potrero	Hubero	VER
Tn P	T12	El Potrero	La Palma	VER
Tn JA	T13	Constancia	Joachín	VER
Tn JB	T14	Constancia	Joachín	VER

Tn: *Trichoderma* nativo

Comparación del crecimiento de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de *T. harzianum* cepa T22

Para obtener el inoculo utilizado en el experimento, los aislamientos de *Trichoderma* (tabla 1) fueron cultivados en medio Papa Dextrosa Agar, Bioxon® (PDA) e incubados durante una semana a 28 °C para favorecer el crecimiento micelial. Con los cultivos ya esporulados, se prepararon suspensiones de cada aislamiento y se ajustó la concentración a 2×10^5 esporas/mL. Para realizar la inoculación de los tratamientos en forma equidistante, se midió el diámetro de la caja Petri (90 mm) con ayuda de un Vernier digital CTM®, que consta de una reglilla graduada en pulgadas y centímetros, acoplado a un sensor digital que envía el resultado de la medición del diámetro del hongo a una pantalla de visualización. Para realizar la medición, se trazó en la parte inferior de la caja (base) la línea del diámetro tomando dos puntos sobre está, un punto en el extremo izquierdo de la orilla hacia el centro a una distancia de 30 mm y con una separación de 30 mm de dicha línea

(en el centro), y un segundo punto de la orilla del extremo derecho hacia el centro con 30 mm de longitud. En este sentido, se inoculó una microgota (de 10 µL) de la solución del aislamiento de *Trichoderma* nativo a confrontar del lado derecho y quedando una separación de 30 mm entre ellos, se colocó la microgota de la cepa T22. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente para favorecer el desarrollo radial del micelio con base en la metodología modificada de Porter (1923).

Los 14 tratamientos (aislamientos) tuvieron tres repeticiones y se mantuvieron a 28°C por tres días, en una estufa de cultivo Terlab® para esperar el crecimiento micelial. Una vez transcurridas las 72 h del ensayo, se midió el desarrollo radial del micelio de cada confrontación de los *Trichoderma* nativos y el T22, se digitalizaron las tres repeticiones de cada tratamiento, utilizando dos Software de acceso libre; el programa Gimp® Ver. 2.8 para el procesamiento de imágenes. Para calcular el área de crecimiento de las dos colonias confrontadas en la superficie de la caja Petri, se

utilizó el analizador de imágenes Image Tool® 3.0 que permitió medir el área de la colonia incluyendo funciones estadísticas integradas, ya que se pueden analizar más de 200 imágenes en una sola sesión y calcula las fuentes de variación mediante la desviación estándar (Wilcox *et al.*, 2002).

La digitalización de imágenes, nos permitirá calcular el porcentaje de inhibición de cada tratamiento. En la figura 1 se muestra en el lado izquierdo la imagen real de la inhibición y al lado derecho, la imagen procesada bajo el software Gimp 2.8 ® en forma vectorial para su análisis con el software Image Tool® 3.0.

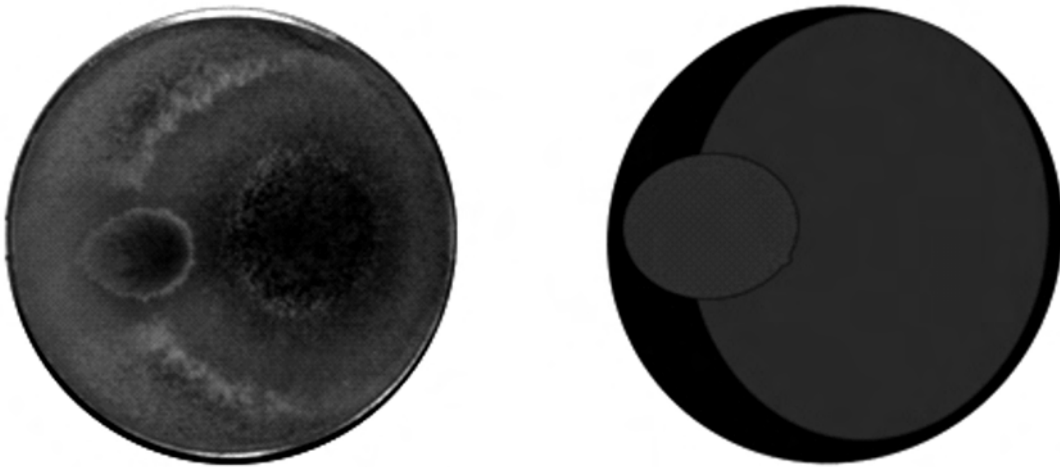


Figura 1. Confrontación imagen real y vectorial. **a)** Confrontación de T03 vs T22, **b)** imagen vectorial, procesada con el software Gimp Ver 2.8.

Con el procesamiento dado a cada tratamiento para discriminar las áreas del desarrollo radial de los aislamientos confrontados (figura 2), se calcularon las áreas de T22 y de cada aislamiento nativo (Tn) con las siguientes operaciones: $T22 = a - b$ y $Tn = a - c - b$; donde $a =$ área total de la caja Petri $b =$ área total menos el área ocupada por la colonia de T22. Y $c =$ área del desarrollo de ambos aislamientos en la confrontación.

Para calcular los porcentajes de inhibición se empleó la fórmula utilizada por Fakhrunnisa *et al.* (2006).

$$I = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde I = Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio

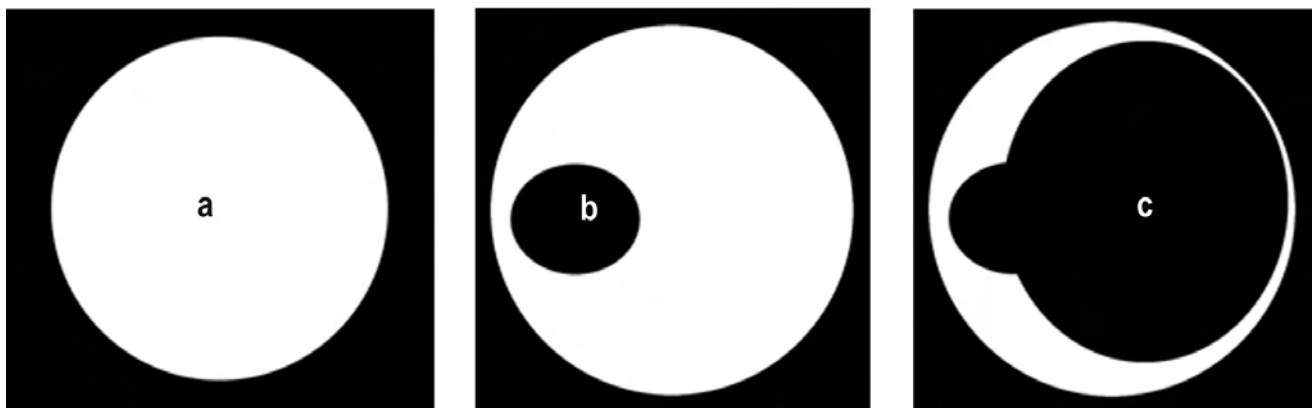


Figura 2. Análisis binario que realiza el Software de imagen vectorial de la confrontación entre Tn13 y T22, procesada con el software Image Tool a) área total de la caja Petri b) área total menos el desarrollo radial de T22 y c) área del desarrollo de ambos aislamientos.

R1 = Crecimiento radial del patógeno sobre el lado opuesto, evaluado en la caja Petri

R2 = Crecimiento radial del patógeno en enfrentamiento

Los datos del porcentaje de inhibición fueron sometidos a la prueba de normalidad y de homogeneidad de Bartlett. Las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar con PROC ANOVA y para la comparación de medias de los porcentajes de inhibición, se utilizó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) en SAS para Windows V 9.2 (SAS, 2009).

Para evaluar la capacidad competitiva por espacio y nutrientes de los aislamientos del género *Trichoderma*,

se realizó un experimento, confrontando aislamientos nativos de este género contra la cepa comercial de *T. harzianum* "T22" (figura 3), con base en la metodología propuesta por Porter (1923).

Se midió el grado de inhibición, utilizando la escala que se ha empleado en estudios de micoparasitismo de *Trichoderma* contra fitopatógenos, (tabla 2), mediante observaciones macroscópicas de las placas con los cultivos duales. Se tomó como índice de inhibición a la invasión de los aislamientos nativos sobre la superficie del micelio de la cepa T22 y para evaluarlo, se usó la escala de Ezziyyani *et al.*, 2004 (tabla 2), citada por Suárez *et al.* (2008) y Fernández y Suárez (2009).

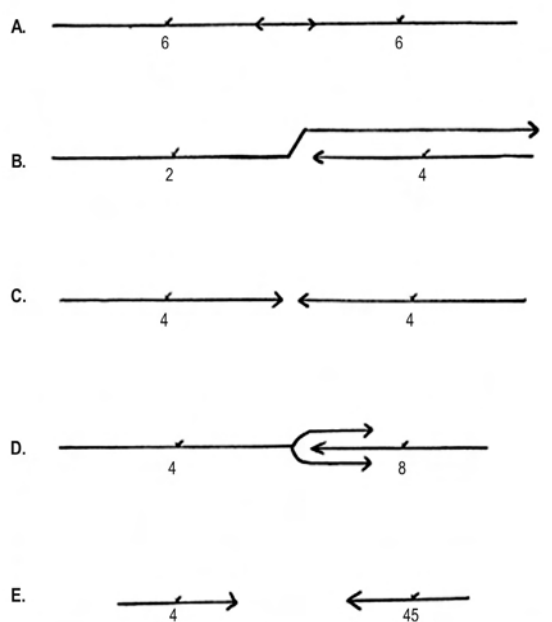


Figura 3. Tipos de Inhibición determinada por Porter, (1923). **A.** mutuamente entrelazados, **B.** sobrepuestos, **C.** inhibición leve, **D.** crecimiento alrededor **E.** inhibición a distancia

Tabla 2. Escala aplicada en la evaluación de la capacidad inhibitoria de los aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa T22 (Porter, 1923).

Grado	Índice de inhibición
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia de la cepa T22
1	Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia de la cepa T22
2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia de la cepa T22
3	Invasión total de la superficie de la colonia de la cepa T22
4	Invasión total de la superficie de la colonia de la cepa T22 y esporulación sobre ella

Tolerancia de aislamientos nativos de *Trichoderma* a la actividad de agua (a_w)

Para evaluar la tolerancia al estrés hídrico de los aislamientos de *Trichoderma*, se utilizó etilenglicol (EG) como supresor de la actividad del agua (a_w), debido a su baja toxicidad y a que no es metabolizado por los hongos (Hernández-Rosas, 2002). Se manejó una concentración al 1% v/v con el medio de cultivo PDA servido en placas de Petri de 90 x 15 mm. Para agregar el EG al medio de cultivo, este fue previamente esterilizado (120 °C y 1.2 Kg/cm²) y se dejó enfriar el medio de cultivo a 60 °C aproximadamente, para agregar el EG y que se homogeneizara en el medio de cultivo PDA. En cada caja de Petri se sirvieron 25 mL de esta mezcla. El tratamiento testigo fue el medio PDA sin ninguna cepa, para confirmar que no existiera desarrollo de otros microorganismos.

El inóculo de cada aislamiento empleado para el desarrollo de este trabajo, se obtuvo de la misma manera que en el bioensayo de comparación del crecimiento de aislamientos nativos, se ajustó la concentración de 2×10^5 esp / mL. La inoculación de las esporas se realizó a temperatura ambiente y se depositaron 10 μ L de la suspensión conidial de cada aislamiento en el centro de la caja Petri; tanto en el medio PDA que fue el Control, como en el PDA + EG 1%. Las cajas inoculadas se incubaron a 28 °C, durante tres días, para digitalizar el desarrollo radial en cada caja. La actividad del agua (a_w) se midió al inicio del experimento en los medios (PDA y PDA + EG 1%), con el medidor digital de actividad del agua marca Decagon®. Las áreas de cada aislamiento se calcularon procesándolas de la manera descrita en el experimento anterior. Se realizó un análisis de varianza con PROC ANOVA a los datos de las áreas calculadas. Para comparar las medias del tratamiento con el EG 1% vs el tratamiento testigo, se realizó la comparación de medias de Dunnett. ($\alpha=0.05$). Cada tratamiento constó de tres repeticiones.

Antagonismo *in vitro* de los aislamientos T07 y T12 contra *C. falcatum*

Para evaluar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sobre *C. falcatum* se seleccionaron los aislamientos T07 y T12 por su capacidad de competencia contra la cepa T22. El aislamiento de *C. falcatum* obtenido de hoja de caña de muestras del estado de Veracruz fue proporcionado por la Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). La inoculación y el cálculo del porcentaje de inhibición se realizaron como se describió en el experimento de la comparación del crecimiento de los aislamientos nativos contra T22.

Los datos del porcentaje de inhibición fueron sometidos a la prueba de normalidad y de homogeneidad de Bartlett. Se realizó un análisis de varianza con PROC ANOVA a los porcentajes de inhibición calculados. Para comparar las medias de los tratamientos se realizó la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Resultados y discusión

Comparación del crecimiento de aislamientos nativos de *Trichoderma* vs *T. harzianum* cepa T22

Al realizar las confrontaciones en el medio de cultivo PDA para evaluar la inhibición de los aislamientos nativos de *Trichoderma* vs *T. harzianum*, cepa T22, se observaron dos tipos de inhibición: tipo B y D. Los aislamientos T02, T03, T06, T07, T09, T10, T13 y T14, no presentaron ninguna invasión de la superficie de la colonia formada por T22, por lo que se les asignó el tipo de inhibición **D** (figura 3), cuando se presenta el crecimiento alrededor del organismo adversario. Considerando la escala que se utilizó para medir el índice de inhibición de estos aislamientos fue cero. Fakhrunnisa *et al.* (2006) mencionan que este tipo de interacción entre dos aislamientos fúngicos se denomina crecimiento mutualista intermedio, donde el desarrollo micelial puede crecer entrecruzado, pero sin ningún signo de interacción microscópica. Esto podría estar asociado con la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de muchas especies de *Trichoderma*, los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no establecen contacto físico (Infante *et al.* 2009). Por esta razón, podríamos sugerir que en la comparación observada por este grupo de aislamientos contra la cepa T22, ejercen su efecto inhibitorio en forma de antibiosis, es decir, la acción directa de metabolitos tóxicos y fungistáticos, producidos por los aislamientos nativos sobre esta cepa (Eziashi *et al.* 2006).

Los aislamientos T01, T04, T05, T08, T11 y T12 presentaron el tipo de inhibición **B** (figura 3), donde se observa un crecimiento superficial sobre el organismo contendiente y el organismo subyacente siempre está inhibido (Cepa T22). El mayor grado de inhibición fue el que presentaron los aislamientos T12 y T11, y se les asignó un valor de 2 porque el desarrollo de estos hongos invadió la mitad de la superficie de la colonia del T22 (figura 4). En cambio, los aislamientos T01, T04, T05 y T08 solo invadieron un cuarto de la superficie de la colonia del T22 (valor 1).



Figura 4. Inhibición tipo B (Porter, 1923) observado entre el aislamiento nativo T12 de *Trichoderma* sp sobre la cepa comercial de *Trichoderma harzianum* "T22".

Los resultados de este experimento muestran la capacidad competitiva de cada uno de los aislamientos estudiados. Los porcentajes de inhibición (I) calculados a las 72 horas de la inoculación de todos los Tn, fueron superiores al área de crecimiento de la cepa T22.

En el porcentaje de inhibición se registraron variaciones de 60 a 92%, el mayor porcentaje fue causado por el aislamiento Tn03, sin diferencias estadísticas con los nativos T07, T01 y T12 (figura 5). De acuerdo con lo reportado por Infante *et al.* (2009) y Sandoval y López

(2002), algunas especies de *Trichoderma* tienen altos niveles de potencial parasítico y actividad metabólica, que les permite confrontar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos.

Los aislamientos T12 y T01 presentaron índice de inhibición, en grado 2 y 1 respectivamente, con estos resultados podemos sugerir que ambos aislamientos podrían utilizar al menos dos modos de acción para producir su efecto antagónico contra algún fitopatógeno como son la inhibición y competencia por nutrientes.

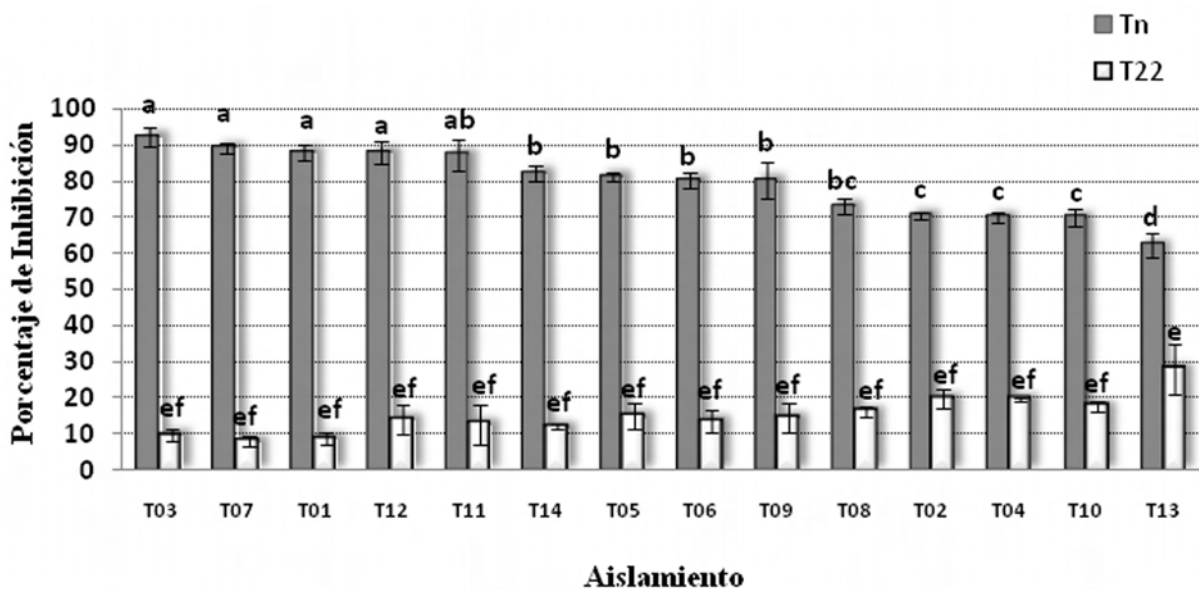


Figura 5. Porcentaje de inhibición de aislamientos nativos de *Trichoderma* vs *Trichoderma harzianum*, cepa comercial T22. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey (LSD=8.6074, GLE=28, $\alpha=0.05$, (P-Value < 0.001, n=42, R2 = 0.803833).

tes y espacio, además las cepas nativas T03, T05, T07 y T12 presentaron abundante esporulación. Zivkovic *et al.* (2010) reportan que el género *Trichoderma* esta biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir en forma de clamidosporas, dándole a este hongo una importante ventaja en la competencia por espacio y nutrientes ante los fitopatógenos. Infante *et al.* (2009) indican que cuando existe competencia por estos recursos, la velocidad de crecimiento y esporulación de un aislamiento puede ser un indicador de la capacidad de colonización efectiva en el nicho ecológico al que pertenece el hongo.

Tolerancia *In vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* a la actividad de agua (a_w)

La disponibilidad de agua puede ser el elemento limitante para el metabolismo de nutrientes y la síntesis de moléculas orgánicas durante el crecimiento hifal, además, permite la degradación extracelular de nutrientes, la actividad enzimática óptima y el transporte de nutrientes a través del micelio fúngico (More, 1996; Hernández - Rosas, 2002). La actividad de agua (a_w) tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo micelial de todos los aislamientos de *Trichoderma* nativos evaluados (figura 6), al inicio del experimento la a_w fue 0.91 en el control (PDA) y 0.88 en el medio tratado con EG 1% (PDA + EG). Se observó que cuando se redujo la a_w , a 0.88 (unidades), el desarrollo micelial de

cada colonia, medido a las 48 horas de la inoculación, disminuyó en promedio 12.37%.

Los aislamientos T03 y T12 presentaron el mejor desarrollo radial (figura 6). Con ambos aislamientos se observó un efecto menor en su crecimiento cuando se disminuyó la a_w en el sustrato. El desarrollo radial de T03 fue menor en 26.80% y el aislamiento T12 solo 23.83% respecto al control (figura 7) mientras que en los demás aislamientos, el crecimiento se redujo hasta un 50.07% o más, respecto al testigo (Crecimiento en PDA). Estos resultados sugieren que los aislamientos T03 y T12 podrían desarrollarse mejor bajo condiciones de estrés hídrico. Resultados similares obtuvieron Aguirre *et al.* (2009) al evaluar la tasa de crecimiento diametral por día (mm.d^{-1}) del hongo *Nomurea rileyi*, expuesto a diferentes atmosferas de a_w modificadas con glicerol, donde observaron mayor crecimiento a mayor actividad de agua (0.998). De igual manera se observó con los aislamientos de *Trichoderma* spp con a_w 0.955 donde el crecimiento y la germinación fue satisfactoria en cambio con una a_w de 0.892 no hubo crecimiento ni germinación en una semana (Schubert *et al.* 2008).

Antagonismo *in vitro* de los aislamientos T07 y T12 contra *C. falcatum*

El análisis de los resultados del porcentaje de inhibición causado por los aislamientos de *Trichoderma*

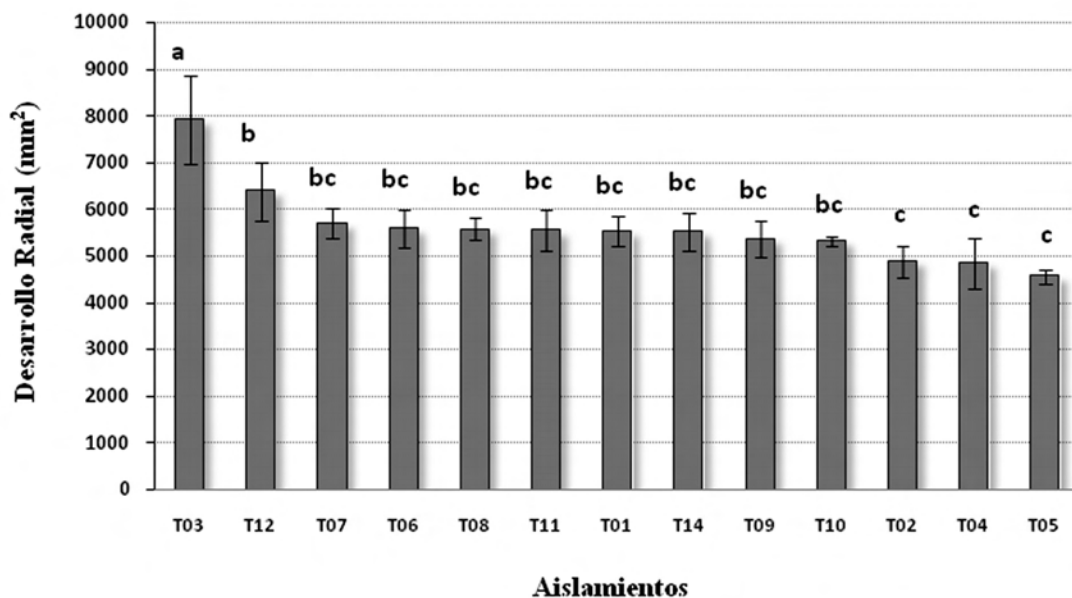


Figura 6. Desarrollo radial de aislamientos nativos de *Trichoderma*, expuestos a condiciones de estrés hídrico simulados con EG 1%. Barras de error estándar con letras diferentes indican diferencias estadísticas (P-Value < 0.001, n=52, R² =0.87333)

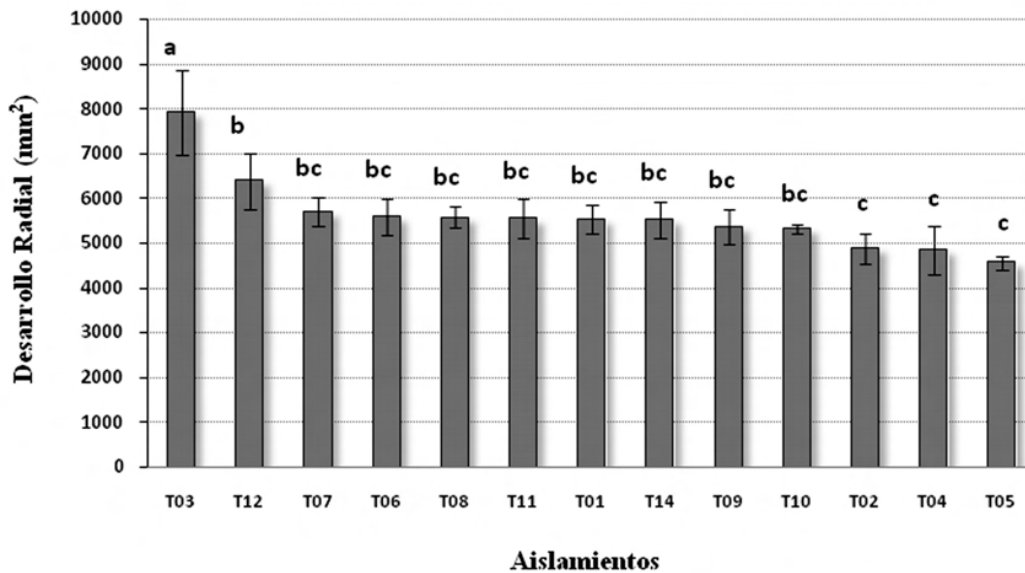


Figura 7. Comparación de medias de Dunnett, del desarrollo radial de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp y del Testigo. DMS; Diferencia mínima significativa GLE; Grados de libertad del error ($\alpha=0.05$, GLE=36, DMS=436.69 mm)
** Significa diferencias estadísticas en los aislamientos respecto al control

nativos contra *C. falcatum*, permitió concluir que los aislamientos T07 y T12 pueden ser probados en campo como agentes de control biológico contra el aislamiento del muermo rojo o enfermedad del cáncer de la caña de azúcar y adicionalmente poseen la ventaja de estar adaptados a las condiciones bióticas y abióticas específicas del agroecosistema considerado en esta investigación. Por lo anterior se sometieron los aislamientos (T07 y T12) a pruebas *in vitro* contra *C. falcatum*, lo que permitió observar que el mejor porcentaje de inhibición contra *C. falcatum* fue causado por el aislamiento T12 (94.05%). Sin embargo, el T07 causó un porcentaje de inhibición de 67.84% (figura 8).

Los resultados encontrados sugieren que los aislamientos nativos del género *Trichoderma* pueden ser utilizados en posteriores interacciones *in vitro* y con potenciales pruebas de campo para observar su efectividad biológica antagónica como agentes biorreguladores, principalmente los aislamientos T07 y T12, ante la problemática de la baja productividad del cultivo de caña de azúcar, el desarrollo de enfermedades asociadas a insectos y la alta humedad relativa que se presentan en este agroecosistema. Adicionalmente, los aislamientos de este género de hongo poseen una fuerte capacidad de movilizar y asimilar los nutrientes del suelo que en su forma original no son accesibles

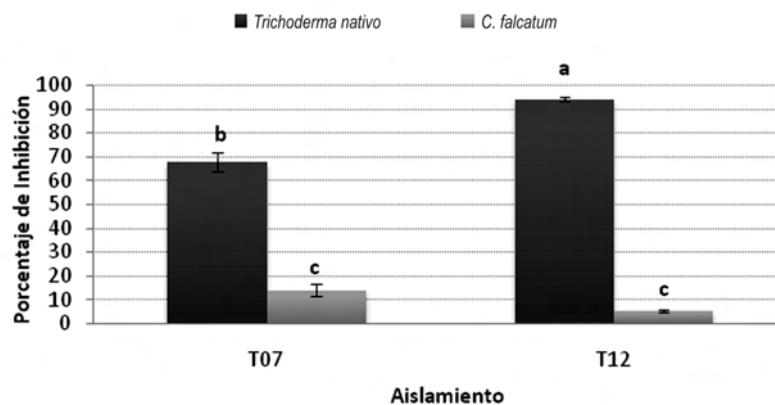


Figura 8. Porcentaje de inhibición de las confrontaciones T07 y T12 contra el hongo *C. falcatum*, DMS; Diferencia mínima significativa GLE; Grados de libertad del error ($\alpha=0.05$, GLE=8, DMS=11.94)

para las plantas, como nitrógeno, fósforo, potasio y carbono orgánico, induciendo al incremento en longitud de las raíces y el posterior aumento de la biomasa, mejorando la tolerancia al estrés hídrico como al déficit de agua (Singh *et al.* 2009).

Conclusiones

Los aislamientos nativos T07 y T12 presentaron alto porcentaje de inhibición contra la cepa T22. Estos atributos permitieron seleccionarlos como mejores candidatos para ser evaluados como agentes de control biológico frente la opción comercial. Además, la capacidad de los aislamientos T03 y T12 para desarrollarse en ambientes con poca disponibilidad de agua (0.88) favorece la absorción y movilización de los nutrientes del suelo con mayor eficiencia. Este incremento en la nutrición puede estar directamente relacionado con el rendimiento de la soca en campo. Finalmente, se recomienda la evaluación *in vitro* y en campo de los aislamientos T07 y T12 contra *C. falcatum*, como agente causal del muermo rojo en el cultivo de caña de azúcar. Finalmente, se recomienda la evaluación *in vitro* y de campo de los aislamientos T07 y T12 *C. falcatum*, como agente causal del muermo rojo en el cultivo de caña de azúcar siguiendo la metodología propuesta en este estudio para las pruebas antagónicas y para la fase de campo la propuesta por Harman *et al.*, (2004)

Los resultados de este estudio permiten demostrar que los aislamientos de microorganismos nativos, provenientes de sistemas o de hábitats particulares, pueden ser una reserva genética con potencial antagonista contra la variedad de fitopatógenos presentes en los agroecosistemas de su procedencia. Se espera que nuestro trabajo sea un ejemplo para futuras investigaciones donde se evalúe la posibilidad de éxito de microorganismos nativos y su aplicación como agentes biorreguladores de enfermedades.

Agradecimientos

A la Línea de Investigación 13 (LPI13): Comunidades Rurales Agrarias, Ejidos y Conocimiento Local; Línea de Investigación 5 (LPI 5): Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal; y Proyecto Nacional SAGARPA-SNITT – COFUPRO – FPV “Diseño de un Programa Contemporáneo de Manejo Integrado de Mosca Pinta en Caña de Azúcar. Finalmente, agradecemos al MC Israel Barrientos Hernández por la digitalización de imágenes.

Referencias bibliográficas

Aguirre N., Villamizar L., Espiner C. y Cotes A. 2009. Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Revista Colombiana de Entomología*. 35: 138-144.

- Bell K., Wells H. and Markham C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72: 379-382.
- Bjorkman, T., Blanchard, L. M., and Harman E. 1998. Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of environmental stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 123: 35-40.
- Eziashi I., Uma U., Adekunle A. and Airede E. 2006. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *African Journal of Biotechnology*. 5: 703-706.
- Ezziyiani, M., S. Pérez, M. Requena, L. Rubio y M. Candela 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 26: 69-78
- Fakhrunnisa H. and Ghaffar A. 2006. *In vitro* interaction of *Fusarium* spp., with other fungi. *Pakistan Journal of Botany*. 38: 1317-1322.
- Fernández J. and Suárez L. 2009. Inhibición *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium Oxysporum* Schlecht f, sp. *passiflorae* en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. Medellín 62: 4743 - 4748.
- Flores, S. 1997. Las enfermedades de la caña de azúcar en México. México, DF. Pp. 285.
- Harman, E., R. Petzoldt, A. Comis and J. Chen. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: 147-153.
- Hernández, F. 2002. Caracterización fisiológica y genética de aislamientos multiespóricos y monoespóricos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Programa en Entomología y Acarología. Págs. 120.
- Hernández-Rosas, F.; Ortiz-Martínez, J, Figueroa-Rodríguez, K. A. 2010. Interacción de *Trichoderma* sp., de la rizósfera de caña de azúcar y hongos entomopatógenos asociados a mosca pinta. XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. 7 al 12 de noviembre. Uruapan, Michoacán. Págs. 128 - 132.
- Hu G. and St. Leger, J. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 6383-6387.
- Infante D., Martínez B., González N. y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24: 14-21.
- Joshi B., Bhatt P. and Bahukhandi D. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *Journal of Environmental Biology*. 31: 921- 928. .

- Kumar N., T. J. Satyavirm and T. Sharma. 2010. Molecular and Pathological characterization of *Colletotrichum falcatum* infecting Subtropical Indian Sugarcane. *J Phytopathology*. 159: 260 - 267
- Matsouri F., Björkman T. and Harman E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Biological Control*. 100: 1213-1221.
- More, E. 1996. Fundamentals of the fungi. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 pp.
- Munir A., Roshan A. and Fasihi D. 1986. Effect of different infection levels of red rot of sugarcane on cane weight and juice quality. *Journal of Agricultural Research*. 24:129-131.
- Páez M. E. y Sanabria N. 2007. Evaluación de la capacidad antagonista de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista de la Facultad de Agronomía*. (LUZ), 24: 27-31.
- Porter C. 1923. Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. *American Journal of Botany*. 11(3): 168-188.
- Robinson-Boyera L., Jegerb J., Xu M. and Jeffries P. 2009. Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Science and Technology*. 19 (10): 1051 - 1065.
- Sandoval I. y López M. 2002. Inhibición de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseoli* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad*. 4: 69 - 72.
- SAS. 2009. Statistical Analysis System. Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schubert M., Fink S and Schwarze F. W. M.R. 2008. *In vitro* screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. *Arboricultural Journal*. 31: 227 - 248.
- Singh, B. and R. Singh, 1994. Varietal differences in net assimilation rate and relative growth rate of sugarcane under moisture stress. *Indian Journal of Plant Physiology*. 37: 183-184
- Singh V., Singh N., Yadav L., Awasthi K., Joshi, B., Singh K., Singh J. Duttamajumder K. 2010. Increasing the efficacy of *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of red rot in sugarcane. *Journal of Horticulture and Forestry*. 2: 66-71.
- Suárez L., Fernández J., Valero O., Gámez M., and Páez R. 2008. Inhibición *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10: 35-43.
- Wilcox, C. D., S. B. Dove, W. D. McDavid and D. B. Greer. 2002. Image tool for Windows Ver 3.0. The University of Texas, Health Science Center, Department of Dental Diagnostic Science, San Antonio, Texas, USA.
- Yedidia I., Srivastava K., Kapulnik Y. and Chet I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelements concentration and increased growth of cucumber. *Plant Soil* 235:235-242.
- Zivkovic S., Stojanovic S., Ivanovic Z., Gavrilovic V., Popovic T. and Balaz J. 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Science Belgrade*. 62: 611-623.