

Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp.

Analysis of the action mode and the antagonistic capability of *Trichoderma asperellum* against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium* sp.

Paola Sanmartín-Negredo¹, Xiomara López², Milena Patricia Pemberthy³, David Granada-Sinar⁴ y Ever Antony Rueda-Lorza^{5*}

Resumen. Se evaluó la contribución de diferentes modos de acción en la actividad antagónica total *in vitro* de cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* frente a los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. Los modos de acción, evaluados de manera individual, correspondieron a la actividad biocida de compuestos volátiles y de metabolitos extracelulares solubles y la capacidad de degradación de quitina y carboximetilcelulosa asociada a la actividad enzimática en medios mínimos. Adicionalmente, se realizaron perfiles químicos preliminares mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (high performance liquid chromatography, HPLC, por sus siglas en inglés) de los extractos de los metabolitos extracelulares solubles y se compararon cualitativamente con los ensayos de actividad biocida. Para determinar el modo de acción del antagonismo total de las cepas de *T. asperellum* evaluadas, se realizó un análisis de correlación de Pearson, un análisis de componentes principales (ACP) y análisis clúster entre todas las variables analizadas. Se observó que la capacidad antagónica de las cepas fue explicada, principalmente, por el enfrentamiento directo y la actividad de los metabolitos volátiles. Los perfiles cromatográficos permitieron asociar la actividad antagónica de las cepas con la presencia de picos fácilmente diferenciables entre los cromatogramas. El análisis de componentes principales para *Fusarium* sp. presentó un primer componente influyente sobre el antagonismo total y la actividad de los metabolitos volátiles, que explican el 83,68% de la varianza total del modelo.

^{1,2,3,4} Unidad de Fitosanidad y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Antioquia, Colombia.

⁵ Universidad del Tolima, C.P. 73000-6299, Ibagué, Tolima. Colombia.

* earuedal@ut.edu.co

Para el caso de *C. gloeosporioides*, el primer componente explica el 73,47% de la varianza del modelo e influyó de forma significativa sobre el crecimiento asociado a la actividad quitinolítica y celulolítica y a la inhibición ejercida por compuestos volátiles y metabolitos extracelulares solubles. La actividad antagonista sobre *C. gloeosporioides* se puede atribuir mayoritariamente al efecto biocida de los compuestos volátiles, mientras que la actividad sobre *Fusarium* sp. se atribuye al aporte simultáneo de varias actividades.

Palabras clave: *Trichoderma asperellum*, actividad antagonista, control biológico, modo de acción, sustancias bioactivas.

Abstract. The contribution to the mode of action in total *in vitro* antagonistic activity of four *Trichoderma asperellum* strains against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium* sp. was assessed. The mode of actions were studied individually, namely, biocidal activity of volatile compounds and extracellular soluble metabolites, and chitin and carboxymethylcellulose degradation capability associated to enzymatic activity in a minimum medium. Moreover, we performed preliminary chemical profiles by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of the extracts from the extracellular soluble metabolites, which were compared qualitatively with the biological activity assays. A Pearson correlation analysis, a Principal Components Analysis (PCA) and a Cluster Analysis were carried out among all of the variables to determine the total mode of action of the *T. asperellum* strains. As a result, the overall antagonistic capability of the strains was mainly due to direct confrontation and the volatile metabolites activity. The chromatographic profiles allowed us to associate the antagonistic activity of the strains with some straightforward detectable peaks in the chromatograms. The PCA analysis on *Fusarium* sp. showed an important component that influenced in the total antagonism and the volatile metabolites activity by explaining the 83,68% of total model variance. On the other hand, the component number one explained the 73,47% of the model variance on *C. gloeosporioides* and influenced significantly the growth associated to chitinolytic and cellulolytic activity and the inhibition exerted by volatile metabolites and extracellular soluble metabolites. Finally, the antagonistic activity against *C. gloeosporioides* is due mainly to the biocidal effect of volatile metabolites, while the activity against *Fusarium* sp. is due to the simultaneous action of several of the tested activities.

Keywords: *Trichoderma asperellum* antagonistic activity, biological control, mode of action, bioactive substances.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los hongos fitopatógenos de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* son de gran importancia para el sector agrícola en Colombia, debido a que ocasionan

pérdidas económicas hasta del 100% en una gran variedad de cultivos (Alzate *et al.*, 2009). *Colletotrichum* spp. es el agente causal de la antracnosis en cultivos, como el tomate de árbol, ñame, fresa, mango, aguacate, entre otros (Freeman, Katan y Ezra, 1998; Abang *et al.*, 2009). Por otro lado, *Fusarium* spp. es el agente etiológico de la fusariosis o pudrición seca en plantaciones de tomate, flores, plátano, etc. (Herrera y Ulloa 1998; Avendaño, Arbeláez y Rondón, 2006; Fernández y Suárez, 2009).

Una de las estrategias utilizadas para el control de patologías agrícolas es el uso de agentes de control biológico cuyo empleo, en conjunto con otras medidas de control y prevención, logran disminuir considerablemente la incidencia del fitopatógeno con el mínimo impacto para el ambiente y la salud humana (López, 1999; Benítez *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008a; Alzate *et al.*, 2009).

Trichoderma spp., género de hongo anamórfico habitante del suelo, es uno de los agentes biocontroladores más utilizados debido a su alta capacidad antagonica frente a diferentes microorganismos fitopatógenos. Se destaca por presentar una alta tasa de multiplicación, plasticidad ecológica y capacidad de producir estructuras de resistencia. Además, se ha reportado que posee un efecto estimulante sobre el crecimiento de cultivos e induce tanto resistencia sistémica como factores de avirulencia en plantas (Samuels, 1996; Grondona *et al.*, 1997).

La alta capacidad antagonica de *Trichoderma* spp. se debe a que presenta diferentes mecanismos de acción contra hongos fitopatógenos, entre los que se encuentran el micoparasitismo y la competencia por espacio y nutrientes. Por medio estos mecanismos, el antagonista, mediante modos físicos y químicos, ataca al patógeno hasta provocar su muerte (Dennis y Webster, 1971c; Harman *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009). *Trichoderma* spp. también utiliza la antibiosis como mecanismo de ataque, el cual consiste en la producción de metabolitos secundarios con capacidad antibiótica (i. e., compuestos solubles en agua, volátiles y peptaboloideos), implicados en mecanismos de supervivencia del hongo (Dennis y Webster, 1971a; Lorito *et al.*, 1996; Vinale *et al.*, 2008a, b). Adicionalmente, el hongo tiene la capacidad de producir compuestos inhibidores de crecimiento y es fuente de enzimas degradadoras de pared celular, tales como celulasas, quitinasas, proteasas, entre otras, lo que hacen de este microorganismo uno de los antagonistas más estudiados y comercializados, como biopesticida o biofertilizante (Barbosa *et al.*, 2001; Carrillo, 2003; Goltapeh y Danesh, 2006; Schubert, Fink y Schwarze, 2008; Vinale *et al.*, 2008a; Ajith y Lakshmi, 2010).

En esta investigación, se evaluó el aporte de diferentes respuestas bioquímicas a la actividad antagonista total de cuatro cepas de *T. asperellum*, frente a los hongos fitopatógenos *C. Gloeosporioides* y *Fusarium* sp. Cada uno de estos mecanismos se evaluó de manera individual mediante métodos, como el enfrentamiento dual con el fitopatógeno, la obtención y evaluación de metabolitos extracelulares solubles y metabolitos volátiles, y mediante la evaluación de su capacidad de crecimiento en medios mínimos de quitina y carboximetilcelulosa como medida indirecta de su actividad enzimática.

2. METODOLOGÍA

2.1 Material biológico

Se utilizaron las cepas T19, T21, T22 y T38 de *T. asperellum* que demostraron antagonismo en estudios previos sobre algunos fitopatógenos (Hoyos, 2007), y una cepa de *C. gloeosporioides*, pertenecientes a la colección de microorganismos de la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). El aislamiento de *Fusarium* sp. se realizó en la finca Las Olas de Flores el Trigal, Antioquia. Todos los hongos fueron cultivados en agar papa-dextrosa (PDA, Merck[®]) a 27 °C, con fotoperiodos de luz-oscuridad 12:12. Las cepas de *T. asperellum* se incubaron durante ocho días y los fitopatógenos durante 15 días.

2.2 Aislamiento de *Fusarium* sp.

Fusarium sp. fue aislado a partir de flores infectadas de *Chrysanthemum morifolium* variedad Anastasia blanca, las cuales se cortaron en trozos de 0,5 cm, se separaron tallos, raíces y flores y se lavaron con hipoclorito de sodio (1,5% v/v) y agua destilada estéril. Posteriormente, se incubaron en cámara húmeda a 25 °C por 48 horas (Quilambaqui, 2005). El micelio observado se replicó, primero, en PDA, y, luego, en medio selectivo para *Fusarium*, compuesto por PDA (infusión de papa 4,0 g/L, D(+)-glucosa 20,0 g/L, agar-agar 15,0 g/L), sulfato de estreptomina (300 mg/L, Sigma-Aldrich[®]) y pentacloronitrobenzoceno (PCNB, 750 mg/L, Sigma-Aldrich[®]). Adicionalmente, se hicieron observaciones microscópicas para confirmar la presencia del fitopatógeno.

2.3 Evaluación del antagonismo total *in vitro*

Los experimentos se realizaron en cajas de Petri utilizando como medio de cultivo PDA. Se tomaron discos de 0,5 cm de diámetro del micelio de cada cepa y se ubicaron a una distancia de 8 cm entre discos, enfrentando cada patógeno (*Fusarium*

sp. y *C. gloeosporioides*) a cada uno de los antagonistas. Los controles de crecimiento fueron cada una de las cepas enfrentadas consigo mismas (Reaves y Crawford, 1994). Los enfrentamientos se incubaron a 27 °C, en fotoperiodos de luz-oscuridad 12:12, y se hicieron mediciones del crecimiento radial durante seis días aproximadamente. A partir de los datos, se realizaron curvas de crecimiento del patógeno. El antagonismo de las cuatro cepas de *T. Asperellum* se obtuvo a partir de la fórmula:

$$\%I = \frac{ABCc - ABCe}{ABCc} \times 100 \quad [1]$$

Donde, %I es el porcentaje de inhibición. ABCe es el área bajo la curva del crecimiento del fitopatógeno enfrentado al antagonista. ABCc es el área bajo la curva del crecimiento del fitopatógeno control no enfrentado con el antagonista.

El área bajo la curva se determinó mediante el conteo de número de píxeles en el programa de fotografía GIMP 2.6, a partir de los gráficos de la cinética de crecimiento (Abramoff *et al.*, 2004).

Adicionalmente, se comprobó el micoparasitismo de las cuatro cepas de *T. asperellum* mediante la siguiente escala de la capacidad antagónica: ninguna invasión de la superficie de la colonia del fitopatógeno —grado 0—; invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del fitopatógeno —grado 1—; invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del fitopatógeno —grado 2—; invasión total de la superficie de la colonia del fitopatógeno —grado 3—; e invasión total de la superficie de la colonia del fitopatógeno y esporulación sobre ella —grado 4— (Fernández y Suárez, 2009).

Las observaciones microscópicas se realizaron a los ocho días para identificar el tipo de interacción hifal entre fitopatógeno y antagonista, tales como: enrollamiento circular, enrollamiento lateral, anastomosis e hifas no afectadas (Reaves y Crawford, 1994). Los montajes microscópicos se hicieron a partir de los enfrentamientos y de microcultivos utilizando hidróxido de potasio (KOH, Protokimica) al 10% (p/v), azul de lactofenol y rojo congo como colorantes (Sánchez, 2004).

2.4 Obtención de metabolitos extracelulares del antagonista

Se realizó a partir de la fermentación sumergida de cada una de las cepas de *T. Asperellum*, y se denominaron igual que su cepa de procedencia (T19, T21, T22 y T38). Se tomaron cuatro discos de 0,5 cm de diámetro del cultivo puro de una de las cepas

y se adicionaron a un erlenmeyer con 1 L de PDB (caldo papa-dextrosa, Merck). Se incubó en agitador orbital a 30 °C y 150 rpm por cinco días. Este procedimiento se hizo para cada cepa del antagonista. Después de finalizado el tiempo de incubación, cada cultivo se filtró, primero, con un tamiz y luego por filtración tangencial (tamaño de poro: 0,45 µm). El sobrenadante obtenido se congeló a -20 °C y se sometió a liofilización. Una vez eliminada el agua, se realizaron tres extracciones con porciones de 100 ml de metanol y se filtró con papel filtro (Whatman®). El solvente se eliminó por evaporación bajo presión reducida, obteniéndose de esta forma entre 900 y 1.000 mg de extracto crudo.

2.5 Preparación de inóculos fúngicos

La suspensión de conidias de los fitopatógenos se preparó a partir de un cultivo puro del hongo, agregando tres gotas de Tween 80 (Sigma-Aldrich®) y 10 ml de agua destilada estéril a la caja de Petri, en la cual se desprendió el contenido y posteriormente se filtró con una gasa para retirar el micelio y resxtos de medio. La concentración de la suspensión de conidias fue determinada por conteo en cámara de Neubauer (Boeco-Germany®) y ajustada a 5×10^6 conidias/ml.

2.6 Actividad antifúngica de los extractos extracelulares

Los extractos crudos de las cepas antagonicas se diluyeron en agua destilada estéril, se llevaron a una concentración *stock* de 1% (p/v) y se sometieron a radiación UV durante 15 min. La actividad antifúngica de los extractos se determinó por la técnica de microplaca (Thines *et al.*, 2004; Poveda, 2006). Los tratamientos consistieron en agregar 100 µl de caldo líquido Sabouraud (BD™), 50 µl de la suspensión de conidias de los fitopatógenos y 50 µl del extracto de cada cepa antagonica en cada pozo. Los controles de los fitopatógenos constaron de lo mismo, adicionando 50 µl de agua destilada estéril a cambio del extracto fúngico. La concentración final del extracto fue de 0,25% (p/v) y se realizaron 16 réplicas por tratamiento. Cada ensayo contó con un control de contaminación del medio (100 µl de caldo Sabouraud y 100 µl de agua destilada estéril) y con un control de contaminación del extracto (100 µl de caldo Sabouraud, 50 µl del extracto y 50 µl de agua destilada estéril). Las microplacas se incubaron a 30 °C y se realizaron mediciones de absorbancia a 595 nm cada 24 horas en un lector de microplacas modelo 680XR (BIO-RAD®). La actividad antifúngica de los extractos se calculó con la ecuación 1 para así obtener el porcentaje de inhibición de los extractos de las cepas del antagonista sobre ambos fitopatógenos.

2.7 Perfil cromatográfico de los extractos extracelulares

Los extractos obtenidos por las cuatro cepas de *T. asperellum* fueron analizados por HPLC como primera etapa en la identificación, aislamiento y elucidación de los posibles compuestos participantes en el mecanismo de acción del antagonista. La concentración de todos los extractos fue de 5000 ppm, y se empleó un cromatógrafo Agilent Serie 1200 (Agilent Technologies) en modo analítico, equipado con desgasi-ficador, bomba cuaternaria, muestreador automático y detector de arreglo de diodos (DAD). En todas las cromatografías se utilizó una fase estacionaria C-18 (Agilent Technologies, Eclipse XDB-C18) empacada en una columna de 2,2 × 150 mm con un tamaño de partícula de 5 µm, flujo 0,5 ml/min y un volumen de inyección de 20 µl. Se emplearon agua (T1, MilliQ) y metanol HPLC (Merck®) como fase móvil para un tiempo de análisis de 15 min, con un gradiente del 0 a 100% metanol por 10 min, seguido del 100% metanol hasta los 15 min.

2.8 Evaluación de metabolitos volátiles

El efecto de los compuestos volátiles de las cuatro cepas de *T. asperellum* contra los fitopatógenos se evaluó con la metodología descrita por Dennis y Webster (1971b), con algunas modificaciones. Se colocaron discos de 0,5 cm de diámetro provenientes de un cultivo puro del antagonista y del patógeno en el centro de dos bases de Petri que contenían PDA (cada uno en una base). Las bases inoculadas se colocaron una frente a la otra y se sellaron con papel parafilm, utilizando como controles cultivos no enfrentados. Los montajes fueron incubados a 27 °C en fotoperiodos de luz-oscuridad 12:12 y se hicieron mediciones diarias del diámetro de crecimiento de los patógenos y antagonistas durante cinco días aproximadamente (Barbosa *et. al.*, 2001; Ajith y Lakshmi, 2010).

Para evaluar el efecto antagónico de los metabolitos volátiles, se calcularon las diferentes áreas bajo la curva de la cinética de crecimiento (GIMP 2.6) del patógeno enfrentado, y se compararon contra los controles no enfrentados utilizando la ecuación 1.

2.9 Evaluación del crecimiento en un medio mínimo de quitina y CMC

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las cuatro cepas de *T. asperellum* en dos medios mínimos utilizando como fuentes de carbono carboximetilcelulosa (CMC) y quitina. La composición de sales de ambos medios fue: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L, Na_2HPO_4 1,1 g/L, KH_2PO_4 0,7 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, MnSO_4 1 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1

mg/L, agar bacteriológico 15 g/L, y como fuente de carbono a uno se le adicionó CMC5 g/L y al otro quitina coloidal 10 g/L (Atlas, 1995). Los cultivos se incubaron a 27 °C en fotoperiodos de luz-oscuridad 12:12, midiéndose el diámetro de crecimiento cada 24 horas, durante cinco días aproximadamente. Se calculó el porcentaje de crecimiento en cada medio mínimo con respecto al crecimiento en PDA, mediante la fórmula:

$$\% \text{ Crecimiento} = C1/C2 \times 100 \text{ [2]}$$

Donde:

C1 es el área bajo la curva de crecimiento del antagonista en el medio mínimo y *C2* es el área bajo la curva de crecimiento del antagonista en PDA.

2.10 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA). Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) y pruebas de comparación de medias de Tukey utilizando el paquete estadístico SAS®. Cada ensayo contó con tres repeticiones en el tiempo, y 16 réplicas por tratamiento para los ensayos por microtécnica.

Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación de Pearson, un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis clúster entre todas las variables analizadas para realizar una aproximación al modo de acción del antagonismo total de las cepas de *T. asperellum* evaluadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de *Fusarium* sp.

El hongo se aisló a partir del tallo de *C. morifolium* var. Anastasia. A las 72 horas presentó colonias de crecimiento radial, color blanco o *beige* uniforme, ligeramente algodonosas y de crecimiento elevado. Luego de ocho días de crecimiento, algunas colonias mostraron una coloración amarillo naranja tornando el medio del mismo color. Después de 20 días, se observaron exudados secretados en la superficie de la colonia (ver figura 1A).

En el microscopio se observaron hifas septadas, hialinas, clamidosporas, microconi-

dias unicelulares, subglobosas y claviformes y macroconidias multiseptadas —de dos a cuatro septos— moderadamente curvadas, de pared delgada y con la célula apical más o menos puntiaguda (ver figuras 1B-C). Se encontraron conidióforos tanto de una sola célula conidiógena como ramificados (ver figura 1D).

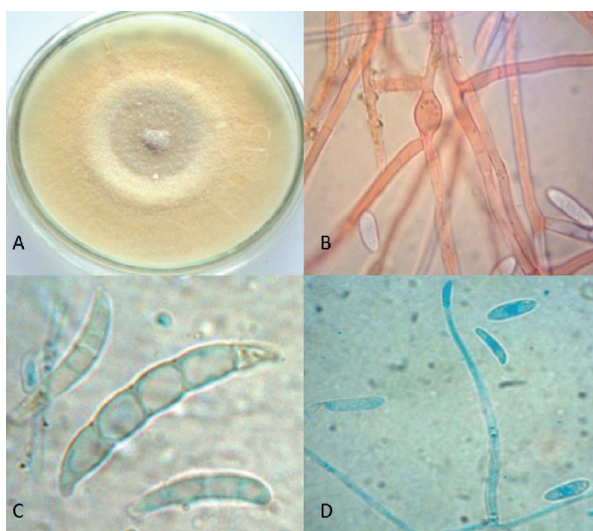


Figura 1. A) *Fusarium* sp., creciendo en agar PDA; B) Hifas septadas, microconidias y clamidosporas de *Fusarium* sp. (400X). C) Macroconidias multiseptadas de *Fusarium* sp. (1.000X). D) Monofialides con una célula conidiógena (400X).

3.2 Evaluación del antagonismo total *in vitro*

Todas las cepas de *T. asperellum* presentaron un alto grado de antagonismo sobre los dos fitopatógenos evaluados, con porcentajes de inhibición que varían desde el 42,4% hasta el 66,8%, lo que mostró mejor antagonismo contra *C. gloeosporioides* que contra *Fusarium* sp.

El ANOVA realizado, para comparar el porcentaje de inhibición de las cuatro cepas de *T. Asperellum* contra *C. gloeosporioides*, muestra que, a un nivel de significancia del 5%, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de inhibición obtenidos en los enfrentamientos con las cepas del antagonista. Por el contrario, el ANOVA que se efectuó para *Fusarium* sp. mostró que sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el antagonismo de cada una de las cepas evaluadas; la T19 fue la que obtuvo el menor porcentaje de inhibición, comparada con las demás, que no presentan diferencias estadísticas entre ellas (ver figura 2).

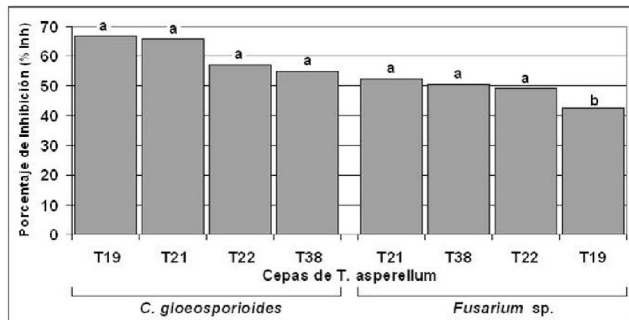


Figura 2. Porcentaje de inhibición de *C. gloeosporioides* y *Fusarium sp.* por las diferentes cepas de *T. asperellum* evaluadas mediante la técnica de enfrentamiento dual. La letra sobre las barras indica la conformación de grupos homogéneos.

Las observaciones macroscópicas muestran la interacción antagonista-fitopatógeno (ver figura 3). Después de una semana de incubación, cuando el antagonista y el fitopatógeno se encuentran, primero se observa una zona de inhibición, luego una intermezcla y finalmente un sobrecrecimiento de *T. Asperellum*, tanto sobre *C. gloeosporioides* como sobre *Fusarium sp.*, cubriéndolos totalmente a los 10 días (ver figuras 3 D-G). Todas las cepas del antagonista mostraron una invasión total y esporulación sobre la superficie de la colonia de ambos fitopatógenos, lo cual califica a *T. asperellum* en un grado antagonístico cuatro, según la escala propuesta por Elías y Arco (1984, citado por Fernández y Suárez, 2009).

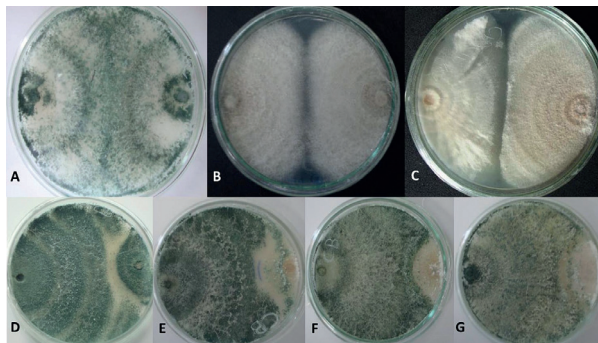


Figura 3. Enfrentamientos de *T. asperellum* contra *Fusarium sp.* y *C. gloeosporioides*. **A)** Crecimiento de *T. asperellum* en agar PDA, utilizado como control; **B)** Crecimiento de *C. gloeosporioides* en agar PDA, utilizado como control; **C)** Crecimiento de *Fusarium sp.* en agar PDA, utilizado como control; **D)** *T. asperellum* cepa T19 enfrentada contra *Fusarium sp.*; **E)** *T. asperellum* cepa T21 enfrentada contra *Fusarium sp.*; **F)** *T. asperellum* cepa T22 enfrentada contra *C. gloeosporioides*; **G)** *T. asperellum* cepa T38 enfrentada contra *C. gloeosporioides*.

Microscópicamente (ver figura 4), se logró apreciar las hifas de *T. asperellum* más delgadas que las de los fitopatógenos. En la zona de interacción, se identificaron procesos, como anastomosis y enrollamiento circular y lateral, mientras que, en zonas alejadas a la interacción, se observó hifas no afectadas.

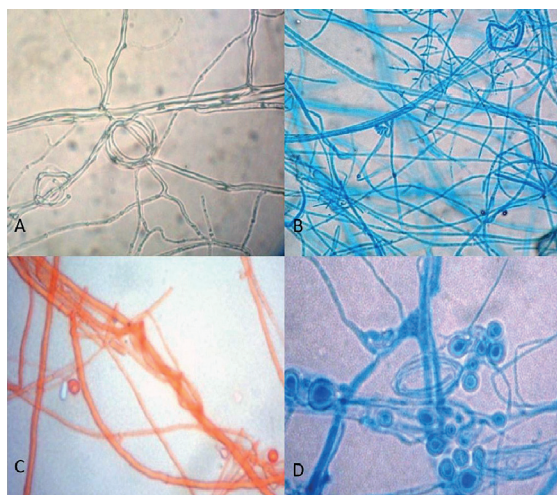


Figura 4. Microfotografías de la interacción entre *T. asperellum* y los fitopatógenos. **A)** Enrollamiento circular; **B)** Anastomosis; **C-D)** Enrollamiento lateral. 400X.

3.3 Actividad antifúngica de los extractos de metabolitos extracelulares

El análisis realizado indica que existen diferencias estadísticamente significativas a un valor $p < 0,05$ en el porcentaje de inhibición obtenido con cada uno de los extractos del antagonista contra *Fusarium* sp. (ver figura 5). El extracto que mostró la mayor actividad antifúngica sobre dicho fitopatógeno fue el de la cepa T38 con un valor del 18,2%, mientras que el extracto de la cepa T21 fue del 4,6%. Es de resaltar que la prueba de comparación de medias mostró que tanto el extracto de T19 como el extracto de T22 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas; es decir, presentan igual actividad antifúngica contra *Fusarium* sp.

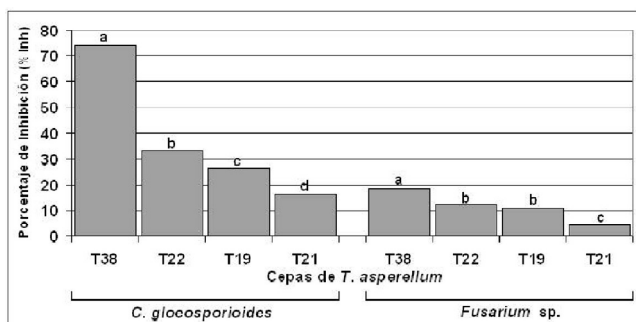


Figura 5. Porcentaje de inhibición causado por los extractos de las cepas de *T. asperellum* sobre *C. gloeosporioides* y *Fusarium sp.*

El análisis de los extractos del antagonista contra *C. Gloeosporioides* fue similar al de *Fusarium sp.*, ya que el T38 presentó una inhibición del 74%, seguido por el T22 (33,1%) y luego por el T19 (26,4%), mientras que el extracto T21 presentó la menor actividad con el 16,1% de inhibición (ver figura 5).

3.4 Perfil cromatográfico de los metabolitos extracelulares

Los cromatogramas obtenidos de cada extracto del antagonista muestran perfiles de metabolitos secundarios similares entre las cuatro cepas, pero con cantidades relativas diferentes (ver figura 6). Existe una región semejante entre los cromatogramas, la cual se encuentra desde el inicio hasta el minuto 2 y donde se concentra una gran cantidad de compuestos. Lo anterior indicó similitudes entre estos extractos. A un tiempo de retención de cinco minutos se observa un compuesto con un gradiente de concentración relativa en el orden T38, T19, T22 y T21. Igualmente, se presenta un pico a los 13,7 min, cuya proporción es superior en T38, extracto que muestra una alta actividad biocida contra los fitopatógenos evaluados. Se resalta que los cromatogramas de T19 (ver figura 6A) y T38 (ver figura 6D) muestran semejanzas en los perfiles en la mayoría de las regiones, que sugieren composición de metabolitos similares que, probablemente desempeñan un papel importante en la actividad biocida de estos extractos contra *Fusarium sp.* y *C. gloeosporioides*.

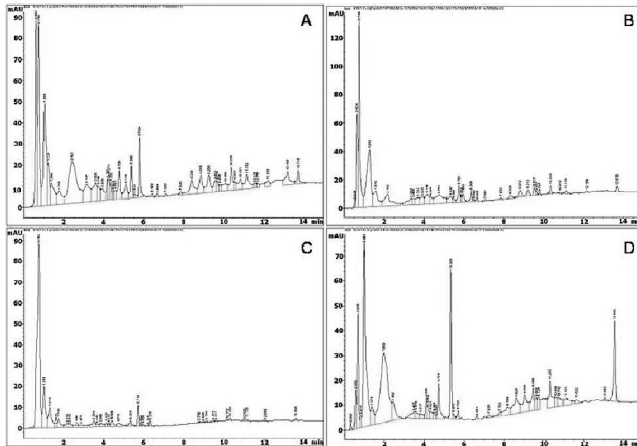


Figura 6. Perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios de las cepas de *T. asperellum* evaluadas. **A)** T19; **B)** T21; **C)** T22; **D)** T38.

3.5 Evaluación de metabolitos volátiles

La evaluación de los metabolitos volátiles contra *Fusarium* sp. (ver figura 7) muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas a un valor $p > 0,05$ entre los porcentajes de inhibición de las sustancias volátiles de T19, T21, T22 y T38, mientras que los metabolitos de T38 presentaron un mayor porcentaje de inhibición (37,8%) contra *C. gloeosporioides*, porcentaje que es estadísticamente diferente del obtenido por los demás.

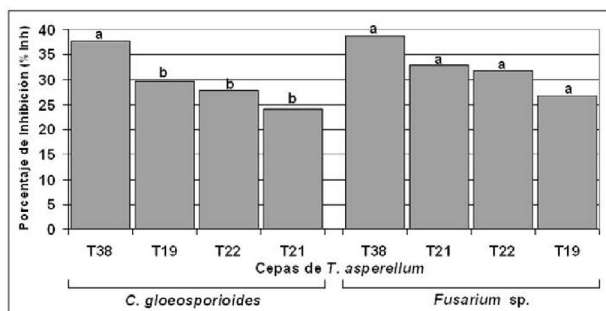


Figura 7. Porcentaje de inhibición de los compuestos volátiles pertenecientes a las cuatro cepas de *T. asperellum* evaluadas sobre *C. gloeosporioides* y *Fusarium* sp. La letra sobre la barra indica la conformación de grupos homogéneos.

3.6 Evaluación del crecimiento en un medio mínimo de quitina y CMC

Al analizar el crecimiento de las distintas cepas del antagonista sobre el medio mínimo de carboximetilcelulosa (CMC), se observó que T21 es la cepa que mayor porcentaje de crecimiento presenta (71%) frente a las demás (ver figura 8). Por el contrario, la cepa T38, con un valor del 92,3%, fue la que presentó un mayor crecimiento en medio mínimo de quitina coloidal, comparado con las demás cepas de *T. asperellum* evaluadas. El aumento en estos medios demostró la capacidad del hongo para producir enzimas quitinolíticas y celulolíticas.

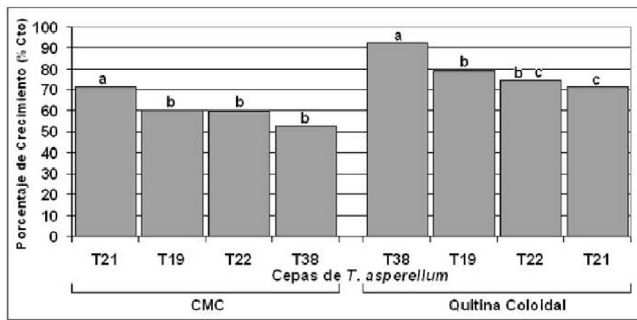


Figura 8. Porcentaje de crecimiento de las cuatro cepas de *T. asperellum* en medio mínimo de carboximetilcelulosa (CMC) y quitina coloidal. La letra sobre la barra indica la conformación de grupos homogéneos.

3.7 Análisis de correlación de componentes principales y clúster

Las correlaciones obtenidas entre el antagonismo total sobre *Fusarium* sp. y las otras actividades evaluadas muestran una correlación positiva entre el antagonismo total y la actividad debida a metabolitos volátiles, con el 29%, seguida del crecimiento asociado a la actividad celulosa (25%). La mayor correlación entre mecanismos (90%) fue la existente entre la actividad debida a metabolitos extracelulares y la asociada a la actividad quitinasa (ver figura 9).

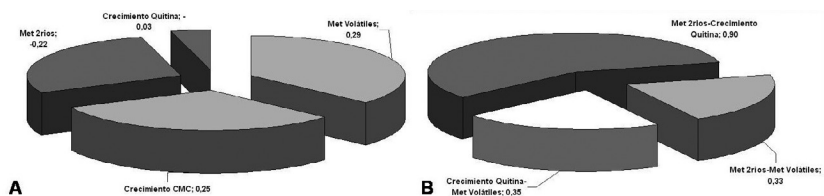


Figura 9. Correlaciones obtenidas para las cuatro cepas de *T. asperellum* contra *Fusarium* sp.: **A)** entre el antagonismo total y los diferentes mecanismo de acción evaluados y **B)** entre los diferentes mecanismo de acción.

El antagonismo total sobre *C. Gloeosporioides* presentó correlación positiva con la actividad, debido a compuestos volátiles, metabolitos extracelulares y crecimiento asociado a la actividad quitinasa. Igualmente, estas variables se correlacionaron positivamente entre ellas, mientras que el crecimiento asociado a la actividad celulasa presenta correlación negativa con el antagonismo total (ver figura 10).

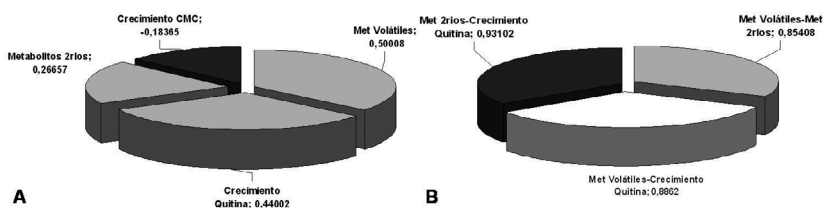


Figura 10. Correlaciones obtenidas para las cuatro cepas de *T. asperellum* contra *C. gloeosporioides*: **A)** entre el antagonismo total y los diferentes mecanismo de acción evaluados y **B)** entre los diferentes mecanismo de acción.

El análisis de componentes principales realizado para *Fusarium* sp. muestra que los primeros dos componentes principales explican el 83,68% de la varianza del modelo. El primer componente principal (CP1) expone las variables antagonismo total y la actividad debida a compuestos volátiles, y el segundo componente principal (CP2) aclara las variables de crecimiento asociado a la actividad celulasa, crecimiento asociado a la actividad quitinasa y actividad de los extractos. En el gráfico Biplot, donde se representan las variables, como los vectores, y las cepas, como los puntos, se observa que la cercanía que tenga el vector al eje del componente principal determinará su asociación. En este caso, la cepa T19 se encuentra más asociada al CP1, mientras que la cepa T22 muestra influencia de ambos componentes principales. Tanto la cepa T38 como la T21 están más asociadas al CP2 (ver figura 11).

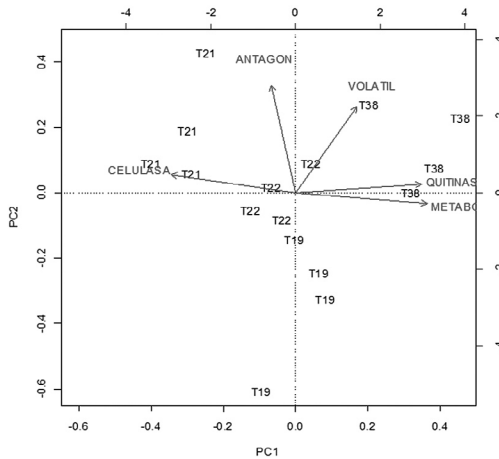


Figura 11. Diagrama Biplot de las variables evaluadas sobre *Fusarium* sp.

El análisis de componentes principales para el antagonismo sobre *C. gloeosporioides* muestra que el CP1 explica el 73,47% de la varianza total del modelo, y CP2 explica el 17,94%, con el 91,41% acumulado entre estos dos componentes principales. La CP1 influye, de forma significativa, en el crecimiento asociado a las actividades: quitinasa, celulasa, antagonónica, debida a compuestos volátiles, y a los metabolitos extracelulares solubles, mientras que la CP2 influye significativamente sobre el antagonismo total (ver figura 12).

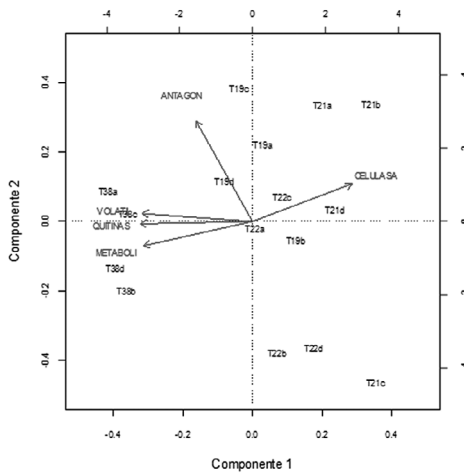


Figura 12. Diagrama Biplot de las variables evaluadas sobre *C. gloeosporioides*.

El análisis clúster, tanto para la actividad sobre *Fusarium* sp. (ver figura 13) como sobre *C. gloeosporioides* (ver figura 14), muestra que la cepa T38 se agrupa aparte de las demás cepas de *T. asperellum*, información que, al complementarse con el análisis Biplot, indicó que dicha cepa presentó una actividad antagonista diferencial más relacionada con la actividad por compuestos volátiles y metabolitos extracelulares y poco relacionada con la actividad celulolítica.

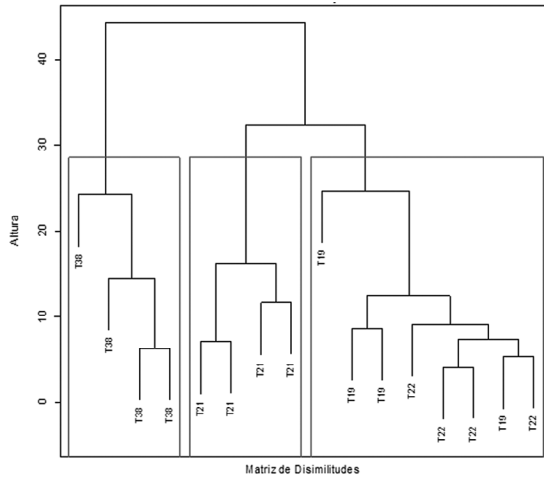


Figura 13. Análisis clúster de las variables evaluadas sobre *Fusarium* sp.

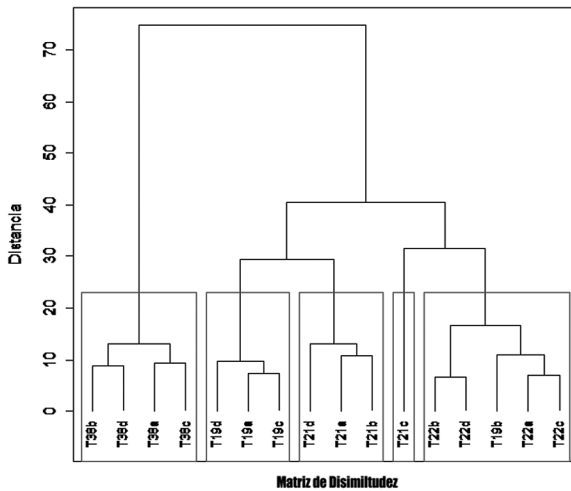


Figura 14. Análisis clúster de las variables evaluadas sobre *C. gloeosporioides*.

4. CONCLUSIONES

Se encontró que todas las cepas de *T. asperellum* evaluadas presentaron un alto grado de antagonismo sobre ambos fitopatógenos, que muestra que el antagonismo total sobre *C. Gloeosporioides* está correlacionado con la actividad antagonónica debido a compuestos volátiles, a metabolitos secundarios solubles y al crecimiento asociado a actividad quitinasa. Por otra parte, el antagonismo total sobre *Fusarium* sp. se encuentra correlacionado, principalmente, con la actividad antagonónica a causa de compuestos volátiles. Tanto el análisis multivariado como el análisis Biplot de los vectores muestran un diferencial en el grado de asociación entre cepas del antagonista y la actividad asociada al mecanismo de acción, y se encontró que la cepa T38 se puede agrupar aparte de las demás cepas en cuanto a su capacidad antagonónica sobre ambos fitopatógenos, y que, en general, la actividad antagonónica total de las cuatro cepas de *T. asperellum* evaluadas se puede explicar, en gran medida, en virtud de la actividad por metabolitos volátiles sobre *Fusarium* sp. y *C. gloeosporioides*.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Corporación para Investigaciones Biológicas y a la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico por el apoyo y financiamiento del proyecto, a Flores el Trigal por proporcionarnos material vegetal y a Cristian David Santa Escobar por su colaboración con los análisis estadísticos.

6. REFERENCIAS

- Abang, M.; Abraham, W.-R.; Asiedu, R.; Hoffmann, P.; Wolf, G. y Winter, S. (2009). Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological Research*, 113, 130-140.
- Abramoff, M. D.; Magelhaes, P. J.; Ram, S. J. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11, 36-42.
- Ajith, P. y Lakshmidivi, N. (2010). Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. *Nature and Science*, 8(9), 265-269.
- Alzate, D.; Mier, G.; Afanador, L.; Durango, D. y García, C. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. *Vitae*, 16(1), 116-125.

- Atlas, R. (1995). *Handbook of media for environmental microbiology*. Boca Ratón, Florida (EE. UU.): CRC Press.
- Avendaño, C.; Arbeláez, G. y Rondón, G. (2006). Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol *Phaseolus vulgaris* L., mediante la acción combinada de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. *Agronomía Colombiana*, 24(1), 62-67.
- Barbosa, M. A.; Rehn, K. G.; Menezes, M. y Mariano, R. (2001). Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 98-104.
- Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, M. C. y Codón, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Salta: Universidad Nacional de Salta.
- Dennis, C. y Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-39.
- Dennis, C. y Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 41-48.
- Dennis, C. y Webster, J. (1971c). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 363-369.
- Fernández, R. y Suárez, C. (2009). Antagonismo *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*, 62(1), 4743-4748.
- Freeman, S.; Katan, T. y Ezra, S. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82(6), 596-605.
- Goltapeh, M. y Danesh, Y. (2006). Pathogenic interactions between *Trichoderma* species and *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural Technology*, 2(1), 29-37.
- Grondona, I.; Hermosa, R.; Tejada, M.; Gomis, M.; Mateos, P.; Bridge, P.; Monte, E. y García, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3189-3198.
- Harman, G.; Howell, C.; Viterbo, A.; Chet, I. y Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56.

- Herrera, T. y Ulloa, M. (1998). *El reino de los hongos: micología básica y aplicada* (2.a ed). México: Fondo de Cultura Económica.
- Hoyos, L. (2007). *Diversidad de aislamientos neotropicales de Trichoderma spp. y su potencial en estimulación de crecimiento de frijol Phaseolus vulgaris*. Tesis de doctorado, Medellín, Doctorado en Biología, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.
- López Ávila, A. (1999). Manejo integrado de plagas: del origen conceptual y su desarrollo empírico. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 3(1), 31-35.
- Lorito, M.; Farkas, V.; Rebuffat, S.; Bodo, B. y Kubicek, C. (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6382-6385.
- Poveda, D. (2006). *Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de Botrytis cinerea en tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Tesis de pregrado, Bogotá, Carrera de Microbióloga Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.
- Quilambaqui, M. (2005). Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* spp. asociadas al declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guajuato, México. *Revista Tecnológica ESPOL*, 18(1), 135-140.
- Reaves, J. y Crawford, R. (1994). *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. Portland, OR (USA): Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Research Paper, PNW-RP-474. p. 8.
- Samuels, G. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923-935.
- Sánchez, M. (2004). *Nuevo método para microcultivo de hongos*. México: Universidad Autónoma de México.
- Schubert, M., Fink, S. y Schwarze, F. (2008). *In vitro* screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi. *Arboricultural Journal*, 31, 227-248.
- Thines, E.; Anke, H.; Weber, R. (2004). Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycological Research*, 108(1), 14-25.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.; Marra, R.; Woo, S., y Lorito, M. (2008a). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 1-10.

Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.; Marra, R.; Barbetti, M.; Li, H.; Woo, S. y Lorito, M. (2008*b*). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 80-86.

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Sanmartín, N. Paola., López, Xiomara; Rueda, Ever A. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Fusarium</i> sp. Revista Tumbaga (2012), 7, vol. II	Día/mes/año 11/07/12	Día/mes/año 10/08/12