



Artículo original

Especies de *Trichoderma* aislados de suelos de cultivo de *Solanum tuberosum* de Huamachuco, Perú. 2012

Trichoderma species isolated of *Solanum tuberosum* soil cultivation from Huamachuco, Peru. 2012

John Asmat Sigüeñas, Raúl Castro Angulo, Suemie Cruz Cruz, Juanita Díaz Valverde, Crystel Méndez Puelles, Gerardo Alayo Espinoza y Miguel Muñoz Ríos

¹Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

RESUMEN

Se aisló e identificó cuatro especies del género *Trichoderma* a partir de suelos de cultivos de papa, *Solanum tuberosum*, de siete caseríos del distrito de Huamachuco (Departamento de La Libertad, Perú), entre abril y junio del 2012. Se colectó 17 muestras de suelos de la rizósfera de terrenos de cultivos de papa, las cuales se procesaron mediante siembras por superficie en placas Petri, conteniendo Agar Sabouraud con estreptomycin (30 ug/mL) y subsecuente incubación a 25°C por 3 a 5 días; posteriormente, se realizaron las observaciones microscópicas con azul de lactofenol. Para efectuar la identificación a nivel de especie se realizaron cultivos puros y luego microcultivos utilizándose claves taxonómicas de identificación. De las 17 muestras obtenidas, 11 cultivos nativos presentaron *Trichoderma* correspondientes a cuatro especies: *T. atroviride*, *T. viride*, *T. harzianum* y *T. pseudokonigii* de muestras de suelo de seis caseríos: Nueve de Octubre, Markahuamachuco, Sausacocha, Puente Piedra, Wiracochapampa y La Ramada.

Palabras clave: *Trichoderma*, agar Sabouraud, identificación, suelos

ABSTRACT

Four species of the genus *Trichoderma* of potato, *Solanum tuberosum*, crops lands from seven villages in the district of Huamachuco (Department of La Libertad, Peru), from April to June, 2012 were isolated and identified. 17 soil samples were collected from rhizosphere of potato crop land, which were processed by planting area basis in Petri plates containing Sabouraud Agar with streptomycin (30 ug/mL) and subsequent incubation at 25 °C for 3-5 days; microscopic observations were performed with blue-lactophenol technique later. In order to perform identification at the species level and then pure cultures were performed microcultures taxonomic identification keys used. Of the 17 samples, 11 showed *Trichoderma* native crops corresponding to four species: *T. atroviride*, *T. viride*, *T. harzianum* and *T. pseudokonigii* of soil samples six villages: Nueve de Octubre, Markahuamachuco, Sausacocha, Puente Piedra, Wiracochapampa and La Ramada.

Keywords: *Trichoderma*, identification, isolation, soil

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se vienen utilizando organismos o sus productos como una alternativa al uso de controladores químicos, ya que estos tienen un impacto negativo en el medio ambiente, los primeros deben tener la misma efectividad que los químicos sin sus efectos negativos, aumentando el rendimiento de los cultivos y protegiéndolos de ciertos microorganismos fitopatógenos; entonces, el control biológico ofrece un medio ambiente seguro y la opción económicamente viable para la protección de las plantas, reducir las enfermedades y gran potencial para promover la agricultura sostenible^{1,2,3}.

Trichoderma spp. son hongos de vida libre altamente interactivos en entornos de raíz, el suelo y hojas; se ha sabido durante muchos años, que producen una amplia gama de sustancias antibióticas y que parasitan a otros hongos^{1,4}. El potencial de las especies de *Trichoderma* como controlador biológico de agentes etiológico de enfermedades de plantas fue reconocida por primera vez en la década de 1930 y desde entonces la lista de enfermedades controladas aumenta paulatinamente y, dependiendo de la especie, el uso de *Trichoderma* en la agricultura puede ofrecer numerosas ventajas, entre otras: la colonización de la rizósfera, el control de patógenos y microflora competitiva, la mejora de la salud vegetal^{5,6,7,8,9,10}.

T. viride figura, entre las especies de *Trichoderma*, como la más estudiada por ser fácilmente adaptable a las condiciones climáticas, factibles de aislar, propagar y evaluar in vitro^{2,7}, así como, aumentar el crecimiento y procurar mayor absorción de nutrientes^{11,12}. *T. harzianum* también mejora el crecimiento de raíces de una amplia variedad de plantas, debido a que acumula sustancias tóxicas, incrementa el volumen de suelo colonizado por las raíces y aumenta la penetración de raíces profundas y la absorción de nitratos, otros iones y diversos metales tóxicos y metaloides^{13,14}.

T. atroviride, por su lado, ha demostrado que inhibe, en condiciones de laboratorio, el crecimiento micelial de *Rizoctonia solani*, uno de los más importantes patógenos que se transmiten por el suelo, cuyo control implica el uso de productos químicos, lo que lleva a un aumento de los costes de cultivo y los efectos adversos sobre la salud humana y animal; además, los patógenos pueden desarrollar resistencia contra pesticidas químicos, lo que aumenta el desafío de la protección de las plantas^{15,16,17}.

Por sus aplicaciones a gran escala en la remediación de contaminantes en suelos y aguas, las especies de *Trichoderma* se producen en todo el mundo; sin embargo, se ha planteado de que las especies nativas, por un lado, muestran mayor competencia como biocontroladores que las introducidas en un determinado lugar y, por otro, es probable que tengan propiedades controladoras distintas de mayor impacto^{3,8,18,19}. En este contexto, el presente trabajo está dirigido a aislar e identificar especies del género *Trichoderma* de suelos de cultivo de *Solanum tuberosum*, durante la época de cosecha, del distrito de Huamachuco (Perú).

MATERIAL Y METODOS

Material biológico:

- Suelos de cultivos de papa del distrito de Huamachuco, La Libertad, Perú
- 17 muestras constituidas por suelo de la rizósfera de cultivo de *S. tuberosum*

Recolección y transporte de muestra

Se recolectó aproximadamente 1 kg de muestra de rizósfera a 20 cm de profundidad del suelo por cada área seleccionada, en bolsas de primer uso. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp.^{20,21}

De cada kilogramo se agregó 10 g de suelo y se aforó a 100 mL con agua destilada estéril. Luego se realizó diluciones al décimo y se tomó una alícuota la cual se sembró por superficie en placas de Petri conteniendo Agar Sabouraud más estreptomycinina (30 ug/mL), luego se incubó a 25°C por 3 a 5 días; se realizaron observaciones microscópicas con azul de lactofenol y luego fueron sembradas en tubos conteniendo Agar Sabouraud más estreptomycinina (30 ug/mL) para obtener cultivos puros. Para la identificación se tomó en cuenta las características macroscópicas de la colonia, así también se realizó microcultivos para observar las características microscópicas y haciendo uso de las claves de identificación correspondientes.

RESULTADOS

Se encontraron cuatro especies de *Trichoderma*: *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* y *T. viride*, las cuales fueron identificadas en base a sus características microscópicas y macroscópicas (Tabla 1, Figs. 1, 2, 3 y 4)

Tabla 1. Características obtenidas de colonias de cuatro especies de *Trichoderma* aisladas de suelos de *Solanum tuberosum* del distrito de Huamachuco - La Libertad (Perú) entre Abril y Junio del 2012.

Características	Especie			
	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. pseudokoningii</i>	<i>T. viride</i>
Conidia	Sub-globosa	Sub-globosa	Elipsoidal	Globosa
Longitud de fálides (µm)	8.5	8.0	9.1	5.0
Longitud de conidia (µm)	4.2	2.5	4.6	4.0
Ancho de conidia (µm)	3.6	2.3	2.9	3.6
Pigmentación	Blanca con pigmentos amarillos	Verde a verde grisáceo	Blanca con pigmentos verde amarillo	Verde oscuro



Figura 1. Conidio en forma sub-globosa de *T. atroviride* (400x)

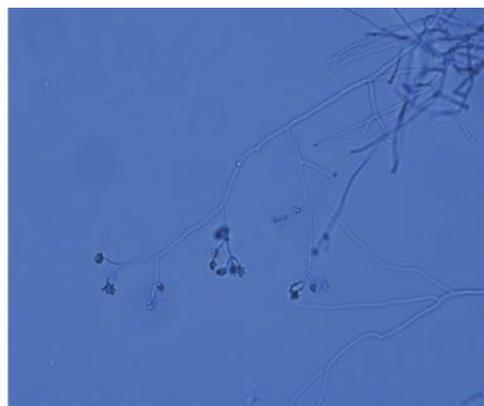


Figura 2. Conidio en forma sub-globosa de *T. harzianum* (400x)



Figura 3. Conidio en forma elipsoidal de *T. pseudokonigii* (400x)

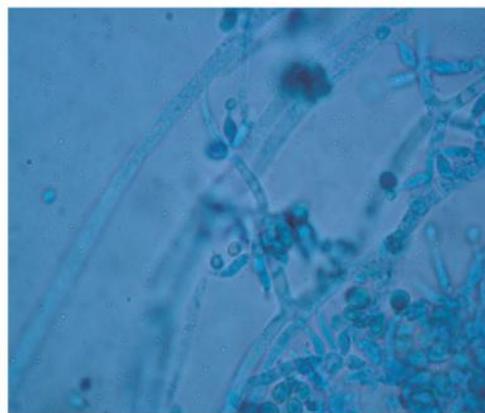


Figura 4. Conidio en forma globosa de *T. viride* (400x)

DISCUSIÓN

Trichoderma es uno de los hongos del suelo aislado con mayor frecuencia y presentes en los ecosistemas en la raíz de planta, este hongo se encuentra distribuido en el mundo y se presenta en diferentes hábitats, su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos^{3,5,18,20}.

En los lugares de muestreo de donde se logró aislar *Trichoderma*, se observaron plantaciones sanas; esto se debería a que algunas cepas de *Trichoderma*, mejoran la rizósfera y también pueden colonizar las superficies de toda la raíz, lo cual se ha evidenciado en los efectos observados que incluyen un aumento del crecimiento y los rendimientos de la planta., mayor absorción de nutrientes, así como una mayor utilización de fertilizantes de eficiencia, porcentaje y tasa de germinación de las semillas, y la resistencia sistémica inducida a las enfermedades^{11,22}.

En la tabla 1, se muestra cuatro de especies de *Trichoderma*, esto se debe a que el pH del suelo es importante para el crecimiento, como la esporulación y la mayor longevidad se obtiene con pH de 6.0 y permanecen viables las esporas en un periodo de 40 días en almacén. Bajo condiciones de campo requiere humedad relativa alta para sobrevivir más tiempo. Se presentan diferencias entre especies del género de acuerdo al tipo de suelo, temperatura y contenido de humedad y no solo se encuentra una sola especie¹⁸.

Las especies identificadas con el uso de claves taxonómicas, pues es de conocimiento que un número considerable de cepas de *Trichoderma*, han sido depositadas en el GenBank, y permanecen aún sin identificación segura; y permanecen para ser más estudiado. Las especies de este género producen una amplia gama de pigmentos de brillante color amarillo verdoso a rojizo en color, aunque algunos también son incoloros; del mismo modo, la pigmentación de conidios varía de incoloro a diversos tonos de verde y, a veces también gris o marrón. Aparte de la pigmentación, la identificación de especies dentro del género es difícil debido a la estrecha gama de variación de la morfología simplificada en *Trichoderma*²³.

La identificación de *Trichoderma* es complicada si no se tiene en consideración distintos criterios de identificación; diversos autores han mencionado que los hongos del género *Trichoderma* son difíciles de distinguir morfológicamente, sin embargo, la clasificación filogenética ha alcanzado auge rápidamente y se espera que aumente constantemente^{24,25}.

Para la identificación de las diferentes especies de *Trichoderma* los pocos caracteres morfológicos disponibles resultaron un inconveniente en el trabajo, ya que son variables en algún grado; pues algunos autores mencionan por qué tan pocas especies se han descrito en la mayor parte de la vida del género²⁵. Por ejemplo, *T. harzianum* es tolerante a la tensión impuesta por escasez de nutriente, son a menudo antagonistas. En las altas temperaturas prevalece *T. viride* mientras que *T. pseudokonigii*, en

las bajas temperaturas. Las razones son porque ciertas especies son más prósperas durante meses más frescos mientras que otras son más persistentes durante meses más calientes. *Trichoderma* puede crecer en los suelos que tienen un rango del pH de 2,5 - 9,5; aunque la mayoría prefieren un ambiente moderado ácido. Las especies que prefieren los suelos más ácidos se tienen un hábito tensionar más tolerante del crecimiento y son generalmente menos agresivas^{4,20}.

Dentro de las especies encontradas, las especies de *T. viride* y *T. harzianum* son las mayormente utilizadas en el control biológico; por otro lado otros autores que realizaron trabajos de caracterización molecular y análisis filogenético han permitido identificar cepas de *Trichoderma harzianum* que son patógenos para las plantas²⁶. *T. harzianum*, recientemente ha cambiado de nombre por el de *T. aggressivum*, pues esta especie es antagonista de champiñones y están adaptados para el crecimiento en el compost, resistiendo a los efectos de inhibición de bacterias en este sustrato de cultivo, y se encuentra presente en la mayoría de los suelos abundantes en materia orgánica. Es aeróbico y pueden estar en los suelos con pH neutro hasta ácido. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente^{27,28}.

A *T. atroviride* se le atribuye la capacidad para detectar y responder a diferentes condiciones ambientales, incluyendo la presencia de un huésped potencial; es esencial para la colonización exitosa de suelo, material orgánico, y el desarrollo de raíces de las plantas. La detección de tales condiciones ambientales se puede producir a través de una variedad de vías de transducción, que determinan la respuesta celular adecuada por parte de este microorganismo²⁹. *T. pseudokoningii*, por su lado, tiene una celulasa fúngica de gran actividad enzimática; en trabajos han visto conveniente manipular la producción de estas enzimas haciendo manipulación genética con *Trichoderma reesei*, lo cual se ve aumentado su producción en un 50%³⁰.

CONCLUSIÓN

- De las muestras de suelo de *Solanum tuberosum* obtenidas de los caseríos Nueve de Octubre, Markahuamachuco, Sausacocha, Puente Piedra, Wiracochapampa y La Ramada (Huamachuco, Perú), se aislaron 11 cultivos del género *Trichoderma*, correspondientes a cuatro especies: *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. atroviride* y *T. viride*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Küçük Ç, Kivanç M. Isolation of *Trichoderma* Spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. Turk J Biol 2003; 27: 247-253.
2. Brunner K, Zeilinger S, Ciliento R, Woo SL, Lorito M, Kubicek CP et. al. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. Appl Environ Microbiol 2005; 71(7):3959-3965.
3. Zeilinger S, Omann M. *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. Gene Regul Syst Bio 2007; 1: 227-234.
4. Howell CR. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant Dis. 2003; 87(1): 4-10.
5. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. Soil Biol Biochem 2008; 40: 1-10.
6. Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochem Eng J 2007; 37: 1–20.
7. Goss EM, Cardenas ME, Myers K, Forbes GA, Fry WE, Restrepo S et. al. The Plant Pathogen *Phytophthora andina* Emerged via Hybridization of an Unknown *Phytophthora* Species and the Irish Potato Famine Pathogen, *P. infestans*. PLoS One 2011; 6(9): e24543.
8. Lorito M, Woo SL, Garcia I, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA et. al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 7860-7865.
9. Benhamou N, Chet I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and Gold Cytochemistry of the Mycoparasitic Process. Phytopathology 1993; 83(10): 1062-1071.
10. Pakula TM, Salonen K, Uusitalo J, Penttilä M. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Microbiology 2005; 151: 135–143.
11. Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. Plant Physiol 2008; 147: 779 – 789.

12. Hoitink HAJ, Madden LV, Dorrance AE. Systemic Resistance Induced by *Trichoderma* spp.: Interactions Between the Host, the Pathogen, the Biocontrol Agent, and Soil Organic Matter Quality. *Phytopathology* 2006; 96(2): 186 – 189.
13. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma*-Species Opportunistic Avirulent Plant Symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 43 – 56.
14. Handelsman J, Stabb EV. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Plant Cell* 1996; 8: 1855 – 1869.
15. Grenville-Briggs LJ, Anderson VL, Fugelstad J, Avrova AO, Bouzenzana J, Williams A et. al. Cellulose Synthesis in *Phytophthora infestans* Is Required for Normal Appressorium Formation and Successful Infection of Potato. *Plant Cell* 2008; 20: 720-738.
16. Lahlali R, Hijri M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 311: 152-159.
17. Carisse O, El Bassam S, Benhamou N. Effect of *Microspheeropsis* sp. Strain P130A on Germination and Production of Sclerotia of *Rhizoctonia solani* and Interaction Between the Antagonist and the Pathogen. *Phytopathology* 2001; 91(8): 782-791.
18. Grondona I, Hermosa R, Tejada M, Gomis MD, Mateos PF, Bridge PD. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(8): 3189-3198.
19. Harman GE. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 2006; 96(2): 190-194.
20. Gams W, Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma*. En: Kubicek CP, Harman GE. (eds.) *Trichoderma y Gliocladium – Basic biology, taxonomy and genetics*. Gran Bretaña: Taylor y Francis; 2002. pp.3-34.
21. Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF, McCray EB. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponible en Web: <http://trichodermaIndex.cfm>. Completada en Octubre del 2002.
22. Harman GE. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derive from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 2000; 84(4): 377-393.
23. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 87(3):787-799.
24. Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem Eng J* 2007; 37: 1–20.
25. Samuels GJ. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology* 2006; 96: 195-206.
26. Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 2004; 7: 249-260.
27. Savoie JM, Mata G. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. *Mycologia* 2003; 95(2):191-199.
28. Carsolio C, Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutiérrez A, Chet I et. al. Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, *ech42*, in Mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(3): 929-935.
29. Mendoza-Mendoza A, Pozo MJ, Grzegorski D, Martínez P, García JM, Olmedo-Monfil V et. al. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(26): 15965-15970.
30. Yao Q, Sun TT, Liu WF, Chen GJ. Gene Cloning and Heterologous Expression of a Novel Endoglucanase Swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72(11): 2799-2805.
31. Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF, McCray EB. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponible en Web: <http://trichodermaIndex.cfm>. Completada en Octubre del 2002.