

Identificación molecular y tasa de crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de la Región Norte del Paraguay

Molecular identification and growth rate of native strains of *Trichoderma* spp. isolated from the Northern Region of Paraguay

Marta Alicia Fernández Gamarra^{1*}, Marco Maidana Ojeda² y Guillermo Andrés Enciso Maldonado³

¹ Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. CP 56230, México.

² Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción, Campus Universitario Itapúa, sub Campus de María Auxiliadora. Tomás Romero Pereira, Itapúa.

³ Maestría en Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. CP 56230, México.

*Autor para correspondencia (martifer87@hotmail.com)

Recibido: 22/10/2016; Aceptado: 20/10/2017.
10.18004/investig.agrar.2017.diciembre.127-132

RESUMEN

Los hongos del género *Trichoderma*, debido a su distribución cosmopolita, rápido crecimiento y producción de abundante esporas, son candidatos ideales para aplicaciones en programas de control biológico en diferentes hábitats. Con el objetivo identificar molecularmente las cepas de *Trichoderma* spp. y evaluar el efecto *in vitro* de la temperatura sobre el crecimiento de las colonias, se realizó una investigación en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Capitán Miranda (CICM) perteneciente al Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), ubicada en el Distrito de Capitán Miranda, Departamento de Itapúa, Paraguay. La tasa de crecimiento y aspecto de la colonia se determinó cultivándolas en medio de cultivo papa-dextrosa-agar a 25, 28 y 31°C y la identificación molecular a nivel de especie se realizó mediante el análisis de las secuencias de nucleótidos realizado en Blastn. De las siete cepas, seis (MS9, MS10, MS12, MS15, MS16 y MS19) corresponden a *T. asperellum* y la restante (MS28) a *T. erinaceum* con una identidad del 100%. La temperatura óptima de crecimiento para todas las cepas evaluadas fue entre 25 y 28°C (crecimiento rápido). Las cepas de *T. asperellum* obtuvieron la mayor tasa de crecimiento, siendo MS10 - MS15 las de mayor tasa de crecimiento a 25°C (24,19 y 23,85 mm día⁻¹), MS16 - MS10 a 28°C obtuvieron una TC de 26,39 y 26,11 mm día⁻¹ y a 31°C las cepas MS19 - MS9 tuvieron una TC de 7,05 y 6,78 mm día⁻¹.

Palabras claves: *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma erinaceum*. Control Biológico.

ABSTRACT

The fungi of the genus *Trichoderma*, due to its cosmopolitan distribution, rapid growth and abundant production of spores, are ideal candidates for applications in biological control programs in different habitats. With the objective of molecularly identify strains of *Trichoderma* spp. and evaluate the *in vitro* effect of temperature on growth and appearance of colonies, an investigation was conducted at the Laboratory of Plant Pathology Research Capitán Miranda Investigation Center (CICM) belonging to the Paraguayan Institute of Agricultural Technology (IPTA), located in the district of Capitán Miranda, Itapúa Department, Paraguay. The growth rate and colony appearance was determined by culturing on potato dextrose agar at 25, 28 and 31 ° C and the molecular identification at the species level was performed by analyzing the nucleotide sequences performed in Blastn. Of the seven strains, six (MS9, MS10, MS12, MS15, MS16 and MS19) correspond to *T. asperellum* and the remaining (MS28) to *T. erinaceum* with an identity of 100%. The optimum growth temperature for all strains tested was 25 to 28 ° C (fast growing). The strain *T. asperelleum* obtained the highest growth rate being MS10 - MS15 the highest growth rate at 25 ° C (24.19 and 23.85 mm.día⁻¹), MS16 - MS10 at 28 ° C obtained a CT 26.39 and 26.11 mm.día⁻¹ and 31 ° C the strains MS19 - MS9 had a CT scan of 7.05 and 6.78 mm.día⁻¹.

Key words: *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma erinaceum*. Biological Control.

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma* fue introducido en la taxonomía por Persoon hace casi 200 años y se compone de hongos anamórficos aislados principalmente de suelo y materia orgánica en descomposición (Grondona et al. 1997). Debido a su distribución cosmopolita, se vuelve un candidato ideal para aplicaciones en programas de control biológico en diferentes hábitats, pero la sensibilidad de las cepas individuales a factores ambientales abióticos debe considerarse para el desarrollo del hongo (Hjeljord y Tronsmo 1998). Se caracteriza por una tasa de crecimiento rápido en medio de cultivo y la producción de numerosas esporas (conidios) de distintas tonalidades de verde (Howell 2003). El reverso de las colonias a menudo es incoloro, amarillo, ámbar o amarillo verdoso, y muchas especies producen cantidades de clamidosporas sumergido en el micelio (Gams y Bisset 1998). La mayoría de los estudios se basa en la caracterización morfológica, que permite una fácil identificación a nivel de género, pero llegar a nivel de especie es difícil de determinar, en especial para los aislamientos de interés como son los agentes de control biológico (Grondona et al. 1997).

Los métodos moleculares implican el uso de PCR (*Polymerase chain reaction*), los cuales se han descrito para diagnosticar, identificar, caracterizar y resolver la diversidad genética entre diferentes aislados de *Trichoderma* spp. siendo altamente sensibles y específicos (Hermosa et al. 2000). Datos de secuenciación obtenidos particularmente en la región del espaciador interno transcrito (ITS) del DNA ribosomal, son utilizados en los análisis filogenéticos de hongos, utilizando cebadores específicos con el objeto de detectar a nivel de especie varios géneros fúngicos (Ospina-Giraldo et al. 1999, Almeida et al. 2003, Babu et al. 2007).

El objetivo de este trabajo fue identificar molecularmente las cepas de *Trichoderma* spp. y evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y aspecto de las colonias *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados fúngicos: un total de siete cepas de *Trichoderma* spp. fueron aislados de suelos cultivados con Sésamo (*Sesamum indicum* L.) en el Departamento de San Pedro, Paraguay y procesadas en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Capitán Miranda (CICM) perteneciente al Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria

(IPTA), ubicada en el Distrito de Capitán Miranda, Departamento de Itapúa, Paraguay.

Aislamiento, purificación y conservación: las muestras de suelo se procesaron mediante una adaptación de la técnica de dilución en placas, descrita por Karthikeyan et al. (2008). De cada muestra se pesaron 10 g de suelo y en cámara de flujo laminar se mezclaron con 90 mL de agua destilada estéril produciendo la solución madre y agitando durante 20 a 30 min. Posteriormente, se tomó 1 mL de la solución inicial que se diluyó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, obteniendo una dilución a 10^{-1} . Se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a 10^{-4} . De las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se tomaron 1 mL que se distribuyó homogéneamente sobre una placa de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad hasta que se observó crecimiento abundante, pero sin exceder el contacto entre cepas. Las colonias que presentaron las típicas características coloniales de *Trichoderma* spp., las cuales son colonias de coloración verdosa y la formación de anillos concéntricos se sembraron en medio PDA e incubadas a 28°C durante 5 días (Küçük y Kivanç 2003) para su purificación, utilizando la técnica monoconidial (Kumar et al. 2007). Los cultivos puros de cada aislado creciendo en placas de Petri con medio de cultivo PDA fueron transferidos a tubos inclinados con PDA e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h, hasta que la superficie del medio esté cubierta completamente con micelio del hongo. Los tubos se etiquetaron y se almacenaron a 4°C (Iqbal y Mukhtar 2015).

Extracción de DNA: El DNA de cada cepa de *Trichoderma* se extrajo de colonias cultivadas en placas Petri con medio cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por tres días en fotoperiodo (12 h luz/oscuridad). El DNA se extrajo con el kit comercial DNeasy Plant Mini® siguiendo el protocolo del fabricante. Un total de 100 mg de micelio fresco fue molido en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero y transferidos a un tubo de microcentrifuga de 1,5 µL, se adicionaron 400 µL de Tampón AP1 y 4 µL de RNasa. Posteriormente fueron agitados en vórtex e incubados por 10 minutos a 65°C en baño María, agitando por inversión 2 o 3 veces. Se adicionaron 130 µL de P3, se mezcló por inversión y se incubaron por 5 minutos en hielo. La mezcla fue colada en una columna de QIAshredder Mini spin y se centrifugó por 2 minutos a 14.000 rpm. El líquido que pasó por la columna fue transferido a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 µL adicionando 1,5 volúmenes del buffer AP3/E; se colocó en una columna DNeasy Mini spin y se centrifugó por 1 min

a 8 000 rpm. Se transfirió en un nuevo tubo de 2 µL, se adicionó 500 µL de Buffer AW2 y centrifugo por 1 minuto a 8.000 rpm. Se adicionó otros 500 µL de Buffer AW2, y centrifugar por 2 minutos a 14.000 rpm, transfiriendo la columna DNeasy Mini spin a un tubo nuevo. Finalmente se adiciono 100 µL de Buffer AE para la elución, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) posteriormente se centrifugó por 1 minuto a 8.000 rpm (QIAGEN 2012). La calidad de DNA obtenido fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0,4% y teñidas con Gel Red. Como referencia se utilizó un marcador molecular de 100 pb, los geles fueron visualizados en un transiluminador UV. Las muestras de DNA se almacenaron a 4°C hasta su uso.

PCR y Secuenciación: las muestras de ADN se enviaron a Macrogen Korea para su análisis por PCR. Se amplificaron las regiones ITS del ADN ribosomal con los primers ITS-5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATG C) (White et al. 1990).

Las secuencias recibidas de Macrogen Korea fueron alineadas con el programa Cluster W versión 1.6 comparadas con todas las secuencias de referencia de la base de datos del GenBank utilizando BLASTn del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) asignando la especie de acuerdo a los niveles de concordancia. Las secuencias alineadas se depositaron en la base de datos GenBank para obtener su número de acceso (Harrington et al. 2000, Choi et al. 2003, Larralde-Corona et al. 2008).

Crecimiento in vitro: para el estudio del crecimiento, las cepas se cultivaron en PDA y se incubaron a 25, 28 y 31°C en oscuridad durante siete días. Se vertió 15 mL de PDA autoclavado en placas Petri de 90 mm de diámetro, una vez solidificado se sembraron en el centro con un disco de 5 mm a partir de un cultivo en crecimiento activo de cada cepa fúngica.

Sobre la base del crecimiento en diámetro, los aislados se categorizaron como rápido (>71 mm), medio (51 a 70 mm), y lento (<51 mm) de acuerdo a una adaptación de la metodología descrita por Iqbal y Mukhtar (2015). Para la TC (mm día⁻¹) se realizaron mediciones cada 24 h con una regla graduada en mm hasta que la colonia llenó toda la superficie de la caja, utilizando la fórmula de Zadoks y Schein (1979): TC (mm día⁻¹) = Crecimiento final (mm) – Crecimiento inicial (mm) /Tiempo final (días) – Tiempo inicial (días).

Los datos de tasa de crecimiento (mm día⁻¹) se analizaron bajo un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones en dos réplicas. Las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey (p=0,05), con el paquete estadístico SAS versión 9.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular de las cepas: Resultados del análisis molecular de cada cepa de *Trichoderma* mediante el análisis de las secuencias de nucleótidos realizado en Blastn reveló que las cepas MS9, MS10, MS12, MS15, MS16 y MS19 mostraron una similaridad del 100% con diversas secuencias correspondientes a cepas de *T. asperellum* (n° de acceso: KX620953, KX 620958, KX620954, KX620955, KX620956, KX620957); y que la cepa MS28 presentó una identidad del 100% con diferentes secuencias reportadas para *T. erinaceum*.

La correcta identificación de las cepas a nivel de especie es el primer paso para la utilización de todo el potencial de los hongos en aplicaciones específicas (Lieckfeldt et al. 1999).

Crecimiento in vitro: La temperatura óptima de crecimiento para todas las cepas evaluadas fue en 25 y 28°C, crecimiento rápido (Figura 1). Las cepas *T. asperellum*, MS10 - MS15 obtuvieron la mayor tasa de crecimiento (24,19 y 23,85 mm día⁻¹) a 25°C, MS16 - MS10 (26,39 y 26,11 mm día⁻¹) a 28°C y MS19 - MS9 (7,05 y 6,78 mm día⁻¹) a 28°C.

Al parecer el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* depende de la especie y del aislamiento dentro de la misma especie. Lieckfeldt et al. (1999) en un ensayo realizado mencionan que *T. asperellum* tiene una temperatura de crecimiento óptimo de 30°C con un máximo de >35°C, resultado que no coincide con lo obtenido en este trabajo.

Especies de *Trichoderma* típica de regiones geográficas frías poseían temperatura de crecimiento óptima menor y máximas en comparación con las especies de las regiones climáticas cálidas. *T. viride* y *T. polysporum* toleran temperaturas máximas de 28 - 31°C y crecieron mucho mejor que otras especies a 7°C. La temperatura máxima de *T. koningii* varió de 32 a 35°C, *T. hamatum* de 30 a 35°C, *T. harzianum* de 30 a 38°C, *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum* de 40 a 41°C (Danielson y Davey 1973).

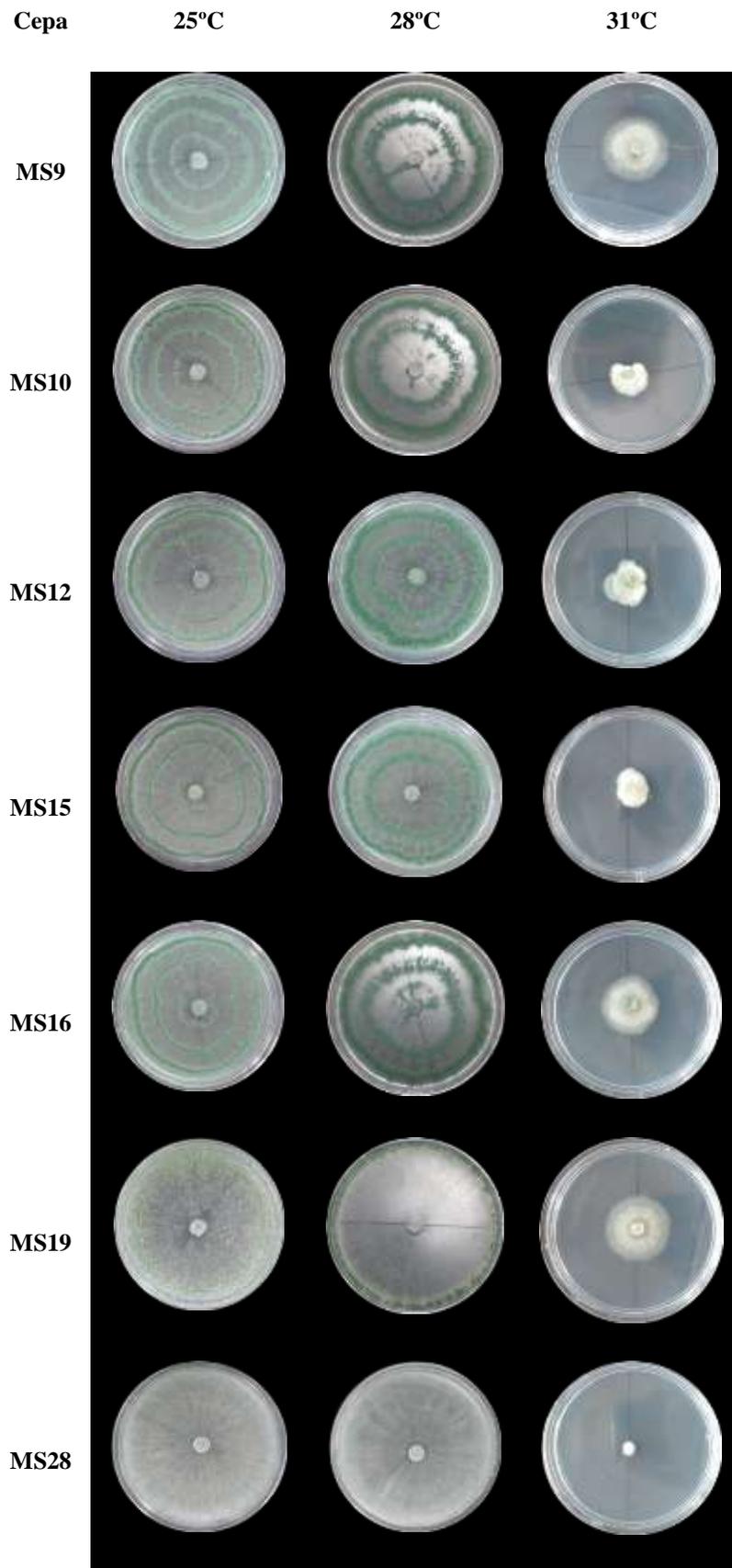


Figura 1. Crecimiento en medio papa-dextrosa-agar de las cepas de *Trichoderma* spp. a diferentes temperaturas, siete días después de la siembra (DDS).

En otro trabajo, Knudsen y Bin (1990) concluyen que en algunos aislamientos de *T. harzianum* la temperatura óptima para el crecimiento fue de 20°C, lo que contradice a Danielson y Davey (1973).

Sin embargo, Antal et al. (2000) investigaron trescientos sesenta cepas de *Trichoderma*, de las cuales catorce identificados como *T. aureoviride*, *T. harzianum* y *T. viride*, con buen crecimiento a 5°C.

Tabla 1. Crecimiento en diámetro y tasa de crecimiento de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp.

| Cepas | Diámetro (mm) | Tasa de crecimiento (mm día ⁻¹) ¹ | Diámetro (mm) | Tasa de crecimiento (mm día ⁻¹) ² | Diámetro (mm) | Tasa de crecimiento (mm día ⁻¹) ³ |
|-------|---------------|--|---------------|--|---------------|--|
| MS9 | 73,85 b* | 22,79 a | 73,36 b | 24,57 c | 24,30 a | 6,78 a |
| MS10 | 74,32 b | 24,19 a | 73,09 b | 26,11 a b | 17,94 c | 4,48 b |
| MS12 | 75,97 a b | 23,26 a | 73,66 a b | 24,88 b c | 18,67 b c | 5,80 a b |
| MS15 | 75,16 a b | 23,85 a | 72,64 b | 24,57 c | 15,79 c | 5,74 a b |
| MS16 | 75,15 a b | 23,24 a | 75,17 a b | 26,39 a | 22,96 a | 6,13 a b |
| MS19 | 76,96 a | 20,96 b | 76,69 a | 25,88 a b c | 22,59 a b | 7,05 a |
| MS28 | 75,87 a b | 23,72 a | 75,59 a b | 25,72 a b c | 8,98 d | 0,98 c |

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).¹⁻²⁻³Tasa de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* a 25, 28 y 31°C a las 72 HDS (Horas Después de Siembra).

CONCLUSIÓN

De las siete cepas evaluadas de *Trichoderma* spp., seis de ellas corresponden a *T. asperellum* y la restante a *T. erinaceum*. La temperatura es un factor limitante en el crecimiento y aspecto de la colonia. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 – 28°C. Las cepas *T. erinaceum* mostraron la mayor tasa de crecimiento en las tres temperaturas evaluadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo proporcionado por el Ing. Agr. Andrés Sanabria al facilitar las cepas utilizadas en este estudio. Así mismo, al Ing. Victoriano Barboza y a los Técnicos investigadores Ing. Gabriela Morel y Christian Dujak del Centro de Investigación Capitán Miranda dependiente del Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria por abrirnos las puertas para la realización del trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, AM; Abdelnoor, RV; Arias, CAA; Carvalho, VP; Jacoud, DS; Marin, SR y Carvalho, CG. 2003. Genotypic diversity among Brazilian isolates of

Macrophomina phaseolina revealed by RAPD. Fitopatologia Brasileira 28(3):279-285.

Antal, Z; Manczinger, L; Szakacs, G; Tengerdy, RP; Ferenczy, L. 2000. Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. Mycological Research 104(05):545-549.

Babu, BK; Saxena, AK; Srivastava, AK y Arora, DK. 2007. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. Mycologia 99(6):797-803.

Choi, IY; Hong, SB; Yadav, MC. 2003. Molecular and morphological characterization of green mold, *Trichoderma* spp. isolated from oyster mushrooms. Mycobiology 31(2):74-80.

Danielson, RM; Davey, CB. 1973. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. Soil Biology and Biochemistry 5(5):495-504.

Gams, W; Bisset, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In Harman, GE; Kubicek, CP. eds.

- Trichoderma* and *Gliocladium*. London. Taylor and Francis. p.3-34.
- Grondona, I; Hermosa, R; Tejada, M; Gomis, MD; Mateos, PF; Bridge, PD; Monte, E; Garcia-Acha, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soil borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8):3189-3198.
- Harrington, TC; Steimel, J; Workneh, F; Yang, XB. 2000. Molecular identification of fungi associated with vascular discoloration of soybean in the north central United States. *Plant Disease* 84(1):83-89.
- Hermosa, MR; Grondona, I; Iturriaga, ET; Diaz-Minguez, JM; Castro, C; Monte, E; Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):1890-1898.
- Hjeljord, L; Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biocontrol: an overview. In Kubicek, CP; Harman, GE. eds. *Trichoderma and Gliocladium*. London, United Kingdom. Taylor and Francis Ltd. p 131-151.
- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease* 87(1):4-10.
- Iqbal, U; Mukhtar, T. 2014. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek from Pakistan. *The Scientific World Journal* 2014(2014).
- Karthikeyan, B; Jaleel, CA; Lakshmanan, GA; Deiveekasundaram, M. 2008. Studies on rhizosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 62(1):143-145.
- Küçük, Ç; Kivanç, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. *Turkish Journal of Biology* 27(4):247-253.
- Knudsen, GR; Bin, L. 1990. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. *Phytopathology* 80(8):724-727.
- Kumar, D; Chand, R; Prasad, LC; Joshi, AK. 2007. A new technique for monoconidial culture of the most aggressive isolate in a given population of *Bipolaris sorokiniana*, cause of foliar spot blotch in wheat and barley. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(11):1647-1651.
- Larralde-Corona, CP; Santiago-Mena, MR; Sifuentes-Rincon, AM; Rodríguez-Luna, IC; Rodriguez-Perez, MA; Shirai, K; Narvaez-Zapata, JA. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80(1):167-177.
- Lieckfeldt, E; Samuels, GJ; Nirenberg, H. I; Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species?. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6):2418-2428.
- Ospina-Giraldo, MD; Royse, DJ; Chen, X; Romaine, CP. 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology* 89(4):308-313.
- Qiagen. 2012. Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. 2 vers. Alemania. 20 p.
- White, TJ; Bruns, T; Lee, SJWT; Taylor, JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. San Diego. Academic Press. p. 315-322.
- Zadoks, JC; Schein, RD. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. New York, United States. Oxford University Press. 427 p.