

A photograph of a sorghum plant in a field, showing significant damage from the pathogen Fusarium nygamai. The leaves are heavily spotted with dark brown and purple lesions, and the central stalk is severely damaged, appearing dark and necrotic. The background shows other green sorghum plants.

Universidad de la Republica

Facultad de Ciencias

**Selección de cepas de
Trichoderma sp. antagonistas
del patógeno de sorgo
*Fusarium nygamai***

Belén Corallo

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Micología

Orientador, Dra. Susana Tiscornia

Dedico el trabajo de tesis a mi hijo Manuel, quien me soportó y acompañó durante toda la carrera.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Lina Bettucci por aceptarme en el laboratorio y confiar en mí, por todos los aportes realizados y por apurarme en la entrega del trabajo.

A mi tutora Dra. Susana Tiscornia que me enseñó desde manipular una caja de Petri hasta como arreglar una estufa y por estar siempre al firme para consolarme en los peores momentos y para tirarme flores en los mejores.

A la Dra. Sandra Lupo por todo lo que aprendí a su lado y espero poder seguir aprendiendo, por escucharme siempre, entenderme, apoyarme y sonreírme.

A todos mis compañeros del laboratorio por los excelentes momentos que pasamos y porque de todos aprendí algo. En especial a Raquel Alonso, Eduardo Abreo, Fernando Navarrete, Silvina Soria y Rafael Ruiz quienes conforman mi equipo de trabajo y aportaron a mi tesis en distintos aspectos.

A mi familia, sin ellos no estaría acá, por estar siempre conmigo y escucharme en mis momentos de estrés pre-examen. En especial a mis hermanos y primos que me esperaron y me permitieron recibirme antes que ellos, con excepción de mi hermano Joaquín.

A Luce, por estar siempre conmigo apoyándome, tranquilizándome y queriéndome.

A Cao, mi amorcito del alma, gracias por estar.

A mis amigos por todo.

Índice

Introducción.....	1
Objetivos.....	7
Hipótesis.....	7
Materiales y Métodos.....	8
Aislamiento e identificación.....	8
Cultivos monospóricos.....	11
Evaluación de la capacidad antagónica en cultivos duales.....	12
Evaluación de la actividad de los metabolitos volátiles.....	13
Evaluación del efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>F. nygamai</i> en sorgo.....	14
Resultados.....	17
Aislamiento e identificación.....	17
Evaluación de la capacidad antagónica en cultivos duales.....	18
Evaluación de la actividad de los metabolitos volátiles.....	22
Evaluación del efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>F. nygamai</i> en semillas de sorgo	24
Discusión	28
Bibliografía	31
Anexo	39

INTRODUCCIÓN

El **sorgo** (*Sorghum bicolor* L. Moench) es uno de los cereales más cultivados en el mundo. Este cereal fue domesticado en Etiopía (África) hace aproximadamente 3000 años A.C. Las variedades de sorgo de mayor importancia económica son *S. bicolor*, *S. guinea*, *S. caudatum*, *S. kafir*, y *S. durra* (Medraoui *et al.*, 2007).

El sorgo dulce (*S. bicolor*) es una especie de planta con metabolismo C4 adaptada a los climas secos y cálidos, presentando una menor pérdida de agua y una mayor eficiencia fotosintética. Es utilizado en varios países para la producción de etanol y el bagazo residual resulta una fuente importante para la nutrición animal. Debido a su buena relación costo beneficio el cultivo de este grano podría considerarse una herramienta estratégica fundamental para el desarrollo de la ganadería en áreas pequeñas (Blansina & Symonds, 2010). La mayor parte de la producción de etanol en el mundo es a partir de la caña de azúcar, pero las nuevas tecnologías tienden a utilizar fuentes no alimenticias para la producción del mismo (Rajeev *et al.*, 2009). El sorgo constituye una fuente de energía renovable y tiene la ventaja de poder ser cultivado en tierras relativamente pobres, no aptas para cultivos con requerimientos exigentes para su desarrollo, además de poder ser utilizado en la rotación de cultivos (Fernández & Garro, 2004). Dentro del MERCOSUR Uruguay y Argentina son los países con mayor dependencia de energías no renovables. En los últimos años se ha promovido la incorporación del etanol como biocombustible en Uruguay, con el fin de disminuir la dependencia energética externa, desarrollar una cadena agroindustrial y aumentar la oferta laboral (Bittencourt & Reig, 2009).

Dado que el sorgo es un cereal de verano crece en condiciones de escasas de agua, que ocasionan estrés a la planta. Esto incrementa la susceptibilidad de la planta frente al ataque por hongos (Petrovic *et al.*, 2009). Entre los hongos, especies del género *Fusarium* ocasionan daños severos, invadiendo los tejidos a través de aberturas naturales o heridas (Calhoun & Park, 1964; Thomas & Buddenhagen, 1980; Dubin, 1984; Mai, 1987; Van Wyk *et al.*, 1987). Una de las principales enfermedades en el sorgo producida por especies de *Fusarium* es la podredumbre

del tallo (Castor & Frederiksen, 1980; Reed *et al.*, 1983; Jardine & Leslie, 1992) ocasionando daños en los haces vasculares de tallo y raíz (Maranville & Clegg, 1984; Zummo, 1984).

El inóculo se encuentra en tejidos vivos de plantas, en rastrojo y en suelo (Tesfaye *et al.*, 2010). *Fusarium* spp. además causa daños económicos significativos en otros cultivos como el maíz, la caña de azúcar, el trigo y el arroz (Nirenberg & O'Donnell, 1998; Leslie *et al.*, 1992; Leslie, 1995). El género *Fusarium* se caracteriza por producir esporas de origen asexual (conidios) largos denominados macroconidios. Estos son curvados, multicelulares, con una célula apical que puede ser: redondeada, papilada, en forma de gancho más o menos afinado y una célula basal en forma de pie que puede ser más o menos elongada. Muchas especies producen también conidios pequeños, generalmente unicelulares, con forma fusiforme, oval o esférica denominados microconidios. Los conidios son importantes para la dispersión del hongo, la que se produce por el viento o la lluvia y son generalmente la forma de propagación que infecta a la planta. A su vez, hay especies que poseen la capacidad de producir estructuras de resistencia denominadas clamidosporas que resultan importantes para la permanencia en el suelo bajo condiciones adversas (Glenn, 2007).

El clima afecta la distribución, la diversidad y la frecuencia de las especies de *Fusarium* asociadas a las plantas y en el suelo, así como el comportamiento de las especies en la epidemiología y en la producción de micotoxinas en las plantas infectadas (Petrovic *et al.*, 2009).

Uno de los problemas sanitarios que afectan al cultivo de sorgo dulce en Uruguay es el causado por *Fusarium nygamai*, un hongo fitopatógeno capaz de producir micotoxinas como fumoniosinas, moniliforminas y beauvericinas (Glenn, 2007). Esta especie se observó por primera vez en podredumbre de tallo y raíz de plantas de sorgo en Nueva Gales del Sur (Sydney – Australia) en 1977 y 1978 (Trimboli & Burgess 1985). Al principio se identificó como *F. moniliforme* debido a que no se observaron clamidosporas. Luego cuando se inocularon las cepas aisladas en raíces de sorgo en condiciones de invernadero, produjeron clamidosporas y esta especie se clasificó como *F. nygamai* (Sangalang *et al.*, 1995). Esta especie pertenece al complejo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) y se encuentra taxonomicamente entre las Secciones

Elegans y *Liseola*. *F. nygamai* no puede incluirse en la Sección *Liseola* debido a que produce clamidosporas y tampoco puede incluirse en la Sección *Elegans* porque produce microconidios en cadenas (Leslie & Summerell, 2006). Las características principales de esta especie son la formación de macroconidios y microconidios en cadenas relativamente cortas y en falsas cabezas y la producción de clamidosporas de pared rugosa como estructuras de resistencia y propagación (Burgess & Trimboli, 2006). *F. nygamai* puede colonizar tejidos aéreos y subterráneos de muchas plantas (Marasas *et al.*, 1988; Jeschke *et al.*, 1990). En sorgo produce manchas en hojas y podredumbre de tallo, disminuyendo además el contenido de azúcar y bajando considerablemente el rendimiento en los cultivos (Petrovic *et al.*, 2009). En Uruguay se ha constatado la presencia del hongo en tallo, hojas y semillas. La infección de los cultivos con este hongo puede generar importantes pérdidas en cuanto al rendimiento en las cosechas, y además constituye un riesgo para la alimentación animal por su capacidad de producir micotoxinas.

Desde sus comienzos la agricultura ha coexistido con microorganismos patógenos e insectos plaga. Tradicionalmente se han utilizado métodos químicos como insecticidas y fungicidas entre otros, con el fin de disminuir las pérdidas en la agricultura y la forestación (Verma *et al.*, 2007). La excesiva utilización de fungicidas, pesticidas y otros fumigantes genera riesgos para el ambiente y el consumo de alimentos. La aplicación de productos químicos a largo plazo genera pérdidas económicas debido al daño provocado en el ambiente, a la permanencia de residuos químicos y a la capacidad de algunos organismos de generar resistencia por la utilización repetida de los mismos.

La definición de control biológico según Van Driesche & Bellows (1996) expresa que el control biológico es el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir la población de una plaga, haciéndola menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de ellos.

Actualmente las prácticas de control de patógenos, tanto agrícolas como forestales, se basan en la utilización de agentes de control biológico como tales o combinados con productos químicos. Estas prácticas tienen la ventaja de reducir el uso de pesticidas. Existen numerosos

agentes de biocontrol registrados que se utilizan comercialmente. Estos incluyen cepas bacterianas de los géneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, como también cepas fúngicas de los géneros *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida*, y *Coniothyrium* (Vinale *et al.*, 2008a).

Los hongos utilizados como agentes de control biológico han ganado aceptación en los últimos tiempos, respecto a las bacterias, debido a su amplio espectro en términos de control de enfermedades y a su rendimiento en producción. Hongos del género *Trichoderma* han sido ampliamente utilizados como agentes de control biológico debido a su alta capacidad antagónica frente a otros organismos como invertebrados, bacterias y hongos (Verma *et al.*, 2007).

***Trichoderma* sp.** (Telomorfo: *Hypocrea*, Hypocreales, Ascomycota, Dikarya) es un hongo cosmopolita, que habita comúnmente en suelos y rizosfera. Sin embargo ha sido reportado en una gran variedad de sustratos naturales y artificiales, lo que muestra su potencial como oportunista y su adaptabilidad a diferentes condiciones ecológicas (Friedl & Druzhinina, 2011). El principal mecanismo de reproducción en *Trichoderma* spp. es mediante la producción de conidios (reproducción asexual). Estos se producen en respuesta a señales de stress para permitir al hongo sobrevivir y dispersarse. La inducción de la conidiogénesis es afectada por las condiciones ambientales como disponibilidad de nutrientes, luz y pH bajo. Por ejemplo la máxima producción de conidios en *T. atroviride* es a pH 4,4 y en *T. harzianum* a pH 5,5 y en presencia de luz (Carreras *et al.*, 2012).

Al igual que otros hongos utilizados en control biológico, las esporas (conidios) de *Trichoderma* spp. son eficientemente utilizadas en preparaciones comerciales debido a que resisten condiciones ambientales adversas (Verma *et al.*, 2007).

La utilización de *Trichoderma* spp. en la agricultura tiene algunas ventajas: colonización de la rizosfera estableciéndose rápidamente en las comunidades microbianas de la misma, control de la micoflora patogénica y competitividad por diversos mecanismos, favoreciendo la salud de la planta y estimulando el crecimiento radicular (Vinale *et al.*, 2008a).

Los modos de acción de *Trichoderma* spp. que pueden ocurrir en una interacción con otro hongo son:

- antibiosis, que involucra la producción de metabolitos secundarios (volátiles o difusibles) que inhiben el crecimiento del otro hongo pudiendo provocar la muerte del mismo
- micoparasitismo, en el cual se producen enzimas extracelulares para la lisis de la pared del hospedador (celulasas, quitinasas, glucanasas) y la interacción es específica
- competencia, donde *Trichoderma* limita el acceso del otro hongo a un recurso compartido por ambos mediante la utilización de un amplio rango de sustratos, rápida velocidad de crecimiento, producción de enzimas y compuestos antibióticos (Hjeljord & Tronsmo, 1998).

Trichoderma spp. se caracteriza por producir una gran diversidad de metabolitos secundarios. Estos son un grupo heterogéneo de compuestos naturales que participan en funciones básicas como competencia, simbiosis, transporte de metales, diferenciación y señalización. Debido a sus propiedades químicas y biológicas son utilizados en la industria médica, farmacéutica o con fines agronómicos. La producción de metabolitos secundarios en *Trichoderma* depende de la cepa e incluye metabolitos volátiles y no volátiles (Vinale *et al.*, 2008b). Hasta el momento existen reportes de las estructuras de más de 100 compuestos (Reino *et al.*, 2008; Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). Estos incluyen compuestos no polares de bajo peso molecular como pironas, terpenoides, esteroides y policétidos. Algunos de estos metabolitos juegan un rol importante en la interacción con plantas y pueden inducir mecanismos de resistencia frente a patógenos o promover el crecimiento de algunas plantas. También se ha detectado *in vitro* la acción anti-microbiana de varios metabolitos.

Se ha planteado como hipótesis que la producción de los metabolitos secundarios ha evolucionado para la comunicación o la defensa, contra otros microbios u organismos multicelulares. El estilo de vida ancestral micoparasítico de *Trichoderma* puede explicar el inusualmente diverso repertorio de los “clusters” biosintéticos, particularmente en *T. atroviride* (*Hypocrea atroviridis*) y *T. virens* (*H. virens*), de una gran variedad de compuestos necesarios en el ataque contra microbios (Mukherjee *et al.*, 2012).

Los compuestos volátiles pertenecen a numerosas clases estructurales como mono y sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, lactonas, ésteres o compuestos C₈. Las condiciones de stress influyen en la expresión de los metabolitos volátiles. Estos metabolitos están involucrados con diferentes procesos biológicos como biocontrol o su relación con el ambiente. Los metabolitos volátiles de *Trichoderma* actúan de forma antibiótica contra hongos patógenos de las plantas y pueden promover el crecimiento de las mismas, así como otorgarles resistencia sistémica. A su vez ha sido demostrado que los metabolitos volátiles juegan un rol importante en el micoparasitismo. Algunos ejemplos son: el 6-pentilo-alfa-pirona que reduce la producción de la micotoxina DON por *Fusarium graminearum*, reduce el crecimiento del micelio de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* y promueve crecimiento en plantas de tomate. Los compuestos C₈ (ej. 3-octanona) inducen la conidiación en tanto los sesquiterpenos exhiben acción antimicrobiana y antiviral. Las especies de *Trichoderma* *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. asperellum* son muy utilizadas como agentes protectores de plantas y como promotores de crecimiento (Stoppacher *et al.*, 2010).

Por otro lado muchas cepas de *Trichoderma* spp. son utilizadas para controlar algunas malezas y como agentes biorremediadores disminuyendo la contaminación del suelo (Verma *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

Objetivo General:

El objetivo de este estudio es evaluar la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* frente a *F. nygamai* aislado de plantas de sorgo dulce.

Objetivos específicos:

- Aislar e identificar cepas de *Fusarium nygamai* de plantas de sorgo dulce con síntoma
- Aislar e identificar cepas de *Trichoderma* de diferentes suelos
- Evaluar la capacidad antagónica de las distintas cepas de *Trichoderma* frente a cepas de *F. nygamai*
- Seleccionar las cepas de *Trichoderma* que presenten mayor capacidad antagónica
- Evaluar el efecto del peletizado de semillas de sorgo dulce con las cepas de *Trichoderma* seleccionadas para controlar a *F. nygamai*

HIPOTESIS

Algunas cepas de *Trichoderma* sp. son capaces de controlar al patógeno de sorgo *F. nygamai*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación

Las cepas de *F. nygamai* se aislaron de plantas de sorgo dulce que presentaban síntoma de fusariosis. Para ello se colocaron 4 fragmentos de hojas de sorgo con síntoma de forma equidistante en una caja de Petri con un algodón humedecido (cámara húmeda) y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días.

Por otro lado, se realizó una desinfección superficial de hojas de sorgo. Para ello se fragmentaron las hojas en trozos de 5mm de largo, luego se sumergieron durante un minuto en alcohol 70% y durante dos minutos en hipoclorito de sodio 0,4%, por último se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Se colocaron 10 fragmentos en una caja de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA (potatoe-dextrose-agar) y se incubó a 25°C, en alternancia de luz oscuridad, durante 7 días.

En ambos casos todas las cepas de *Fusarium* que emergieron se transfirieron a cajas de Petri de 4.5cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA y se incubaron durante 7 días a 25°C en alternancia de luz oscuridad. Se obtuvieron cultivos puros de cada aislamiento.

Las cepas de *Trichoderma* se aislaron de muestras de suelo. Para ello se colocaron 10g de la muestra de suelo en un matraz con 90 ml de agua destilada estéril. Luego se realizaron dos diluciones consecutivas de 1 en 10. Se sembraron en superficie 0,5ml de cada dilución en cajas de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA-Chloramphenicol 0.01% y se incubaron durante 4 días a 25°C en alternancia de luz oscuridad. En base a las características macroscópicas se efectuaron aislamientos de las colonias de *Trichoderma* en cajas de Petri de 4.5cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA y se incubaron durante 4 días a 25°C en alternancia de luz oscuridad. Se obtuvieron de esta forma cultivos puros de cada aislamiento.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. se conservaron en tubos con medio PDA a 5°C y se ingresaron a la colección del Laboratorio de Micología. Las cepas de *Trichoderma* se

guardaron en crioviales con agua destilada estéril a 5°C y las de *F. nygamai* en crioviales con agua-glicerol (10%) a -80°C.

Para la identificación de *Fusarium* se utilizaron los criterios de Burgess & Trimboli (2006). Las cepas de *Trichoderma* se identificaron siguiendo la clave de Gams & Bissett (1998) y la clave de Samuels (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>).

Los aislamientos de *Fusarium* spp. se sembraron en cajas de Petri de 4.5cm de diámetro conteniendo medio de cultivo_Carnation Leaf Agar (CLA) para una mejor observación de sus estructuras reproductoras. Los cultivos de *Fusarium* spp. realizados en PDA se utilizaron para observar las características macroscópicas para la identificación de las especies. Esas características fueron: color, forma y textura de la colonia, color del envés de la colonia. En el caso de *Trichoderma* spp. se observó: color, forma y textura de la colonia, color del envés, formación de grumos, color de los conidios y ubicación de la conidiogénesis en la colonia, presencia de exudados, de pigmentos difusibles y producción de metabolitos volátiles con aroma a coco.

Tanto para *Fusarium* como para *Trichoderma* las características micromorfológicas de los distintos aislamientos, observadas en microscopio óptico, fueron: tipo de conidiogénesis y disposición de los conidios, color, tamaño y forma de los conidios y célula conidiógena y presencia/ausencia de clamidosporas.

La identidad de las cepas de *Trichoderma* se confirmó mediante métodos moleculares por comparación de la secuencia de ADN de la región ITS.

El ADN se extrajo a partir de cultivos puros en PDA según el método de Lee & Taylor (1990). Se raspó el micelio con bisturí estéril y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se agregaron 400 µl de buffer de lisis [Tris HCL 50mM pH 8, EDTA Na₂ 50 mM, SDS 0,3%] y 5 µl de proteinasa K 2% (p/v). Se realizó la lisis mecánica con un machacador plástico estéril. La muestra se incubó a

60°C durante 30 minutos. Se agregaron 112 µl de NaCl 5M y 52 µl de CTAB 10X (CTAB 10% (p/v), Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)). Se incubó a 65°C durante 10 minutos. Se agregaron 570 µl de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó enérgicamente y se incubó a -20°C durante 30 minutos.

Para la amplificación mediante PCR de la región ITS, se utilizaron los primers ITS4 e ITS5 (Tabla 1). Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 94°C), hibridación (30 segundos a 50°C) y extensión (1 minuto a 72°C); seguidos de un ciclo de extensión final de 4 minutos a 72°C.

La amplificación se realizó en un termociclador Corbett Research.

En todos los casos la mezcla de la reacción contenía: 5 µl de Buffer 10X, 5 µl de dNTPs (2,5 mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de primer ITS4 (10 mM), 1 µl de primer ITS5 (10 mM), 0,5 µl de Taq polimerasa, 32 µl de agua y 4 µl de la muestra de ADN (50 µl de volumen final). El control negativo se realizó utilizando la misma mezcla pero sin agregado de ADN y el control positivo se realizó utilizando una muestra que dio positiva en una reacción de PCR previa.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1% en buffer TBE 1X teñidos con bromuro de etidio y bajo luz UV en transiluminador. Como marcador molecular se utilizó DNA mass ruler 100pb (Fermentas).

Tabla 1. Primers utilizados en las PCRs.

Primer	Secuencia (5' → 3')	Referencia
ITS4	tcctccgcttattgatatgc	White <i>et al.</i> (1990)
ITS5	ggaagtaaaagtcgtaacaagg	White <i>et al.</i> (1990)

Los productos de PCR, fueron secuenciados en MACROGEN, Corea. Las secuencias obtenidas fueron alineadas contra las secuencias presentes en la base de datos de GenBank y de

International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy, utilizando la herramienta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cultivos monospóricos

Se realizaron cultivos monospóricos de los aislamientos de *Fusarium nygamai*. Para ello, se resuspendieron las esporas de un cultivo puro en un tubo con agua destilada estéril. Luego se colocó una gota de esta suspensión entre un porta y un cubreobjetos y se observó al microscopio óptico, de forma de contar entre 7 y 10 conidios por campo de observación. De no obtenerse esta concentración, se agregó más cantidad de inóculo en el caso de observar un número muy bajo de conidios, o se diluyó con agua en caso de tener un número muy alto de conidios por campo de observación. Luego se volcó la suspensión de esporas en una placa de Petri de 9cm de diámetro conteniendo agar-agua 2%. Se dejó reposar un minuto para que se adhieran los conidios al medio de agar-agua y se descartó el exceso de líquido. Para favorecer la germinación se incubó a 25°C durante 24 hs en un plano inclinado. Luego en condiciones de esterilidad y bajo microscopio estereoscópico se transfirió una espora germinada a una placa de Petri de 4.5cm de diámetro conteniendo PDA y se incubó a 25°C.

Se realizó por triplicado para cada cepa de *F. nygamai*.

Se utilizaron los cultivos monospóricos en todos los ensayos siguientes.

Evaluación de la capacidad antagónica en cultivos duales

Para evaluar la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *F. nygamai* se realizaron cultivos duales enfrentando cada cepa de *F. nygamai* (2 cepas) con cada una de las 12 cepas de *Trichoderma* seleccionadas.

A partir de cada cultivo puro de *Trichoderma* sp. se cortó un disco con sacabocado del borde de la colonia (zona en crecimiento activo) y se colocó en una caja de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA. Por otro lado se cortó un disco con sacabocado del borde de la colonia de un cultivo puro de *F. nygamai* y se colocó a una distancia de 2cm del disco con *Trichoderma* sp. (Figura 1). Se incubó a 25°C en alternancia de luz oscuridad.

El control se realizó colocando en una caja de Petri conteniendo medio de cultivo PDA un disco con *F. nygamai*.

Se midió el radio de crecimiento de *F. nygamai* en la zona de enfrentamiento cada 24hs durante 3 días. Se calculó el porcentaje de inhibición como:

$I = [(F \times 100)/C] - 100$, siendo F: la media de los diámetros de las colonias de *F. nygamai* probadas con el antagonista potencial y C: la media de los diámetros de las colonias control.

Los ensayos se realizaron por triplicado.

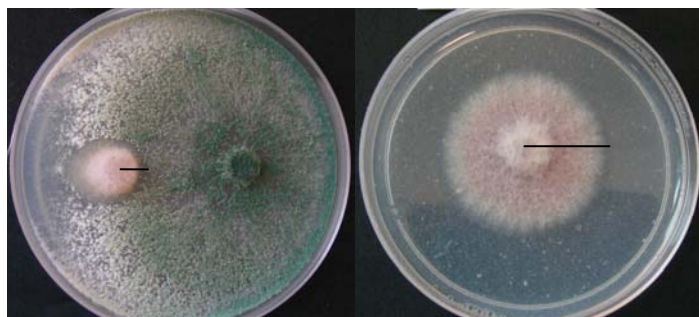


Figura 1. Crecimiento de *F. nygamai* en cultivos duales (izquierda) y control (derecha)

Con el fin de evaluar el tipo de interacción a nivel del micelio, se realizaron preparados de la zona de contacto y se observó al microscopio óptico el aspecto de las hifas. Para ello, bajo condiciones asépticas, se utilizó cinta scotch, y se tomaron muestras en tres puntos cercanos a la zona de interacción entre las colonias. Cada muestra se colocó entre un porta y un cubre objeto con una gota del colorante lactofenol-azul de algodón.

Para evaluar la viabilidad de ambos micelios en la zona de interacción se recortó una pequeña porción de los micelios en dicha zona y también a cada lado de la misma (Figura 2). Cada muestra obtenida se inoculó en medio fresco PDA en una caja Petri de 4.5cm de diámetro. Se evaluó el crecimiento de uno o de ambos micelios.

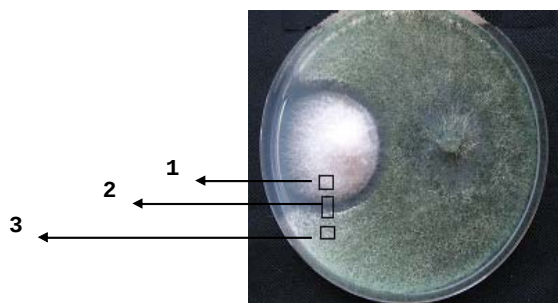


Figura 2. Muestras tomadas en la zona de interacción:

1- *F. nygamai*, 2- zona de interacción y 3 – *Trichoderma* sp.

Evaluación de la actividad de los metabolitos volátiles

Para evaluar la inhibición en el crecimiento de *F. nygamai* por el efecto de metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma* spp. se realizó la metodología sugerida por Dennis & Webster (1971b).

A partir de un cultivo puro de *Trichoderma* sp. se cortó un disco con sacabocado del borde de la colonia y se colocó en el centro de una caja de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA. Se incubó a 25°C durante 48 hs. Por otro lado se cortó un disco con sacabocado del

borde de la colonia de un cultivo puro de *F. nygamai* y se colocó en el centro de una caja de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA. Se incubó a 25°C durante 24hs. Luego se colocó la base de la caja de Petri conteniendo *Fusarium nygamai* sobre la base de la caja de Petri conteniendo *Trichoderma* sp. Se sellaron ambas bases enfrentadas con parafilm y se incubó a 25°C con alternancia de luz oscuridad (Figura 3).

El control se realizó colocando un disco conteniendo *F. nygamai* en el centro de una caja de Petri de 9cm de diámetro con medio PDA.

Se midió el radio de crecimiento de *F. nygamai* cada 24hs durante 4 días. Los enfrentamientos y el testigo se realizaron por triplicado.

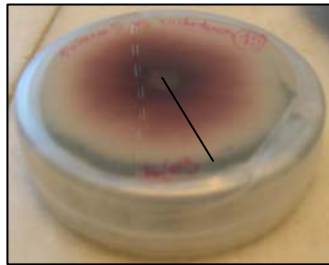


Figura 3. Cajas enfrentadas conteniendo *Trichoderma* sp. (abajo) y *F. nygamai* (arriba).

Evaluación del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *F. nygamai* en sorgo

Para evaluar la germinación de las semillas, se realizó una desinfección superficial sumergiéndolas un minuto en alcohol 80%, dos minutos en hipoclorito de sodio 4% y enjuagando con agua destilada estéril. Luego se las colocó en cajas de Petri de 9cm con medio agar-agua 2%. Se repartieron 10 semillas sin agregados por caja, 10 semillas con adherente comercial A.D.Cell, 10 con una suspensión de conidios de dos cepas de *F. nygamai* y 10 con una suspensión de *Trichoderma* sp. (Figura 4).

Las semillas se sumergieron en una suspensión de 10^5 esporas/ml de *F. nygamai* o en una suspensión de 10^6 esporas/ml de *Trichoderma* sp., según correspondiera. La concentración de esporas se determinó contando en cámara de Neubauer.

Todos los los ensayos se realizaron por quintuplicado.



Figura 4. Disposición de las semillas de sorgo dulce en la caja de Petri.

El peletizado se realizó mezclando semillas con adherente A.D.Cell y una suspensión de 10^6 esporas/ml de *Trichoderma* sp. Las semillas peletizadas con *Trichoderma* sp. se colocaron en tubos con agar-agua 2% y se agregaron 100 μ l de una suspensión de 10^5 esporas/ml de *F. nygamai*. Los controles se realizaron colocando semillas peletizadas con *Trichoderma* en tubos con agar-agua pero sin agregado de *Fusarium* y semillas sin *Trichoderma* sp. con el agregado de la suspensión de *Fusarium*. Semillas sin agregados y semillas con adherente fueron utilizadas como testigo (Figura 5).

Se utilizaron 10 tubos por tratamiento que fueron incubados a 25°C durante 20 días. Al cabo de los cuales se describió la sintomatología que presentaban las plántulas.



Figura 5. Semillas en tubos tiempo 0 (izquierda) y luego de 20 días (derecha)

Se realizó una desinfección superficial de las plantas con los tratamientos que contenían solo *Fusarium* y *Trichoderma* + *Fusarium*. Los diferentes órganos de las plantas se cortaron en fragmentos y se sumergieron (por separado) en alcohol 70% durante 1 minuto, en hipoclorito de sodio 0,4% durante 2 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron en papel de filtro estéril. Los fragmentos de cada planta se inocularon en una caja de Perti de 9cm de diámetro conteniendo PDA (1caja: 1planta) y se incubaron durante 72 hs a 25°C, con el fin de reaislar los hongos (Figura 6).

Para determinar si los resultados obtenidos eran independientes de los tratamientos realizados se utilizó el Test de Fisher (H_0 : los tratamientos no afectan los resultados).



Figura 6. Disposición de los fragmentos de 1 planta de sorgo en la caja de Perti.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación

Las cepas de *Fusarium* se aislaron de hojas incubadas en Cámara húmeda y de segmentos de hoja con síntoma inoculados en PDA. Las 12 cepas de *Trichoderma* se aislaron de suelo fresco.

Del total de cepas de *Fusarium* sp. dos correspondían a *F. nygamai* (F4 y F5). En la Tabla 2 se encuentran las especies de *Trichoderma* identificadas. El código de acceso del genBank corresponde al de la especie de la base de datos que mostró mayor homología de secuencia con la especie en estudio.

Tabla 2. Especies de *Trichoderma* identificadas, porcentaje de similitud y número de acceso al GenBank.

Nº cepa	Identificación morfológica	Identificación molecular	Query coverage	Máxima identidad	Nº acceso
3	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	100%	JX436466
6	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	98%	JQ617302
8	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	100%	JX436466
15	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma virens</i>	100%	100%	JQ040400
21	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	100%	JX436466
31	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	99%	JX421707
38	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	100%	JX273472
40	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	93%	JF694930
47	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma viride</i>	100%	100%	HQ259986
48	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	100%	JX465482
49	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma virens</i>	100%	98%	JQ973614
51	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	99%	JX421707

Evaluación de la capacidad antagónica en cultivos duales

Las Figuras 7a y b muestran el crecimiento de *F. nygamai* frente a las 12 cepas de *Trichoderma*. Todas las cepas de *Trichoderma* mostraron capacidad para reducir la velocidad de crecimiento de *F. nygamai*.

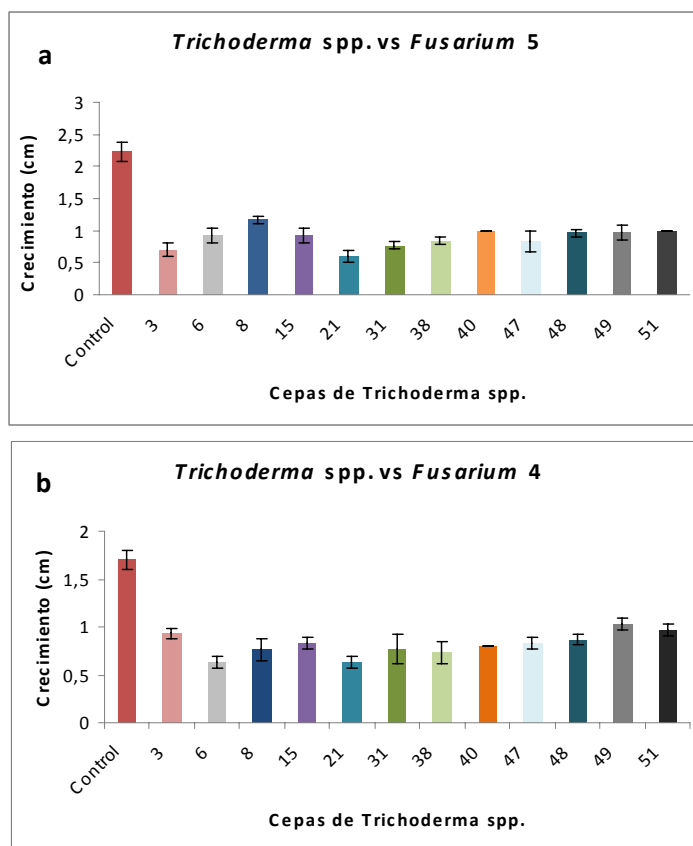


Figura 7. Crecimiento de *F. nygamai* en cultivos duales con las 12 cepas de *Trichoderma* y control. **a:** cepa F5 de *F. nygamai* y **b:** cepa F4 de *F. nygamai*.

El porcentaje de inhibición de todas las cepas de *Trichoderma* fue mayor frente a la cepa F5 de *F. nygamai* (Tabla 3). Las cepas de *T. atroviride* 3 y 21 presentaron mayor actividad antagónica frente a la cepa de *F. nygamai* F5 (68.7% y 73.1%, respectivamente). La cepa 6 de *T. asperellum* y la cepa 21 de *T. atroviride* fueron las más activas frente a la cepa F4 de *F. nygamai* (62.7%). Las cepas menos activas fueron la 8 (*T. atroviride*) frente a la cepa F5 y la 49 (*T. virens*) frente a la cepa F4 de *F. nygamai*.

Tabla 3. Porcentaje de la inhibición del crecimiento de las cepas de *F. nygamai* (F5 y F4) enfrentadas a las distintas cepas de *Trichoderma* spp., a las 72 hs de inoculado.

Cepas	% Inhibición	
	F5	F4
3	68,7	45,1
6	58,2	62,7
8	47,8	54,9
15	58,2	51,0
21	73,1	62,7
31	65,7	54,9
38	62,7	56,9
40	55,2	52,9
47	62,7	51,0
48	56,7	49,0
49	56,7	39,2
51	55,2	43,1

En la Tabla 4 se muestran las interacciones que ocurrieron entre las 12 cepas de *Trichoderma* y las dos cepas de *F. nygamai*. Algunas cepas de *Trichoderma* (6, 8, 21, 31, 38 y 40) sobrecrecieron y esporularon sobre el micelio de *F. nygamai*. Otras redujeron el crecimiento de *F. nygamai* parcialmente, rodeando la colonia y creciendo el micelio en forma sumergida por debajo de la misma (3, 47, 48 y 51). Finalmente las cepas 15 y 49 de *T. virens* presentaron una inhibición mutua “dead lock” con *F. nygamai* (Figura 8a, b, c y d).

Tabla 4. Interacción entre cepas de *Trichoderma* spp. y *F. nygamai*

Interacción	Cepas de <i>Trichoderma</i>											
	3	6	8	15	21	31	38	40	47	48	49	51
Sobrecrecimiento	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Inhibición sin sobrecrecimiento	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Inhibición mutua	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

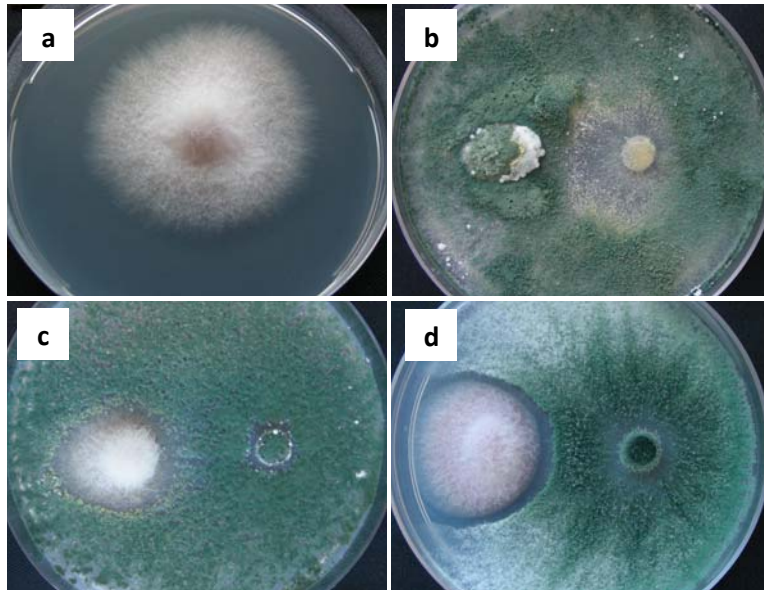


Figura 8. Interacción entre *Trichoderma* spp. y *F. nygamai*. **a:** Control (F5), **b:** *Trichoderma* sp. sobrecrece a *F. nygamai* (F4 vs T21), **c:** *Trichoderma* sp. rodea al micelio de *F. nygamai* (F5 vs T3) y **d:** *Trichoderma* sp. y *F. nygamai* se inhiben mutuamente- “dead lock” (F4 vs T49).

En la mayoría de enfrentamientos en donde se observó sobrecrecimiento se obtuvo únicamente *Trichoderma* spp. en las tres zonas analizadas (Figura 9a). Sin embargo en los enfrentamientos de las cepas 8, 31, 38 y 40 de *T. atroviride* con la cepa F5 de *F. nygamai* se aislaron ambos hongos de la zona de crecimiento de *F. nygamai* y de la zona de interacción (Figura 9b).

En los enfrentamientos que *Trichoderma* spp. inhibió sin sobrecrecimiento a la colonia de *F. nygamai* se aisló tanto *Trichoderma* como *Fusarium* a partir de la zona de interacción. Cuando se aisló de la zona de crecimiento de *Fusarium* también estaba presente el micelio de *Trichoderma* sp. en forma de micelio sumergido (Figura 9c).

En los enfrentamientos que hubo inhibición mutua se aisló *Fusarium* de la zona correspondiente a la colonia de *F. nygamai*. En cambio de la zona de interacción se aisló tanto *Trichoderma* sp. como *F. nygamai* (Figura 9d).

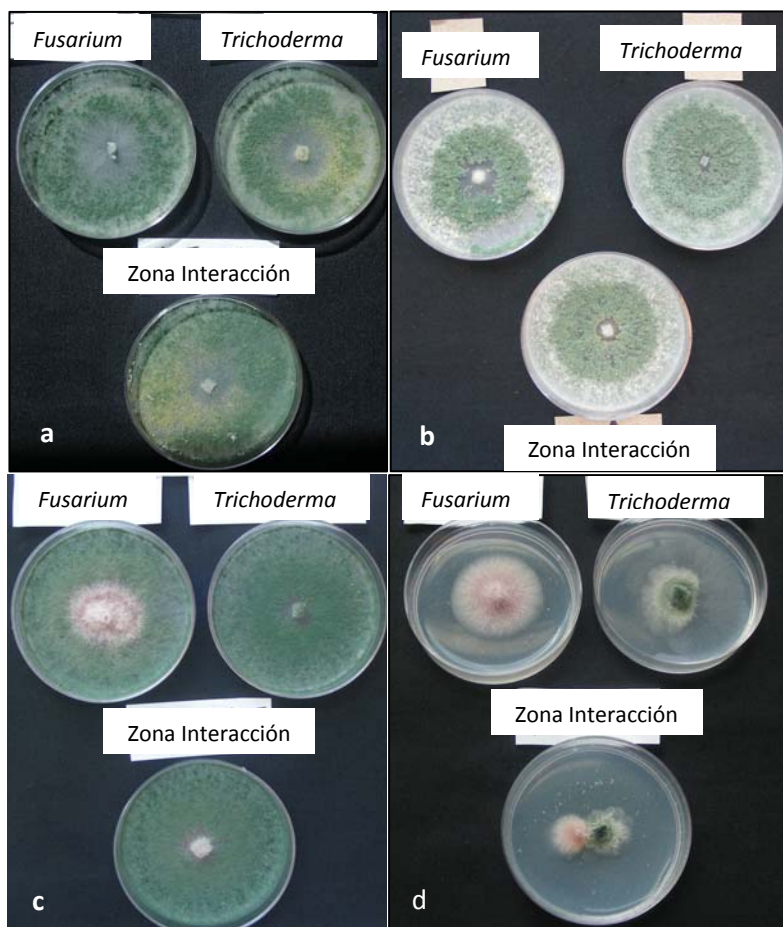


Figura 9. Recuperación de *Trichoderma* spp. y *F. nygamai* en la zona de interacción y a cada lado de la misma. **a:** cepa F4 de *F. nygamai* y cepa 21 de *Trichoderma*, **b:** cepa F5 de *F. nygamai* y cepa 31 de *Trichoderma*, **c:** cepa F4 de *F. nygamai* y cepa 3 de *Trichoderma* **d:** cepa F4 de *F. nygamai* y cepa 49 de *Trichoderma*

En los casos en que hubo sobrecrecimiento se observaron numerosas clamidosporas de *Trichoderma* en la zona de interacción (Figura 10a). Cuando *Trichoderma* rodeó a *F. nygamai* se observó en la zona de interacción las hifas de ambos hongos entremezcladas, siendo las más delgadas de *F. nygamai* y las más anchas de *Trichoderma* (Figura 10b). Cuando hubo inhibición mutua los micelios tuvieron las características de las colonias de ambos hongos, micelio, fiálides y conidios de *Trichoderma* (Figura 10c) y micelio y microconidios de *F. nygamai* (Figura 10d).

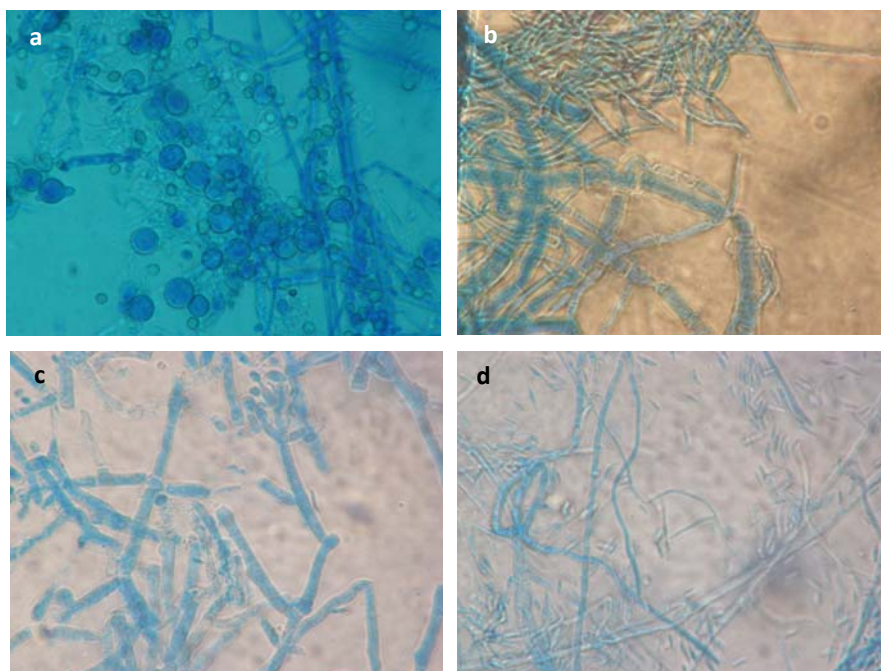


Figura 10. Micelio de *F. nygamai* y *Trichoderma* sp. en las distintas interacciones. **a:** clamidosporas y micelio de *Trichoderma* sp., **b:** micelio de *Trichoderma* sp. y *F. nygamai* entremezclado, **c:** micelio y conidios de *Trichoderma* sp. y **d:** micelio y microconidios de *F. nygamai*.

Evaluación de la actividad de los metabolitos volátiles

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* evaluadas mostraron una débil reducción del crecimiento sobre ambas cepas de *F. nygamai*. En la Tabla 5 se observa que la cepa 21 de *T. atroviride* fue la que mostró una mayor actividad (Figura 11) y la de menor actividad correspondió a la cepa 49 (*T. virens*) frente a la cepa F4 de *F. nygamai*. En el caso de los enfrentamientos de la cepa de *F. nygamai* F5 frente a la cepa 48 de *T. asperellum* y 51 de *T. atroviride* el crecimiento fue mayor o igual al control.

Tabla 5. Porcentaje de la inhibición del crecimiento de las cepas de *F. nygamai* (F5 y F4) expuestas a los metabolitos volátiles producidos por las distintas cepas de *Trichoderma* spp., a las 96 hs de inoculado. * se observó un crecimiento mayor o igual al control.

Cepas	% Inhibición	
	F5	F4
3	16.3	7.3
6	1.5	4.9
8	3.1	6.1
15	1.5	7.3
21	19.5	20.6
31	16.3	13.4
38	6.4	12.2
40	14.6	9.7
47	3.1	7.3
48	*	8.5
49	16.3	1.3
51	*	7.3



Figura 11. Crecimiento de la cepa F5 de *F. nygamai* enfrentada con la cepa 21 de *Trichoderma* (derecha) y control (izquierda), a las 96 hs de inoculado.

Las Figuras 12a y b muestran las respuesta del crecimiento de *F. nygamai* frente a las 12 cepas de *Trichodema*.

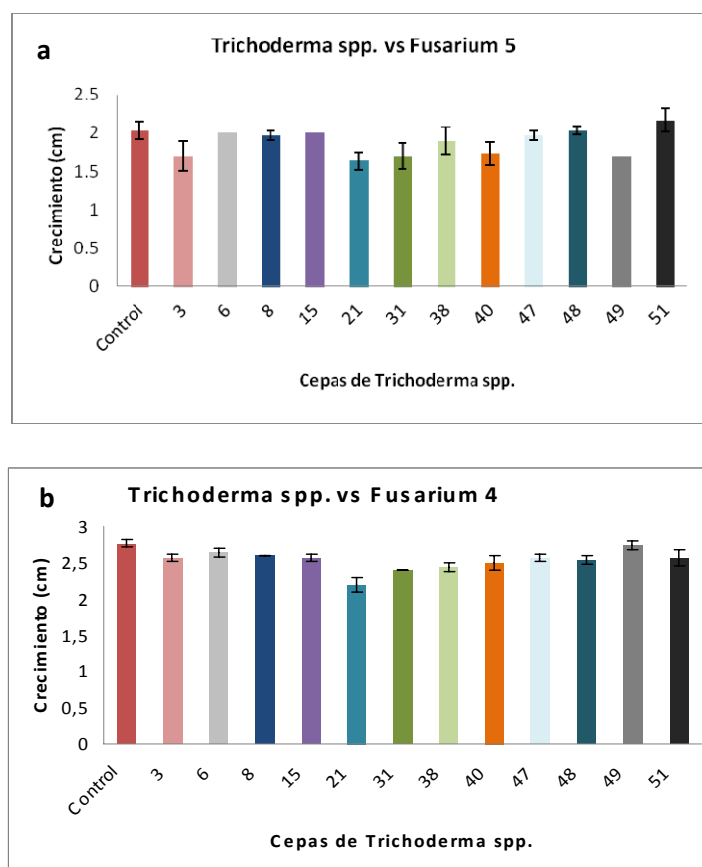


Figura 12. Crecimiento de *F. nygamai* enfrentado con las 12 cepas de *Trichoderma* y control, a las 96 hs de inoculado. **a:** cepa F5 de *F. nygamai* y **b:** cepa F4 de *F. nygamai*.

Evaluación del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *F. nygamai* en semillas de sorgo

Se seleccionaron las cepas de *T. atroviride* 8 y 21 y la cepa 6 de *T. asperellum*, en base a la efectividad para controlar el crecimiento de *F. nygamai* (F4 y F5) *in vitro*.

La Tabla 6 muestra los porcentajes de germinación de semillas de sorgo tratadas con las cepas de *Trichoderma* seleccionadas, con *F. nygamai* y sin tratar. Las semillas sin tratamiento presentan un porcentaje de germinación de 90%, ligeramente superior al resto de las semillas tratadas. No se encontraron diferencias entre el porcentaje de germinación de las semillas con adherente más *Trichoderma* o *Fusarium*.

Tabla 6. Porcentaje de germinación de las semillas con los distintos tratamientos.

Tratamiento	%	
	Germinación	Desvío
Semillas	90	0.82
semillas + adherente	78	1.26
semillas + T6	70	1.73
semillas + T8	75	1.16
semillas + T21	80	1.22
semillas + F 4, 5	76	1.14

El 100% de las plántulas tratadas con *F. nygamai* (F4 y F5) presentaban síntoma. Como se observa en la Tabla 7, tanto el adherente comercial utilizado como el tratamiento con la cepa 6 de *T. asperellum* no producen daños a las plántulas. Sin embargo la cepa 8 y la 21 de *T. atroviride* afectaron la sobrevivencia de las plántulas de sorgo, observándose un 40% y un 60% de plántulas enfermas, respectivamente. Los tratamientos con las cepas seleccionadas 6 y 21 controlaron moderadamente la patogenicidad de *F. nygamai*, pero la cepa 21 de *T. atroviride* afectó el desarrollo normal de las plántulas (Figura 13).

El test de Fisher mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento con *F. nygamai* y el tratamiento con la cepa de *T. asperellum* (6), indicando que el tratamiento con la cepa 6 protegió a las plántulas de la infección por *F. nygamai* (Anexo, Tabla 1).

Tabla 7. Porcentaje de semillas sanas y enfermas luego de los distintos tratamientos. (*) Incluye plántulas muertas y con síntomas.

Tratamiento	% Sanas	%Enfermas(*)
Semillas	80	20
S + adherente	90	10
S + T 6	80	20
S + T 6 + F	50	50
S + T 8	60	40
S + T 8 + F	10	90
S + T 21	40	60
S + T 21 + F	30	70
S + Fusarium	0	100

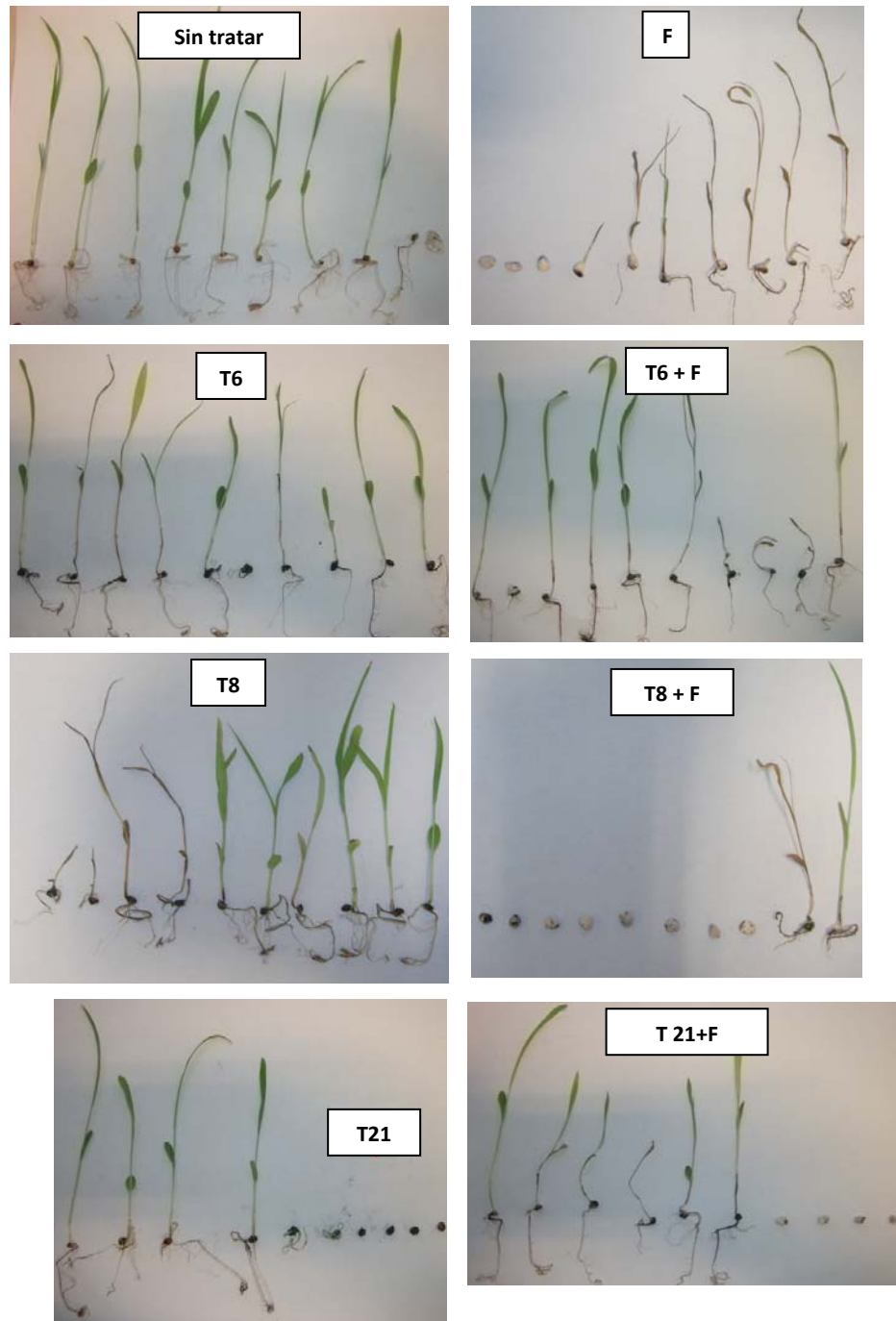


Figura 13. Plántulas de sorgo a los 20 días de aplicados los distintos tratamientos. **F:** *F. nygamai*, **T6:** cepa 6 de *Trichoderma*, **T8:** cepa 8 de *Trichoderma* y **T21:** cepa 21 de *Trichoderma*.

La Tabla 8 muestra los porcentajes de recuperación sobre medio de cultivo PDA tanto de *Trichoderma* spp. como de *F. nygamai* a partir de las plántulas. El mayor porcentaje de aislamiento de *Fusarium* fue a partir de tallo, mientras que el porcentaje de aislamientos de *Trichoderma* spp. fue mayor en raíz. En la Figura 14a se observan los segmentos del tallo de la plántula de sorgo colonizados por *F. nygamai* y en la Figura 14b se observa el desarrollo de *Trichoderma* sp. y en el extremo de uno de los segmentos el de *F. nygamai*.

Tabla 8. Porcentaje de recuperación de *Trichoderma* sp. (T) y *F. nygamai* (F) a partir de los distintos órganos de la planta.

Órgano	% Recuperación					
	Raíz		Tallo		Hoja	
Tratamiento	T	F	T	F	T	F
T6 + F	56	22	33	56	89	44
T8 + F	100	50	50	100	50	100
T21 + F	67	50	50	67	50	17
<i>F.nygamai</i>	0	50	0	83	0	50

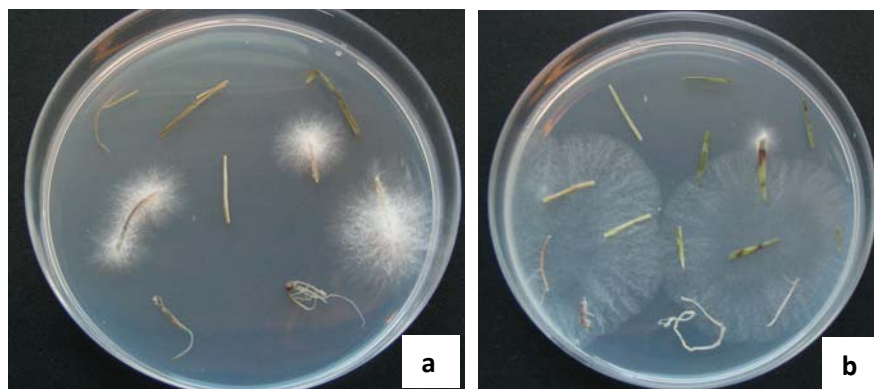


Figura 14. Segmentos de las plántulas de sorgo en medio de cultivo PDA. **a:** con *F. nygamai* (control) y **b:** con *Trichoderma* y *F. nygamai* (T 21 vs F 4,5)

DISCUSIÓN

La identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas coincidió con la realizada en base a la morfología, con excepción de dos cepas (6 y 48). En estos casos sería conveniente, para una correcta identificación, el estudio de más de un gen y la realización de árboles filogenéticos para establecer correctamente las relaciones entre los aislamientos.

Cuando se realizaron los cultivos duales todas las cepas de *Trichoderma* spp. mostraron capacidad para reducir la velocidad de crecimiento de las dos cepas de *F. nygamai*, siendo la cepa 21 de *T. atroviride* la más eficiente. La cepa 5 de *F. nygamai* mostró mayor sensibilidad frente a *Trichoderma* spp. que la cepa 4, por lo que resulta importante evaluar el efecto antagónico en más de una cepa del patógeno.

Las cepas de *Trichoderma* de la misma especie mostraron diferencias en cuanto a la eficiencia en la inhibición del crecimiento de *F. nygamai*. Lo mismo fue observado por Bettucci *et al.* (1988), en ese trabajo los autores evaluaron el efecto antagónico de varias especies de *Trichoderma* sobre hongos de la podredumbre de madera. Asimismo Dennis & Webster (1971a) en un estudio sobre propiedades antagonistas de *Trichoderma* spp. encontraron que diferentes cepas de una misma especie presentaban distinto efecto antagónico. Por lo que es notoriamente importante evaluar varias cepas a fin de seleccionar aquella que presente el mejor potencial como agente de control biológico. Además las cepas de *Trichoderma* spp. mostraron un gradiente de actividad inhibitoria: desde la reducción parcial del crecimiento hasta la capacidad de sobrecrecimiento y esporulación sobre el micelio del fitopatógeno.

En la mayoría de los casos que hubo sobrecrecimiento se aisló únicamente *Trichoderma* spp. a partir del frente de crecimiento de *F. nygamai*, esto podría deberse a la capacidad micoparasítica de *Trichoderma* spp. Esta capacidad de *Trichoderma* spp. fue demostrada frente a otros patógenos. Lupo *et al.* (2002) encontraron que *T. harzianum* y *T. konigii* mostraban la habilidad de sobrecrecer a *Sclerotium rolsii* y en numerosos trabajos se demostró la capacidad micoparasítica de *Trichoderma* spp. sobre varios hongos (Harman *et al.*, 2004).

La función de numerosas clamidosporas en el micelio de *Trichoderma* spp. en la zona de interacción posiblemente se deba al estrés de la interacción.

En los enfrentamientos con las cepas de *T. atroviride* 8, 31, 38 y 40 y la cepa F5 de *F. nygamai*, si bien *T. atroviride* sobrecreció a *F. nygamai* se aislaron ambos hongos a partir de la zona de crecimiento de *F. nygamai*. Este hecho revela que ninguno de los hongos interactuantes fue capaz de inhibir completamente al otro.

En los casos que *Trichoderma* spp. rodeó la colonia de *F. nygamai* se aislaron ambos hongos a partir del frente de crecimiento de *F. nygamai*, indicando que el micelio de *Trichoderma* spp. creció de forma sumergida por debajo de la colonia de *F. nygamai*. En la zona de interacción las hifas de ambos hongos se encontraban entremezcladas y las de *F. nygamai* estaban vacuolizadas, este hecho también fue observado por Dubey *et al.* (2007) al estudiar la interacción entre especies de *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

En las cepas de *T. virens* que presentaron una inhibición mutua “dead lock” con *F. nygamai*, se aislaron ambos hongos de la zona de interacción y únicamente *Fusarium* de la zona correspondiente a la colonia de *F. nygamai* y se observó que los micelios no presentaban modificaciones. Esto probablemente se deba a la inhibición del crecimiento de ambos micelios mediada por metabolitos difusibles dado que ambos hongos no entraron en contacto. La intensidad de la interacción dependería de la cantidad de metabolitos producida. Lo mismo fue observado en el estudio sobre interacciones interespecíficas de hongos asociados a podredumbre de madera realizado por Bettucci & Silva, 1992.

Los metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. produjeron una débil reducción del crecimiento de ambas cepas de *F. nygamai*, siendo la cepa 21 de *T. atroviride* la que mostró mayor actividad. Estos metabolitos son importantes en el ambiente del suelo por su actividad fungistática (Watson & Ford, 1972)

El crecimiento de la cepa 5 de *F. nygamai* frente a la cepa 48 de *T. asperellum* y 51 de *T. atroviride* fue mayor o igual al control. Denis & Webster (1971b) observaron una gran

variabilidad en la capacidad de producción de metabolitos volátiles entre cepas del género *Trichoderma*, por lo que podría esperarse gran variación en el efecto de estos metabolitos sobre los organismos blanco. Otros autores (Camporota 1985; Papavizas & Davey, 1962) han observado que algunos hongos son tolerantes e inclusive se ven estimulados por algunos de los metabolitos volátiles también producidos por *Trichoderma* spp.

La cepa de *T. asperellum* (6) fue la única que protegió a las plántulas de la infección por *F. nygamai*. Cabe destacar que la cepa 21 de *T. atroviride* fue la más eficiente en los ensayos *in vitro* pero cuando los ensayos se realizaron sobre plántulas, afectó la sobrevivencia de las mismas. Lo cual impediría su utilización como agente de control biológico.

La recuperación sobre medio de cultivo PDA tanto de *Trichoderma* spp. como de *F. nygamai* a partir de las plántulas refleja la efectividad de la de inoculación. Esto indicaría que el paletizado con esporas puede ser una estrategia para el control de la enfermedad en cultivos.

La recuperación de *F. nygamai* de los segmentos de tallo y hoja de las plántulas fue menor cuando las semillas fueron tratadas con las cepas de *Trichoderma* 6 y 21. Esto concuerda con la capacidad de estas cepas como antagonistas de *F. nygamai*. El mayor porcentaje de aislamiento de *Fusarium* fue a partir de tallo, mientras que el porcentaje de aislamientos de *Trichoderma* spp. fue mayor en raíz. Efectivamente esos son los órganos naturales de colonización de ambos hongos.

Sería interesante probar más cepas de *Trichoderma* dada la baja eficiencia que se encontró con las cepas evaluadas y la gran variabilidad en el efecto antagónico que presentan las distintas cepas de *Trichoderma* spp.

BIBLIOGRAFÍA

Bettucci L., Lupo S. & Silva S. 1988. Control growth of wood-rotting fungi by non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 157-165.

Bettucci L. & Silva S. 1992. Interspecific interactions between Wood-Rotting fungi from old standing trees. *Cryptogamie, Mycol.* 13: 11-19.

Bittencourt G. & Reig N. 2009. La industria de biocombustibles en Uruguay: situación actual y perspectivas. Documento de trabajo. Departamento de Economía, Facultad de Ciencias Sociales, Universidad de la República, Uruguay. N°. 11/09.

Blansina E. & Symonds R. 2010. El sorgo se muestra como cultivo ideal para estos tiempos. *Agricultura. Asociación rural del Uruguay* 79: 48-50.

Burguess L. W. & Trimboli D. 2006. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. Nov. *Mycologia* 78: 223-229.

Calhoun J. & Park D. 1964. *Fusarium* diseases of cereals: infection of wheat plants, with particular reference to the effect of soil moisture and temperature on seedling infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47: 559-572.

Camporota P. 1985. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie* 5: 613-620.

Carreras N., Sánchez J. A. & Herrera A. 2012. *Trichoderma* sensing the environment for survival and dispersal. Review Microbiology 158: 3-16.

Castor L. L. & Frederiksen R. A. 1980. *Fusarium* and *Curvularia* grain molds in Texas. In: Sorghum Diseases: A world review. Proceedings of the International Workshop on Sorghum Diseases. (Williams R.J., Frederiksen R.A. & Mughogho L.K. Eds.) ICRISAT, Andhra Pradesh, India 93–102.

Dennis C. & Webster J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Brit. Mycol. Soc. 57: 25-39.

Dennis C. & Webster J. 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Trans. Brit. Mycol. Soc. 57: 41-48.

Dubey S. C., Suresh M. & Singh B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological Control 40: 118–127.

Dubin H. J. 1984. Reflections on foot rots of wheat in warmer, nontraditional wheat growing climates. In: Wheats for more tropical environments. (Villareal R. L. Ed.)Proc. Intern. Symp.. Mexico, D.F. 185-192.

Fernández C. & Garro O. 2004. Alcohol a partir de sorgo dulce. Sacarificación y fermentación. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Universidad del Noroeste, Argentina.

Friedl M. A. & Druzhinina I. S. 2012. The tribal dwelling in soil: taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species regulating the development of each other. *Microbiology* 158: 1-2.

Gams w. & Bissett J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 1. (Kubicek C. P. & Harman G. E. Eds.) Taylor & Francis. London, UK 3-34.

Glenn A. E. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 137: 213-240.

Harman G E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. & Lorito M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. Vol. 2. *Nature reviews. Microbiology* 43-56.

Hjeljord L. & Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 2. (Kubicek C. P. & Harman G. E. Eds.) Taylor & Francis. London, UK 131-151.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>

Jardine D. J. & Leslie J. F. 1992. Aggressiveness of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) isolates to grain sorghum under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 76: 897–900.

Jeschke N., Nelson P. E. & Marasas W. F. O. 1990. *Fusarium* species isolated from soil samples collected at different altitudes in the Transkei, southern Africa. *Mycologia* 82: 727-733.

Lee S. & Taylor J. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. and White T. J. Eds.) Academic Press, San Diego, California 282-287.

Leslie J. F. 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Can. J. Bot.* 73: S282–S291.

Leslie J. F., Doe F. J., Plattner R., Shackelford D. D. D. & Jonz J. 1992. Fumonisin B1 production and vegetative compatibility of strains from *Gibberella fujikuroi* mating population 'A' (*Fusarium moniliforme*). *Mycopathologia* 117: 37–45.

Leslie J. F. & Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Pub. Iowa 388.

Lupo S., Dupont J. & Bettucci L. 2002. Ecophysiology and saprophytic ability of *Trichoderma* spp. *Cryptogamie, Mycol.* 23: 71-80.

Mai W. F. 1987. Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Annu. Phytopathol.* 25: 317-338.

Maranville J. W. & Clegg M. D. 1984. Morphological and physiological factors associated with stalk strength. In: Sorghum Root and Stalk Rots: A Critical Review. Proceedings of the Consultative Group discussion on Research needs and Strategies for Control of Root and Stalk Rot Diseases. (Mughogho L.K. Ed.). ICRISAT, Bellagio, Italy/Patancheru, India 111–118.

Marasas W. F. O., Burgess L. W., Anelich R. Y, Lamprecht S. C. & van Schalkwyk D. J. 1988. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris In South African soils. South African Journal of Botany 54: 63-71.

Medraoui L., Ater M., Benlhabib O., Msikine D. & Filali-Maltouf A. 2007. Evaluation of genetic variability of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in northwestern Morocco by ISSR and RAPD markers. Comptes Rendus Biologies 330: 789–797.

Mukherjee P. K., Horwitz B. A. & Kennerley C. M. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma*- a genomic perspective. Microbiology 158: 35-45.

Nirenberg H. I. & O'Donnell K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90: 434–458.

Papavizas G. C. & Davey C. B. 1962. Activity of Rhizoctonia in soil as affected by carbon dioxide. Phytopathology. 52: 759-766.

Petrovic T., Walsh J. L., Burgess L. W., & Summerell B. A. 2009. *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Australasian Plant Pathology* 38: 373-379.

Rajeev K. S., Reeta R. S., Gincy M. M. & Ashok P. 2009. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy* 34: 421-424.

Reed J. E., Patridge J. E. & Nordquist P. T. 1983. Fungal colonization of stalks and roots of grain sorghum during the growing season. *Plant Dis.* 67: 417–420.

Reino J. L., Guerrero R. F., Hernández-Galán R. & Collado I. G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem* 7: 89–123.

Sangalang A. E., Burgess L. W., Backhouse D., Duff J. & Wurst M. 1995. Mycogeography of *Fusarium* species in soils from tropical, arid and Mediterranean regions of Australia. *Mycological Research* 99: 523-528.

Sivasithamparam K. & Ghisalberti E. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1. (Kubicek C. P. & Harman G. E. Eds.) Taylor & Francis. London, UK 139-191.

Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R. & Schuhmacher R. 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods* 81: 187-193.

Tesfaye T. T., Newton O., Christopher R. L., Larry C. & Mitchell R. T. 2010. Analysis of host plant resistance to multiple *Fusarium* species associated with stalk rot disease in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Field Crops Research* 118: 177–182.

Thomas M. D. & Buddenhagen I. W. 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia* 20: 882-887.

Trimboli D. S. & Burgess L. W. 1985. Fungi associated with basal stalk rot and root rot of dryland grain sorghum in New South Wales. *Plant Protection Quarterly* 1: 3-9.

Van Driesche R. G. & Bellows T. S. 1996. *Biological Control*. Chapman & Hall, New York 539.

Van Wyk P. S., Pauer G. D. C. & Marasas W. F. O. 1987. Geographic distribution and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat in the Orange Free State, South Africa. *Phytophylactica* 19: 271-274.

Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. & Valéro J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1-20.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L. & Lorito M. 2008a. *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L. & Lorito M. 2008b. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 80-86.

Watson A. G. & Ford E. J. 1972. Soil fungistasis. A reappraisal. *Annu. Phytopathol.* 10: 327-348.

White T. J., Burns T., Lee S. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J. Eds.). Academic Press, Inc.: New York 315-322.

Zummo N. 1984. *Fusarium* root and stalk disease complex. In: *Sorghum Root and Stalk Rots: A Critical Review. Proceedings of the Consultative group Discussion on Research needs and Strategies for Control of Sorghum Root and Stalk Rot Diseases*. (Mughogho L.K. Ed.). ICRISAT, Bellagio, Italy/Patancheru, India 25–29.

ANEXO

Medios de cultivo

Agar – agua

- 20 g. agar
- 1 l. agua destilada

Potatoe-dextrose-agar (PDA)

- 250 g. de papa blanca hervida
- 20 g. agar
- 20 g. dextrosa
- 1 l. agua destilada

Carnation Leaf Agar (CLA)

- 20 g. agar
- 1 l. agua

Se llenan cajas de Petri con medio agar-agua 2% y previo a la solidificación del medio se colocan 4 fragmentos de hoja de clavel por placa. Las hojas de clavel deben previamente ser deshidratadas en estufa a 60 °C durante 1 hora y desinfectadas superficialmente: 2 minutos en etanol 70%, 5 minutos en hipoclorito de sodio 1%, 2 enjuagues con agua destilada estéril y secado en papel de filtro estéril.

Test de Fisher

Tabla 1. Comparación de los tratamientos con *F. nygamai* y *Trichoderma* spp. en semillas mediante Test Fisher.

Tratamiento	Semillas	S + ad	S + T 6	S + T 6 + F	S + T 8	S + T 8 + F	S + T 21	S + T 21 + F	S + F
Semillas	-	0.395	0.418	0.175	0.314	0.003	0.085	0.035	0
S + ad		-	0.5	0.07	0.152	0.001	0.029	0.01	0
S + T 6			-	0.175	0.314	0.003	0.085	0.035	0
S + T 6 + F				-	0.315	0.07	0.5	0.325	0.016
S + T 8					-	0.029	0.328	0.185	0.005
S + T 8 + F						-	0.135	0.248	0.5
S + T 21							-	0.5	0.043
S + T 21 + F								-	0.105
S + <i>Fusarium</i>									-