

DIVERSIDAD DEL HONGO *Trichoderma* spp. EN PLANTACIONES DE MAÍZ DE VENEZUELA

DOMENICO PAVONE MANISCALCO y BLAS DORTA

RESUMEN

La enfermedad del maíz conocida como 'mancha bandeada', producida por *Rhizoctonia solani*, es causante de graves daños en este cultivo, siendo el uso de *Trichoderma* spp. una de las estrategias para controlarlo. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la diversidad de especies de *Trichoderma* en Venezuela dirigidos a conocer su distribución así como a la creación de bancos de cepas para ser usadas en biocontrol. El presente trabajo contempla el estudio de la diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz en Venezuela. A partir de muestras de suelo colectadas en campos de maíz en los estados Anzoátegui, Aragua, Apure, Barinas, Bolívar, Guárico, Monagas, Portuguesa y Yaracuy. Se aislaron cepas de *Trichoderma*

spp. y se obtuvieron sus respectivos cultivos monospóricos. A partir de estos cultivos se realizó la identificación de especies mediante el análisis de las secuencias de los espaciadores transcritos internos del DNA ribosomal (ITS1 e ITS2) y el gen del factor de elongación de la traducción 1a (tef1). Para ello se utilizaron los programas TrichOKEY, TrichoMARK y TrichoBLAST (www.isth.info). Se encontraron nueve especies distintas en 176 aislados totales: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. pleurotum*, *T. reesei*, *T. spirale* y *T. virens*, siendo *T. harzianum* la especie más abundante. El hallazgo y estudio de estas cepas podría generar en el mediano plazo nuevos productos biotecnológicos.

El género *Trichoderma* reúne gran cantidad de especies encontradas en casi todos los tipos de suelos y en materia orgánica en descomposición, especialmente madera y hojarasca, las cuales poseen una gran importancia desde el punto de vista económico ya que son capaces de producir enzimas de interés industrial (Kubicek *et al.*, 1996) y sustancias con actividad antimicrobiana (Vizcaino *et al.*, 2005), pueden ser utilizadas como agentes biocontroladores de enfermedades en plantas con variados mecanismos de acción (Harman, 2000; Kexiang *et al.*, 2002; Benítez *et al.*, 2004) e incluso han sido reportadas como patógenos oportunistas en humanos inmunosuprimidos (Druzhinina y Kubicek, 2005), siendo la especie más común en estos casos *Trichoderma longibrachiatum* (Trabelsi *et al.*, 2010). Para un aprovechamiento óptimo de todas estas potencialidades se deben

hacer estudios de diversidad para obtener y preservar cepas que poseen características deseables. Este proceso implica no sólo la búsqueda de nuevas cepas, sino también el estudio detallado de las mismas para comprobar su potencialidad biotecnológica, siendo de suma importancia la correcta identificación de cada aislado. A pesar de que la caracterización morfológica ha sido el método más utilizado para identificar especies de *Trichoderma* (Druzhinina y Kopchinskiy, 2004), ésta es muy propensa a errores, con la consecuencia de que alrededor del 50% de los aislados depositados en colecciones están mal identificados (Druzhinina y Kubicek, 2005), siendo las herramientas moleculares las más confiables en la identificación de las especies de *Trichoderma*. Dada la gran importancia económica que posee este género por sus múltiples aplicaciones biotecnológicas, resulta de interés estudiar su diversidad en el país

con base en identificaciones confiables. Es así como este trabajo estuvo enfocado a la obtención de aislados de *Trichoderma* provenientes de campos de maíz de Venezuela y a su posterior identificación molecular, a los efectos de construir un banco de cepas autóctonas.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras de suelo

Se tomaron muestras de suelo en cultivos de maíz ubicados en los estados Anzoátegui, Aragua, Apure, Barinas, Bolívar, Guárico, Monagas, Portuguesa y Yaracuy. La toma de muestras se realizó con una pala de jardinería esterilizada con etanol 70%, recolectando el material edáfico desde la superficie hasta ~15cm de profundidad, incluyendo la hojarasca y parte de la rizósfera de las

PALABRAS CLAVE / *Hypocrea* / ITS / Maíz / *tef1* / *Trichoderma* spp. / Venezuela /

Recibido: 01/05/2013. Modificado: 08/12/2014. Aceptado: 10/12/2014.

Domenico Pavone Maniscalco. Licenciado en Biología, Magister en Agronomía y Doctor en Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor, Universidad de Carabobo, Venezuela. e-mail: dfpavone@gmail.com

Blas Dorta. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Profesor, UCV, Venezuela. Dirección: Laboratorio de Procesos Fermentativos, Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV, Venezuela. e-mail: bdorta@gmail.com

plantas de maíz. Las muestras, de ~500g, fueron almacenadas separadamente en bolsas de polietileno estériles y llevadas al laboratorio bajo refrigeración, hasta su procesamiento. En ningún caso el tiempo entre la toma de la muestra y el procesamiento de la misma fue mayor a tres días.

Aislamiento fúngico

Cada muestra de suelo fue resuspendida en agua destilada estéril (~50g/100ml) utilizando fiolas de 500ml. Las preparaciones fueron agitadas durante 10min en un agitador orbital modelo Rotabit de la marca PSelecta. De cada suspensión se tomó una alícuota de 1ml, la cual fue diluida (1/10 y 1/100). Se sembraron por rastrilleo alícuotas de 0,1ml de estas diluciones en placas de Petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA; Hi-Media) suplementado con 1mg·ml⁻¹ de amoxicilina y de cloramfenicol para evitar la proliferación de bacterias. Las placas fueron incubadas a 25 ±2°C bajo luz fluorescente continua durante siete días. Los aislados obtenidos fueron purificados mediante siembra por agotamiento en el mismo medio de cultivo. Los criterios de selección de los aislados fueron: colonias con crecimiento rápido, blancas o verdes (Druzhinina y Kopchinskiy, 2004).

Cultivos monospóricos

A partir de colonias purificadas y esporuladas de cada uno de los aislados obtenidos, utilizando un asa de platino se transfirieron pequeñas cantidades de esporas a tubos de ensayo conteniendo 10ml de agua destilada estéril, con el objeto de obtener suspensiones diluidas. Cada suspensión fue volcada en una placa de Petri conteniendo agar agua (AA) al 1,8%, e inmediatamente todo el líquido fue descartado inclinando la placa. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 18-20h bajo luz fluorescente continua. Bajo un microscopio estereoscópico (20×) se seccionaron de cada placa trozos de agar conteniendo en su superficie una única espora germinada, siendo el criterio de germinación empleado la presencia de un tubo germinal cuya longitud era el doble del tamaño de la espora. Cada trozo de agar fue colocado en el centro de una nueva placa de Petri conteniendo medio PDA. Estas placas fueron incubadas bajo las mismas condiciones durante siete días.

Identificación de los aislados

La identificación morfológica preliminar de los aislados, a nivel de género, se realizó mediante la observación al microscopio óptico de estructuras

características de *Trichoderma* spp. (conidióforos, esporas, fiálides, etc.). La identificación molecular se llevó a cabo mediante el análisis de las secuencias de los espaciadores transcritos internos 1 y 2 del ADN ribosomal (ADNr) y parte del gen del factor de elongación de la traducción 1α (*tefl*). Para ello se utilizó los programas TrichoKEY v. 2.0, TrichoMARK y TrichoBLAST (www.isth.info).

Extracción de ADN

A partir de los cultivos monospóricos esporulados se inocularon frascos conteniendo 20ml de caldo papa dextrosa, preparado a partir de una infusión de papa (200g de papa en 1 l de agua destilada, hervida por 10min) y suplementado con 1% dextrosa. Las preparaciones fueron incubadas a 25 ±2°C durante 72h empleando un agitador orbital modelo Rotabit (PSelecta) a 80rpm. El micelio obtenido en cada caso fue cosechado por filtración utilizando filtros Whatman N° 1 y se eliminó el exceso de líquido con la ayuda de servilletas estériles. La extracción del ADN genómico se realizó utilizando la metodología descrita por Aljanabi y Martínez (1997). El micelio fue homogeneizado en 400µl de buffer de extracción (Tris-HCl 10mM; NaCl 0,4M; EDTA 20mM; pH 8,0) en un tubo Eppendorf de 1,5ml de capacidad. Seguidamente fueron agregados 40µl de SDS 20% y 8µl de 20mg·ml⁻¹ Proteinasa K. Las preparaciones fueron incubadas durante 1h a 60°C, y posteriormente se agregó 300µl de NaCl 6M. Cada tubo fue agitado en vortex a máxima velocidad durante 30s y centrifugado a 10000rpm durante 20min. Se transfirieron 700µl del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf al que se agregó igual volumen de isopropanol puro frío. La preparación se agitó suavemente por inversión y se incubó a -20°C durante 1h. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 10000rpm durante 20min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con etanol 70%. El precipitado fue secado y luego resuspendido en 50µl de agua ultrapura estéril y mantenido a -20°C.

Amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr y *tefl*

El ADN extraído de cada aislado monospórico fue sometido a reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando el kit Go Taq (Promega), para amplificar las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr y *tefl*. En cada reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25µl de la mezcla de reacción, conteniendo: 2,5µl de buffer; 1,5µl de MgCl₂ 25mM; 1,5µl de

dNTP 10mM; 0,75µl de iniciador ITS1: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3' a 0,2mM; 0,75µl de iniciador ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' a 0,2mM (White *et al.*, 1990) para los genes ribosomales; y 0,5µl Taq DNA polimerasa a 5U/µl en 12,5µl de agua ultrapura estéril. En el caso del gen *tefl*, se procedió con el mismo protocolo, pero utilizando los iniciadores: EF1-728F 5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3' y Tef1-Llevrev 5'-AACTGTCAGGCAATGTGG-3' (Druzhinina, 2009). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Biorad® modelo Icycler, bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5min, 45 ciclos a 94°C por 1min, 55°C por 1min, y 72°C por 1min; finalmente se realizó una extensión a 72°C por 10min, para los genes ribosomales. El protocolo para PCR de *tefl* fue 94°C por 1min, 33 ciclos a 94°C por 1min, 59°C por 1min, y 74°C por 55s; finalmente se realizó una extensión a 72°C por 7min. Las amplificaciones fueron verificadas con una electroforesis en gel de agarosa 1%. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit AxyPrep PCR Clean-Up (Axygen Biosciences).

Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Para la PCR de secuenciación se preparó una mezcla final de 10µl con 20ng del templado y 10pmoles del iniciador ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3') en el caso de los genes ribosomales y de EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') para *tefl*. Posteriormente se agregaron 4µl de mezcla de reacción (BygDye® Terminator 3.1; Applied Biosystems) con solución buffer y una mezcla de ddNTPs y dNTPs, completándose el volumen con agua de grado biología molecular. Las muestras así preparadas fueron sometidas a 25 ciclos de PCR (98°C durante 2min; 59°C durante 1min y 60°C durante 4min). Finalmente, el ADN purificado y eluido con formamida fue procesado en un secuenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems).

Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr y *tefl*, éstas fueron analizadas comparándolas con las bases de datos específica para el género *Trichoderma* TrichoKEY versión 2.0 (Druzhinina *et al.*, 2005), TrichoMARK

y TrichoBLAST (Kopchinskiy *et al.*, 2005), disponibles en línea (www.isth.info).

Resultados y Discusión

Obtención e identificación de aislados de *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron más de 300 aislados fúngicos, cuyo análisis preliminar basado en la morfología de las colonias desarrolladas en medio PDA indicaban que podían tratarse de *Trichoderma* spp. Estos aislados fueron observados al microscopio óptico para verificar las estructuras típicas de *Trichoderma* con valor taxonómico, determinándose que sólo 216 pertenecían a este género. A partir de estos aislados se obtuvieron los respectivos cultivos monospóricos, paso fundamental para garantizar la identificación confiable de cada uno.

Debido a la abundante homoplasia en los caracteres fenéticos en

Trichoderma spp, resulta imposible discriminar entre especies solamente con base en la morfología (ISTH, 2012). Esta homoplasia también es la razón por la que el número de especies basadas en características morfológicas es significativamente menor al número de especies filogenéticas reconocidas por secuencias de ADN (Druzhinina *et al.*, 2006). Para la identificación molecular de *Trichoderma* spp. se realizó el análisis de las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2, utilizando el Programa TrichOKEY (Druzhinina *et al.*, 2006). Si bien la mayoría de las especies de este género pueden ser identificadas solo con esta información, se da el caso de algunas especies muy relacionadas, en las que el polimorfismo de las regiones ITS no es suficiente para diferenciarlas entre sí. En estas circunstancias la identificación puede conducir a varias opciones de especies para el mismo aislado, tal como lo indica en el análisis de ITS presentado en la Tabla I. Atendiendo a esta

limitación, se decidió complementar el estudio mediante la amplificación de parte del gen del factor de elongación de la traducción 1a (*tef1*). El análisis de las secuencias del gen *tef1* se realizó mediante la aplicación TrichoBLAST, la cual es una base de datos pública soportada a través del diagnóstico de sus secuencias y el uso de herramientas que buscan similitud. Esta base de datos abarca las 88 especies del género caracterizadas genéticamente y contiene un compendio de secuencias basadas en cinco marcadores utilizados con mayor frecuencia a nivel filogenético, entre los que están ITS1 e ITS2, *tef1* (intrón grande y corto). TrichoBLAST posee la ventaja que permite utilizar varios *loci*, lo cual detecta el fragmento correcto dentro de las secuencias que son utilizadas para la búsqueda de similitud (Kopchinskiy *et al.*, 2005).

Para utilizar el servicio anteriormente descrito, se debe realizar un diagnóstico preliminar de la secuencia con

TABLA I
IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS OBTENIDOS Y SU ORIGEN GEOGRÁFICO*

| Aislado | Origen | Identificación por ITS | Identificación por <i>tef1</i> |
|----------------------|--|---|--------------------------------|
| TV21, 22, 23, 26, 28 | Anzoátegui (1034328N/20 343755E) Río Guarú Municipio Anaco | <i>T. harzianum</i> | |
| TV25 | | <i>T. pleurotum</i> | |
| TV30 | Anzoátegui (0930506N/20 423123E) Suelo arenoso | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV32 | Anzoátegui (1080173N/20 273745E). Salistral, Vía Píritu-Onoto | <i>T. harzianum</i> | |
| TV33 | Anzoátegui (1071365N/20 268084E) Machaguas Vía Píritu-Onoto | - | |
| TV34 | | <i>T. harzianum</i> | |
| TV35, 36, 38, 39 | Anzoátegui (1068059N/20 264727E) Vía Píritu-Onoto | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV42 | Apure (0875118N/19 559509E) Afueras de Apurito, vía Achaguas | <i>T. harzianum</i> | |
| TV44 | Apure (0865066N/19 578392E) Buenavista, Fundo La Esperanza vía Apurito-Achaguas | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV45 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV47 | Apure (0860577N/19 607677E) Vía Achaguas-San Fernando, después de Morrocoy | <i>T. harzianum</i> | |
| TV48, 49, 50 | | <i>T. harzianum</i> | |
| TV52 | Apure (0860139N/19 625293E) Vía Achaguas-San Fernando | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV55 | Apure (0863306N/19 637754E) Vía Achaguas-San Fernando | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV58, 62, 63 | | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV60, 61 | Apure (0853620N/19 660844E) Vía San Juan de Payara, Yacaguama, Municipio Biruaca | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV59 | | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> | <i>T. koningiopsis</i> |
| TV64 | Apure (0852690N/19 659245E) Vía San Juan de Payara, Yacaguama, Municipio Biruaca | - | |
| TV65 | | - | |
| TV66, 67, 70, 71 | | <i>T. harzianum</i> | |
| TV68 | Apure (0851822N/19 658283E) Yacaguama | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV72, 74, 75, 73, 80 | | <i>T. harzianum</i> | |
| TV76, 77 | Apure (0860801N/19 666839E) Vía San Juan de Payara, Capote | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV79 | | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |

Continúa en página siguiente.

| Aislado | Origen | Identificación por ITS | Identificación por <i>tefl</i> |
|---------------------------------------|--|---|--------------------------------|
| TV81 | | <i>T. virens</i> | |
| TV82 | Bolívar (09305486N/20 476392E) Autopista Ciudad Bolívar-Puerto Ordaz | No identificada | <i>T. koningiopsis</i> |
| TV83 | | - | |
| TV84 | Bolívar (0871836N/20 592551E) Vía Guasipati, después del pueblo Las Muera | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum</i> | <i>T. koningiopsis</i> |
| TV85 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV86, 87, 88, 91 | | <i>T. harzianum</i> | |
| TV89 | Bolívar (0873220N/20 586498E) Las Muera Vía Guasipati-Upata, Municipio Piar | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum, T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV90 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV92, 93 | Bolívar (0876278N/20 580049E) Santa María, Vía Guasipati-Upata, Municipio Piar | <i>T. harzianum</i> | |
| TV95, 96, 97, 98, 99, TV100 | Barinas (080620N/705448O) | <i>T. harzianum</i> | |
| TV101, 104 | | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum, T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV103, 115 | | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum</i> | <i>T. koningiopsis</i> |
| TV108, 109 | Barinas (08063N/705446O) | <i>T. harzianum</i> | |
| TV113 | | <i>T. spirale</i> | |
| TV116, 117 | Barinas (081836N/704393O) | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum, T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV118, 119, 121, 122, TV123, 124, 126 | | <i>T. virens</i> | |
| TV127 | Barinas (082333N/703661O) | <i>T. harzianum</i> | |
| TV129 | Barinas (0976213N/19 388915E) Veguitas, sector La Marqueseña | - | |
| TV130 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV134 | Barinas (0961607N/19 402254E) Después de Sabaneta, entrada a Curito | <i>T. harzianum</i> | |
| TV135 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV138 | Barinas (0949384N/19 412477E) Los Pajales a 30min de Puerto Nutrias | <i>T. harzianum</i> | |
| TV140 | Barinas (0942258N/19 418260E) Vía Puerto Nutrias | <i>T. harzianum</i> | |
| TV142 | Guárico (1000778N/20 203197E) Samanote, Municipio El Socorro | <i>T. harzianum</i> | |
| TV147 | Guárico (0999868N/20 206083E) La Atarraya, Municipio El Socorro | <i>T. harzianum</i> | |
| TV148 | | <i>T. virens</i> | |
| TV150 | | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum</i> | <i>T. koningiopsis</i> |
| TV151 | Guárico (0999332N/20 210248E) | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum, T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV152 | Guárico (0993891N/20 195357E) | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV153, 55, 56, 157, 58, TV163 | | <i>T. harzianum</i> | |
| TV159 | | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum</i> | <i>T. koningiopsis</i> |
| TV161 | Guárico (1017991N/20 196509E) Tucupido, Municipio Rivas | <i>T. harzianum</i> | |
| TV162 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV164 | Guárico (1000470N/20 203964E) La Atarraya, Municipio El Socorro | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV165 | | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum</i> | <i>T. koningiopsis</i> |
| TV167 | Guárico (0999329N/20 210255E) Pelicano | <i>T. atroviridae</i> | |
| TV168 | Guárico (0999332N/20 210248E) | <i>T. koningiopsis, T. ovalisporum, T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV169 | Guárico (1017991N/20 196509E) Tucupido, Municipio Rivas | <i>T. harzianum</i> | |
| TV171, 172 | Guárico (1016314N/19 670333E) Vía Calabozo-Dos Caminos | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV173, 174 | Guárico (1019201N/19 674556E) Vía Calabozo- Dos Caminos, Parcela El Machete, Sector Mataflaire | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV175 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV177, 178, 179 | Monagas (1038272N) El Blanquero, vía El Corocito | <i>T. harzianum</i> | |
| TV180, 181 | | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV182 | Monagas (1070437N/20 453493E) Vía Maturín-El Corozo, Furríal, La Candelaria | <i>T. harzianum</i> | |

Continúa en página siguiente.

| Aislado | Origen | Identificación por ITS | Identificación por <i>tefl</i> |
|-----------------------------|--|---|--------------------------------|
| TV187, 189 | Monagas (1070839N/20 441317E) Muri, Municipio Cedeño, | <i>T. harzianum</i> | |
| TV190 | Parcela La Guariqueña, vía Punta de Mata | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV192, 193 | Monagas (1079052N/20 427081E) Entrada Viento Fresco, | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV194 | Municipio Cedeño | | |
| TV194 | Monagas (1087571N/20 430250E) Vía San Félix, afueras de | <i>T. harzianum</i> | |
| TV197 | Caicara de Maturín | | |
| TV197 | Monagas (1087701N/20 429962E) Vía San Félix, afueras de | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV198 | Caicara de Maturín | <i>T. virens</i> | |
| TV199, 200, 201 | Monagas (1098115N/20 428302E) Vía San Félix, afuera de | <i>T. harzianum</i> | |
| TV202 | Caicara de Maturín, Guatatal | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV204 | Monagas (1118283N/20 421311E) San Antonio, vía | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV206 | Maturín-Cumaná | | |
| TV206 | Portuguesa (1070512N/19 492813E) Vía San Rafael de Onoto, | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV207 | Acarigua | | |
| TV207 | Portuguesa (1050416N/19 470521E) Autopista | <i>T. harzianum</i> | |
| TV208 | Acarigua-Guanare | <i>T. harzianum</i> | |
| TV210, 212 | Portuguesa (1030996N/19 484079E) Turén. | <i>T. harzianum</i> | |
| TV215 | Portuguesa (1035994N/19 457609E) Autopista Acarigua | <i>T. harzianum</i> | |
| TV217, 218, 219, 221 | Guanare | | |
| TV222, 223, 224, 225, TV226 | Portuguesa. Papelón, Ojo de agua, cerca de la acuicultura del | <i>T. reesei</i> | |
| TV227, 228 | INIA. | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV229 | Portuguesa. Las Mercedes, via Guanare-Guanarito. Sr. Pompilio. | <i>T. erineceum</i> | |
| TV233 | Portuguesa. Autopista Guanare-Acarigua, cerca de bomba PDV, | <i>T. harzianum</i> | |
| TV234, 238 | saliendo de Guanare, Compañía Calsa. | | |
| TV235, 236 | Portuguesa. Finca Los Manices, Carretera vieja | <i>T. virens</i> | |
| TV237 | Guanare-Ospino | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV239, 240, 243, 245 | Portuguesa. Finca Los Manices, Carretera vieja | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV241, TV244 | Guanare-Ospino | <i>T. harzianum</i> | |
| TV242 | Aragua. Sector Guayabita, Turmero | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV246, 248, 249, 250 | Aragua. Sector Guayabita, Turmero | <i>T. harzianum</i> | |
| TV247 | Aragua. Valle de Tucutunemo, Vía Principal | <i>T. virens</i> | |
| TV251, 251, 252, 253, TV254 | Aragua. Valle de Tucutunemo, Vía Principal Sra. Candelaria | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV255 | Aragua. Valle de Tucutunemo, Vía Principal Sra. Candelaria | <i>T. harzianum</i> | |
| TV256, 257, 258 | Aragua. Sur de Aragua, Vía San Francisco de Cara | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV260, 263 | Aragua. Sur de Aragua, Vía San Francisco de Cara | <i>T. harzianum</i> | |
| TV261, 262 | Yaracuy. Vía Taria | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV264, 270 | Yaracuy. Vía Taria | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV267 | Yaracuy. Vía Albarico | <i>T. harzianum</i> | |
| TV271 | Yaracuy. Vía Albarico | - | |
| TV275, 276 | Yaracuy. Vía San Pablo | <i>T. harzianum</i> | |
| TV277, 281, 282 | Yaracuy. Cerca de Chivacoa | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV283, 284 | Yaracuy. Cerca de Chivacoa | <i>T. harzianum</i> | |
| TV285 | Yaracuy. Vía Sabana de Parra | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV286 | Yaracuy. Vía Sabana de Parra | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV292 | Yaracuy. Entre Cambural y Yaritagua | <i>T. erinaceum</i> | |
| TV294, 296, 297 | Yaracuy. Entre Cambural y Yaritagua | <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. ovalisporum</i> , <i>T. asperellum</i> | <i>T. asperellum</i> |
| TV303, 305 | Yaracuy. Entre Cambural y Yaritagua | <i>T. harzianum</i> | |
| TV306 | Yaracuy. Entre Cambural y Yaritagua | <i>T. erinaceum</i> | |

* Los aislados fueron identificados con las letras TV (*Trichoderma* Venezuela) y un número que las diferencia.

*Tricho*MARK, el cual es un programa diseñado específicamente para la detección y recuperación de marcadores filogenéticos de secuencias problema. Ello permite realizar posteriormente la presentación individual de éstas en el programa *Tricho*BLAST para buscar similitudes. *Tricho*MARK es capaz de diagnosticar secuencias de genes de *Hypocrea/Trichoderma*, basado en secuencias de oligonucleótidos específicas para los géneros, tomando en cuenta tanto el extremo 5' como el extremo 3' del marcador (Druzhinina *et al.*, 2005) y recupera el área exacta de la región del marcador filogenético, omitiendo las secuencias flanqueantes.

Los alineamientos resultantes de un BLAST son una medida de similitud, pero la similitud no representa una medida de relación (de Queiroz, 1992; citado en Kopchinskiy *et al.*, 2005). Por lo tanto, al utilizar estos servicios de comparación de secuencias, se debe tomar en cuenta cuáles marcadores filogenéticos se están utilizando y si la base de datos contiene las secuencias respectivas para todas las especies conocidas. La Subcomisión Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea*, ha estudiado más de 1000 secuencias de ITS1 e ITS2, que representan todas las especies genéticamente conocidas de *Hypocrea/Trichoderma*, demostrando que estas regiones tienen alto valor diagnóstico (Kopchinskiy *et al.*, 2005). Bajo estas condiciones, la identificación de una especie es posible sólo donde se consiga una alineación perfecta entre dos secuencias. Si ello no ocurre es indicativo de la presencia de un nuevo alelo de una especie conocida, o de una especie nueva (Kopchinskiy *et al.*, 2005).

Como ya se ha mencionado, para identificar especies que no pueden ser discriminadas con base en las regiones ITS, se utilizan genes como *tefl*. Los intrones de *tefl* son muy particulares, ya que son muy raras las secuencias idénticas dada la alta variabilidad intraespecífica. Por ello, la Subcomisión para la Taxonomía de *Hypocrea/Trichoderma* ha probado si los alineamientos con el mayor *score* (medida de cuan buenos son los alineamientos de las secuencias), representan una identificación correcta, y se ha logrado probar esto en todas las muestras estudiadas (Kopchinskiy *et al.*, 2005). Por lo tanto, al obtener las secuencias de los intrones correspondientes a *tefl*, se puede considerar como la identificación correcta a la de mayor *score*, a pesar de no coincidir en un 100%.

Los programas *Tricho*MARK y *Tricho*BLAST, lograron identificar secuencias del intrón largo y

corto. Cabe destacar que el intrón largo es el marcador filogenético más informativo en *Hypocrea/Trichoderma* (Druzhinina, 2009). Una vez ubicados los marcadores filogenéticos con *Tricho*MARK, se hizo el análisis de similitud con *Tricho*BLAST. Los análisis realizados por *tefl* pudieron discriminar entre las distintas especies posibles que habían sido propuestas por ITS (Tabla I). Los aislados TV30, TV58, TV62, TV79, TV89, TV101, TV104, TV116, TV151, TV168, TV190, TV202, TV235, TV239, TV240, TV243, TV245, TV246, TV248, TV261, TV286 y TV294 fueron identificados con el análisis de ITS como *T. koningiopsis/T. ovalisporum/T. asperellum*, mientras que las secuencias *tefl*, determinaron que estos aislados pertenecen a *T. asperellum*. En el caso de los aislados TV84, TV103, TV115, TV150, TV159, TV165 y TV255 el análisis de ITS arrojó como resultado *T. koningiopsis/T. ovalisporum*, identificando las secuencias *tefl* a estos aislados como *T. koningiopsis*. La cepa TV82 no pudo ser identificada por ITS; sin embargo, el análisis del gen *tefl* la identificó como *T. koningiopsis*.

Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz de Venezuela.

Los aislados obtenidos en el presente trabajo son una representación de la diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz de Venezuela. En total se obtuvieron 176 aislados (Tabla I) pertenecientes a nueve especies distintas: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. pleurotum*, *T. reesei*, *T. spirale* y *T. virens*; obteniéndose una relación de especies distintas con respecto al total de aislados de 0,051.

Relaciones más altas de especies halladas sobre el número total de aislados obtenidos han sido reportadas: 0,15 para el sudeste de Asia (14 especies/96 aislados; Kubicek *et al.*, 2003); 0,096 (13/135) en China (Zhang *et al.*, 2005); 0,1 (19/182) en regiones neotropicales (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009); 0,38 en la rizósfera de *Coffea arabica* en bosques de tierras altas en Etiopía (Belayneh y Druzhinina; citado en Migheli *et al.*, 2009); 0,15 (6/38) en plantaciones de *Theobroma cacao* del Estado Carabobo, Venezuela (Rivas y Pavone, 2010); 0,12 (14/110) en Polonia (Blaszczuk *et al.*, 2011); y más recientemente 0,012 (23/1910) en China (Ry *et al.*, 2012) y 0,34 (22/65) en Manipur (Kamala *et al.*, 2013). La relativamente baja relación observada en el presente estudio pudiese estar relacionada con el manejo que se le da a estos campos en Venezuela, donde existen perturbaciones de suelo y vegetación

permanentes en cada ciclo de cosecha, con aplicaciones de varios tipos de plaguicidas, herbicidas, etc., lo que podría afectar negativamente la diversidad de *Trichoderma* spp.

La diversidad y proporción de especies de *Trichoderma* spp. encontrada se muestra en la Figura 1. *T. harzianum* es la especie más abundante con 45,95%; seguida de *T. erinaceum* con 22,97%; *T. koningiopsis* 15,54%; *T. virens* 8,11%; *T. asperellum* 4,73%; *T. pleurotum* 0,68%; *T. atroviride* 0,68%; *T. spirale* 0,68 y *T. reesei* 0,68%. La especie más abundante a escala general y por estado (Figura 2) fue *T. harzianum*, seguida por *T. erinaceum*, excepto en los Estados Barinas, Bolívar y Aragua, donde *T. virens* fue la segunda especie más abundante en los dos primeros y *T. koningiopsis*, en el último. Solo hubo alrededor de un 5% de especies no identificadas, ello básicamente por fallas en la secuenciación, como reacciones negativas o secuencias incompletas.

El conocimiento de la distribución de especies de *Trichoderma* está evolucionando constantemente en el contexto de los avances actuales en la resolución de la taxonomía del género, por lo que puede suponerse un mejor entendimiento de la biogeografía de *Trichoderma* al comprender mejor los complejos de especies agregadas (Hoyos-Carvajal y Bissett, 2011). La gran abundancia que posee *T. harzianum* ha sido reportada en otros trabajos (Kullning *et al.*, 2000; Kubicek *et al.*, 2003; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009; Rivas y Pavone, 2010; Blaszczuk *et al.*, 2011; Ry *et al.*, 2012; Kamala *et al.*, 2013). Se ha reportado una alta variabilidad morfológica y metabólica que puede explicar la amplia distribución de esta especie agregada en diferentes

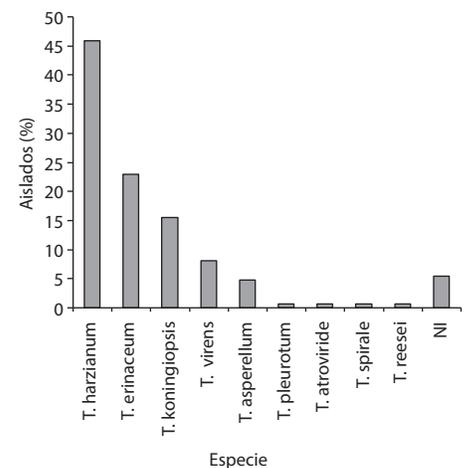


Figura 1. Distribución de la diversidad de especies de *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz en Venezuela. NI: no identificado

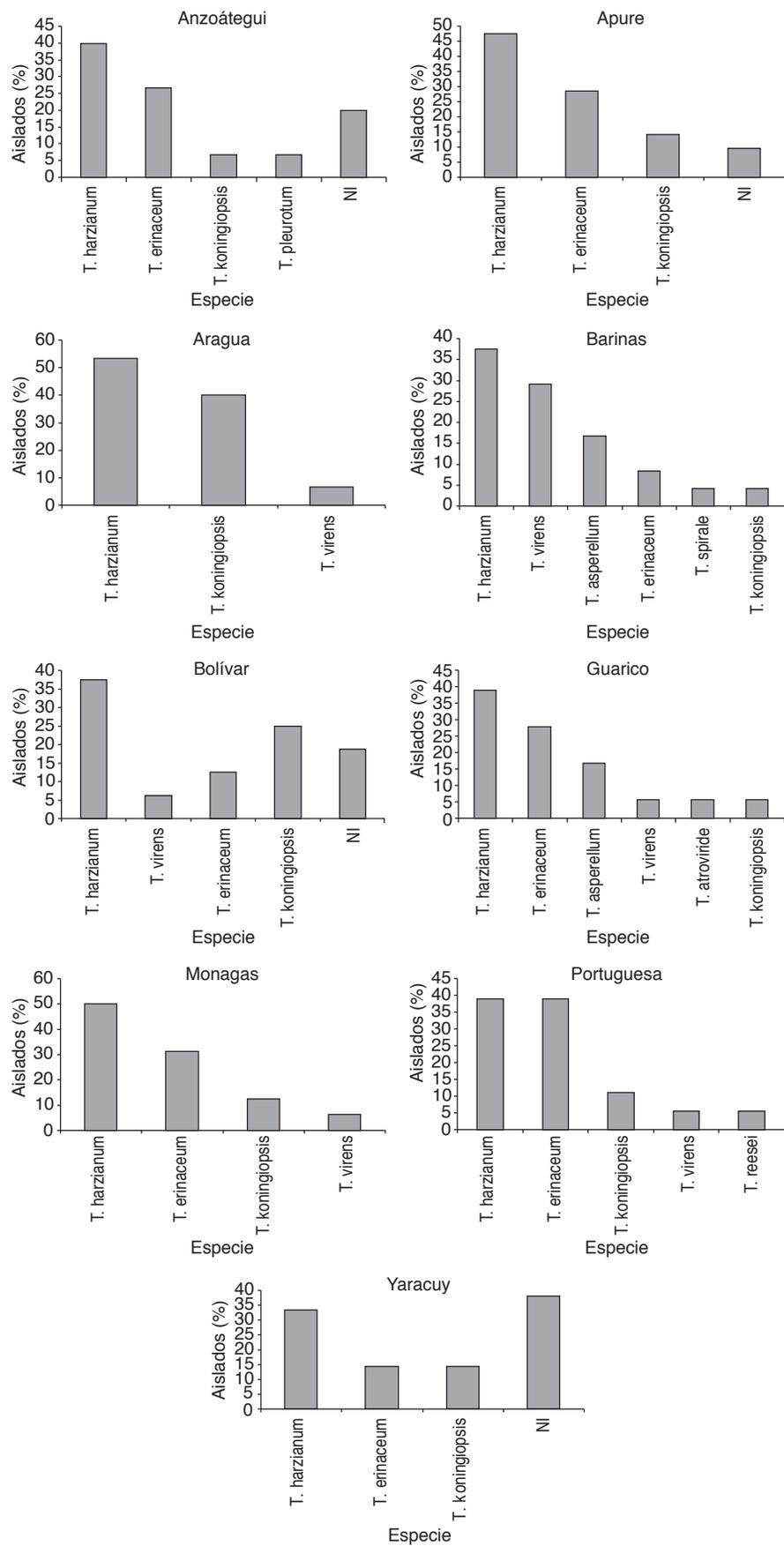


Figura 2. Distribución de la diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz por Estado. NI: no identificada.

hábitats (Kullning *et al.*, 2000; Kubicek *et al.*, 2003). De hecho, aunque el nombre de *T. harzianum* ha sido utilizado para agentes de biocontrol en el pasado, en la actualidad existe abundante evidencia de que varias especies genéticamente diversas son usadas como agentes de control biológico (Druzhinina y Kubicek, 2005).

Hoyos-Carvajal y Bissett (2011) citan los trabajos realizados por Jaklitsch (2009, 2011) acerca de la diversidad de *Trichoderma* en Europa como el estudio más completo sobre una región biogeográfica, y sugieren que la biodiversidad de *Hypocrea/Trichoderma* sobre el suelo excede a la existente en el suelo, especulando que la mayoría de las especies pueden ser necrotroficas sobre otros hongos que colonizan madera y corteza. Así, las generalizaciones acerca de la distribución de *Trichoderma* se han vuelto muy complicadas, siendo su ocurrencia determinada por componentes microclimáticos, disponibilidad de sustratos, asociaciones rizosféricas, química del suelo e interacciones ecológicas. Además, la introducción de especies invasivas, los agentes de control biológico y las perturbaciones agrícolas, pueden producir cambios en los patrones específicos de distribución (Hoyos-Carvajal y Bissett, 2011). Estas perturbaciones pudieran ser la causa de la baja diversidad de *Trichoderma* encontrada en este trabajo.

Aplicaciones biotecnológicas de los aislados de *Trichoderma* spp. obtenidos.

Además del conocimiento de la diversidad de *Trichoderma*, este estudio es de interés por las aplicaciones biotecnológicas que puedan tener las cepas colectadas para la producción de bienes y servicios, entre las cuales están el biocontrol de plagas (Sivan y Chet, 1993; Latorre *et al.*, 1997; Cotxarrera *et al.*, 2002; Prasad *et al.*, 2002; Yedidia *et al.*, 2003; Howell y Puckhaber, 2005; Santamarina y Roselló, 2006; Trillas *et al.*, 2006; Tondje *et al.* 2007; Sahebani y Hadavi, 2008; Jaimes *et al.*, 2009; Joseph *et al.*, 2009; The Regents of the University of California, 2011; Wijesinghe *et al.*, 2011); el control de malezas (Hutchinson, 1999; Héaux *et al.*, 2005); la bioremediación de compuestos fenólicos (Chakroun *et al.*, 2010); producción de exopolisacáridos con actividad antiinflamatoria (Hoon y Yun, 2005); inducción de resistencia a patógenos en plantas (Perazzolli *et al.*, 2008; Perazzolli *et al.*, 2011); producción de enzimas celulasas (Kuhls *et al.*, 1996; Da Silva *et al.*, 2011) y el aumento de la biomasa en plantas (Harman, 2000; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Tortolero y Pavone, 2012). Algunas

cepas han sido identificadas como patógenos en cultivos de champiñón (Komon-Zelazowska *et al.*, 2007). Algunos de los aislados obtenidos en el presente trabajo están siendo estudiados para la obtención de productos biotecnológicos tales como celulasas, amilasas y agentes de control biológico de plagas.

Conclusiones y Recomendaciones

La diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz de Venezuela resultó ser baja en comparación con otros valores reportados en la literatura. Las especies encontradas fueron: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. pleurotum*, *T. reesei*, *T. spirale* y *T. virens*, siendo la más abundante *T. harzianum*.

Los estudios de diversidad de *Trichoderma* en Venezuela son escasos, habiendo poca información que permita comparar los resultados obtenidos en este trabajo. Mayores esfuerzos en este sentido son necesarios, ya que esta información es fundamental para la conservación de la diversidad y el desarrollo biotecnológico del país.

Las aplicaciones biotecnológicas recomendadas para las cepas obtenidas en el presente trabajo comprenden: biocontrol de hongos fitopatógenos, resistencia sistémica inducida en plantas contra fitopatógenos, aumento de la biomasa en plantas, así como producción de antibióticos, polisacáridos con capacidad terapéutica y celulasas, bioremediación de compuestos fenólicos, entre otros. Sin embargo, a pesar de ser ésta un área poco atendida desde el punto de vista científico e industrial en Venezuela, el estudio de estas propiedades y la forma de obtener productos biotecnológicos a partir de éstos puede convertirse en un área económicamente competitiva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Christian Kubicek, Irina Druzhinina, Quirico Migheli, Virgilio Balmas y Monika Komon por su asesoría en la identificación de los aislados de *Trichoderma* y al CDCH-UC por los fondos otorgados (N° CDCH-AM-391-10).

REFERENCIAS

- Aljanabi S, Martínez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Ac. Res.* 25: 4692-4693.
- Benítez T, Rincón A, Limón M, Codón A (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7: 249-260.
- Błaszczak L, Popiel D, Chelkowski J, Koczyk G, Samuels G, Sobieralski K, Siwulski M (2011) Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *J. Appl. Genet.* 52: 233-243.
- Chakroun H, Mechichi T, Martínez M, Dhoub A, Sayadi S (2010) Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Proc. Biochem.* 45: 507-513.
- Contreras-Cornejo H, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1579-1592.
- Cotxarrera L, Trillas-Gay M, Steinberg C, Alabouvette C (2002) Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium wilt* of tomato. *Soil Biol. Biochem.* 34: 467-476.
- Da Silva P, Sánchez C, Ribeiro M, Freitas S, Da Cruz J (2011) Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technol.* 107: 517-521.
- Druzhinina I (2009) PCR protocols for amplification of *Trichoderma* phylogenetic markers. www.isth.info/methods/method.php?methodid=10 (Cons. 11/05/2011).
- Druzhinina I, Kopchinskiy A (2004) *Trichoderma* Morphology. International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. www.isth.info/morphology.php. (Cons. 03/11/2005).
- Druzhinina I, Kubicek C (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6B: 100-112.
- Druzhinina I, Kopchinskiy A, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek C (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* 42: 813-828.
- Druzhinina I, Kopchinskiy A, Kubicek C (2006) The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Harman G (2000) Myths and dogmas of Biocontrol, Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84: 377-393.
- Héraux F, Hallett S, Weller S (2005) Combining *Trichoderma virens*-inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables. *Biol. Control* 34: 21-26.
- Hoon J, Yun J (2005) Structural and molecular characterization of extracellular polysaccharides produced by a new fungal strain, *Trichoderma erinaceum* DG-312. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 1250-1257.
- Howell C, Puckhaber L, (2005). A study of the characteristics of "P" and "Q" strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedlings diseases. *Biol. Control* 33: 217-222.
- Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J (2009) Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropics regions. *Fungal Genet. Biol.* 46: 615-631.
- Hoyos-Carvajal L, Bissett J (2011) Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. En Grillo O, Venora G (Eds.) *The Dynamical Processes of Biodiversity-Case of Studies of Evolution and Spatial Distribution*. Intech. 366 pp.
- Hutchinson C (1999) *Trichoderma virens*-inoculated composted chicken manure for biological weed control. *Biol. Control* 16: 217-222.
- ISTH (2012) *How to Identify Trichoderma in a Nut Shell*. www.isth.info/content.php?page_id=94 (Cons. 06/01/2012).
- Jaimes Y, Moreno C, Cortes A (2009) Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* TH003. *Acta Biol. Col.* 3: 2-9.
- Joseph M, Issali A, Kébe I, Kouame B, Konan J, Allou K, Zakra N, Aké S (2009) Effects of climatic parameters on the expression of the black pod disease on *Theobroma cacao* in Cote d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.* 20: 1183-1193.
- Kamala T, Indira S, Thingnam G, Gopalrao B (2013) Genetic diversity and species pattern of *Trichoderma* and *Hypocrea* in Manipur using *in silico* analysis. *Bioinformation* 9: 106-111.
- Kexiang G, Xiaoguang L, Yonghong L, Tianbo Z, Shuliang W (2002) Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. viridae* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. *J. Phytopathol.* 150: 271-276.
- Komon-Zelazowska M, Bissett J, Zafari D, Hatvani L, Manczinger L, Woo S, Lorito M, Kredics L, Kubicek C, Druzhinina I (2007) Genetically Closely Related but Phenotypically Divergent *Trichoderma* Species Cause Green Mold Disease in Oyster Mushroom Farms Worldwide. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7415-7426.
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek C, Druzhinina I (2005) TrichoBLAST: A multi-locus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycol. Res.* 109: 657-660.
- Kubicek C, Bözlzbauer U, Kovacs W, Mach R, Kuhls K, Lieckfeldt E, Börner T, Sameuls G (1996) Cellulase formation by species of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and of *Hypocrea* spp. with anamorphs referable to *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Fungal Genet. Biol.* 20: 105-114.
- Kubicek C, Bissett J, Druzhinina I, Gradinger C, Szakacs G (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: A case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.* 38: 310-319.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels G, Kovacs W, Meyervii W, Petri O, Gams W, Börner T, Kubicek C (1996) Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 7755-7760.
- Kullning C, Szakacs G, Kubicek C (2000) Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol. Res.* 104: 1117-1125.
- Latorre B, Agosin E, San Martín R, Vázquez G (1997) Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against Botrytis bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protect.* 16: 209-214.
- Migheli Q, Balmas V, Zelazowska M, Scherm B, Fiori S, Kopchinskiy A, Kubicek C, Druzhinina I (2009) Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environ. Microbiol.* 11: 35-46.
- Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A, Elad Y, Pertot I (2008) Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biol. Control* 47: 228-234.

- Perazzolli M, Benedetta R, Bozza E, Pertot I (2011) *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biol. Control* 58: 74-82.
- Prasad R, Rangeshwaran R, Hegde S, Anuroop C (2002) Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. *Crop Protect.* 21: 293-297.
- Rivas M, Pavone D (2010) Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. *Interciencia* 35: 777-783.
- Ry S, Lui Z, Fu K, Fan L, Chen J (2012) *Trichoderma* biodiversity in China. *J. Appl. Genet.* 53: 343-354.
- Sahebani N, Hadavi N (2008) Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2016-2020.
- Santamarina M, Roselló J (2006) Influence of temperature and water activity on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. *Crop Protect.* 25: 1130-1134.
- Sivan A, Chet I (1993) Integrated control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with *Trichoderma harzianum* in combination with methyl bromide or soil solarization. *Crop Protect.* 12: 380-386.
- The Regents of the University of California (2011) *Trichoderma atroviride* v2.0. <http://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.home.html> (Cons. 29/11/2011).
- Tondje P, Roberts D, Bon M, Widmer T, Samuels G, Ismaiel A, Begoude A, Tchana T, Nyemb-Tshomb E, Ndoumbe-Nkeng M, Bateman R, Fontem D, Hebbat K (2007) Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol. Control* 43: 202-212.
- Tortolero J, Pavone D (2012) Efecto de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* y algunos parámetros fisiológicos en *Zea mays* L. bajo condiciones de vivero. *Fitopatol. Venez.* 25: 10-15.
- Trabelsi S, Hariga D, Khales S (2010) First case of *Trichoderma longibrachiatum* infection in a renal transplant recipient in Tunisia and review of the literature. *Tunisie Méd.* 88: 52-57.
- Trillas M, Casanova E, Cotxarrera L, Ordovás J, Borrero C, Avilés M (2006) Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol. Control* 39: 32-38.
- Vizcaíno J, Sanz L, Basilio A, Vicente F, Gutiérrez S, Hermosa M, Monte E (2005) Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycol. Res.* 109: 1397-1406.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. Londres, RU. pp. 315-322.
- Wijesinghe C, Wilson R, Samarasekara J, Wijesundera R (2011) Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Protect.* 30: 300-306.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I (2003) Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7343-7353.
- Zhang C, Druzhinina I, Kubicek C, Xu T (2005) *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a north to south distribution of species in east Asia. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 251-257.

DIVERSITY OF THE FUNGUS *Trichoderma* spp. ON CORN FIELDS IN VENEZUELA

Domenico Pavone Maniscalco and Blas Dorta

SUMMARY

The fungal infection of corn plants by *Rhizoctonia solani* is a major pest that is responsible for low yields of corn plantations. One of the strategies for the control of this disease is the use of *Trichoderma* spp. as a biocontroler of the fungus. However, in Venezuela there are few studies of the diversity and distribution of *Trichoderma* or aimed at the establishment of banks of strains to be used for biocontrol. The objective of this work is to study the diversity of *Trichoderma* spp. in corn plantations in Venezuela. Isolation of several strains of *Trichoderma* spp. from soil samples of corn fields of nine Venezuelan states (Anzoátegui, Aragua, Apure, Barinas, Bolívar, Guárico, Monagas, Portuguesa and Yaracuy) was carried out

and monosporic cultures of each strain were obtained. The specific identification of the species was achieved by analysis of the internal transcribed rDNA spacer (ITS 1 and 2) and the translated elongation factor (*tef1*) sequences with the TrichoKEY, TrichoMARK and TrichoBLAST (www.isth.info) programs. From 176 isolates, nine species were identified: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. pleurotum*, *T. reesei*, *T. spirale* and *T. virens*, the most abundant being *T. harzianum*. These identified species and/or strains of *Trichoderma* spp. isolated from Venezuelan corn fields can now be evaluated as biological controls on different plant diseases.

DIVERSIDADE DO FUNGO *Trichoderma* spp. EM PLANTAÇÕES DE MILHO NA VENEZUELA

Domenico Pavone Maniscalco e Blas Dorta

RESUMO

A enfermidade do milho conhecida como 'mancha-da-bainha', produzida por *Rhizoctonia solani*, é causante de graves danos neste cultivo, sendo o uso de *Trichoderma* spp. uma das estratégias para controlá-lo. No entanto, existem poucos estudos sobre a diversidade de espécies de *Trichoderma* na Venezuela dirigidos a conhecer sua distribuição assim como à criação de bancos de cepas para ser usadas em biocontrole. O presente trabalho contempla o estudo da diversidade de *Trichoderma* spp. em plantações de milho na Venezuela. A partir de amostras de solo recolhidas nos campos de milho nos estados Anzoátegui, Aragua, Apure, Barinas, Bolívar, Guárico, Monagas, Portuguesa e Yaracuy, se isolaram cepas de *Trichoderma* spp. e se obtiveram

seus respectivos cultivos monospóricos. A partir destes cultivos se realizou a identificação de espécies mediante a análise das sequências dos espaçadores transcritos internos do DNA ribossomal (ITS1 e ITS2) e o gene do fator de alongação da tradução *1a (tef1)*. Para isto se utilizaram os programas TrichoKEY, TrichoMARK e TrichoBLAST (www.isth.info). Em um total de 176 isolados se encontraram nove espécies distintas: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. pleurotum*, *T. reesei*, *T. spirale* e *T. virens*, sendo *T. harzianum* a espécie mais abundante. A descoberta e estudo destas cepas poderiam gerar no médio prazo novos produtos biotecnológicos.