

Antagonismo *in vitro* de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales

Juan Asdrúbal Flores-Pacheco¹

RESUMEN

Los hongos endófitos, son aquellos que colonizan los tejidos vivos internos de las plantas sin causar efecto significativo en el hospedante. Estos hongos, al ejercer en ocasiones, antagonismo frente a patógenos fúngicos a la planta hospedante, pueden ser una solución para el control de muchas de las enfermedades forestales causadas por otros hongos. Este campo ha sido poco evaluado en pruebas *in vitro* y en pruebas *in vivo*. Se utilizaron cinco hongos endófitos y seis hongos patógenos que se enfrentaron en medio de cultivo generalista Papa + Dextrosa + Agar (PDA) en condiciones de oscuridad a 25° C por siete días. Durante este periodo se midieron los ejes centrales y laterales de la colonia. Con estos datos se obtuvo el coeficiente de forma del hongo y se calculó el crecimiento directo, el coeficiente de forma del hongo patógeno frente al endófito respectivo, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial y el porcentaje de inhibición de la zona de crecimiento. Se establecieron placas únicamente con el hongo patógeno a manera de grupo control. Los datos se analizaron con un Análisis de Varianza y para los casos estadísticamente significativos se aplicó la prueba de Diferencia Mínima Significativa. Los resultados muestran que los endófitos que tienen una mayor inhibición frente a los hongos patógenos. De esta manera se demuestra un efecto controlador de al menos un endófito sobre uno o más patógenos. Esto sugiere su posible utilidad como Agente de Control Biológico (ACB) ante enfermedades forestales. La reducción del crecimiento de los hongos patógenos ante la presencia de los endófitos, puede deberse a los mecanismos de acción de éstos (competencia y secreción de micotoxinas) frente al patógeno. Se deben realizar ensayos *in vivo* donde los endófitos se inoculen de acuerdo con su ecología y con un tiempo adecuado para la colonización de la planta.

Palabras claves: control biológico, hongos patógenos, sanidad vegetal, antagonismo *in vitro*.

Recibido: 20 de junio de 2017

Aceptado: 27 de noviembre de 2017

¹ Docente Investigador en la Facultad de Recursos Naturales y Medio Ambiente, Bluefields Indian & Caribbean University- BICU, Apartado postal N° 88, Avenida Universitaria, Bluefields, Nicaragua. Doctor en Conservación y Sistemas Forestales Sostenibles / Patología Forestal y Fisiología Vegetal. Correo electrónico: juan18asdrubal@gmail.com; japachecobicu@gmail.com

***In vitro* antagonism of endophytic fungi for use in the biocontrol of forest diseases**

ABSTRACT

Endophytic fungi are those that colonize the internal living tissues of plants without causing significant effect on the host. These fungi, when exerting at times, antagonism against fungal pathogens to the host plant, can be a solution for controlling many of the forest diseases caused by other fungi. This field has been little evaluated in *in vitro* tests and in live tests. Five endophytic fungi and six pathogenic fungi were used, which were exposed in a generalized potato + Dextrose + Agar (PDA) culture medium under dark conditions at 25°C for seven days. During this period the central and lateral axes of the colony were measured. With these data, the shape coefficient of the fungus was obtained and the direct growth was calculated, the shape coefficient of the pathogenic fungus against the respective endophyte, the percentage of inhibition of radial growth and the percentage of inhibition of the growth zone. Plaques were established only with the pathogenic fungus as a control group. The data were analyzed with an Analysis of Variance and for the statistically significant cases the Significant Minimum Difference test was applied. The results show that endophytes have a greater inhibition against pathogenic fungi. In this way a controlling effect of at least one endophyte on one or more pathogens is demonstrated. This suggests its possible usefulness as a Biological Control Agent (CBA) in forest diseases. The reduction of the growth of pathogenic fungi in the presence of endophytes may be due to their mechanisms of action (competition and secretion of mycotoxins) against the pathogen. *In vivo* tests should be carried out where the endophytes are inoculated according to their ecology and with an adequate time for the colonization of the plant.

Keywords: biological control, pathogenic fungi, plant health, *in vitro* antagonism.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos, se definen como aquellos que colonizan los tejidos vivos internos de las plantas sin causar un efecto significativo en el hospedante (Botella and Diez, 2011). A pesar de su escasa implantación como Agentes de Control Biológico (ACB) en campo, han sido ya utilizados con éxito para la protección de las plantas (Arnold et al., 2003). De este modo, una de las líneas de trabajo más importantes en el ámbito de la protección forestal frente a enfermedades consiste en el estudio de la micoflora interna de las especies vegetales.

En la actualidad, no se han encontrado medidas de control basadas en endófitos con aplicación en viveros y plantaciones forestales. Un enfoque de gestión integrada que permita la combinación de estrategias ecosostenibles, ambientalmente inocuos y económicamente rentables, que permitan reducir el impacto económico y ecológico de estas enfermedades. La gestión integrada puede incluir medidas de cuarentena, mejora genética y manejo silvicultural adecuado, así como la selección genética de clones de especies que son menos susceptibles a patógenos (Wingfield et al., 2008; Porter et al., 2009).

En esta clase de manejo integrada ha de tener también cabida el control biológico. Particularmente, el uso de hongos endófitos, (Martínez-Álvarez, et al., 2016), tiene un futuro prometedor tanto por los resultados que proporciona (Bailey and Gilligan, 1997) como por la inocuidad en el ecosistema en que se emplee. Hasta el momento el control biológico ha sido empleado con éxito en el control de varias patologías vegetales (Trestic et al., 2001; Kwon et al., 2009; Romeralo, et al., 2013; Martínez-Álvarez, 2015).

Las interacciones entre los hongos fitopatógenos y los hongos endófitos, son conocidas desde principios del siglo XX (Weindling, 1932), siendo ya desde entonces objeto de estudio el uso de estos hongos endófitos como Agente de Control Biológico (ACB) (Mehrotra et al.,

1998, Yang, 1995). Actualmente se sabe que los tejidos vegetales que contienen hongos endófitos afectan la resistencia de sus hospedantes frente a parásitos (Miller, 1986; Vinale et al., 2008). Por ejemplo, varios estudios han demostrado que las plantas inoculadas con endófitos incrementan su crecimiento (Barka et al., 2002), mejoran la resistencia a la sequía (Swarthout et al., 2009), toleran condiciones de suelos no aptos (Malinowski et al., 2005), tienen mayor acceso a nutrientes (Robin et al., 2000) o mejoran la defensa frente a animales herbívoros (Bernstein and Carroll, 1977; Carrol, 2012) y patógenos (Arnold et al., 2003).

Este último beneficios, puede a su vez agruparse y diferenciarse en: efectos directos, indirectos y ecológicos (Gao et al., 2010). En los efectos directos los endófitos suprimen directamente al patógeno mediante la producción de antibióticos (Richardson et al., 2014) o la secreción de enzimas líticas (Vinale et al., 2008). Por otro lado, los efectos indirectos que los endófitos provocan en las plantas, ayudando a reducir el daño del patógeno pueden ser, por ejemplo, la inducción de la resistencia a la planta, la estimulación de producción de metabolitos y el incremento del crecimiento y de la actividad fisiológica. Por último, ejemplos de los efectos ecológicos son la ocupación de un nicho ecológico, el hiperparasitismo y la depredación (Gao et al., 2010).

Uno de los endófitos más estudiados por su potencial como ACB en las enfermedades de las plantas es el género *Trichoderma* (Howell, 2003). Una de las características más destacadas que presenta este, es su habilidad para parasitar otros hongos (Weindling, 1932). Además este género es capaz de producir sustancias antibióticas que son inhibidoras de muchos patógenos (Juhásová et al., 2005), de las cuales destacan las enzimas chitinazas, gluconasas, así como el ácido 2.6 dichloroisonicotínico (Howell, 2003). Sin embargo, el principal mecanismo de control biológico de *Trichoderma* spp. es la competencia por el espacio y los nutrientes de la rizosfera (Howell, 2003).

El crecimiento de este hongo, estudiado en este experimento, no está limitado al suelo o las raíces, sino que es capaz de colonizar el floema, xilema y médula de los árboles (Jankowiak, 2006). Existen muchos ejemplos de *Trichoderma* spp. y otros endófitos como controladores de enfermedades en plantas (Latunde-Dada, 1993; Maciá-Vicente et al., 2008; Ruano-Rosa et al., 2010) siendo en algunos casos enfermedades causadas por el género *Fusarium* (Sivan and Chet, 1987; Bernal-Vicente et al., 2009; Basak and Basak, 2011), y otros de interés forestal como *Rosellinia necatrix* (Ruano Rosa and López Herrera, 2009).

Los estudios realizados hasta el momento sobre el Control Biológico con hongos endófitos tal es el caso de patógenos como *Fusarium circinatum*, *Phytophthora alni*, *P. pluvivora*, *Gremmeniella abietina*, *Cryphonectria parasitica* y *Heterobasidion annosum* mediante el uso de hongos endófitos destacando el género *Trichoderma* spp. y *Aspergillus*. Se ha observado la interacción antagonista, por ejemplo, de *Fusarium circinatum* y las especies fúngicas *Pinicillium chrysogenum* Link y *Fusarium lateritium* Ness (Romón et al., 2008). Por último, también se ha evaluado el uso potencial de endófitos como *Trichoderma* spp y *Clonostachys* spp. como controladores de *Fusarium circinatum*, en plantas de *Pinus radiata* (Moraga-Suazo et al., 2011). Este estudio observó un incremento significativo de la supervivencia de las plantas de *Pinus radiata* con las cepas de *Clonostachys* spp probadas, no siendo así en el caso de los aislamientos de las cepas de *Trichoderma* spp.

En consecuencia, en el presente estudio se analizó el efecto antagonista de seis hongos endófitos de *Pinus* spp. Frente a seis patógenos forestales (*Trichoderma atroviride*, *Mucor hiemalis*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus flavus*, *T. viride*). Para ello se recurrió al análisis de diferentes variables coloniales a fin de determinar el grado de inhibición entre organismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto protector de hongos antagonistas contra la infección de patógenos forestales

La evaluación del efecto antagonista de cada especie fúngica endófito (Tabla 1) contra cada especie patógena (Tabla 2) se realizó *in vitro*, mediante el emparejamiento de dobles aislados (patógeno - endófito). Los ensayos se llevaron a cabo en placas Petri de 90 mm de diámetro, utilizando medio de cultivo PDAs (3.90% patata-dextrosa-agar, suplementado con 0.50 mg/l de estreptomicina sulfato como agente antibiótico) sellado con papel Parafilm®. Se cultivaron los organismos de forma aislada y se incubaron las placas a 25° C en la oscuridad durante una semana (Martínez-Álvarez et al., 2012).

Transcurrido este tiempo se extrajo un trozo de PDAS con micelio. Posteriormente, se tomaron placas Petri con PDA, en las cuales se sembraron los enfrentamientos de hongos patógenos contra hongos endófitos. Se utilizaron 5 repeticiones por cada enfrentamiento que consistió en la confrontación endófito vs patógeno. Esto se hizo colocando una sección de 5x5 mm de micelio con medio PDAs con micelio de cada aislado en extremos opuestos de la placa, de forma tal, que se garantice el enfrentamiento de los micelios de las dos especies enfrentadas. La evaluación de la acción antagonista de cada especie se determinó por medio de la estimación del área de crecimiento micelial ocupada por cada especie. Se usaron cuatro indicadores para medir el efecto antagonista de los hongos endófitos sobre el patógeno (Martínez-Álvarez, 2016). Figura 1.

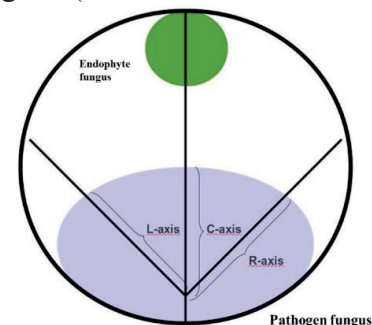


Figura 1. Representación Gráfica del co-cultivo entre patógenos forestales y hongos endófitos en el interior de una placa Petri (Martínez-Álvarez et al., 2016).

Tabla 1. Hongos endófitos. Fuente de los aislados y códigos Martínez-Álvarez, P. et al., 2016.

Especie	Código	Año de colecta	Hospedero	Localización	País	Latitud	Longitud	N° Acceso GenBank
Trichoderma atroviride	HP136	2010	Pinus radiata	Comillas, Cantabria	España	43° 20' 16.2" N	4° 18' 17.1" W	KT323338
Mucor hiemalis	HP139	2010	Pinus radiata	Comillas, Cantabria	España	43° 20' 16.2" N	4° 18' 17.1" W	KT323340
Chaetomium globosum	HP148	2010	Pinus radiata	Comillas, Cantabria	España	43° 20' 16.2" N	4° 18' 17.1" W	KT323349
Aspergillus flavus	HP149	2010	Pinus radiata	Comillas, Cantabria	España	43° 20' 16.2" N	4° 18' 17.1" W	KT323350
Trichoderma viride	HP155	2010	Pinus radiata	Comillas, Cantabria	España	43° 20' 16.2" N	4° 18' 17.1" W	KT323356

Variables Analizadas

Las variables evaluadas en el presente ensayo se desglosan a continuación:

- a. Longitud del eje central (eje C) de la colonia del hongo patógeno.
- b. Coeficiente de la forma, calculado a partir de la diferencia del eje lateral y el eje central (Santamaría et al., 2007).
- c. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial = $100 * ((r1 - \text{eje C}) / r1)$ (ecuación 1), donde r1 es el máximo radio de la colonia del hongo patógeno en cualquier dirección en la placa control (Royse and Ries, 1978).
- d. Porcentaje de inhibición de la zona de crecimiento. Para ello se utiliza la ecuación $\%IzC = [(A -$

$B) / A] * 100$ (ecuación 2), donde A= es el radio del hongo patógeno en la placa control y, B= es el radio del hongo patógeno en la placa de enfrentamiento (Orole and Adejumo, 2009).

Análisis estadístico

Los datos que se obtuvieron de este experimento fueron procesados en el programa estadístico SPSS (IBM® Statistical SPSS®, 2016). Todas las variables cuantitativas fueron evaluadas para comprobar la normalidad y homogeneidad de varianzas, bajo este supuesto se aplicaron las pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) y Diferencia Mínima Significativa (DMS) de Fisher con $\alpha=0.05$, con el fin de identificar las diferencias en las variables evaluadas para cada tratamiento experimental.

Tabla 2. Patógenos forestales. Se numeran las referencias de los aislados de los patógenos utilizados Martínez-Álvarez, 2015, 2 Botella et al., 2010, 3-4 Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos, 5-6 M. M. Haque, 2014.

Especie	Código	Año de colecta	Hospedero	Localización	País	Latitud	Longitud	N° Acceso GenBank
Fusarium circinatum 1	FcCa6	2010	Pinus radiata	Comillas, Cantabria	España	43° 20' 16.2" N	4° 18' 17.1" W	041R01
Heterobasidion annosum 2	A14009-AF-ZAPR001	2014	Pinus Pinaster	Mahide, Boya, Zamora	España	41° 52' 22.4" N	6° 22' 30.8" W	-----
Gremmeniella abietina 3	VAI-13	2003	Pinus halepensis	Villalba de los Alcores, Palencia	España	31° 43' 30.02" N	2° 54' 30.4" W	FN663462

Cryphonectria parasitica 4	C1164-ZA28	2005	Castanea sativa	Arrabalde, Zamora	España	26° 03" 58.00' N	46° 65" 7.50' W	-----
Phytophthora alni 5	ZABRE02	2012	Alnus glutinosa	Betrocino, Zamora	España	41° 54" 48.00' N	5° 44" 45.60' W	AF139366.1
Phytophthora pluvivora 6	SORLDD14	2010	Alnus glutinosa	Langa de Duero, Soria	España	41° 36" 34.00' N	3° 25" 10.00' W	KF413075

RESULTADOS

Los cinco hongos endófitos evaluados en este ensayo (Tabla 1) empleados en este ensayo frente a distintos patógenos (Tabla 2), han sido seleccionados por su potencial como agentes de control biológico (ACB). Previamente fueron probados en ensayos *in vivo* (Martínez-Álvarez et al., 2016) demostrando por medio de la técnica del área bajo la curva (AUDPC) (Navarro Flores, 2016) carecen de potencial patogénico para especies forestales, específicamente para coníferas del género *Pinus*. En todos los casos se comparan los resultados del o de los hongos endófitos con mayor reducción del crecimiento del hongo patógeno con el control de este último.

Tal y como muestran las Figuras 2-5, presentan el efecto en la reducción del crecimiento (mm) del eje C del patógeno frente a la acción del hongo endófito. Concretamente, la figura 2 muestra la reducción del crecimiento de la colonia de *F. circinatum* frente a *Trichoderma viride* que lo redujo un 82% (p-valor<0.001), mientras que, *Trichoderma atroviride* y *Aspergillus flavus* ambos generan un 65% (p-valor<0.005) de reducción en el crecimiento de la colonia. Para este caso, Se nota cobertura total del área de la placa Petri por parte de los hongos endófito, incluso creciendo sobre la colonia de *F. circinatum*. En el caso de la figura 3, *T. viride* y *T. atroviride* que redujeron un 87.5% (p-valor<0.001) el crecimiento de *Gremmeniella abietina*.

En el caso de *Heterobasidion annosum* (figura 4) fue el endófito *Mucor hiemalis* el que causó la reducción

del 84.21% (p-valor<0.001) frente al control. En este enfrentamiento se distinguen claramente las colonias de ambos hongos. Este mismo endófito redujo el crecimiento de *Phytophthora plurivora* (figura 7) en un 60.50% (p-valor<0.05), teniendo el mayor éxito de todos los enfrentamientos probados. Sin embargo, *Aspergillus flavus* presenta un potencial muy elevado como ACB. En el enfrentamiento con *Cryphonectria parasitica* (figura 5) redujo un 85.45% (p-valor<0.001) el crecimiento de este patógeno. Efecto que también genera en *Phytophthora alni* (figura 6) *Phytophthora plurivora* (figura 7) con 83.33% (p-valor<0.001) y 68.41% (p-valor<0.05), respectivamente.

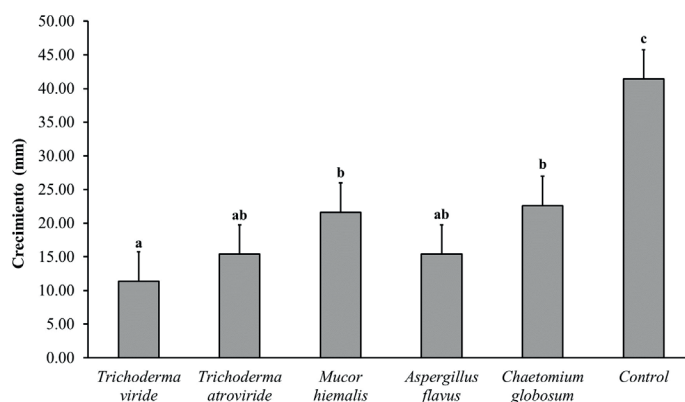


Figura 2. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Fusarium circinatum* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa

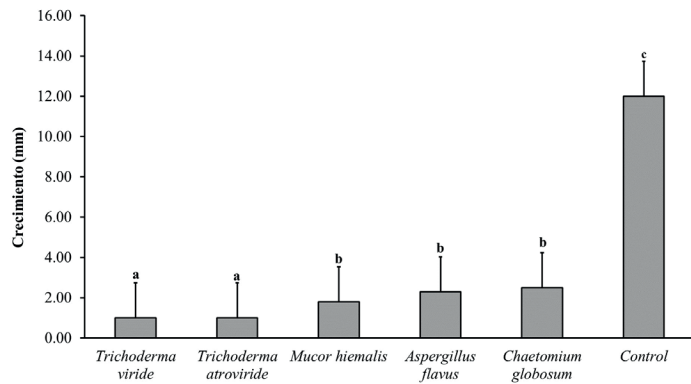


Figura 3. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Gremmeniella abietina* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

Figura 3. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Gremmeniella abietina* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

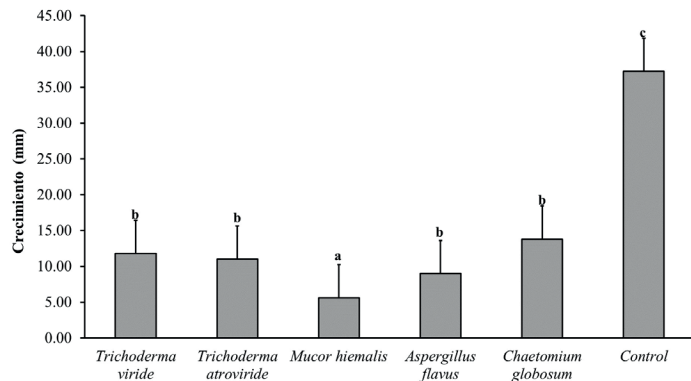


Figura 4. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Heterobasidion annosum* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

Figura 4. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Heterobasidion annosum* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

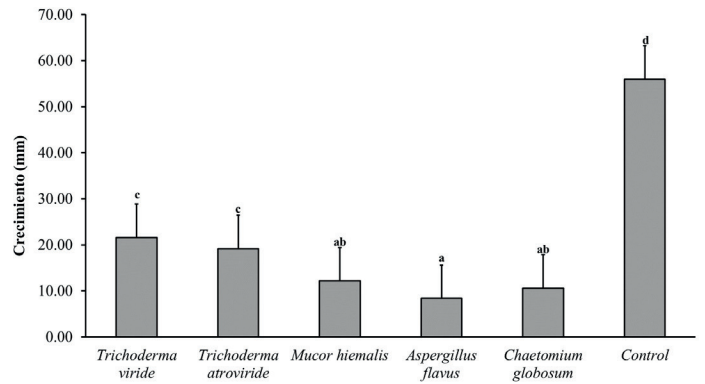


Figura 5. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Cryphonectria parasitica* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

Figura 5. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Cryphonectria parasitica* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

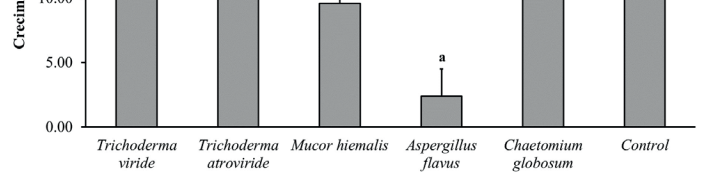


Figura 6. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Phytophthora alni* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

Figura 6. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Phytophthora alni* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

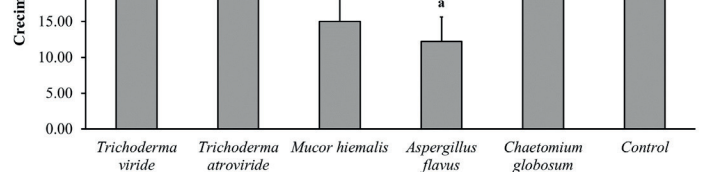


Figura 7. Longitud (mm) del eje Central (C) en enfrentamientos *in vitro* de *Phytophthora plurivora* contra hongos endófitos. Prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) - Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95). Letras (a-c) distintas indican

diferencia estadística $\alpha=0.05$. En la gráfica se han reflejado los valores de la Media (Md) y Desviación Estándar (DE).

En la Tabla 3 muestran los tres parámetros obtenidos para estimar el efecto inhibitorio de los hongos endófitos enfrentados a patógenos. Los parámetros contenidos son i) Coeficiente de la forma del patógeno, ii) Porcentaje de inhibición del crecimiento radical y iii) Porcentaje de inhibición de la zona de crecimiento. En el caso de *T. viride* y *T. atroviride* se encontraron diferencias significativas con un p-valor<0.001 en los tres parámetros monitoreados en los patógenos *F.*

circinatum y *G. abietina*. Para *P. alni* únicamente *T. viride* mostró diferencias significativas (p-valor<0.001), aunque no se desprecia el p-valor<0.05 *T. atroviride* sobre el mismo hongo. Al igual que en las figuras iniciales *M. hiemalis* mostro diferencia significativa (p-valor<0.001) en la inhibición del desarrollo de *H. annosum* y *P. pluvivora*, incluso estadísticamente superior (p-valor<0.05) a los valores registrados por las especies de *Trichoderma*. También, *A. flavus* mostro diferencia significativa sobre *C. parasitica* y *P. alni* (p-valor<0.001), en ambos casos, pero siendo el único con este grado de control para *C. parasitica*.

Tabla 3. Comparaciones múltiples para enfrentamientos in vitro de patógenos forestales y hongos endófitos. Md = Media aritmética. DE = Desviación Estándar. Sig. = Indicador de diferencia significativa. * P-valor<0.05. ** P-valor<0.001. ns = sin diferencia significativa. Diferencia Mínima Significativa (DMS = 0.95).

Especies patógenas	Hongos endófitos	Coeficiente de la forma del patógeno			Porcentaje de inhibición del crecimiento radial			Porcentaje de inhibición de la zona de crecimiento		
		Md	DE	Sig.	Md	DE	Sig.	Md	DE	Sig.
<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	1.00	0.71	**	75.74	4.15	**	72.46	4.71	**
	<i>Trichoderma atroviride</i>	1.40	0.89	**	67.24	5.55	**	62.80	6.30	**
	<i>Mucor hiemalis</i>	2.40	3.05	*	54.04	3.56	*	47.83	4.05	*
	<i>Aspergillus flavus</i>	2.40	0.55	*	52.55	1.17	*	57.49	1.33	*
	<i>Chaetomium globosum</i>	1.00	0.00	ns	51.91	2.43	ns	45.41	2.76	ns
<i>Heterobasidion annosum</i>	<i>Trichoderma viride</i>	1.20	0.45	*	71.22	4.01	*	68.28	4.42	*
	<i>Trichoderma atroviride</i>	1.60	1.14	*	73.17	7.72	*	70.43	8.50	*
	<i>Mucor hiemalis</i>	1.00	0.00	**	86.34	3.70	**	84.95	4.08	**
	<i>Aspergillus flavus</i>	1.20	1.30	*	78.05	11.82	*	75.81	13.03	*
	<i>Chaetomium globosum</i>	1.60	0.55	ns	66.34	4.01	ns	62.90	4.41	*
<i>Gremmeniella abietina</i>	<i>Trichoderma viride</i>	0.00	0.00	**	83.05	0.00	**	85.00	20.87	**
	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	0.00	**	83.05	0.00	**	85.00	0.00	**
	<i>Mucor hiemalis</i>	0.00	0.00	*	61.02	0.00	*	65.00	0.00	*
	<i>Aspergillus flavus</i>	0.00	0.00	*	55.93	0.00	*	59.33	0.00	*
	<i>Chaetomium globosum</i>	0.00	0.00	*	68.81	1.52	*	50.00	2.24	*
<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Trichoderma viride</i>	2.60	1.52	*	62.11	14.71	*	36.31	6.17	*
	<i>Trichoderma atroviride</i>	3.20	2.49	*	66.32	16.89	*	38.25	20.32	*
	<i>Mucor hiemalis</i>	2.60	3.65	*	68.59	13.27	**	47.38	24.91	**
	<i>Aspergillus flavus</i>	1.80	0.74	**	85.26	7.50	**	79.22	20.77	**
	<i>Chaetomium globosum</i>	2.00	1.00	ns	61.40	15.22	ns	59.03	19.09	ns

<i>Phytophthora alni</i>	<i>Trichoderma viride</i>	1.40	1.14	**	52.00	5.70	*	46.21	6.40	*
	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.60	0.55	*	32.00	4.47	**	23.60	5.02	*
	<i>Mucor hiemalis</i>	1.00	0.71	ns	37.00	10.37	ns	21.60	11.65	ns
	<i>Aspergillus flavus</i>	0.60	1.34	**	88.00	26.83	**	86.52	30.15	**
	<i>Chaetomium globosum</i>	0.60	0.89	*	45.00	8.66	*	38.20	9.73	*
<i>P. pluvivora</i>	<i>Trichoderma viride</i>	3.80	1.30	*	40.50	5.70	*	34.62	6.26	**
	<i>Trichoderma atroviride</i>	1.60	0.89	*	42.50	7.91	*	36.81	8.69	*
	<i>Mucor hiemalis</i>	1.40	1.14	**	62.50	3.95	**	58.79	4.34	**
	<i>Aspergillus flavus</i>	2.00	1.41	*	39.50	15.55	**	36.48	17.09	*
	<i>Chaetomium globosum</i>	2.40	0.89	*	48.50	5.76	*	43.41	6.33	*

DISCUSIÓN

Los organismos patógenos evaluados en el presente estudio, generan graves daños ecológicos y económicos a escala global por lo que han sido catalogados como de interés por la Organización europea y mediterránea de protección fitosanitaria (EPPO) (2006a). Principalmente en los países donde se hallan detectados estos patógenos se han llevado investigaciones para su control. Sin embargo, muchas de ellas se han dirigido a la búsqueda de resistencia del hospedante, son muy pocas las que exploran el control biológico por medio de hongos endófitos (Zabalgogeoazcoa, 2008, Abello and Kelemu, 2006).

De acuerdo a los trabajos publicados por Martínez-Álvarez et al., (2012, 2016) las especies de *Trichoderma* spp., frente a *F. circinatum*. Demostró un elevado efecto de control inhibitorio por producción de micotoxinas de carácter antifúngicas combinadas con su capacidad de micoparasitar al huésped (Rolando et al., 2013). Estas micotoxinas inhibitorias actuaron tanto sobre *F. circinatum* evitando el crecimiento de la colonia (Sánchez-Fernández et al., 2013), pero en otros patógenos como es el caso de *G. abietina* y *P. alni* no solo redujeron el crecimiento de la colonia, sino que también parasitó la colonia del patógeno al punto de cubrir totalmente la placa Petri.

Las dos especies de *Trichoderma* es el hongo endófito que tiene mejor efecto sobre *F. circinatum* y *G. abietina* (Romeralo et al., 2015). Sin embargo, el éxito

de este endófito está relacionado directamente con la zona y momento de inoculación, incluso siendo más determinante que la concentración utilizada (Orole and Adejumo, 2009). De acuerdo a publicaciones de Moraga-Suazo et al., (2014) al realizar un estudio en el que se probaron varias cepas de *Trichoderma* spp. y de *Clonostachys* spp., para el control de *F. circinatum* no se obtuvieron resultados positivos al inocular el endófito en el tejido vegetal o en el sustrato al tiempo o luego que el patógeno. Contrariamente, en los casos en los que el patógeno fue inoculado, bien fuera en tejido vegetal o sustrato, posteriormente a la introducción del endófito, se observó un claro efecto antagónico de este último (Aleandri et al., 2015).

El género *Trichoderma* posee diferentes mecanismos de acción que pueden favorecer a la planta hospedante ante la presencia de un fitopatógeno (Verma et al., 2007), entre los que cabe destacar la competencia y la antibiosis (Sánchez-Fernández et al., 2013). La competencia en *Trichoderma* spp. es muy alta ya que biológicamente tiende a colonizar agresivamente el sustrato y a sobrevivir en casos de carencia de sustrato en forma de clamidosporas, además de que puede crecer sobre distintos sustratos y tiene una elevada tasa de esporulación (Bailey et al., 2008). La antibiosis es el mecanismo que permite a *Trichoderma* spp inhibir a los patógenos a partir de la producción de sustancias inhibitoras consideradas antibióticos y micotoxinas. Para el caso del endófito *C. globosum* el principal mecanismo de acción es la micostática, mejor conocido como efecto fungistático, que consiste en inhibir

el crecimiento de otros hongos, pero sin provocar la muerte de antagonista (Rolando et al., 2013). *Aspergillus flavus* compite directamente por espacio, nutrientes y recursos necesarios para el desarrollo del micelio e hifas de ambos hongos (Bettioli, et al., 2014).

El hongo endófito, *A. flavus*, presentó mayor efecto inhibitorio frente a los patógenos *C. parasítica*, *P. alni* y *P. plurivora* en concordancia con lo encontrado por Robin et al., (2000). Además, mostró gran diferencia con el resto de endófitos en estos dos últimos patógenos. Aunque no es de gran relevancia ya que es bastante conocida por sus efectos positivos ante muchos patógenos y ha sido objeto de estudio en muchas ocasiones como agente de control biológico (ACB). *Mucor hiemalis* que tuvo efecto frente a *H. annosum* en cambio en el resto de patógenos no redujo su crecimiento. Estudios de Yakimenko and Grodnitskaya, (2000) indican que al integrar este endófito en el suelo se registró la reducción la incidencia de enfermedades en plántulas de coníferas. Consideran que este hecho se debe a la mejora y aumento de la microflora del suelo y de la planta que aumento la capacidad de la planta para resistir infección de patógenos.

CONCLUSIONES

Es necesario continuar con la siguiente fase, la prueba in vivo de los cinco endófitos frente a los respectivos patógenos. Debe prestarse especial atención a la forma y tiempos de inoculación de los endófitos (Jankowiak, 2006) para obtener el máximo de su potencial colonizador y protector-estimulante (Ruppel et al., 1983). Es recomendable la producción de plantas con semillas y sustrato estéril en el que los endófitos sean inoculados al suelo al momento de la siembra de la semilla (Martínez-Álvarez et al., 2012). En el caso de utilizar plantas provenientes de vivero se recomienda la misma vía de inoculación del endófito con al menos 15 a 42 días de antelación a la inoculación del patógeno respectivo (Aleandri et al., 2015).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, es prometedor el potencial de estos hongos endófitos como Agentes de Control Biológico de hongos patógenos de amplia distribución mundial. Deben de estudiarse con mayor profundidad, en pruebas de patogenicidad in vivo, la acción de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *F. circinatum* y *G. abietina*, así como *M. hiemalis* sobre *H. annosum* y *P. plurivora*. También deben tomarse en consideración los resultados positivos que se obtuvieron con *A. flavus* sobre *C. parasítica* y *P. alni*. En consecuencia, se ha determinado el efecto antagonista in vitro de cada uno de los endófitos frente a los patógenos a los que se enfrentaron, esto abre confirma su potencial para el control biológico. Esto debe ser confirmado con más pruebas y ensayo in vivo de los endófitos inoculados en los hospederos de cada patógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELLO, J.F., and S. KELEMU. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpioca - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7: 55–57.
- ALEANDRI, M.P., G. CHILOSI, N. BRUNI, A. TOMASSINI, A.M. VETTRAINO, and A. VANNINI. 2015. Use of nursery potting mixes amended with local *Trichoderma* strains with multiple complementary mechanisms to control soil-borne diseases. *Crop Protection* 67: 269–278. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.023>.
- ARNOLD, A.E., L.C. MEJÍA, D. KYLLO, E.I. ROJAS, Z. MAYNARD, N. ROBBINS, and E.A. HERRE. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15649–15654.
- BAILEY, B.A., H. BAE, M.D. STREM, J. CROZIER, S.E. THOMAS, G.J. SAMUELS, B.T. VINYARD, and K.A. HOLMES. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for

- endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46: 24–35.
- BAILEY, D.J., and C.A. GILLIGAN. 1997. Biological control of pathozone behaviour and disease dynamics of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma viride*. *New Phytologist* 136: 359–367.
- BARKA, E.A., S. GOGNIES, J. NOWAK, J.C. AUDRAN, and A. BELARBI. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control* 24: 135–142.
- BASAK, A.C., and S.R. BASAK. 2011. Biological control of *Fusarium solani* sp. *dalbergiae*, the wilt pathogen of *dalbergia sissoo*, by *Trichoderma viride* and *T. harzianum*. *Journal of Tropical Forest Science* 23: 460–466.
- BERNAL-VICENTE, A., M. ROS, and J.A. PASCUAL. 2009. Increased effectiveness of the *Trichoderma harzianum* isolate T-78 against *Fusarium* wilt on melon plants under nursery conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 827–833.
- BERNSTEIN, M.E., and G.C. CARROLL. 1977. Microbial populations on Douglas fir needle surfaces. *Microbial Ecology* 4: 41–52.
- BOTELLA, L., and J. JAVIER DIEZ. 2011. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity* 47: 9–18.
- BOTELLA, L., T.T. TUOMIVIRTA, J. KAITERA, V. CARRASCO NAVARRO, J.J. DIEZ, and J. HANTULA. 2010. Spanish population of *Gremmeniella abietina* is genetically unique but related to type A in Europe. *Fungal Biology* 114: 778–789.
- BUENO, A., J.J. DIEZ, and M.M. FERNÁNDEZ. 2010. Ophiostomatoid fungi transported by *Ips sexdentatus* (Coleoptera; Scolytidae) in *Pinus pinaster* in NW Spain. *Silva Fennica* 44: 387–397.
- CARROL, G. 2012. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology* 69: 2–9.
- CENTRO DE SANIDAD FORESTAL DE CALABAZANOS. 2007. Junta de Castilla y León. *Polígono Industrial de Villamuriel S/N, 34190 Villamuriel de Cerrato, Palencia, Spain* 0–1.
- EPPO. 2006. First report of *Gibberella circinata* in France. *European and Mediterranean Plant Protection Organization* 104: 9.
- GAO, F.K., C.C. DAI, and X.Z. LIU. 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 4: 1346–1351.
- HOWELL, C.R. 2003. A case in point is that of *T. virens*–treated root segments taken from soil heavily infested with propagules of *Macrophomina phaseolina*, the pathogen that causes charcoal rot in a wide range of crops *Biological Control of Plant Diseases: the history and*. *Plant Disease* 87: 4–10.
- IBM® STATISTICAL SPSS®. 2016. IBM® SPSS® 24.0. Statistical Package for the Social Sciences. Available at: <http://www.spss.com/>.
- JANKOWIAK, R. 2006. Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings. *Annals of Forest Science* 63: 801–808.
- JUHÁSOVÁ, G., K. ADAMČÍKOVÁ, and C. ROBIN. 2005. Results of biological control of chestnut blight in Slovakia. *Phytoprotection* 86: 19–23.
- KWON, S.-J.J., W.-S.S. LIM, S.-H.H. PARK, M.-R.R. PARK, and K.-H.H. KIM. 2009. Erratum: Molecular characterization of a dsRNA mycovirus, *Fusarium graminearum* Virus-DK21, which is phylogenetically related to hypoviruses but has a genome organization and gene expression strategy resembling those of plant potex-like viruses (*Molecules. Molecules and Cells* 28: 73–74).
- LATUNDE-DADA, A.O. 1993. Biological-Control of Southern Blight Disease of Tomato Caused by *Sclerotium rolfsii* with Simplified Mycelial Formulations of *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology* 42: 522–529.
- MACIÁ-VICENTE, J.G., H.B. JANSSON, S.K. ABDULLAH, E. DESCALS, J. SALINAS, and L.

- V. LOPEZ-LLORCA. 2008. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 90–105.
- MALINOWSKI, D.P., H. ZUO, D.P. BELESKY, and G.A. ALLOUSH. 2005. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes. *Plant and Soil* 267: 1–12.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P. 2015. Environmentally friendly methods for the integrated management of pine pitch canker (PPC) disease. University of Valladolid - INIA.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P., F.M. ALVES-SANTOS, and J.J. DIEZ. 2012. In vitro and in vivo interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fennica* 46: 303–316.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P., R.A. FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.V. SANZ-ROS, V. PANDO, and J.J. DIEZ. 2016. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control* 94: 1–10.
- MEHROTRA, A. K., G. A., and A. A. 1998. Fungi-agents of biological control in biocontrol of plant diseases. *Mehrotra R., Aneja K., Gupta A., A. A.* Boca Ratón: C.R.C. Press.
- MILLER, J.D. 1986. Toxic metabolites of epiphytic and endophytic fungi of conifer needles. In *F. & Van den Heuvel Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press 1: .
- MORAGA-SUAZO, P., A. OPAZO, S. ZALDÚA, G. GONZÁLEZ, and E. SANFUENTES. 2011. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. Strains to Control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* Seedlings. *Chilean journal of agricultural research* 71: 412–417.
- MORAGA-SUAZO, P., L. ORELLANA, P. QUIROGA, C. BALOCCHI, E. SANFUENTES, R.W. WHETTEN, R. HASBÚN, and S. VALENZUELA. 2014. Development of a genetic linkage map for *Pinus radiata* and detection of pitch canker disease resistance associated QTLs. *Trees - Structure and Function* 28: 1823–1835.
- NAVARRO FLORES, J.R. 2016. La técnica del área bajo la curva. *Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos Universidad de Costa Rica*.
- OROLE, O.O., and T.O. ADEJUMO. 2009. Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 3: 969–973.
- PORTER, B., M.J. WINGFIELD, and T.A. COUTINHO. 2009. Susceptibility of South African native conifers to the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *South African Journal of Botany* 75: 380–382.
- RICHARDSON, S.N., A.K. WALKER, T.K. NSIAMA, J. MCFARLANE, M.W. SUMARAH, A. IBRAHIM, and J.D. MILLER. 2014. Griseofulvin-producing *Xylaria* endophytes of *Pinus strobus* and *Vaccinium angustifolium*: Evidence for a conifer-understory species endophyte ecology. *Fungal Ecology* 11: 107–113.
- ROBIN, C., C. ANZIANI, and P. CORTESI. 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90: 730–737.
- ROLANDO, Á., R. CARRIÓN, R. NINA, H. SMELTEKOP, J. ALMANZA, M. LOZAMURGUIA, A.C. MICHEL-ACEVES, ET AL. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. *Avances de Investigación Agropecuaria* 28: 89–107.
- ROMERALO, C., L. BOTELLA, O. SANTAMARIA, and J.J. DIEZ. 2013. Control biológico de *Gremmeniella abietina* en plántulas de *Pinus halepensis* en invernadero mediante el uso de hongos endófitos. *Congreso Forestal Español* 6CFE01-383: 1–11.
- ROMERALO, C., and R. ROMERALO-TAPIA. 2015. Management of *Gremmeniella abietina* by means

- of biological control agents and host resistance. Universidad de Valladolid. España 190.
- ROMERALO, C., J. WITZELL, R. ROMERALO-TAPIA, L. BOTELLA, and J.J. DIEZ. 2015. Antagonistic activity of fungal endophyte filtrates against *Gremmeniella abietina* infections on Aleppo pine seedlings. *European Journal of Plant Pathology* 143: 691–704.
- ROMÓN, P., M. TROYA, M.E.F. DE GAMARRA, A. EGUZKITZA, J.C.C. ITURRONDOBEITIA, A. GOLDARAZENA, M.E. FERNÁNDEZ DE GAMARRA, ET AL. 2008. Fungal communities associated with pitch canker disease of *Pinus radiata* caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain: association with insects and pathogen-saprophyte antagonistic interactions. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 30: 241–253.
- ROYSE, D.J., and S.M. RIES. 1978. The Influence of Fungi Isolated from Peach Twigs on the Pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology* 68: 603–607.
- RUANO-ROSA, D., L. DEL MORAL-NAVARRETE, C.J. LOPEZ-HERRERA, and L. DEL MORAL-NAVARRETE. 2010. Selection of *Trichoderma* spp. isolates antagonistic to *Rosellinia necatrix*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: 1084–1097.
- RUANO ROSA, D., and C.J. LÓPEZ HERRERA. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. *Biological Control* 51: 66–71.
- RUPPEL, E.G., R. BAKER, G.E. HARMAN, J.P. HUBBARD, R.J. HECKER, and I. CHET. 1983. Field tests of *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. as a biocontrol agent of seedling disease in several crops and *Rhizoctonia* root rot of sugar beet. *Crop Protection* 2: 399–408.
- SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R., B. SÁNCHEZ-ORTIZ, Y. SANDOVAL-ESPINOSA, A. ULLOA-BENÍTEZ., B. ARMENDÁRIZ-GUILLÉN., M. GARCÍA-MÉNDEZ., and M. MACÍAS-RUBALCAVA. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip* 16: 132–146.
- SANTAMARÍA, O., L. BOTELLA, and J. DIEZ. 2007. *Gremmeniella abietina* in North-western Spain: Distribution and associated mycoflora. *Acta Silvatica and Lignaria Hungarica* 137–145.
- SIVAN, A, and I. CHET. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma hazianum* under field condition. *Plant Disease* 71: 587–592.
- SWARTHOUT, D., E. HARPER, S. JUDD, D. GONTHIER, R. SHYNE, T. STOWE, and T. BULTMAN. 2009. Measures of leaf-level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. *Environmental and Experimental Botany* 66: 88–93.
- TRESTIĆ, T., M. UŠČUPLIĆ, C. COLINAS, G. ROLLAND, A. GIRAUD, and C. ROBIN. 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 391–396.
- UL HAQUE, M. 2014. Identification, characterization and pathogenicity of *Phytophthora* spp. ASSOCIATED WITH THE MORTALITY OF *Alnus glutinosa* in Spain. 142.
- VERMA, M., S.K. BRAR, R.D. TYAGI, R.Y. SURAMPALLI, and J.R. VALÉRO. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1–20.
- VINALE, F., K. SIVASITHAMPARAM, E.L. GHISALBERTI, R. MARRA, S.L. WOO, and M. LORITO. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1–10.
- WAGNER BETTIOL, MARTA C. RIVERA, PEDRO MONDINO, JAIME R. MONTEALEGRE A., Y.C.C. 2014. Control biológico de enfermedades

- de plantas en América Latina y el Caribe. *Facultad de Agricultura, Universidad de la República, Montevideo*. 402 pp.
- WEINDLING, R. 1932. Trichoderma lignorum as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22: 837–845.
- WINGFIELD, M.J., A. HAMMERBACHER, R.J. GANLEY, E.T. STEENKAMP, T.R. GORDON, B.D. WINGFIELD, and T.A. COUTINHO. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - A growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 37: 319–334.
- YAKIMENKO, E.E., and I.D. GRODNITSKAYA. 2000. Effect of Trichoderma fungi on soil micromycetes that cause infectious conifer seedling lodging in Siberian tree nurseries. *Microbiology* 69: 726–729.
- YANG. 1995. Phaeotheca dimorphospora as a potential biocontrol agent for shoot blight caused by *Gremmeniella abietina*. *Canadian Journal Plant Pathology* 17: 7–12.
- ZABALGOGEAZCOA, I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 138–146.