

AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma koningiopsis*

Alba Marina Cotes

Investigadora Laboratorio de Control Biológico,
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA,
Km. 14 vía Bogotá-Mosquera.
E-mail: amcotes@corpoica.org.co



CAPÍTULO 1

El potencial de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico de fitopatógenos fue reconocido inicialmente en 1930, reportándose en los años subsiguientes el control de muchas especies (Aluko y Hering, 1970; Bliss, 1951; Chet, 1987; Elad y Kapat, 1999; Harman, 2001; Howell, 1982; Lifshitz *et al.*, 1986; Lumsden *et al.*, 1992, Sharon *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 1972; Yedidia *et al.*, 1999, 2000; Zhang *et al.*, 1996) y culminando en 2004 con 16 productos registrados ante la 'United States Environmental Protection Agency' (EPA) junto con muchos otros registrados en India, Israel, Nueva Zelanda y Suecia (Howel *et al.*, 2003), recomendados tanto para el control de patógenos del suelo y foliares como para la inducción del crecimiento vegetal.

A nivel nacional, los desarrollos sobre este microorganismo han sido lentos; los primeros estudios sobre *Trichoderma* como agente de control biológico se reportaron en 1980, y ha sido en los últimos años en que se han registrado ante el ICA

varios productos a base de este microorganismo, comercializados para el control de enfermedades causadas por hongos del suelo (ICA, 2009).

Con todo, y a pesar del potencial de este género en el control biológico, no todas las especies ni todas las cepas de una misma especie son eficientes como agentes de dicho control, razón por la que se requiere de un trabajo minucioso que permita evaluar diferentes aislamientos y seleccionar el que presente mayor actividad biocontroladora y consistencia en esta actividad. Es así como al evaluar la actividad biocontroladora contra *Pythium splendens* en frijol de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp. nativos de Colombia (codificados de 1 a 12), en comparación con un aislamiento de referencia (codificado como 13) y de uno que constituye el principio activo de un producto registrado en el mercado internacional (codificado como 14), se eligió el aislamiento nativo Th003, identificado como *Trichoderma koningiopsis* (Figura 1) (Cotes *et al.*, 1993).

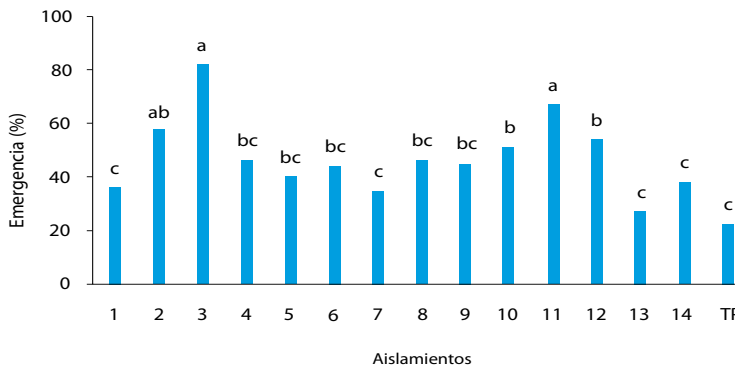


Figura 1. Efecto de 14 aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre la emergencia de plántulas de frijol en un suelo inoculado con *Pythium splendens*. TP (Testigo Patógeno). Las columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a $P < 0,05$.

Una vez seleccionado un agente de control biológico eficiente, el estudio de los mecanismos empleados por esta cepa microbiana es esencial no solo para ayudar a entender el fenómeno sino desde el punto de vista aplicado en la producción y formulación del biocontrolador, y en el manejo de las enfermedades en campo. Las investigaciones realizadas en el pasado han demostrado que los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., contra diversos patógenos son muchos, variando

para cada cepa y en cada interacción hospedero-patógeno (Howell, 2003); por ello, en la mayoría de los países la definición de este aspecto es fundamental para el registro de los productos.

Sin embargo, en Colombia son pocos los estudios llevados a cabo con microorganismos biocontroladores en general y menos aún los realizados particularmente con cepas nativas de *Trichoderma* spp. Es por esto que el conocimiento de los

mecanismos de acción permite hacer más efectivo el control ejercido por el agente de control biológico y entender sus limitaciones. Se pueden desarrollar sistemas efectivos de producción masiva, de formulación, de almacenamiento y de aplicación en campo, pero si los mecanismos de acción del microorganismo no se potencializan estos desarrollos pueden resultar fallidos en condiciones de su aplicación práctica.

En relación con los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., muchos autores han atribuido el fenómeno de control al micoparasitismo y a la capacidad de este antagonista para producir toxinas, lo que ha explicado el control ejercido por diferentes cepas contra *Rhizoctonia solani* (Weindling, 1932; Weindling, 1934), *Sclerotinia americana* (Weindling, 1934), *Phytophthora* spp. (Howell y Stipanovic, 1983) y *Pythium ultimum* (Lumsden *et al.*, 1992). Otros autores lo han atribuido a la competencia del hongo por espacio y nutrientes, y particularmente por la habilidad de algunas cepas para colonizar la rizósfera (Harman, 2001; Howell *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1996); y más recientemente se ha atribuido el fenómeno de control de diversos patógenos a la producción de enzimas líticas de *Trichoderma* spp. del tipo quitinasas y glucanasas. Estas enzimas han demostrado capacidad para romper los polisacáridos quitina y β -glucanos, que son constituyentes de la pared de los patógenos y que le confieren la rigidez a su pared celular (Howell, 2003).

La acción enzimática ha sido descrita en la interacción cebolla- *Sclerotium cepivorum*- *T. koningii* (Metcalf y Wilson, 2001). Diversos autores han trabajado para esclarecer el rol de las quitinasas en el mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. Por ejemplo, Lorito transfirió el gen que codifica para una endoquitinasa de *T. harzianum* en tabaco y papa y obtuvo en estas plantas una resistencia de amplio espectro contra diferentes patógenos (Lorito *et al.*, 1998). Cuando plantas de manzano fueron transformadas con los genes que codifican para una exo y una endoquitinasa de *Trichoderma atroviride*, se obtuvo resistencia a *Venturia inaequalis*.

Otro criterio interesante en relación con la acción de las enzimas de *Trichoderma* spp. es el descrito por Elad y Kapat (1999) y Elad (2000), quienes demostraron que la protección conferida por *T. harzianum* contra *Botrytis cinerea* en frijol es debida

principalmente a la producción de proteasas que inactivan las exo y endopoligalacturonasa pectinmetilesterasa, pectato liasa poligalacturonasa, celulasa y cutinasa del patógeno; el principal rol fue atribuido a una cistein proteasa (Elad y Kapat, 1999). Un mecanismo alternativo propuesto para explicar la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. es la inducción de resistencia en la planta hospedera, concepto que ha sido verificado en pepino cohombro, donde después de la inoculación con *T. harzianum* se observó un aumento en la actividad de la peroxidasa y quitinasa, además de deposición de calosa (Yedidia *et al.*, 1999). Posteriormente en la misma interacción se demostró que la inoculación con *T. harzianum* inducía diferentes proteínas relacionadas con la patogénesis, dentro de las que se destacan hidrolasas (Yedidia *et al.*, 2000). A su vez, otros dos estudios demostraron lo siguiente:

1. Que cuando se inoculaban semillas de algodón con *Trichoderma virens* o con sus filtrados de cultivo, se inducía en las raíces de las plántulas la síntesis de altas concentraciones de terpenoides altamente inhibitorios de *R. solani* (Howell *et al.*, 2000).
2. Que cuando se aplicaba *T. harzianum* en sitios espacialmente separados de aquel en el que se inoculaba *B. cinerea*, se logró una reducción de la enfermedad que osciló entre 25% y 100% en tomate, lechuga, pimentón, frijol y tabaco. El efecto fue atribuido a la inducción de resistencia sistémica.

Este fenómeno ha sido igualmente demostrado usando una cepa de *Trichoderma hamatum* en rábanos (Krause *et al.*, 2003) y en pepino (Khan *et al.*, 2004), contando una cepa de *T. harzianum* contra *Phytophthora capsici* en pimiento, en el que se observó acumulación de capsidiol (Sid Ahmad, 2000).

Un efecto de *Trichoderma* que también podría tener un rol en el control ejercido contra diferentes patógenos es la estimulación del crecimiento vegetal. Esta respuesta ha sido descrita por varios autores en cultivos de pepino, arveja, tomate, rábano, tabaco y tomate. El fenómeno no ha sido del todo esclarecido, aunque se han sugerido algunas explicaciones, las cuales mencionan la inhibición y alteración de la microflora normal de las raíces y la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento (factores de crecimiento y

fitohormonas); uno de los cuales ya ha sido extraído y caracterizado (Windham *et al.*, 1986).

A propósito, en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA se han realizado diferentes investigaciones que han permitido aislar, seleccionar, producir, formular y evaluar cepas nativas de microorganismos altamente eficaces en el control de fitopatógenos. Es el caso del hongo nativo *Trichoderma koningiopsis* (cepa Th003), antes identificado como *Trichoderma koningii*. Con esta cepa se ha obtenido entre el 70% y el 100% de control en los siguientes patosistemas: *Pythium splendens* en frijol y pepino (Cotes, 1993); *R. solani* en frijol (Cotes, 1993); *R. solani* en papa (Beltrán *et al.*, 2007), *R. solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (Cotes *et al.*, 2001); *B. cinerea* y *Oidium* sp. en tomate (Moreno, 2003); *S. sclerotio-*

rum en lechuga y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar *et al.* 2004). Dichos modelos han involucrado actividades a nivel de laboratorio, pruebas experimentales en invernadero bajo condiciones controladas y a nivel de cultivos comerciales en campo abierto e invernadero.

Este fenómeno de protección se ha relacionado con varios mecanismos, los cuales se ilustran a continuación. Cuando *T. koningiopsis* (cepa Th003) fue aplicado en el suelo, se observó una correlación positiva entre la actividad de las enzimas exo- β -1,3 glucanasa y exoquitinasas producidas por este biocontrolador y el control del fitopatógeno del suelo *P. splendens* en frijol, sugiriendo que las enzimas producidas por *T. koningiopsis* en el suelo juegan un rol importante en la degradación de las paredes de los patógenos (Cotes *et al.*, 1994) (Figura 2).

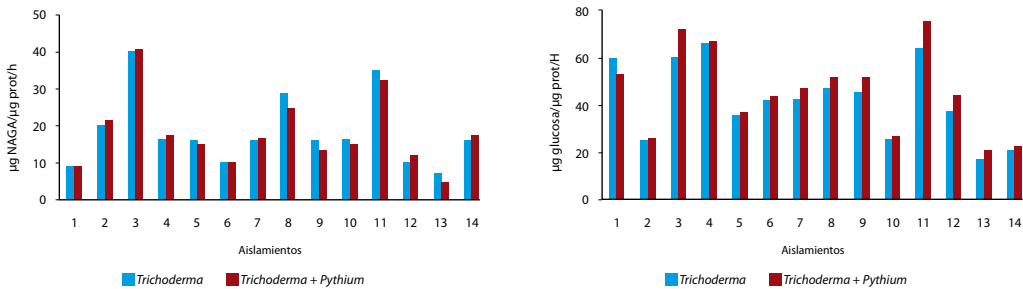


Figura 2. Determinación de la actividad quitinasa (A) y β -1,3 glucanasa (B) en extracto de suelo inoculado con 14 aislamientos de *Trichoderma* spp. o con *Trichoderma* spp. y *P. splendens*.

De otra parte, en diferentes experimentos se presentó también una correlación positiva (coeficiente de correlación 0,7) entre el tiempo de pregerminación de las semillas en presencia del antagonista, la actividad de enzimas de origen vegetal de tipo endo- β 1,3 glucanansas y endoquitinasas, y la protección conferida a las plantas de frijol, mostrando que *T. koningiopsis* puede estimular la producción de estas enzimas en el tejido vegetal, las cuales también podrían estar relacionadas con la degradación de la pared celular de los patógenos (Cotes *et al.*, 1996).

El efecto de las enzimas líticas de origen vegetal contra el patógeno fue posteriormente demostrado con esta misma cepa de *T. koningiopsis* en la interacción tomate - *F. oxysporum* (Clavijo y Cotes, 1998), y por otro lado, en investigaciones llevadas a cabo en las interacciones pepino cohombro - *P. splendens* (Jacqmin *et al.*, 1993), frijol - *R. solani* (Mezui *et al.*, 1994) y tomate - *R. solani*, tomate - *F. oxysporum* (Cotes *et al.*, 2001). Con esta cepa de *T. koningiopsis*, además de un control biológico efectivo ejercido contra estos patógenos, se presentó un fenómeno de inducción de crecimiento vegetal.

Tabla 1. Relación entre el tratamiento de semillas de frijol con celulasa, la colonización del tegumento por *Trichoderma* spp. y el efecto protector contra *P. splendens*.

Tratamiento en semilla	Colonización (UFC.g ⁻¹)		Protección (%)		
	Th003	Th013	Th003	Th013	Testigo relativo
Agua	8x10 ⁴	8x10 ³	100	6.8	3.2
Celulasa	1x5 ⁵	7x10 ⁴	100	83.2	43.2

El aislamiento Th003 de *T. koningiopsis* fue seleccionado por su alta actividad biocontroladora de *P. splendens* y se contrastó con el aislamiento Th013, que presentó una baja actividad biocontroladora.

La alta actividad biocontroladora que ha mostrado la cepa Th003 de *T. koningiopsis* frente a diferentes patógenos en diferentes especies vegetales, también ha estimulado el desarrollo de algunas investigaciones realizadas por miembros del mismo grupo, tendientes a dilucidar sus mecanismos de acción.

Es así como al estudiar la interacción *T. koningiopsis* - frijol - *P.splendens*, Cotes *et al.* (1996) demostraron que el control superior al 95% ejercido contra el fitopatógeno al fitoinvigorizar semillas

mediante pregerminación controlada de semillas en matriz sólida durante 24 horas en presencia del biocontrolador estuvo relacionado con varios fenómenos, entre ellos la colonización de los tegumentos por parte de *T. koningiopsis* mediada por la capacidad celulolítica de esta cepa (Tabla 1); el consumo de los exudados de la semilla; la producción de enzimas líticas de origen microbiano del tipo celulazas, exoquitinasas y exo-β-1,3 glucanasas, las cuales demostraron su habilidad para degradar la pared celular del patógeno (Figura 3); y la inducción en el hospedero de proteínas relacionadas por la patogénesis del tipo endoquitinasas y endo-β-1,3 glucanasas que también demostraron su habilidad para degradar la pared celular del patógeno (Figura 4), sugiriendo así un fenómeno de inducción de resistencia.

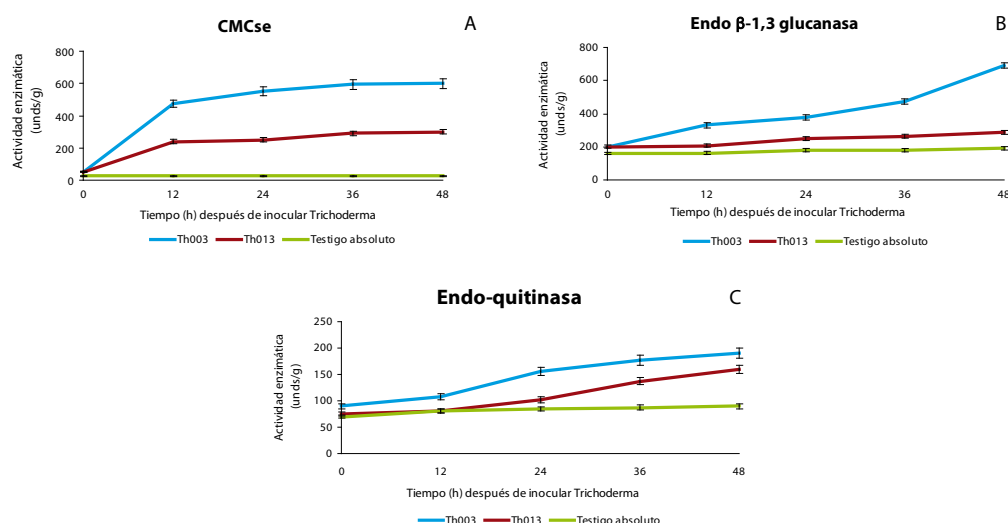


Figura 3. Actividad enzimática (Carboximetilcelulosa CMCse (A), endo-β-1,3 glucanasa (B) y endoquitinasa (C) en extractos de tegumentos de semillas inoculadas con *Trichoderma* (Th003 y Th013). La actividad enzimática está indicada como unidades.g-1 de semilla peletizada. La barra vertical indica el error estándar de la media (n: 9).

La resistencia inducida es el proceso por el cual las defensas de la planta son activadas de tal forma que cuando el patógeno infecta es rápidamente reconocido por la planta que desarrolla adecuadas defensas para restringir su desarrollo. La re-

sistencia inducida puede ser localizada (en ésta el sitio de inducción es la única parte de la planta con elevada resistencia) o puede ser sistémica (cuando la inducción en una parte de la planta lleva a la protección de la planta entera).

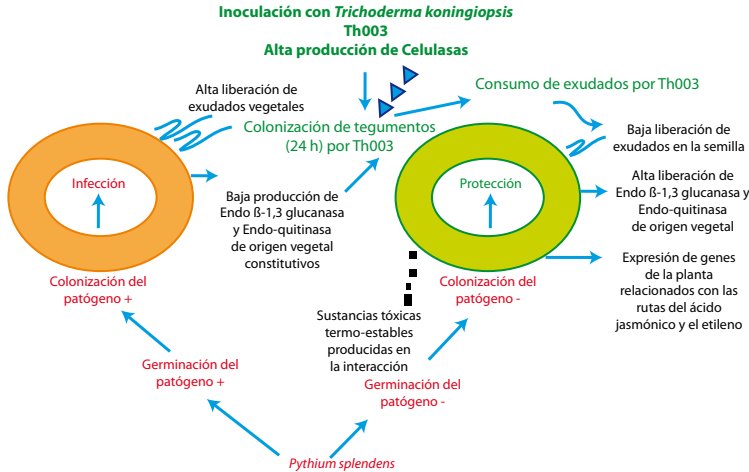


Figura 4. Modos de acción de *T. koningiiopsis* Th003 definidos para la interacción frijol - *P. splendens*. La expresión génica mencionada en el esquema es hipotética para frijol, ya que ésta fue demostrada en la interacción *T. koningiiopsis*-tomate - *F. oxysporum*.

La resistencia sistémica se divide en dos: 'resistencia sistémica adquirida' (SAR) o 'resistencia sistémica inducida' (ISR). La SAR es elicitada por patógenos necrótrofos que causan reacción hipersensible o por químicos tales como el ácido salicílico, el ácido indol acético (INA) o el ácido amino-butírico (BABA) (Ryu *et al.*, 2003). El tema de inducción de resistencia ha sido ampliamente estudiado en relación con las bacterias asociadas a las raíces, las cuales han demostrado que pueden aumentar la resistencia o los niveles de defensa de las plantas a un amplio espectro de patógenos (Whipps, 2001). Dichas bacterias viven en o dentro de las raíces de las plantas y se nutren de los exudados de las raíces (Pieterse *et al.*, 2002). Algunas cepas se conocen con el nombre de 'rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas' o PGPR (del inglés *plant growth-promoting rhizobacteria*) (Wei *et al.*, 1996), las cuales pueden ser usadas como biofertilizantes (Kennedy *et al.*, 2004). Estas bacterias producen efectos directos e indirectos sobre el crecimiento y sobre la resistencia a enfermedades (Kennedy *et al.*, 2004; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

La resistencia inducida por las bacterias es de tipo indirecto, eficiente contra plagas y enfermedades e incrementa la resistencia de la planta en los órganos aéreos al activar la formación de barreras físicas y químicas (Ryu *et al.*, 2003), fenómeno que es conocido como 'resistencia sistémica inducida' (Pieterse *et al.*, 2002). Su ruta de señalización es independiente del ácido salicílico, lo cual la hace diferente de la resistencia sistémica adquirida (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

En el caso de las PGPR se ha demostrado que el control biológico mediado por ISR es fundamentalmente diferente del control biológico debido al antagonismo. En el primero, un amplio rango de patógenos puede controlarse, dado que la protección ocurre en partes de la planta no tratadas o colonizadas por las PGPR; de tal forma que mientras las PGPR colonizan las raíces, una enfermedad foliar puede ser controlada por ISR. En este último caso, dado que las defensas generales del hospedero son activadas, una PGPR que elicita ISR puede provocar la supresión de múltiples patógenos—incluyendo hongos, bacterias, virus y nemátodos— e incluso en algunos casos suprimen

insectos. El estudio de la ISR elicitada por PGPR se ha concentrado en dilucidar las señales de las rutas metabólicas de la planta; sin embargo, evidencias preliminares sugieren que diferentes rutas metabólicas pueden activarse en las plantas, dependiendo de las cepas PGPR utilizadas y del patosistema estudiado.

Algunos géneros de hongos tales como *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Coniothyrium*, *Taloromyces* y *Ampelomyces* también han mostrado su habilidad para inducir resistencia sistémica en una gran variedad de cultivos (De Meyer *et al.*, 1998; Harman, 2001; Howell, 2003). Algunos de estos hongos pueden igualmente tener un efecto positivo sobre el crecimiento y la cosecha al aumentar la solubilidad y la toma de los nutrientes. La defensa sistémica adquirida ha sido ampliamente estudiada y varios genes han sido identificados (Maleck *et al.*, 2000; Glazebrook, 2001). La hipótesis que se ha formulado a partir de estos estudios es que una compleja red de rutas de señalización interdependientes lleva la información sobre la naturaleza del agresor al resto de la planta; no obstante, el conocimiento o entendimiento global de la resistencia de la planta y el control preciso de las relaciones entre las rutas de respuesta es todavía escaso. El reciente desarrollo de herramientas moleculares que permiten el análisis global de la expresión génica, admite responder las preguntas más globales y entender de manera integral fenómenos complejos como la resistencia de la planta o su defensa a fitopatógenos. Una de esas

herramientas son los microarreglos, los cuales permiten monitorear la expresión a nivel genómico (Mysore *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; López *et al.*, 2005).

Con el propósito de demostrar el fenómeno de inducción de resistencia de *T. koningiopsis* Th003, se utilizó el patosistema tomate - *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Para esto, se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) establecidas en cubos de enraizamiento con el sistema radical separado en dos porciones. Cuando Th003 se inoculó en una porción de la raíz 96h antes de inocular *F. oxysporum* en la otra porción, se presentó un retraso significativo de la colonización del fitopatógeno en el sistema vascular de la planta, en comparación con las plantas inoculadas solamente con el fitopatógeno. Este resultado demuestra que *T. koningiopsis* Th003 estimuló respuestas sistémicas de defensa en la planta, dado que el antagonista y el fitopatógeno permanecieron separados espacialmente. En un ensayo paralelo también se demostró la habilidad de *T. koningiopsis* para promover el crecimiento vegetal. Al utilizar microarreglos de tomate TOM1, se demostró que el tratamiento de las plantas con *T. koningiopsis* afectó los niveles de mRNA de 45 genes: 41 en raíces y 4 en hojas, siendo de particular interés la inducción de genes involucrados en las rutas del ácido jasmónico y del etileno. La expresión de los genes seleccionados fue validada utilizando PCR en tiempo real, demostrando correlación entre los dos métodos (Moreno *et al.*, 2009).

- Aluko, M. O.; Hering, T. F. (1970). The mechanism associated with the antagonistic relationship between *Corticium solani* and *Gliocladium virens*. *Trans. Br. Mycol. Soc* 55: 173 - 179.
- Beltrán, C.; Cotes, A. M.; Paris, A. (2007). Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* Kühn, in potato. *IOBC Bulletin Vol. 30* (6) 55 - 58.
- Bliss, D. E. (1951). The destruction of *Armillaria mellea* in *Citrus solis*. *Phytopathology* 41: 665-683.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma* – Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to plant Diseases Control*. I. Chet, ed. Jhon Wiley & Sons, New York. P. 137 - 160.
- Clavijo, G.; Cotes, A. M. (1998). Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate, mediante tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 1, No. 2, p. 58 - 66.
- Cotes (1993). Study of common bean protection against damping-off by treatment of seeds with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de doctorado. Universidad de Gembloux, Bélgica. 121 p.
- Cotes, A. M. ; Lepoivre, P.; Thonart, P. (1994). Relationship between the protective activities of several strains of *Trichoderma* against damping-off agents and their ability to produce hydrolytic enzymes activities in soil or in synthetic media. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 59/3a pp.931- 941.
- Cotes, A. M.; Lepoivre, P.; Semal, J. (1996). Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 497 - 506.
- Cotes, A.M.; Cárdenas, A.; Pinzón, H. (2001). Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici. *IOBC WPRS Bulletin Vol. 24* (3) 259 - 263.
- Elad, Y. and Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathology* 105:177 - 189.
- Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*. P. 709 - 714.
- De Meyer; Bigirimana, J., Elad, Y.; Hofte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 279 - 286.
- Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* – 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301 - 308.
- Harman, G. E. (2001). Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84: 377 - 393.
- Howell, C.R. (1982). Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings *Phytopathology* 72: 496 - 498.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the control *Pythium ultimum Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248 - 252.
- Howell, C. R.; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248 - 252.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma Species* in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease: Vol. 87* N° 1. P. 4 - 10.
- Instituto Colombiano Agropecuario ICA. (2009). Regulación y control de bioinsumos agrícolas – productos registrados. Oficina de coordinación de plaguicidas químicos de uso agrícola. Actualizado: 04 de febrero de 2009.
- Jacqmin, B. ; Cotes, A. M. ; Lepoivre, P.; Semal, J. (1993). Effect of the combination of seed priming and *Trichoderma* treatment on incidence of damping-off agents. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 58/3b, 1321 - 1328.
- Kennedy, I. R.; Choudhury, A. T. M. A.; Kecskes, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited *Soil Biology & Biochemistry* 36 (8): 1229 - 1244.
- Khan, J.; Ooka, J.; Miller, S. A.; Madden, L. V.; Hoitink, H. A. J. (2004). Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora crown rot* and leaf blight. *Plant Disease*. 88: 280 - 286.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Krause, M. S.; De Ceuster, T. J. J.; Ti-
quia, S. M.; Michel, F. C.; Madden, L.
V.; Hoitink, H. A. (2003). Isolation and
characterization of rhizobacteria
from composts that suppress the se-
verity of bacterial leaf spot of radish.
Phytopathology 93: 1292 - 1300.
- Lee, S.; Kim, S. Y.; Chung, E.; Joung,
Y. H.; Pai, H. S.; Hur, C. G.; Choi, D.
(2004). EST and microarray analyses
of pathogen-responsive genes in hot
pepper (*Capsicum annuum* L.) non-
host resistance against soybean
pustule pathogen (*Xanthomonas*
axonopodis pv. *glycines*). *Funct. Inte-
gr. Genomics* 4: 4.
- Lifshiz, R.; Windham, M. T.; Baker,
R. (1986). Mechanism of biological
control of preemergence damping-
off of pea by seed treatment with
Trichoderma spp. *Phytopathology*
76: 720 - 725.
- López, C.; Soto, M.; Restrepo, S.;
Piegu, B.; Cooke, R.; Delseny, M.; To-
hme, J.; Verdier, V. (2005). Cassava
gene expression profile in response
to *Xanthomonas axonopodis* pv.
manihotis infection using a cDNA
microarray. *Plant Molecular Biology*.
In press.
- Lorito, M.; Woo, S. L.; Fernández, I.
G.; Collucci, G.; Harman, G. E.; Pintor-
Toro, J. A.; Filippone, E.; Muccifora, S.;
Lawrence, C. B.; Zonia, A.; Tuzun, S.;
Scala, F. (1998). Genes from myco-
parasitic fungi as a source for im-
proving plant resistance to fungal
pathogens. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*
95: 7860 - 7865.
- Lumsden, R. D.; Locke, J. C.; Adkins,
S. T.; Walter, J. F.; Ridout, C. J. (1992).
Isolation and localization of the anti-
biotic gliotoxin produced by *Gliocladi-
um virens* from alginate prill in soil
and soilless media. *Phytopathology*
82: 230 - 235.
- Maleck, K.; Levine, A.; Eulgem, T.;
Morgan, A.; Schmid, J.; Lawton, K.
A.; Dangel, J. L.; Dietrich, R. A. (2000).
The transcriptome of *Arabidopsis*
thaliana during systemic acquired
resistance. *Nat. Genet.* 26: 403 - 10.
- Metcalfe, D. D. and Wilson, C.R. (2001).
The process of antagonism of Sclero-
tium cepivorum in white rot affect-
ed onion roots by *Trichoderma*
konigii. *Plant Pathol.* 50: 249 - 257.
- Mezui, J. C. ; Cotes, A. M. ; Lepoi-
vre, P. ; Semal, J. (1994). Evaluation
of seed priming and *Trichoderma*
treatment for the biological control
of damping-off agents. In *Diseases
and Insects in Forest Nurseries*. Ed.
INRA, Paris (Les Colloques, N° 68).
pp.189 - 196.
- Mysore, K. S.; D'Ascenzo, M. D.; He, X.;
Martin, G. B. (2003). Overexpression
of the disease resistance gene Pto
in tomato induces gene expression
changes similar to immune respon-
ses in human and fruitfly. *Plant Phy-
siology* 132: 1901 - 12.
- Moreno, V. C. A. (2003). Control bio-
lógico de enfermedades foliares
del cultivo del tomate (*Lycopersicon*
esculentum Mill.) con énfasis en mil-
deo polvoso (*Oidium* sp.). Trabajo de
grado. Ingeniero Agrónomo. Univer-
sidad Nacional de Colombia. 106 p.
- Moreno, C. A.; Castillo, F.; González,
A.; Bernal, D.; Jaimes, Y.; Chaparro,
M.; González, C.; Rodríguez, F.; Res-
trepo, S.; Cotes, A. M. (2009). Biolo-
gical and molecular characterization
of the response of tomato plants
treated with *Trichoderma konin-
giopsis*. *Physiological and Molecular
Plant Pathology*. Vol. 1 (1 - 10).
- Persello-Cartieaux, F.; Nussaume,
L.; Robaglia, C. (2003). Tales from
the underground: molecular plant-
rhizobacteria interactions. *Plant Cell
and Environment* 26 (2): 189 - 199.
- Pieterse, C. M. J.; Van Wees S. C. M.;
Ton, J.; Van Pelt, J. A.; Van Loon, L. C.
(2002). Signaling in rhizobacteria-
induced systemic resistance in *Ara-
bidopsis thaliana*. *Plant Biology* 4 (5):
535 - 544.
- Ryu, C. M.; Hu, C.H.; Reddy, M. S.;
Kloepper, J. W. (2003). Different sig-
naling pathways of induced resis-
tance by rhizobacteria in *Arabidop-
sis thaliana* against two *pathovars* of
Pseudomonas syringae. *New Phyto-
logist* 160 (2): 413 - 420.
- Sharon, E.; Bar-Eyal, M.; Chet, I.; He-
rrera-Estrella, A.; Kleifeld, O.; Spiegel,
Y. (2001). Biological control of the
root-knot nematode *Meloidogyne*
javanica by *Trichoderma harzianum*.
Phytopathology 91: 687 - 693.
- Sid Ahmad, A.; Sánchez, C. P.; Cande-
la, M. E. (2000). Evaluation of induc-
tion of systemic resistance in pepper
plants (*Capsicum annuum*) to *Phyto-
phthora capsici* using *Trichoderma*
harzianum and its relation with
capsidiol accumulation. *Eur. J. Plant.
Pathol.* 106: 817 - 824.
- Villamizar, L.; Moreno, C.; Paris, A.;
Cotes, A.; Garzón, C. (2004). Deve-
lopment of biopesticide prototypes
for controlling pathogens in vegeta-
bles. En: *Diseases Biocontrol. Inter-
national Workshop: Development
of biocontrol agents of diseases for
commercial applications in food
productions systems*. Book of ab-
stracts. Sevilla, España. Ediciones de
la UdL. pp. 136.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma*
lignorum on a parasite of other soil
fungi. *Phytopathology* 22: 837 - 845.
- Weindling, R. (1934). Studies on a
lethal principle effective in the para-
sitic action of *Trichoderma lignorum*
on *Rhizoctonia solani* and other soil
fungi. *Phytopathology* 24: 1153 -
1179.
- Wells, H. D.; Bell D. K. and Jaworski,
C. A. (1972). Efficacy of *Trichoderma*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfii*. *Phytopathology* 62: 442 - 447.
- Wei, G.; Kloepper, J.W. and Tuzun, S. (1996). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86: 221 - 224.
- Windham, M.; Elad, Y.; Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518 - 521.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and Biocontrol in the Rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487 - 511.
- Yedidia, I.; Benhamou, N. and Chet, I. (1999). Induction of defense in cucumber plants (*Cucumis sativas* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061 - 1070.
- Yedidia, I.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y. and Chet, I. (2000). Induction and accumulation of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant physiol. Biochem.* 38: 863 - 873.
- Zhang, J.; Howell, C.R. and Starr, J.L. (1996). Suppression of *Fusarium* colonization of cotton roots and *Fusarium* wilt by seed treatment with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. *Biocontrol. Sci. Technol.* 6:175 - 18.