

Sanidad Vegetal

Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas,
en colaboración con la Universidad Miguel Hernández

Nueva cepa de *Trichoderma harzianum*

- Un método para el control de calidad e identificación rápida del hongo *Trichoderma harzianum* en sus productos.

A. Martínez-Murcia, Ph. D.¹:
B. Pérez Martí, Ph. D.²

¹Unidad de Diagnóstico Molecular. Uiv. Miguel Hernández. Orihuela, Alicante
ammurcia@umh.es
²Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas S. L. Moncada, Valencia.
perez@iabiotec.com

Entre los hongos utilizados para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo, las especies de *Trichoderma* merecen una mayor atención. Los *Trichoderma* viven en asociación con plantas a las que protegen de la actividad de diversos hongos patógenos por diferentes caminos lo que complica el conocer en profundidad su forma de actuar.

Actuando como micoparásitos (Harman, 2000), producen enzimas que degradan las paredes celulares de las hifas y esclerocios del patógeno a la vez que excretan metabolitos con actividad antibiótica que inhiben el crecimiento de dichos hongos patógenos.

También actúan por mecanismos de competencia. Así, cuando entran en contacto con las raíces, las van cubriendo con su micelio, avanzando a medida que aquellas crecen y formando una barrera que las protege de la actividad de ciertos hongos patógenos. Su importancia ha llegado hasta el punto de insertar los genes de este hongo en plantas para proveerlas de re-

sistencia a diversas enfermedades (Lorito et al. 1998).

El tipado de cepas cobra especial relevancia en la agricultura al permitir hacer seguimientos de cepas registradas. Dado el extenso número de cepas de *Trichoderma harzianum*, es fundamental el uso de estas técnicas para la identificación de nuevas variedades o cepas y para el control de calidad de nuestros productos.

Una técnica genética utilizada en la identificación de especies y géneros de hongos es el análisis de polimorfismo de ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD), basada en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN nuclear mediante PCR, utilizando un único cebador de secuencia aleatoria y bajo peso molecular que, a muy baja temperatura, hibrida con la molécula de DNA en diferentes posiciones. Los fragmentos se analizan mediante electroforesis, obteniéndose un patrón genético ("fingerprinting") característico para cada organismo, ya que el número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de determinado ADN mediante RAPD se mantiene

constante siempre que se use el mismo cebador y se haga el estudio en las mismas condiciones. Los perfiles obtenidos permiten la diferenciación de ADNs a nivel de especie o incluso de individuo (Boekhout et al., 1998, Reiss et al. 1998, Roberts et al., 1992).

Métodos

Identificación de especie: El DNA extraído de un cultivo puro fue sometido a experimentos de identificación genética. El gen rDNA 16s se amplificó por PCR y se secuenció casi en su totalidad. Al compararlo con bases de datos se observó que se trataba de *Trichoderma harzianum*.

Tipado de las cepas: A partir del producto Tripromoter se creció *Trichoderma harzianum* en placas "rosa de bengala agar" para la obtención de biomasa fúngica, tras lo que se realizó la extracción y purificación del DNA mediante un protocolo optimizado para hongos. El tipado de las cepas se realizó mediante la técnica molecular RAPD.

Se llevaron a cabo experimentos para la puesta a punto de condiciones apropiadas para la reacción de RAPD, y



De izquierda a derecha, *Trichoderma* dosis normal con *Fusarium*, *Trichoderma* media dosis con *Fusarium*, sin *Trichoderma* con *Fusarium*, sin *Trichoderma* y sin patógeno.

Foto: Equipo de Soriano y Porras, Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria de la Universidad de Castilla-La Mancha.



Efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* frente a *Fusarium* sp. La placa de la derecha muestra el crecimiento de *Fusarium* sp. in vitro; la de la izquierda muestra la inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. por *Trichoderma harzianum*. Ambas fueron sembradas simultáneamente.

pruebas con diferentes cebadores para conseguir los que presentaran mayor polimorfismo y fuesen capaces de diferenciar mejor entre cepas. Finalmente se seleccionó el cebador TH2 para el tipado genético de *T. harzianum*.

Resultados y conclusiones

Mediante la tipificación del Tripromoter de I.A.B., se pone de manifiesto que la cepa es la misma en todos los lotes y diferente de las cuatro cepas de *Trichoderma harzianum* de referencia. Aislados de suelo recolectado, fueron identificados como *T. harzianum* mediante secuenciación del gen rDNA 16s.

El tipado genético garantiza la autenticidad de las cepas usadas en diferentes productos, así como la calidad de las mismas. Además, el traba-

Los *Trichoderma* viven en asociación con plantas a las que protegen de la actividad de diversos hongos patógenos por diferentes caminos lo que complica el conocer en profundidad su forma de actuar

jo ha permitido poner a punto un método de tipado inequívoco de gran utilidad para el control de calidad microbiológico de estos fungicidas.

Los métodos convencionales basados en técnicas de cultivo presentan varios problemas que los hacen menos útiles en la cadena de producción:

- Las reacciones bioquímicas son altamente variables, lo que impide la identificación exacta y segura de una cepa.

- Los resultados tardan días y para entonces ha finali-

zado la fermentación en la línea de producción, lo cual supone un riesgo elevado de pérdidas en la producción.

Este método da I.A.B. resultados inequívocos, identificando a nivel de cepa el microorganismo utilizado en la fermentación, controla con garantía la identidad del microorganismo en todo el proceso de producción, asegurando que el producto final contiene sólo la cepa con la que se inició la producción, evitando o detectando rápidamente posibles contaminaciones por otros microorganismos.

El análisis molecular permite detectar la cepa en productos similares. Además, se pueden aislar y comparar cepas tras su uso en campo, verificando si se trata de la misma cepa que la usada en el proceso industrial y evaluar su viabilidad en el medio ambiente.

El análisis molecular de los productos envasados de I.A.B. confirmará su calidad y homogeneidad en la cadena de producción. Otros argumentos que añaden valor comercial: certificación de calidad; control y rendimiento de la producción, evaluación de su efectividad y análisis microbiológico fiable y rápido.

Bibliografía

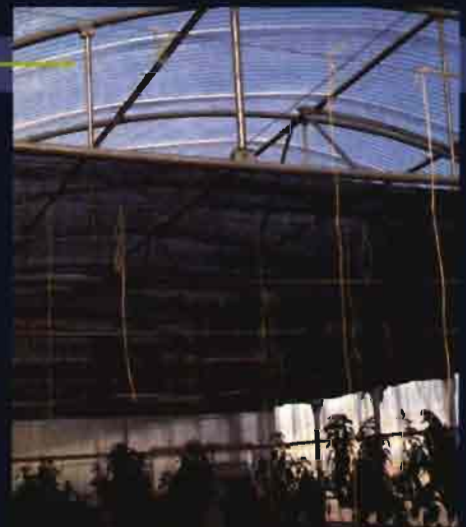
www.horticom.com?57389

Con vocación de servir



PLAST-TEXTIL, S.L. ofrece una amplia gama de productos al servicio de la agricultura y horticultura:

- **Mallas sombreo:** agrotexiles de protección solar. Gama que ofrece protección a partir del 30% hasta el 90%
- **Mallas antigranizo**
- **Mallas protección lluvias, escarcha y heladas**
- **Mallas antitrip:** agrotexiles de protección frente a insectos
- **Malla suelo:** agrotexiles para el revestimiento del suelo
- **Mallas cortavientos:** agrotexiles protección viento y salinidad
- **Mantones:** agrotexiles para la recolección de frutos -almendra, aceituna, etc.-, con una extensa gama de tamaños.



Plast-Textil
AGROTEXTILES

Polígono Industrial, s/n - 46869 ADZANETA DE ALBAIDA (Valencia) - España
Tels.: +34-96 235 90 01 / 235 90 05 / 235 70 17
Fax: +34-96 235 70 57
e-mail: info@plastextil.com - <http://www.plastextil.com>

