

UCH-FC
B. Ambiental
C 133
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

Efecto de la competencia interespecífica sobre el éxito de invasión de *Trichoderma harzianum*

Seminario de Título
entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de
Biólogo con mención en Medio ambiente

MARCOS VINICIUS CAIAFA SEPÚLVEDA

Julio 2016

Santiago-Chile

Directora del Seminario de Título: Dra. Margarita Carú
Co-directora del Seminario de Título: Dra. Julieta Orlando



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Marcos Vinicius Caiafa Sepúlveda

“Efecto de la competencia interespecífica sobre el éxito de invasión de *Trichoderma harzianum*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente.

Dra. Margarita Carú
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de la Dra. Margarita Carú sobre una línea horizontal.

Dra. Julieta Orlando
Co-Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de la Dra. Julieta Orlando sobre una línea horizontal.



Comisión de Evaluación

Dr. Marcelo Baeza
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul del Dr. Marcelo Baeza sobre una línea horizontal.

Dra. Alejandra González
Evaluadora

Firma manuscrita en azul de la Dra. Alejandra González sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, 13 de julio de 2016

BIOGRAFIA

Soy Marcos Vinicius Caiafa Sepúlveda, nací en La Serena el 26 de julio de 1990. Desde muy temprana edad desarrollé un gran interés por conocer y entender la naturaleza. En el año 1997 ingresé a primero básico en la Escuela Experimental de Música "Jorge Peña Hen", institución donde realicé mis estudios hasta cuarto medio. En el año 2009, gracias al apoyo incondicional de mi familia, me mudé a



Santiago para ingresar a Biología Ambiental en la Universidad de Chile. Allí tuve la oportunidad de trabajar en distintitos laboratorios lo que me permitió tener una mayor claridad sobre mi área de interés. En el año 2013 ingresé al laboratorio de Ecología Microbiana para realizar una unidad de investigación bajo la dirección de la Dra. Julieta Orlando. Laboratorio donde permanecí para desarrollar mi seminario de título bajo la dirección de la Dra. Margarita Carú.

ÍNDICE GENERAL

Biografía.....	ii
Índice de figuras.....	iv
Abreviaturas.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	5
Resultados.....	11
Discusión.....	30
Conclusiones.....	37
Bibliografía.....	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de enfrentamientos duales.....	8
Figura 2. Esquema de ensayos de invasión.....	9
Figura 3 Curvas de velocidad de crecimiento versus concentración de sustrato....	15
Figura 4 Secuencia de fotografías de los enfrentamientos entre <i>Trichoderma harzianum</i> (Th) y <i>Paecilomyces variotii</i> en placas con diferentes concentraciones de VM.....	17
Figura 5 Secuencia de fotografías de los enfrentamientos entre <i>Trichoderma harzianum</i> (Th) y <i>Paecilomyces variotii</i> (Pv) en placas con diferentes concentraciones de PD	18
Figura 6 Fotografías y recuentos de esporas de los enfrentamientos duales entre <i>Paecilomyces variotii</i> (Pv) y <i>Trichoderma harzianum</i> (Th)	20
Figura 7 Secuencia de fotos de los enfrentamientos entre <i>Trichoderma harzianum</i> (Th) y <i>Trichoderma novaezelandeae</i> (Tn) en placas con diferentes concentraciones de VM.....	22
Figura 8 Secuencia de fotos de los enfrentamientos entre <i>T. harzianum</i> (Th) y <i>T. novaezelandeae</i> (Tn) en placas con diferentes concentraciones de PD.....	23
Figura 9 Fotografías y recuentos de esporas de los enfrentamientos duales entre <i>Trichoderma novaezelandeae</i> (Tn) y <i>Trichoderma harzianum</i> (Th).....	24
Figura 10 Perfil de DGGE de las tres especies fúngicas: <i>P. variotii</i> (Pv), <i>T. novaezelandeae</i> (Tn) y <i>T. harzianum</i> (Th).....	25
Figura 11 Abundancias relativas de los componentes fúngicos en los microcosmos utilizando Vogel con D-manitol como medio de cultivo	26

Figura 12 Producción de esporas de hongos crecidos en microcosmos utilizando VM como medio nutritivo a baja (0,1% p/v) y alta (2% p/v) concentración de la fuente de carbono.....	28
Figura 13 Abundancias relativas de los tres hongos en microcosmos utilizando PD como medio nutritivo.	29
Figura 14 Producción de esporas de hongos crecidos en microcosmos utilizando PD como medio nutritivo a baja (0,1% p/v) y alta (2% p/v) concentración de nutrientes.....	30

ABREVIATURAS.

- DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante)
- DNA: Deoxyribo Nucleic Acid (Ácido Desoxiribo Nucleico)
- RNA: RiboNucleic Acid (Ácido RiboNucleico)
- PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- PDA: Potato Dextrose Agar (Agar Papa Dextrosa)
- PDB: Potato Dextrose Broth (Caldo de Papa Dextrosa)
- PB: Medio no definido Papa-Dextrosa
- Pv: *Paecilomyces variotti*
- TAE: Tris Acetato EDTA
- TE: Tris EDTA
- Th: *Trichoderma harzianum*
- Tn: *Trichoderma novaezelandeae*
- EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilén DiaminoTetra-acético)
- SDS: Sodium Dodecyl Sulphate (Dodecil Sulfato de Sodio)
- VM: Medio salino Vogel suplementado con D-manitol

Resumen

La evidencia empírica sugiere que el resultado de una invasión biológica es una función de la presión de propágulos, las características abióticas del ecosistema invadido y las características bióticas de la comunidad receptora y la especie invasora. Aunque existen muchos estudios sobre la ecología de invasión de animales y plantas, hay pocos estudios en microorganismos invasores. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la competencia interespecífica sobre el éxito del invasor *T. harzianum* en un contexto de baja y alta disponibilidad de nutrientes. Para ello se seleccionaron dos especies fúngicas para conformar una comunidad experimental receptora. Se cultivaron las especies en un medio definido y otro no definido a distintas concentraciones. Luego se realizaron enfrentamientos duales en medio sólido entre *T. harzianum* y los hongos de la comunidad experimental bajo condiciones de baja y alta concentración de nutrientes utilizando medios definidos y no definidos. Finalmente, utilizando los mismos medios de cultivo pero en estado líquido, se realizaron ensayos de invasión en microcosmos, en los cuales se inocularon esporas del invasor *T. harzianum* en la comunidad experimental previamente montada en microcosmos.

Las curvas de crecimiento obtenidas muestran que *T. harzianum* presenta la mayor velocidad de crecimiento en ambos tipos de medio, esta diferencia es más clara a mayores concentraciones de nutrientes en los medios de cultivo. Los resultados de los enfrentamientos muestran que la invasividad de *T. harzianum* es mayor cuando éste crece en condiciones de alta concentración de nutrientes, este resultado se observa tanto en medios definidos como no definidos. Por otra parte, los resultados de los ensayos en microcosmos indican que *T. harzianum* no logra establecerse bajo ninguna de las condiciones experimentales. Sin embargo, se observa el efecto de la competencia interespecífica entre los hongos de la comunidad experimental.

ABSTRACT

Empirical evidence suggests that biological invasion outcome is a function of propagule pressure, the abiotic characteristics of the invaded ecosystem and the biotic characteristics of the recipient community and invading species. Although exist many studies about animals and plants invasion ecology, there are few studies on invasive microbes. The aim of this study is evaluate the effect of interspecific competition on establishment of the fungal invasor *Trichoderma harzianum* in conditions of low and high resource supply.

For this purpose two fungal species were selected to form an experimental community. The species were cultivated in a defined medium and other not defined at different concentrations. Then were dual clashes in Petri dishes between *T. harzianum* and fungi of the community pilot under conditions of low and high concentration of nutrients using media-defined and not defined. Finally, using the same culture media, tests were performed of invasion in microcosm, in which were inoculated spores of the invader *T. harzianum* in the experimental community in microcosm. Growth curves obtained show that *T. harzianum* presents the largest rate of growth in both types of medium, the difference is clearer at higher concentrations. Results from the clashes show the invasiveness of *T. harzianum* is greater when this grows in conditions of high concentration of nutrients, this result is observed both in media defined as not defined. On the other hand, results from trials in microcosm suggest that *T. harzianum* fails to be established under any of the experimental conditions. However, there is the effect of the interspecific competition between fungi of the experimental community.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Convención de Diversidad Biológica (www.cbd.int), una especie invasora es aquella que ha sido introducida o diseminada más allá de su área de distribución natural y su potencial de dispersión, constituyendo una amenaza para la diversidad biológica local. En este sentido, diversos estudios han mostrado el papel que juegan las invasiones biológicas en la pérdida de biodiversidad y en la alteración de procesos ecosistémicos (McKinney y Lockwood 1999; Sala y col. 2000).

En una revisión reciente, Catford y col. (2009) señalan numerosas hipótesis que intentan explicar el éxito de las invasiones biológicas, detectando un alto grado de redundancia en ellas y pudiendo esbozar como los principales factores determinantes: la presión de propágulos, las características biológicas de la especie invasora, las características abióticas del ambiente receptor y las características biológicas de la comunidad receptora.

Entre los estudios que abordan las características abióticas del ambiente receptor, se puede destacar el modelo propuesto por Davis y col. (2000) que plantea que la susceptibilidad a la invasión de una comunidad aumenta a medida que aumenta la disponibilidad de recursos, ya sea por un aumento en el aporte de nutrientes, por una disminución en el consumo de nutrientes o ambas.

Por otra parte, entre los factores bióticos que afectan el éxito de una especie invasora se puede mencionar el efecto mutualista que pueden tener las especies de la comunidad receptora favoreciendo el establecimiento de invasores, o interacciones antagónicas que pueden generar una resistencia biótica a los invasores (Callaway y col. 2004; Levine y col. 2004).

Sin embargo, la mayoría de estas hipótesis han derivado del estudio de invasiones de plantas y animales, donde se ha centrado gran parte del esfuerzo investigativo, pero existen muy pocos estudios que busquen entender los factores determinantes de las invasiones microbianas, entre ellas las invasiones fúngicas y sus efectos (Desprez-Loustau y col. 2007).

La utilización de hongos como modelos de estudio de invasiones biológicas se presenta como un importante desafío, ya que no solo constituye un aporte a la comprensión de las invasiones microbianas sino también, a la posibilidad de trabajar con comunidades experimentales que permiten poner a prueba algunas de las hipótesis propuestas.

Los estudios de invasiones microbianas son escasos, probablemente, debido a que los microorganismos son considerados esencialmente cosmopolitas con altos niveles de dispersión (Martiny y col. 2006). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que algunos microorganismos exhiben rangos de distribución limitados (Whitaker y col. 2003; Martiny y col. 2006; Telford y col. 2006) por lo que una distribución no cosmopolita abre la posibilidad de que los microorganismos puedan invadir nuevos hábitats con las consecuencias ecológicas que esto puede tener (Litchman 2010).

Por esta razón, la utilización de un modelo de invasión fúngica resulta importante ya que los hongos son componentes relevantes de la microbiota, con una alta diversidad de especies (Hawksworth 2001; Blackwell 2011), las cuales participan en los ciclos biogeoquímicos y en el recambio de nutrientes especialmente en ambientes áridos (Collins y col. 2008). Algunos autores han sugerido que en los suelos semiáridos, la microbiota y la macrobiota pueden estar funcionalmente integradas a través de una gran red fúngica ("fungal loop") la cual mejora la fertilidad del suelo,

optimiza la utilización de nutrientes y mantiene la humedad del suelo (Collins y col. 2008; Green y col. 2008).

A pesar de que la ecología de invasiones no ha puesto mucha atención a los hongos (Pyšek y col. 2008), se han descrito algunas especies invasoras como el fitopatógeno *Phytophthora cinnamomi* introducido en Australia, o el hongo tóxico *Amanita phalloides* introducido en Norteamérica (Desprez-Loustau y col. 2007).

En este estudio se busca evaluar el papel que cumple la competencia por nutrientes limitados en una invasión fúngica, para ello se utilizó como invasor al hongo cosmopolita *Trichoderma harzianum*. Con este hongo se han desarrollado diversos productos de uso agrícola para el control biológico de hongos fitopatógenos, por lo que se cuenta con información sobre su capacidad para competir con y depredar a otras especies fúngicas (Wardle y col. 1993; Druzhinina y col. 2011). Además, se sabe que *T. harzianum* posee una gran capacidad para colonizar nuevos hábitats y competir con especies fúngicas residentes (Hjeljord y Tronsmo 1998), un ejemplo de ello son los estudios de Zadworny y col. (2004) y De Jaeger y col. (2010) en los que se demuestra cómo *T. harzianum* puede parasitar a otros hongos beneficiosos para las plantas como lo son los hongos ectomicorrícicos y micorrizas arbusculares. Estas características, hacen de *T. harzianum* un buen modelo de invasor para la realización de ensayos en comunidades fúngicas experimentales.

Para evaluar la capacidad invasora de *T. harzianum* se utilizará una comunidad receptora experimental mínima compuesta de dos especies fúngicas: *Paecilomyces variotii* y *Trichoderma novaezelandeae*. Estas especies son comunes de encontrar en suelos agrícolas y en el caso de *P. variotii* es utilizada como agente biocontrolador (Druzhinina y col. 2011; Suárez-Estrella y col. 2013). Para determinar si la competencia es el factor que determina el éxito del invasor, se evaluará el comportamiento de *T.*

harzianum en enfrentamientos duales con las especies de la comunidad receptora y en un ensayo de microcosmos, bajo distintas condiciones de disponibilidad de nutrientes. Se espera que una menor disponibilidad de nutrientes genere mayor competencia por los recursos, reduciendo el éxito del invasor, por el contrario una mayor disponibilidad de nutrientes reduciría la intensidad de la competencia favoreciendo la colonización del invasor.

Hipótesis

Si el éxito de una especie invasora depende de sus habilidades para competir con la comunidad residente por los recursos disponibles, entonces *T. harzianum* será más exitoso para colonizar cuando hay una reducción de la intensidad de competencia entre el invasor y la comunidad residente.

Objetivo General

Determinar el efecto de la competencia interespecífica sobre el éxito de invasión de *T. harzianum* en un contexto de baja y alta disponibilidad de nutrientes.

Objetivos específicos

- a) Determinar las velocidades de crecimiento de los aislados fúngicos seleccionados a distintas concentraciones de nutrientes para definir las condiciones de cultivo en contextos de alta y baja disponibilidad de nutrientes.
- b) Determinar el éxito reproductivo (producción de esporas) de los aislados fúngicos en enfrentamientos duales entre *T. harzianum* y los hongos de una comunidad experimental en contextos de baja y alta disponibilidad de nutrientes.
- c) Determinar el establecimiento del *T. harzianum* en una comunidad fúngica experimental en contextos de baja y alta disponibilidad de nutrientes.
- d) Determinar el efecto del invasor sobre la abundancia relativa de los miembros de la comunidad residente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas fúngicas, cultivo de los hongos y determinación de la utilización de fuentes de carbono

Las especies fúngicas utilizadas fueron *Trichoderma harzianum* (Th), *Paecilomyces variotii* (Pv) y *T. novaezealandeae* (Tn). Estas especies son parte del cepario de hongos del laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Las cepas se mantuvieron en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) y se incubaron a 25°C. La utilización de D-manitol para los ensayos posteriores se definió a partir de perfiles metabólicos en placas FF-Biolog™, por ser una fuente consumida por las tres especies. En contraste, se utilizó el medio Papa-Dextrosa como medio rico no definido.

2.2. Curvas de Crecimiento

Las especies fúngicas se cultivaron en dos medios: medio salino Vogel suplementado con D-manitol (VM) y medio no definido Papa-Dextrosa (PD) a distintas concentraciones (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 % p/v). Cada cultivo fúngico se preparó en frasco de 50 mL con 15 mL de medio de cultivo inoculado con 10^2 esporas. Luego, se incubaron a 25°C con agitación a 150 rpm. El peso seco se midió cada 24 horas a partir del tercer día después de la inoculación. Los cultivos se realizaron en duplicado y para cada medición se utilizaron muestras independientes (muestras destructivas). Las velocidades de crecimiento de las especies fúngicas a las distintas concentraciones de nutrientes en los medios de cultivo se determinó a partir de las curvas de peso seco versus tiempo. Una vez calculadas las velocidades de crecimiento en las distintas concentraciones, se ajustaron al modelo cinético de Monod.

2.3. Enfrentamientos duales

Los enfrentamientos duales se realizaron en medio sólido entre las siguientes especies fúngicas: 1) *P. variotii* / *T. harzianum* y 2) *T. novaezelandeae* / *T. harzianum*, utilizando

Los enfrentamientos se realizaron en dos tipos de medio, uno con una baja disponibilidad de nutrientes (VM y PD 0,1%) y otro con una alta disponibilidad de nutrientes (VM y PD 2%). Cada placa se inoculó con 10^2 esporas de cada especie de hongo en dos puntos a 4 cm el uno del otro (Figura 1).

Las placas se incubaron durante 10 días a 25°C, se monitoreó el enfrentamiento tomando fotografías diariamente, y al término de la incubación se cortaron dos trozos de gel equivalente a $0,3 \text{ cm}^2$ en la zona de enfrentamiento de cada colonia (Figura 1).

Luego, se re-suspendió cada trozo de gel en 1 mL de agua destilada, se agitó por 5 minutos para posteriormente cuantificar el número de esporas en una cámara de Neubauer. Las esporas de las especies fúngicas estudiadas son distinguibles morfológicamente al microscopio (ver Anexo). Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de Mann-Whitney.

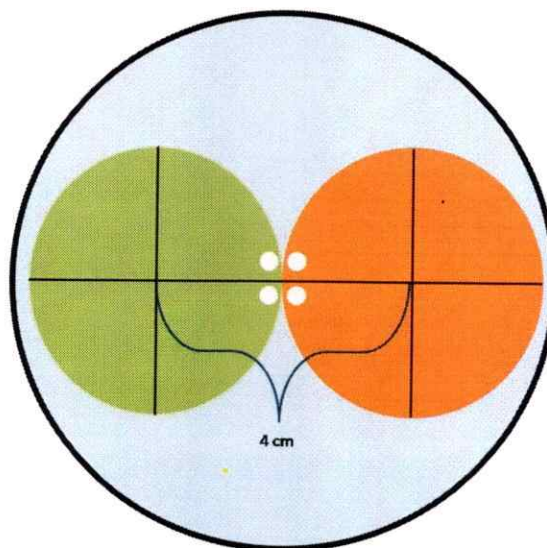


Figura 1. Esquema de enfrentamientos duales, el centro de una colonia se encuentra a 4 cm de la otra. En blanco, una representación de los cortes de gel realizados en la zona de enfrentamiento de las colonias fúngicas.

2.4. Ensayo de invasión de *Trichoderma harzianum* en microcosmos

Con el objetivo de ensayar la invasión de *T. harzianum* en una comunidad experimental, se conformaron comunidades compuestas por los hongos *P. variotii* y *T. novaezelandeae* de manera de poder determinar el éxito del invasor en condiciones de baja y alta concentración de nutrientes.

Las comunidades experimentales se construyeron en microcosmos usando 0,3 g de lana de roca estéril como sustrato, en botellas de vidrio con una proporción de 1:5 (v:v) sustrato:aire. El sustrato estéril y libre de materia orgánica se enriqueció con el correspondiente medio de cultivo a la concentración preestablecida hasta alcanzar un 60% de la capacidad de retención de agua. A partir de ellos, se realizaron los tratamientos, por triplicado, considerando un diseño factorial en que los factores fueron:

medio de cultivo a baja y alta concentración de nutrientes, presencia (+I) o ausencia (-I) del invasor, y tres tiempos de muestreo (0, 4 y 10 días post-invasión) (Figura 2).

Los hongos de la comunidad se inocularon en los medios de baja y alta concentración de nutrientes a una concentración de 10^5 esporas/g de sustrato y se incubaron a 25°C durante 48 h antes de la invasión por *T. harzianum*. En el t0 dpi (días post invasión) se inoculó el invasor a una concentración de 10^5 esporas/g de sustrato. Cada ensayo se realizó en triplicado.

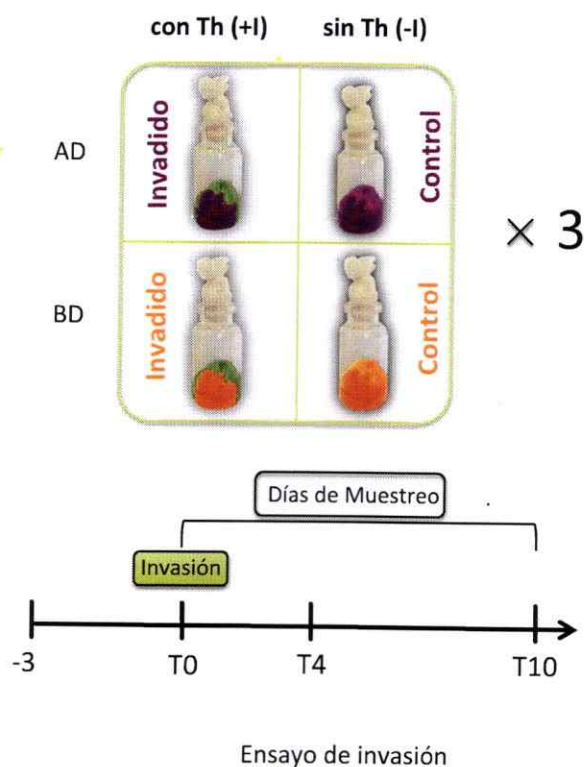


Figura 2. Esquema de ensayos de invasión. La comunidad experimental compuesta por *T. novaezelandeae* y *P. variotii* (Tn + Pv), se ensambló 3 días previos a la invasión (-3) y se incubó en dos medios distintos, ambos con alta (AD) y baja (BD) concentración de nutrientes. El T0 indica el momento de la invasión, mientras que el T4 y el T10 corresponden a 4 y 10 días post-

invasión (dpi) por *T. harzianum* (Th), respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.5. Monitoreo de la comunidad experimental

Para evaluar la invasión de *T. harzianum* (Th) en la comunidad fúngica experimental compuesta por *P. variotii* (Pv) y *T. novaezelandeae* (Tn) se realizaron dos aproximaciones experimentales: i) se determinó la producción de esporas de las tres especies fúngicas y ii) se determinó la abundancia relativa de cada una de ellas mediante perfiles de DGGE de los amplicones correspondientes a la región intergénica (ITS2) que separa los genes ribosomales 5,8S y 28S.

2.5.1. Producción de esporas

Para cuantificar la presencia de cada componente de la comunidad y el invasor, se determinó la producción de esporas de cada uno (los hongos seleccionados producen esporas distinguibles morfológicamente que permiten su cuantificación diferencial). A partir de una suspensión de 1 mL de cada uno de los microcosmos se cuantificaron esporas en una cámara de Neubauer para determinar la producción de propágulos de los hongos de la comunidad y del hongo invasor.

2.5.2. Perfiles de DGGE

Para detectar los cambios producidos en la abundancia relativa de los componentes de las comunidades (control e inoculada) durante el tiempo de incubación de los microcosmos, se procedió a amplificar la región ITS2 que separa los genes del RNA ribosomal 5.8S y 28S. La mezcla de amplicones se separó mediante DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Para evaluar el efecto del invasor se compararon los perfiles de DGGE y se determinó la proporción relativa de cada

amplificación. Para ello, el DNA de cada muestra se purificó utilizando el "Power soil DNA Isolation Kit" (MoBio Laboratories, Inc) según las indicaciones del fabricante. El DNA extraído se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v), en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8,0), y teñidos con GelRed™ (Biotium) para determinar la calidad e integridad del DNA. La concentración de DNA obtenida de cada muestra se determinó espectrofotométricamente usando un lector Epoch (Biotek). Para las reacciones de amplificación por PCR se utilizó GoTaq® Green Master Mix 1X (Promega) y los partidores ITS3 con GC clamp (ITS3GC) e ITS4, los cuales permiten amplificar la región ITS2 del DNA genómico de hongos (White y col. 1990; Nikolcheva y col. 2005). El partidador ITS3GC tiene una secuencia idéntica a ITS3, a excepción de su extremo 5' el cual posee una cola GC de 40-pb ("GC clamp") necesaria para realizar el ensayo de DGGE (Muyzer y col. 1993). El tamaño esperado para los productos de PCR corresponde a 370 pb, el cual fue corroborado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) teñidos con GelRed™, previo al análisis por DGGE.

Para los perfiles de DGGE, los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida al 8% (p/v) en de buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM), con un gradiente desnaturalizante de 45% a 60% (100% de desnaturalización correspondiente a 40% de formamida y 7M urea). La corrida electroforética se realizó a 58°C, 50V por 16 h y los geles se tiñeron con GelStar® Nucleic Acid Gel Stain. Las imágenes del gel se registraron bajo luz UV con una cámara digital marca Olympus.

Con las imágenes obtenidas, se determinó la concentración de DNA de cada banda. Para ello se midió la intensidad de las bandas utilizando el programa ImageJ versión 1.48. La intensidad de las bandas correspondientes a cada microcosmos se normalizó respecto a la intensidad de las bandas de una mezcla control equimolar, formada por los extractos de DNA de los tres aislados fúngicos. Luego, utilizando los valores de la

concentración de DNA de los extractos de cada microcosmos, se determinó la abundancia relativa de cada especie de hongo en los microcosmos.

RESULTADOS

Crecimiento de los hongos bajo las distintas condiciones de cultivo

Cada especie fúngica se cultivó a distintas concentraciones de la disponibilidad de nutrientes en los medios de cultivo utilizados, y se construyó una curva de crecimiento para cada caso (datos en anexo). A partir de las curvas de crecimiento se determinó la velocidad de crecimiento en las distintas condiciones de cultivo. Con estos datos se construyeron las curvas de velocidad de crecimiento versus concentración de sustrato de *T. novaezelandeae* (Tn), *P. variotti* (Pv) y *T. harzianum* (Th) en los dos medios de cultivo (VM: medio salino Vogel suplementado con D-Manitol y PD: medio no definido Papa-Dextrosa). Todas las curvas de crecimiento, se ajustaron al modelo de Monod, calculándose la velocidad máxima de crecimiento ($V_{m\acute{a}x}$); la concentración a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima (K_s), y el coeficiente de determinación R^2 (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de ajuste de las curvas de acuerdo al modelo de Monod

	VM			PD		
	Tn	Pv	Th	Tn	Pv	Th
$V_{m\acute{a}x}$	14,01	4,11	33,43	3,62	2,38	5,80
K_s	0,46	0,10	0,84	0,07	0,34	0,60
R^2	0,81	0,89	0,97	0,84	0,92	0,86

Para el cultivo VM, *T. harzianum* presentó mayor crecimiento comparado con las otras dos especies fúngicas en todo el rango de concentraciones ensayadas, pero sin alcanzar su velocidad máxima de crecimiento. Las otras dos especies de hongos alcanzaron su máxima velocidad de crecimiento entre el VM 1% y el VM 2% (Figura 3).

Cuando los hongos se cultivaron en medio PD, la velocidad máxima de crecimiento para *T. novaezelandeae* y *P. varioti*, se alcanzó entre el PD 1% y el PD 2%; en el caso de *T. harzianum*, en PD2% no alcanzó su velocidad máxima de crecimiento. Cabe destacar que las tres especies fúngicas exhibieron una menor velocidad de crecimiento en el medio PD comparada con aquella obtenida en medio VM. De acuerdo a los resultados observados, se determinó realizar los experimentos de invasión y los enfrentamientos duales a dos concentraciones de nutrientes (0,1% y 2%) para ambos medios de cultivo (VM y PD) (Figura 3).

3

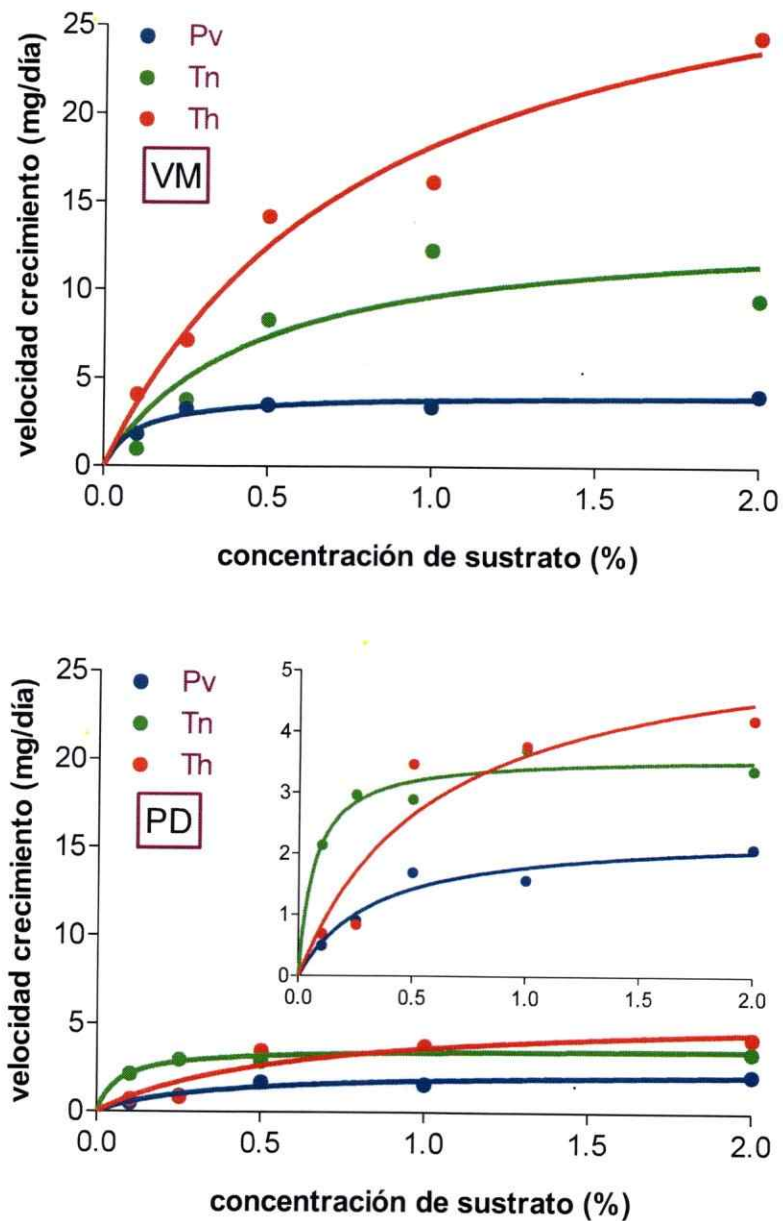


Figura 3. Curvas de velocidad de crecimiento versus concentración de sustrato de *Trichoderma novaezealandae* (Tn), *Paecilomyces variotti* (Pv) y *T. harzianum* (Th) en dos medios de cultivo (VM: medio salino Vogel suplementado con D-Manitol y PD: medio no definido Papa-Dextrosa).

Enfrentamientos duales

Para evaluar el comportamiento de *T. harzianum* con cada una de las especies que componen la comunidad, se analizaron los respectivos enfrentamientos duales en placas con los medios de cultivo sólidos (VM y PD) a las distintas condiciones nutricionales determinadas (0,1% y 2%).

En los enfrentamientos entre *T. harzianum* y *P. variotii* se puede observar que, en todas las condiciones de cultivo, el primero presentó mayor crecimiento radial que el segundo. Cuando se compara el crecimiento de *T. harzianum* en los diferentes medios de cultivo, no se observan diferencias importantes en su crecimiento miceliar, aunque en PD el micelio presenta una coloración más intensa. En el caso de *P. variotii*, llama la atención que en medios con baja disponibilidad de nutrientes (0,1%) el micelio creció muy compacto y se formó un halo de inhibición en la zona de contacto con *T. harzianum*. En cambio, en los medios con alta concentración de nutrientes (2%) el micelio de *T. harzianum* presentó un alto crecimiento, llegando incluso a invadir el micelio de *P. variotii* (Figuras 4 y 5). Por otro lado, en los enfrentamientos realizados a bajas concentraciones de nutrientes, aunque *T. harzianum* presenta un mayor crecimiento que *P. variotii*, no logra invadir la colonia. Esto sugiere que la invasividad de *T. harzianum* se ve limitada cuando éste se encuentra en condiciones nutricionales limitantes. Por el contrario, cuando se encuentra en un medio rico en nutrientes, tiene un crecimiento mucho mayor y su invasividad también es mayor.

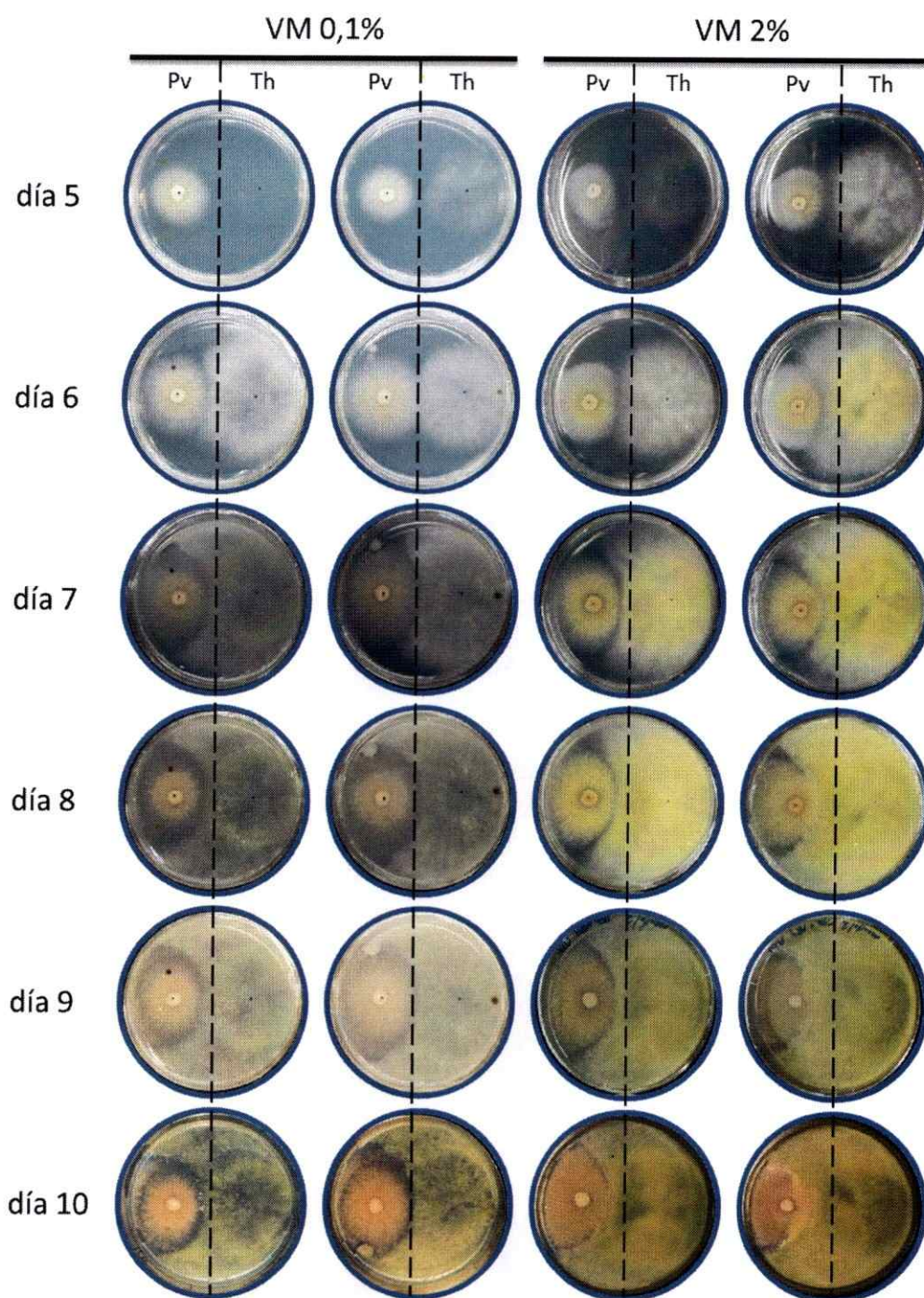


Figura 4. Secuencia de fotos de los enfrentamientos entre *Trichoderma harzianum* (Th) y *Paecilomyces variotii* a diferentes tiempos de incubación. VM: medio salino Vogel suplementado con D-Manitol.

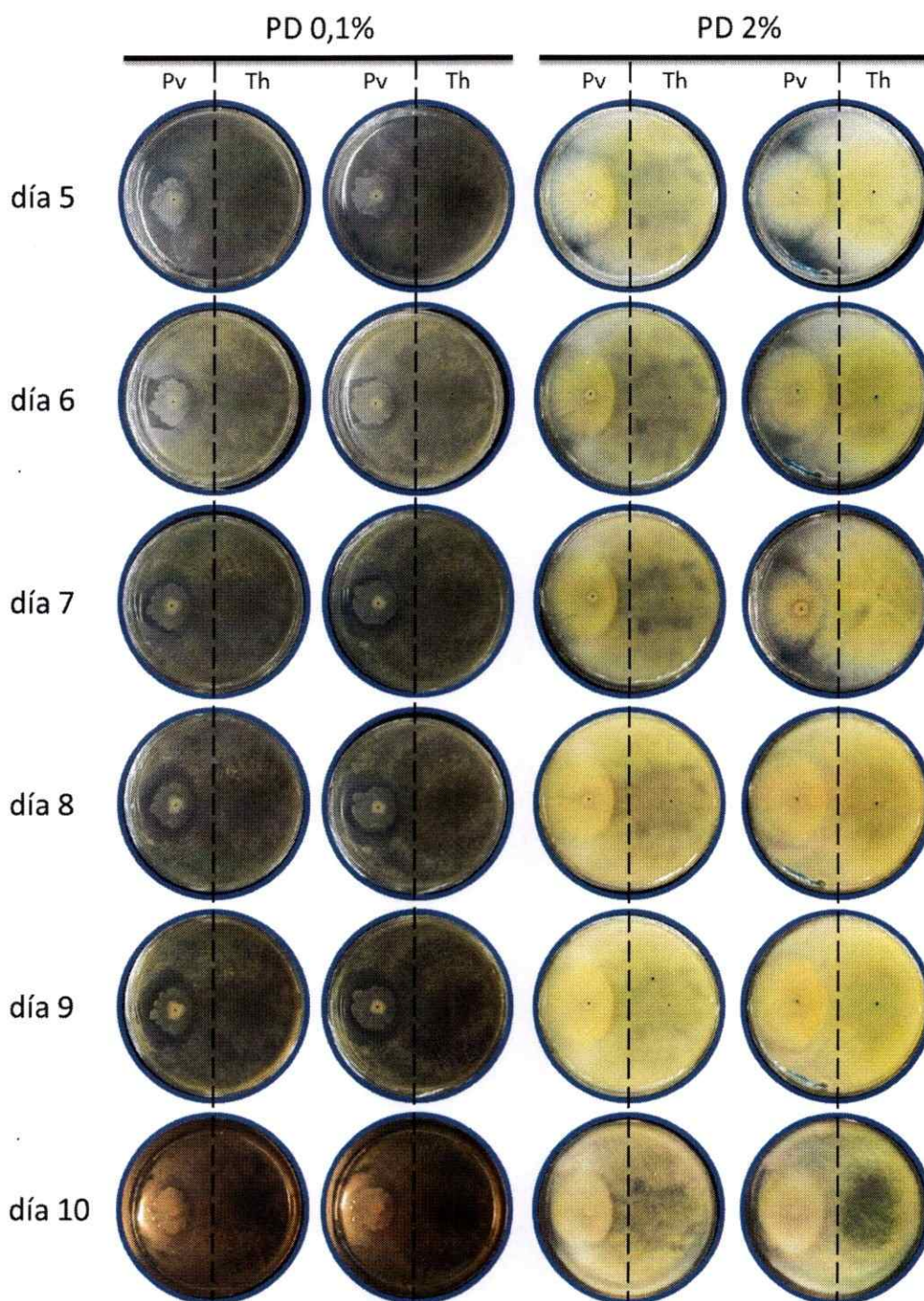


Figura 5. Secuencia de fotos de los enfrentamientos entre *Trichoderma harzianum* (Th) y *Paecilomyces variotii* a diferentes tiempos de incubación. PD: medio no definido Papa-Dextrosa.

Cuando se analiza la zona de interacción entre los dos micelios en relación a la producción de propágulos (Figura 6), se puede observar que en VM 0,1% ninguno de los hongos reduce significativamente la producción de esporas del otro (Figura 6A y 6B). Por el contrario, en PD 2% interfieren en la producción de esporas del hongo con el que se enfrentan, estableciéndose una condición de competencia entre ellos (Figura 6G y 6H). En las otras dos condiciones de cultivo (VM 2% y PD 0,1%), la interacción que se establece entre los hongos es de tipo amensal, donde sólo el crecimiento de *T. harzianum* se afecta negativamente, reduciéndose la producción de propágulos por la presencia de *P. variotii* (Figura 6C-6F).

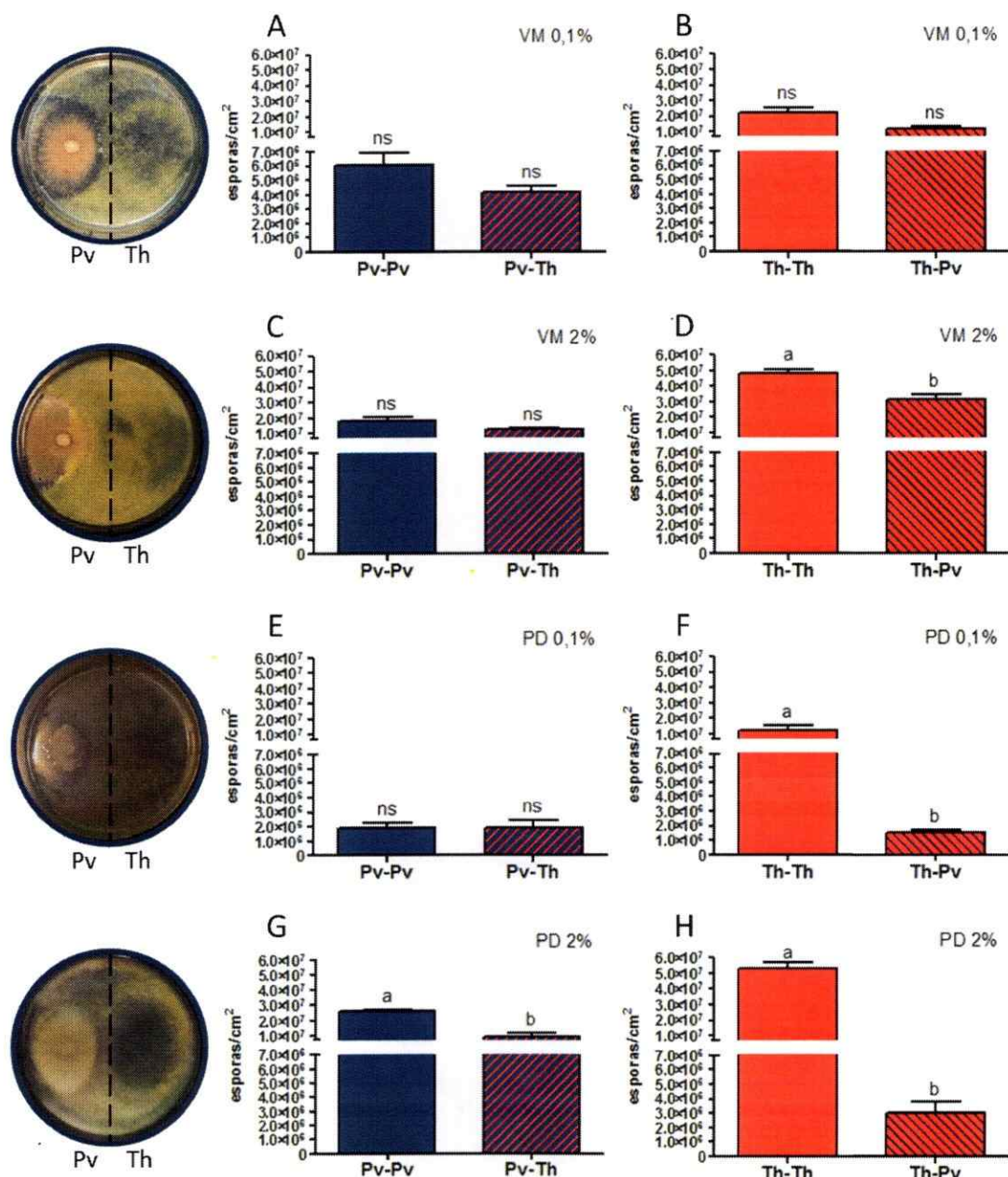


Figura 6. Fotografías y recuentos de esporas de los enfrentamientos duales entre *Paecilomyces variotti* (Pv) (A, C, E y G) y *Trichoderma harzianum* (Th) (B, D, F y H) después de 10 días de cultivo, a concentraciones bajas (0,1%) y altas (2%) de dos medios de cultivo (VM: medio salino Vogel suplementado con D-Manitol y PD: medio no definido Papa-Dextrosa). Cada gráfico representa la producción de esporas en enfrentamientos de la misma especie (Pv-Pv o Th-Th) usados como control y en enfrentamientos entre especies distintas (Pv-Th o Th-Pv).

En el caso de los enfrentamientos entre *T. novaezelandeae* y *T. harzianum*, la mayor diferencia en el crecimiento radial se observó en VM, donde en ambas concentraciones *T. novaezelandeae* presentó un crecimiento más compacto, con bajo crecimiento en extensión comparado con *T. harzianum*, el cual es invadido por este último entre los días 8 y 9 de cultivo (Figura 7). Por otra parte, en los enfrentamientos realizados en medio PD el crecimiento de ambos hongos es similar, ya sea en alta o baja concentración de nutrientes (Figura 8). En cuanto a la producción de esporas, cuando ambos hongos se enfrentan en los distintos medios (Figura 9), se observa que en VM 0,1% ninguna de las especies fúngicas afecta la producción de esporas del otro hongo (Figura 9A y 9B). Cuando ambos hongos se enfrentan en PD 0,1%, *T. novaezelandeae* redujo la producción de esporas de *T. harzianum*. Por el contrario, a alta concentración de nutrientes, ya sea en medio definido (VM 2%) o no-definido (PD 2%), se observa que hay competencia entre los hongos ya que en ambos se reduce la producción de esporas en presencia de la otra especie fúngica, siendo *T. harzianum* más eficiente en la competencia (Figura 9C, 9D, 9G y 9H).

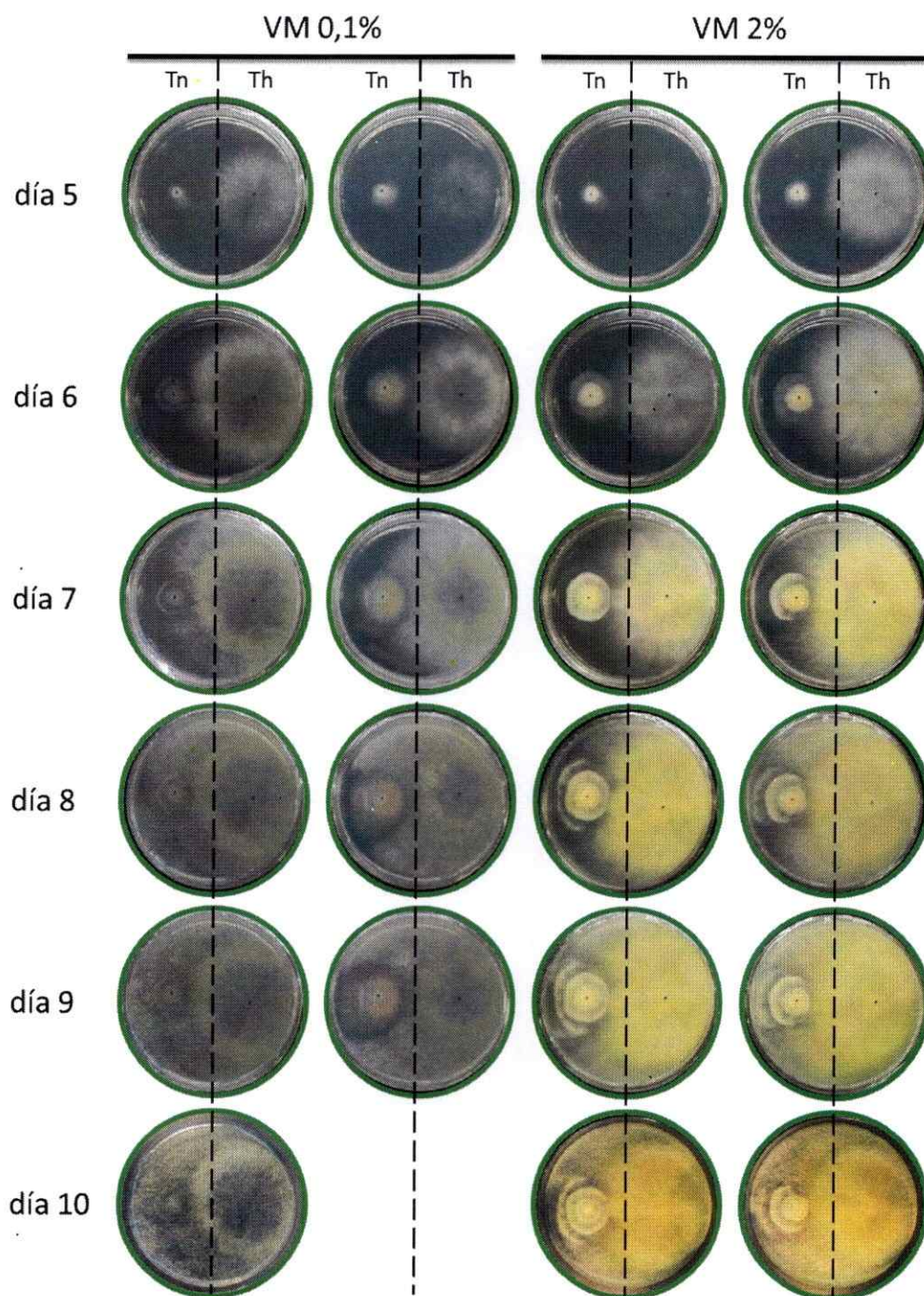


Figura 7. Secuencia de fotos de los enfrentamientos entre *Trichoderma harzianum* (Th) y *T. novaezelandeae* (Tn) a diferentes tiempos de incubación. VM: medio salino Vogel suplementado con D-Manitol.

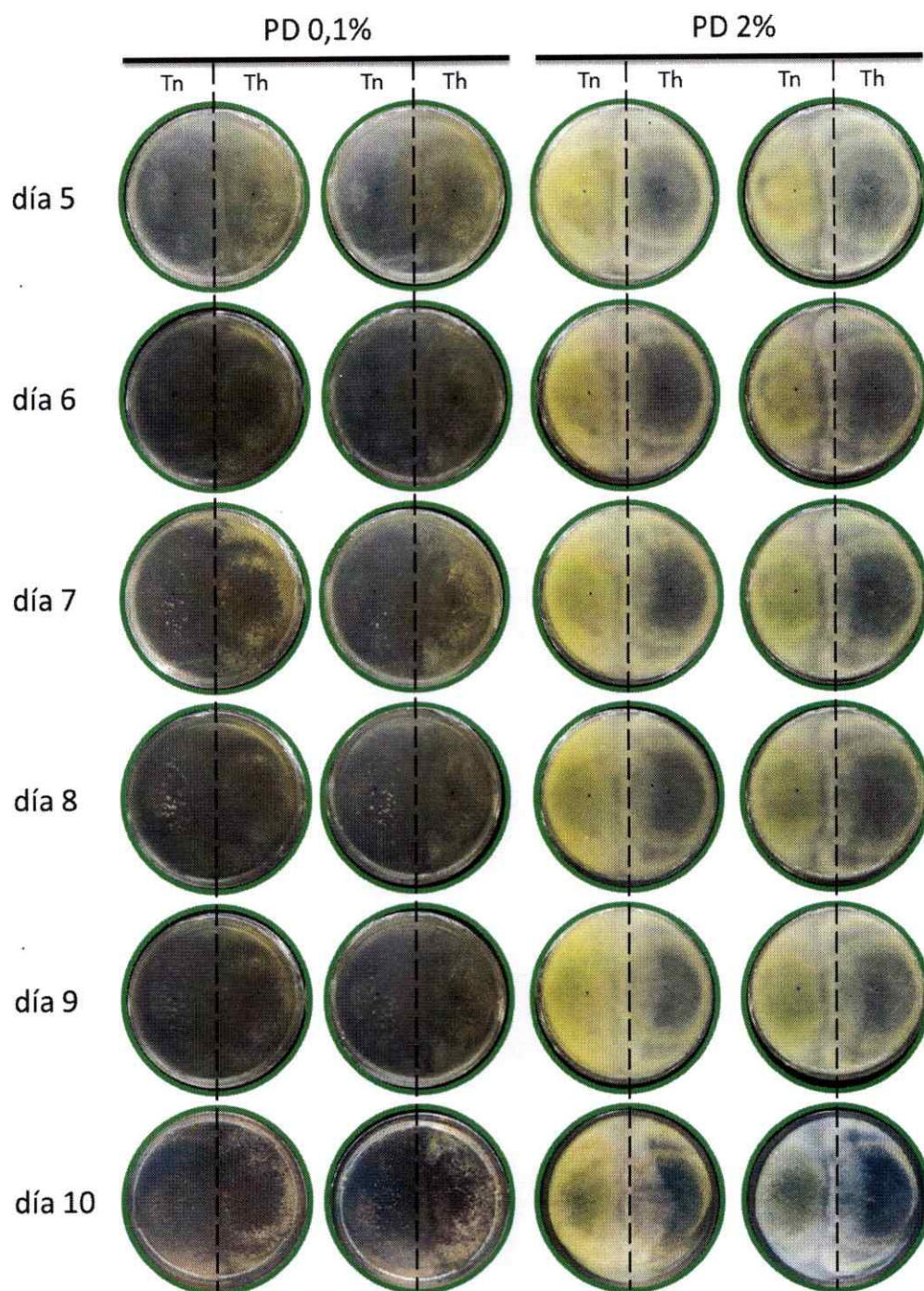


Figura 8. Secuencia de fotos de los enfrentamientos entre *Trichoderma harzianum* (Th) y *T. novaezealandeae* (Tn) a diferentes tiempos de incubación. PD: medio no definido Papa-Dextrosa.

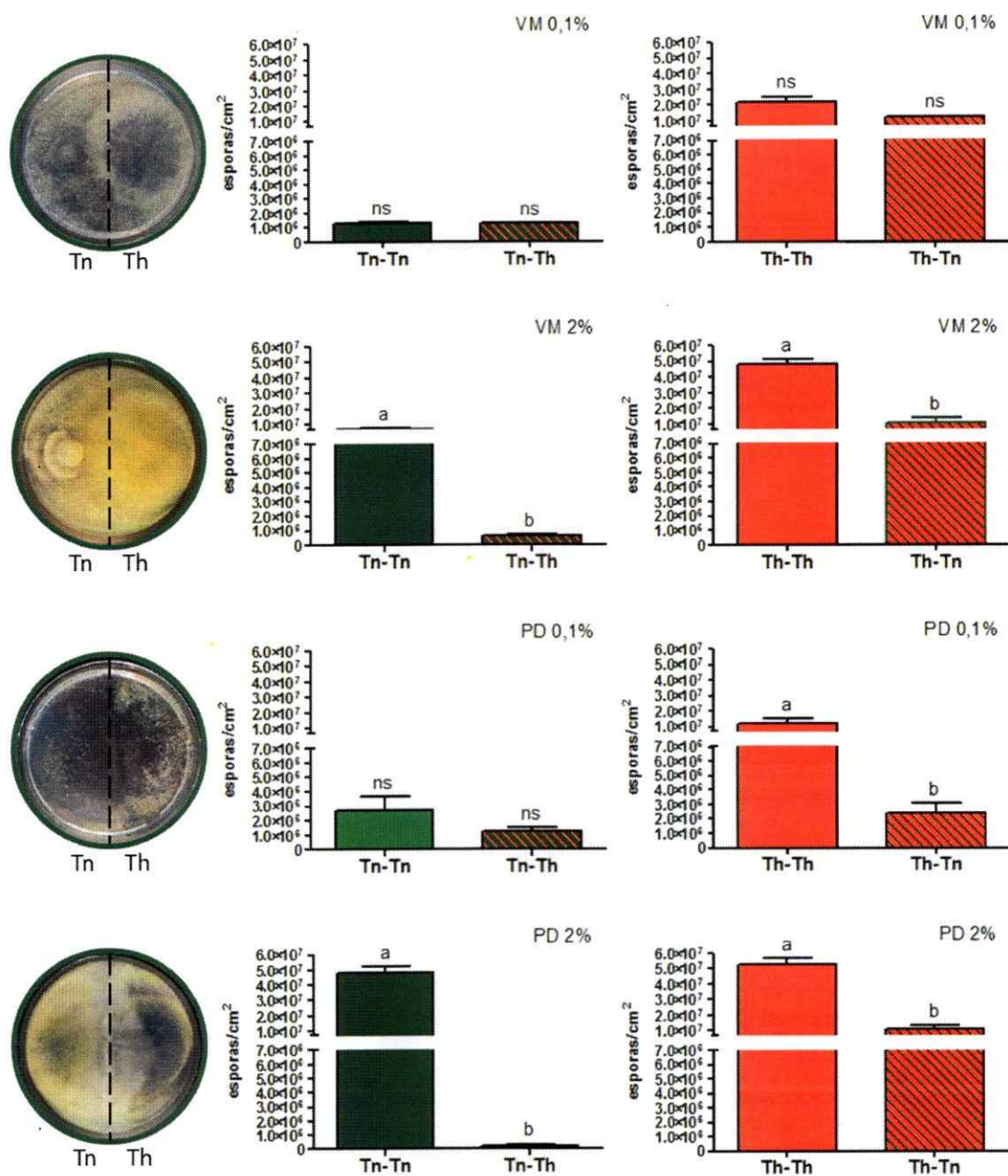


Figura 9. Fotografías y recuentos de esporas de los enfrentamientos duales entre *Trichoderma novaezealandae* (Tn) (A, C, E y G) y *T. harzianum* (Th) (B, D, F y H) a concentraciones bajas (0,1%) y altas (2%) de dos medios de cultivo (VM: medio salino Vogel suplementado con D-Manitol y PD: medio no definido Papa-Dextrosa). Cada gráfico representa la producción de esporas en enfrentamientos de la misma especie (Tn-Tn o Th-Th) usados como control y en enfrentamientos entre especies distintas (Tn-Th o Th-Tn).

Ensayo de invasión de *Trichoderma harzianum* en microcosmos

Para estudiar la capacidad invasora de *T. harzianum* y su efecto sobre la comunidad receptora, se diseñó un experimento de microcosmos con una comunidad experimental compuesta por *P. variotti* y *T. novaezelandeae*. Los cambios en abundancia relativa de los componentes de la comunidad experimental receptora y el hongo invasor se siguieron mediante DGGE (Figura 10). A partir de los perfiles de DGGE se construyeron gráficos de abundancia relativa de los componentes fúngicos obtenidos en el medio definido VM (Figura 11) y el medio no definido PD (Figura 13).

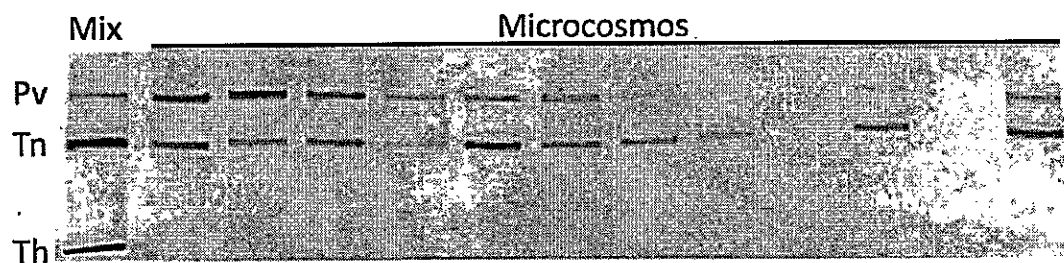


Figura 10. Perfiles de DGGE. En el mix se pueden distinguir las tres especies fúngicas, de arriba hacia abajo, *P. variotti* (Pv), *T. novaezelandeae* (Tn) y *T. harzianum* (Th). Los diferentes carriles representan diferentes condiciones nutricionales y tiempos de incubación de microcosmos control e inoculados con *T. harzianum*.

En el caso de los microcosmos en los que se utilizó D-manitol como fuente de carbono (medio VM), se puede observar que *T. harzianum* no es capaz de invadir la comunidad en ninguna de las concentraciones de nutrientes (0,1% y 2%). Bajo las condiciones del ensayo no se observan cambios en la abundancia relativas de los componentes de la comunidad invadida comparada con el control. Por otra parte, aunque ambas especies fúngicas que componen la comunidad receptora se inocularon simultáneamente en los

microcosmos con el mismo número de esporas, se observa que existe un dominio de *T. novaezelandeae* en la comunidad durante todo el ensayo, indicando que hay un proceso sucesional propio de la comunidad receptora independiente de la presencia del invasor (Figura 11). Cabe recordar que el T0 corresponde a una comunidad que tienen 3 días de incubación pre-invasión.

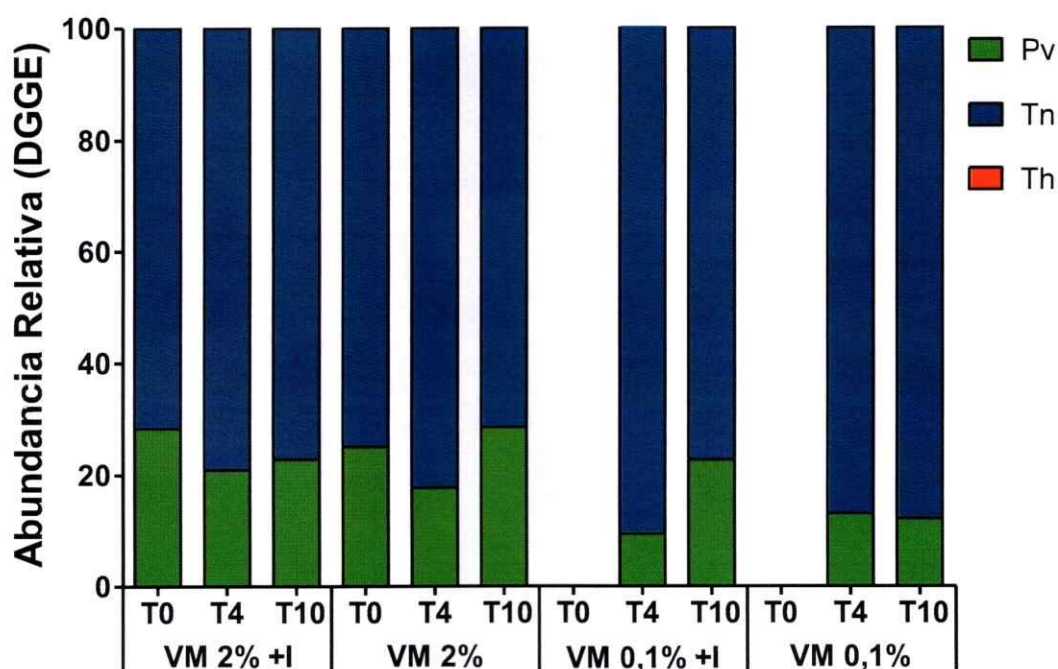


Figura 11. Abundancias relativas de los componentes fúngicos en los microcosmos utilizando medio de cultivo VM (medio salino Vogel suplementado con D-Manitol) a alta (2%) y baja (0,1%) concentración de nutrientes. Los microcosmos inoculados con *T. harzianum* se indican con +I. El T0 indica el momento de la invasión, mientras que el T4 y el T10 corresponden a 4 y 10 días post-invasión, respectivamente..

Adicionalmente, para evaluar la capacidad de propagación de cada hongo, se determinó la producción de esporas de las especies fúngicas conformando la comunidad de cada microcosmos. En la Figura 12 se muestra la producción de

esporas en los microcosmos con medio definido VM. En el T0, la producción de esporas en alta (2%) y baja (0,1%) concentración de nutrientes es reducida, y se encuentra en el rango de entre 5×10^5 y 5×10^6 esporas por gramo de sustrato para ambas especies fúngicas. En los tiempos siguientes la producción de esporas se incrementa en los microcosmos con alta disponibilidad de nutrientes (2%) mientras que permanece sin mayores cambios a baja concentración (0,1%). *P. variotii* presentó una mayor producción de esporas en T4 y T10, en comparación con *T. novaezealandeae*, cuando crecieron en microcosmos con alta disponibilidad de nutrientes. Por otra parte, se cuantificaron muy pocas esporas de *T. hazianum* en los microcosmos inoculados, registrándose una concentración de entre 10^4 y 10^5 esporas por gramo de sustrato, la cual es cercana a la concentración con la cual se inocularon las esporas en los microcosmos, indicando que *T. hazianum* no fue capaz de germinar y colonizar la comunidad en las condiciones del ensayo.

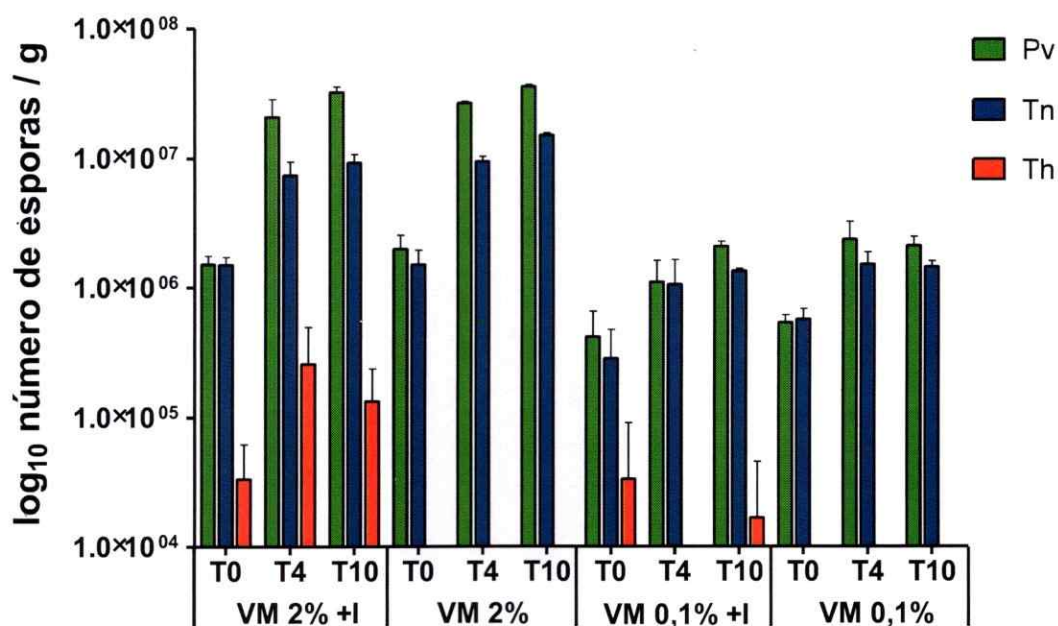


Figura 12. Recuento de esporas de hongos crecidos en microcosmos utilizando medio de cultivo VM (medio salino Vogel suplementado con D-Manitol) a alta (2%) y baja (0,1%) concentración de nutrientes. Los microcosmos inoculados con *T. harzianum* se indican con +I. El T0 indica el momento de la invasión, mientras que el T4 y el T10 corresponden a 4 y 10 días post-invasión, respectivamente.

En el caso de los microcosmos incubados con medio no definido PD (Figura 13), se puede observar que el patrón de abundancia relativa de los componentes de la comunidad receptora es similar al observado en los microcosmos incubados con medio definido VM. En todos los casos, la especie fúngica más abundante fue *T. novaezelandeae* alcanzando valores cercanos al 70% en los microcosmos con mayor concentración de nutrientes y cercanos al 85% en aquellos con baja concentración de nutrientes. En ambas condiciones nutricionales no se observaron cambios significativos entre los microcosmos inoculados comparados con los controles no inoculados.

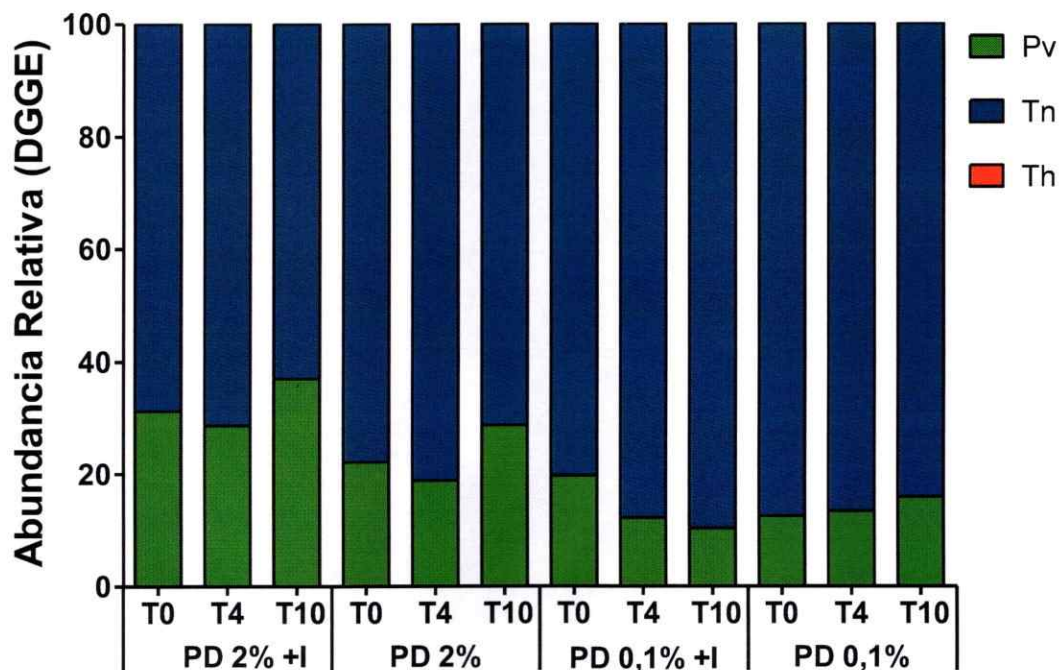


Figura 13. Abundancias relativas de los tres hongos en los microcosmos utilizando medio de cultivo PD (medio no definido Papa-Dextrosa) a alta (2%) y baja (0,1%) concentración de nutrientes. Los microcosmos inoculados con *T. harzianum* se indican con +I. El T0 indica el momento de la invasión, mientras que el T4 y el T10 corresponden a 4 y 10 días post-invasión, respectivamente.

En cuanto a la producción de esporas (Figura 14), al igual que los microcosmos incubados con D-manitol, estuvo limitada fuertemente por la disponibilidad de nutrientes. *P. variotii* presentó una mayor producción de esporas en comparación con *T. novaezelandeae* en todos los microcosmos con alta concentración de nutrientes (2%). En cambio, a baja concentración de nutrientes (0,1%), no hay diferencias significativas en la producción de esporas de ambos componentes fúngicos. En todos los microcosmos inoculados se pudieron cuantificar esporas de *T. harzianum*, sin embargo, las concentraciones detectadas corresponden aproximadamente a la misma cantidad inoculada en T0.

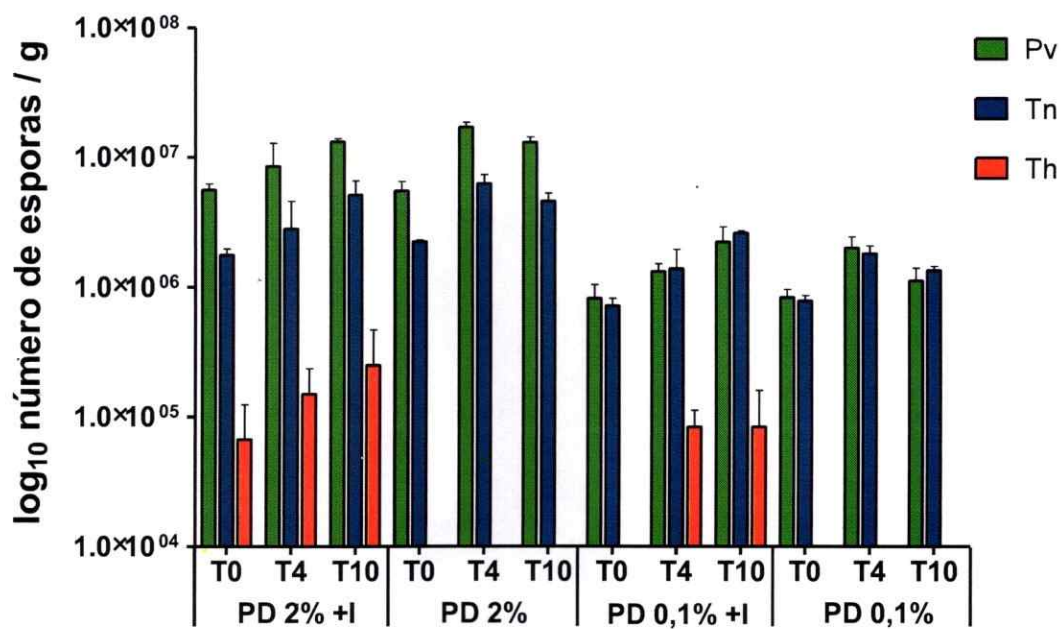


Figura 14. Recuento de esporas de hongos crecidos en microcosmos utilizando medio de cultivo PD (medio no definido Papa-Dextrosa) a alta (2%) y baja (0,1%) concentración de nutrientes. Los microcosmos inoculados con *T. harzianum* se indican con +I. El T0 indica el momento de la invasión, mientras que el T4 y el T10 corresponden a 4 y 10 días post-invasión, respectivamente.



DISCUSIÓN

En este seminario de título se propuso evaluar la capacidad de invasión de *T. harzianum* sobre una comunidad fúngica experimental en distintos contextos nutricionales, bajo el supuesto de que una especie con mayor habilidad competitiva podría establecerse exitosamente en la comunidad receptora. Para ello fue necesario determinar las condiciones experimentales necesarias para diseñar un experimento de invasión bajo distintas condiciones nutricionales. El primer aspecto que se abordó fue determinar la velocidad de crecimiento de las especies fúngicas en distintas condiciones nutricionales, determinando las respectivas curvas de crecimiento en distintas condiciones nutricionales, que en este caso fueron dos medios (VM y PD a dos concentraciones cada uno). Las curvas de crecimiento sirvieron como base para construir las curvas de velocidad de crecimiento versus concentración de sustrato las cuales se ajustaron al modelo de Monod (1949). A partir de ellas fue posible predecir que a bajas concentraciones de nutrientes (0,1%), la velocidad de crecimiento depende de la disponibilidad de nutrientes y por lo tanto podría ser un escenario de mayor intensidad de competencia. Por el contrario, a alta concentración de nutrientes (2%) las tres especies fúngicas estudiadas alcanzaron la velocidad máxima de crecimiento y no dependerían de la concentración de nutrientes, los cuales estarían en exceso para las necesidades del crecimiento fúngico. En este último caso se esperaría un escenario de baja intensidad de competencia. En este sentido, el hecho de que las máximas velocidades de crecimiento hayan sido alcanzadas por las especies del género *Trichoderma* podría indicar que ambas especies poseen estrategias similares en el uso de los recursos. Sin embargo, es importante considerar que las curvas obtenidas son

válidas sólo si los hongos se crecen bajo las condiciones del ensayo, por ejemplo la temperatura a la cual se realizan los cultivos influye en la velocidad de crecimiento de los aislados fúngicos (Carreiro y Koske 1992).

Con las condiciones establecidas, se procedió a determinar el comportamiento del invasor frente a cada una de las especies fúngicas de la comunidad receptora mediante enfrentamientos duales realizados en distintas condiciones nutricionales. Para ello se evaluó la capacidad de *T. harzianum* de inhibir o invadir el micelio del otro hongo y la capacidad de producción de esporas en las zonas de contacto de ambas especies.

Los resultados obtenidos en los enfrentamientos duales sugieren que la competencia entre hongos depende de las especies enfrentadas y de la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. Este efecto se pudo observar más claramente cuando se comparan los enfrentamientos duales entre *T. harzianum* y *P. variotii* y entre *T. harzianum* y *T. novaezealandeae* en medio salino Vogel suplementado con D-manitol al 2%. En el primer caso, la interacción entre los hongos es de tipo amensal, donde *P. variotii* afecta negativamente la producción de esporas de *T. harzianum*. Por el contrario, en el segundo enfrentamiento ambos hongos compiten, lo que se refleja en la reducción significativa de la producción de esporas en presencia de la otra especie fúngica. La reducción de la producción de esporas por efecto de la competencia en el caso de *T. harzianum*, fue observada previamente por Carreiro y Koske (1992).

Otro aspecto que podría condicionar la interacción entre los hongos es la relación filogenética entre ellos. Cuando se enfrentan dos hongos muy cercanos filogenéticamente, como lo son *T. harzianum* y *T. novaezealandeae*, se observa una interacción de competencia sólo cuando se encuentran en condiciones de mayor disponibilidad de nutrientes. Por otra parte, en el enfrentamiento dual entre *T.*

harzianum y *P. variotii*, dos especies más distantes filogenéticamente, sólo se observa competencia en el medio no definido PD 2%, es decir con mayor diversidad y disponibilidad de nutrientes, siendo *P. variotii* más eficiente en la competencia. Bajo las otras condiciones de cultivo la interacción es de tipo amensal, con un desmedro para *T. harzianum*, o no hay interacción. Estas observaciones son contrarias a lo esperado previamente, es decir que la competencia se diera cuando los nutrientes son limitados y deben competir por ellos, no cuando está disponible una mayor concentración de nutrientes.

En los ensayos en microcosmos, se puede notar que la interacción entre *P. variotii* y *T. novaezealandae* afecta las abundancias relativas de dichos hongos en la comunidad durante la incubación. En este sentido, el dominio de *T. novaezealandae* en los microcosmos puede deberse a la mayor velocidad de crecimiento de esta especie en comparación con *P. variotii*. Por otra parte, las diferencias observadas entre las abundancias relativas calculadas a partir de los perfiles de DGGE y la producción de esporas en los microcosmos, podrían estar explicadas por las estrategias ecológicas utilizadas por ambas especies. De esta manera, en las condiciones de los microcosmos *P. variotii* estaría favoreciendo la producción de propágulos (esporas) por sobre el crecimiento micelial, lo cual correspondería una estrategia tipo r. En cambio, *T. novaezealandae* estaría favoreciendo el crecimiento micelial por sobre la producción de propágulos, correspondiendo a una estrategia tipo k.

Boddy (2000) distingue dos tipos de competencia fúngica: una primaria para la obtención de recursos no colonizados y otra secundaria que corresponde al combate por la obtención de recursos ya colonizados por otro hongo. En este sentido es importante destacar que tanto en los experimentos de enfrentamientos duales como en los ensayos realizados en microcosmos, se presentan los dos tipos de competencia.

En el primer caso, el resultado de la interacción está determinado principalmente por las velocidades de crecimiento de los hongos, es decir, el tiempo que demoran en colonizar el sustrato disponible, lo que corresponde a una competencia primaria. Una vez que los micelios se encuentran, se puede observar una competencia secundaria en la que los hongos van a competir por recursos colonizados. Por otro lado, los ensayos en microcosmos se puede distinguir una competencia primaria entre los hongos de la comunidad *P. variotii* y *T. novaezelandeae*, en los primeros días después de la inoculación, quienes compiten por el sustrato no colonizado. Una vez que el sustrato es colonizado, se puede distinguir una competencia secundaria entre *P. variotii* y *T. novaezelandeae*. Mismo tipo de competencia ocurre cuando es inoculado el invasor *T. harzianum*, ya que las esporas de éste deben competir con los hongos de la comunidad para poder establecerse, pero su colonización se producirá sólo si es capaz de competir por recursos ya colonizados.

El hecho de que *T. harzianum* no haya logrado establecerse en la comunidad de los microcosmos puede explicarse por varias razones. Primero, los hongos de la comunidad compiten por los mismos nutrientes y el sustrato ya estaba colonizado al momento de la inoculación, por lo cual *T. harzianum* tiene una desventaja en términos de abundancia relativa del inóculo (número de esporas por gramo de sustrato). En el momento de la inoculación con el invasor (T0), los hongos de la comunidad receptora tiene una biomasa micelial y una producción de esporas mayor o igual al inóculo, excepto en medio PD 2%, donde la comunidad receptora tiene un orden de magnitud mayor de esporas. Se ha reportado que la proporción en la que se encuentran los hongos puede definir el balance de la competencia, y en consecuencia determinar si habrá exclusión competitiva o no (Wardle y col. 1993). Segundo, la resistencia biótica que ofrece la comunidad del microcosmos a ser invadida por el invasor *T. harzianum*.

Esto es congruente con lo reportado por Callaway y col (2004) y Levine y col. (2004), ya que son las interacciones que establecen entre las especies de la comunidad y el invasor las que pueden determinar el establecimiento del invasor. En este sentido, es importante analizar las propiedades de los hongos de la comunidad receptora. Diversos estudios han reportado a *P. variotii* como controlador biológico, destacado principalmente por su efecto nematocida (Al-Qasim y col. 2009; Suárez-Estrella y col. 2013). Del mismo modo, las especies del género *Trichoderma* han sido ampliamente estudiadas por su alto potencial oportunista y su adaptabilidad a distintas condiciones ecológicas (Druzhinina y col. 2012).

La competencia entre hongos puede estar influenciada por otros factores abióticos que pueden afectar diferencialmente a cada especie fúngica, por ejemplo la temperatura del ambiente y las temperaturas óptimas de crecimiento de cada especie de hongo (Carreiro y Koske 1992), de manera que el resultado de los ensayos realizados tanto en placas como en microcosmos podrían variar si se realizan a temperaturas diferentes. Esto debido a que la temperatura a la que se realizaron los experimentos podría no ser la temperatura óptima para todas las especies fúngicas, de manera que algunas especies podrían estar desfavorecidas.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en los enfrentamientos duales y en los ensayos en microcosmos no son comparables. A pesar de que en ambos casos se utilizaron las mismas concentraciones de nutrientes, se trata de ensayos muy distintos en términos del número de organismos que interactúan y la distribución espacial de los microorganismos; sin embargo, los enfrentamientos duales nos permiten identificar las posibles interacciones que se establecen en los microcosmos cuando los tres componentes fúngicos están presentes. De manera que los enfrentamientos duales permiten explicar parte de lo observado en los ensayos en

microcosmos. En este sentido los enfrentamientos duales entre *P. variotii* y *T. novaezelandeae* (datos no mostrados U.I. R. Sánchez) revelan que este último crece y ocupa mayor superficie en la placa que el primero, lo cual es coincidente con lo observado en las abundancias relativas de ambos hongos en los ensayos de microcosmos, indicando que *T. novaezelandeae* tiene mayor habilidad competitiva que *P. variotii*. Por otra parte, los enfrentamientos duales de cada miembro de la comunidad receptora con el invasor revelan que en condiciones de mayor concentración de nutrientes (PD 2%), *T. novaezelandeae* y *T. harzianum* ocupan el espacio en la placa de Petri a igual velocidad y ambos se interfieren en la producción de esporas, lo que sugiere que *T. novaezelandeae* es probablemente la especie con mayor habilidad competitiva en la comunidad receptora que impide la colonización exitosa de *T. harzianum*. Estas observaciones coinciden con los tipos de competencia descritos por Boddy (2000), donde se debe considerar el efecto que produce la disposición espacial de los micelios interactuantes. Además, es importante considerar las relaciones filogenéticas entre los componentes fúngicos. De acuerdo a la hipótesis de naturalización de Darwin (1859), es esperable que dos especies muy cercanas como lo son *T. novaezelandeae* y *T. harzianum* compitan más intensamente.

En este estudio, bajo las condiciones de los ensayos de microcosmos, *T. harzianum* no fue capaz de invadir la comunidad experimental seleccionada aun cuando su velocidad de crecimiento en las distintas condiciones nutricionales es mayor comparada con los hongos de la comunidad receptora. Los resultados observados, claramente sugieren que las interacciones que se establecen entre los componentes fúngicos en el microcosmos, definen el éxito o el fracaso del invasor.

No obstante, otros factores podrían impedir observar el efecto de la disponibilidad de recursos sobre el establecimiento del invasor fúngico, por ejemplo un inóculo

insuficiente o una serie temporal muy corta. En ambos casos, el invasor podría no lograr aumentar su biomasa y/o propágulos que le permitan colonizar la comunidad receptora. Del mismo modo, ensayos de invasión bajo otras condiciones bióticas pueden contribuir significativamente a la comprensión de los factores que afectan el proceso de invasión en comunidades fúngicas.

CONCLUSIONES

- En los enfrentamientos duales, la competencia entre los hongos es afectada por las condiciones nutricionales del ensayo. En el caso de *T. harzianum*, la habilidad competitiva de este es afectada por la concentración de nutrientes.
- En los ensayos de invasión realizados en microcosmos, *T. harzianum* no logró establecerse en ninguna de las condiciones ensayadas (baja o alta concentración de nutrientes). En este sentido, bajo las condiciones de los experimentos *T. harzianum* no es un hongo invasor

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Qasim, M., Abu-Gharbieh, W., Assas, K., 2009. Nematophagal ability of Jordanian isolates of *Paecilomyces variotii* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Mediterranea* 37, 53-57.
- Blackwell, M., 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98, 426-438.
- Boddy, L., 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 185-194.
- Callaway, R.M., Thelen, G.C., Rodriguez, A., Holben, W.E., 2004. Soil biota and exotic plant invasion. *Nature* 427, 731-733.
- Carreiro, M.M., Koske, R.E., 1992. The effect of temperature and substratum on competition among three species of forest litter microfungi. *Mycological Research* 96, 19-24.
- Catford, J.A., Jansson, R., Nilsson, C., 2009. Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. *Diversity and Distributions* 15, 22-40.
- Collins, S.L., Sinsabaugh, R.L., Crenshaw, C., Green, L., Porrás-Alfaro, A., Stursova, M., Zeglin, L.H., 2008. Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *Journal of Ecology* 96, 413-420.
- Darwin, C., 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- Davis, M.A., Grime, J.P., Thompson, K., 2000. Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *Journal of Ecology* 88, 528-534.
- De Jaeger, N., Declerck, S., de la Providencia, I.E., 2010. Mycoparasitism of arbuscular mycorrhizal fungi: a pathway for the entry of saprotrophic fungi into roots. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 312-322.
- Desprez-Loustau, M. L., Robin, C., Buee, M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Satche, I., Rizz, D.M., 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 472-480.
- Druzhinina, I.S., Komoń-Zelazowska, M., Ismaiel, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G.J., Kubicek, C.P., 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49, 358-368.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9, 749-759.
- Green, L.E., Porrás-Alfaro, A., Sinsabaugh, R.L., 2008. Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. *Journal of Ecology* 96, 1076-1085.

- Hawksworth, D.L., 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105, 1422-1432.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. *En* GE Harman & CP Kubicek (Eds) *Trichoderma and Gliocladium*. vol 2, pp. 131-151. Taylor & Francis Ltd.
- Levine, J.M., Adler, P.B., Yelenik, S.G., 2004. A meta-analysis of biotic resistance to exotic plant invasions. *Ecology Letters* 7, 975-989.
- Litchman, E., 2010. Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 13, 1560-1572.
- Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreas, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., Staley, J.T., 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4, 102-112.
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology* 3, 371-394.
- McKinney, M.L., Lockwood, J.L., 1999. Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution* 14, 450-453.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Nikolcheva, L.G., Bourque, T., Barlocher, F., 2005. Fungal diversity during initial stages of leaf decomposition in a stream. *Mycological Research* 109, 246-253.
- Pyšek, P., Richardson, D.M., Pergl, J., Jarosik, V., Sixtova, Z., Weber, E., 2008. Geographical and taxonomic biases in invasion ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 237-244.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287, 1770-1774.
- Suárez-Estrella, F., Arcos-Nievas, M.A., Lopez, M.J., Vargas-García, M.C., Moreno, J., 2013. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. *Biological Control* 67, 509-515.
- Telford, R.J., Vandvik, V., Birks, H.J.B., 2006. Dispersal limitations matter for microbial morphospecies. *Science* 312, 1015-1015.
- Wardle, D.A., Parkinson, D., Waller, J.E., 1993. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia* 94, 165-172.
- Whitaker, R.J., Grogan, D.W., Taylor, J.W., 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301, 976-978.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18, 315-322.
- Zadworny, M., Werner, A., Idzikowska, K., 2004. Behaviour of the hyphae of *Laccaria laccata* in the presence of *Trichoderma harzianum* in vitro. *Mycorrhiza* 14, 401-405.

ANEXO

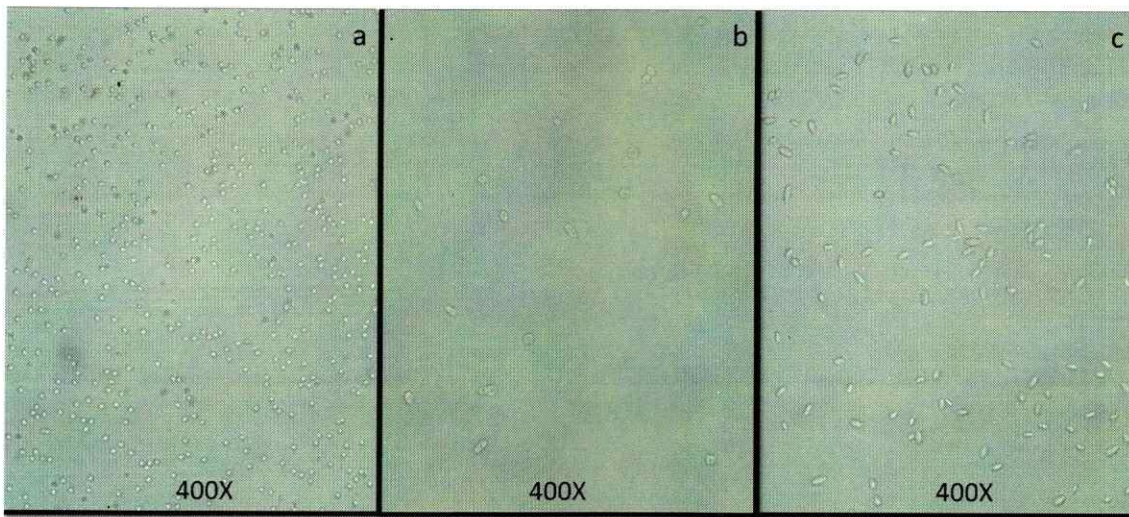


Figura Anexa 1. Fotografías en microscopio óptico de las esporas de *Trichoderma harzianum* (a), *Trichoderma novaezelandeae* (b) y *Paecilomyces variotti* (c).

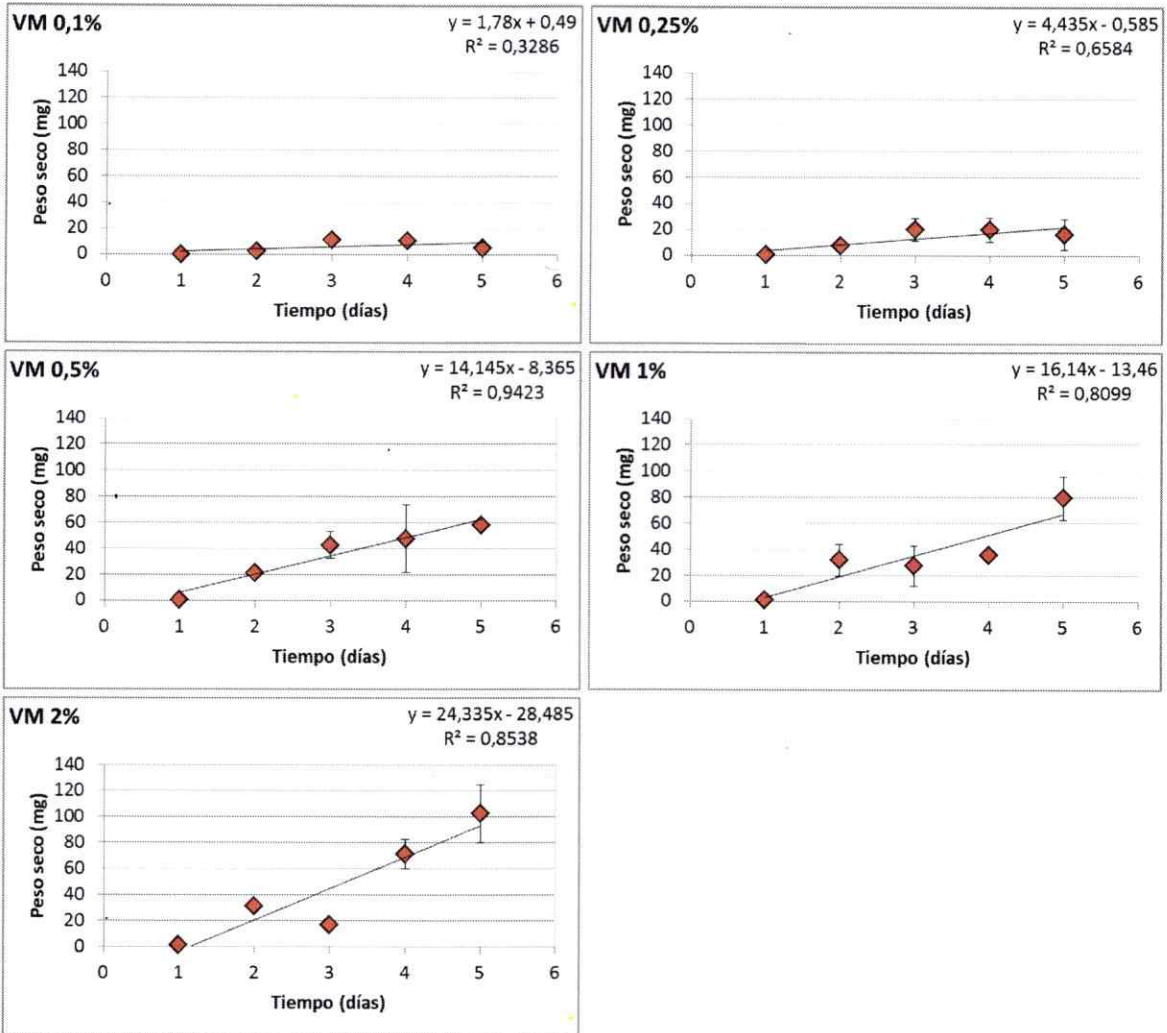


Figura Anexa 2. Curvas de peso seco versus tiempo para *Trichoderma harzianum* en cinco concentraciones de medio salino Vogel suplementado con D-manitol (VM). Se presentan todas las gráficas con la misma escala para facilitar la comparación de las pendientes.

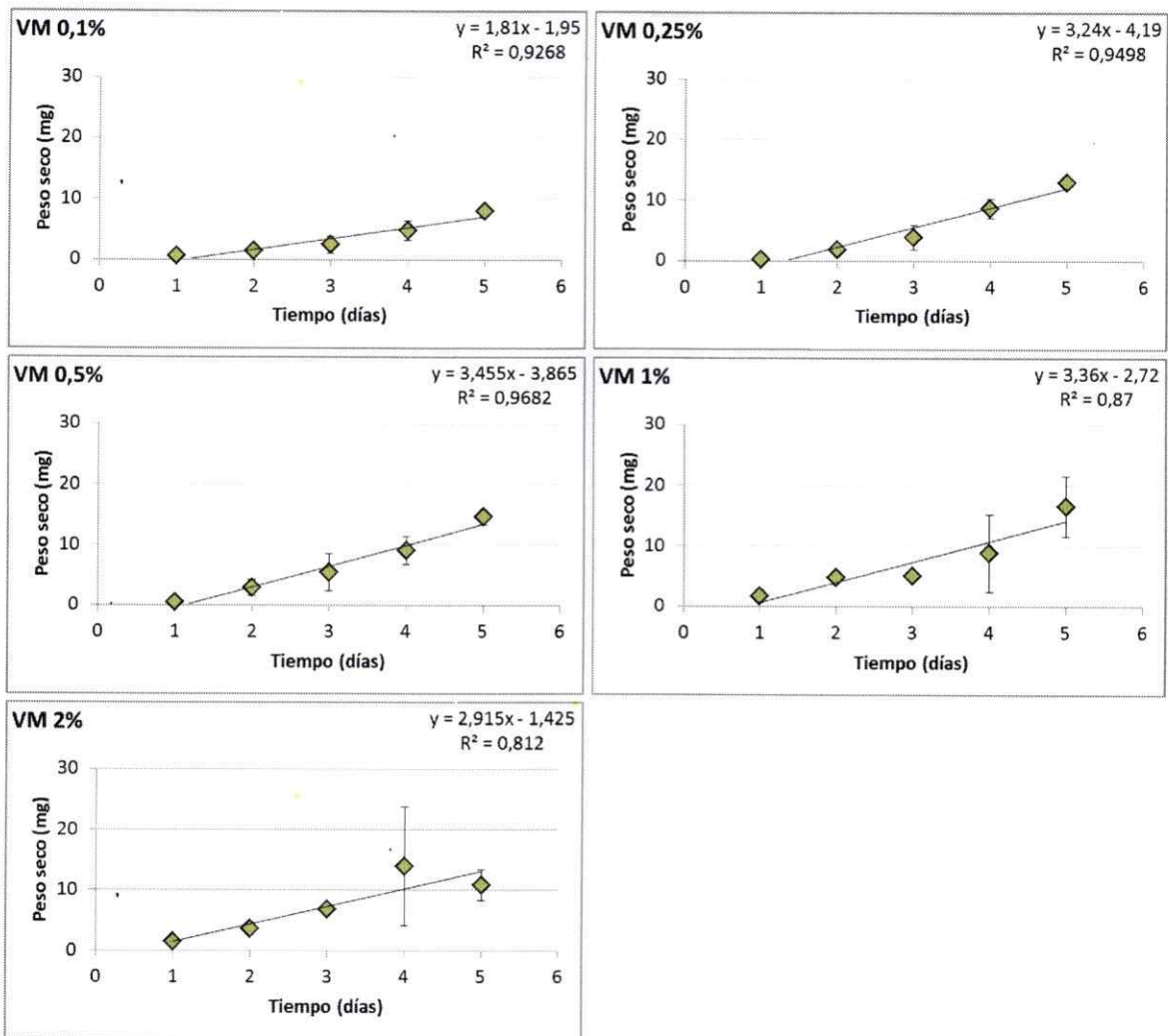


Figura Anexa 3. Curvas de peso seco versus tiempo para *Paecilomyces variotii* en cinco concentraciones de medio salino Vogel suplementado con D-manitol (VM). Se presentan todas las gráficas con la misma escala para facilitar la comparación de las pendientes.

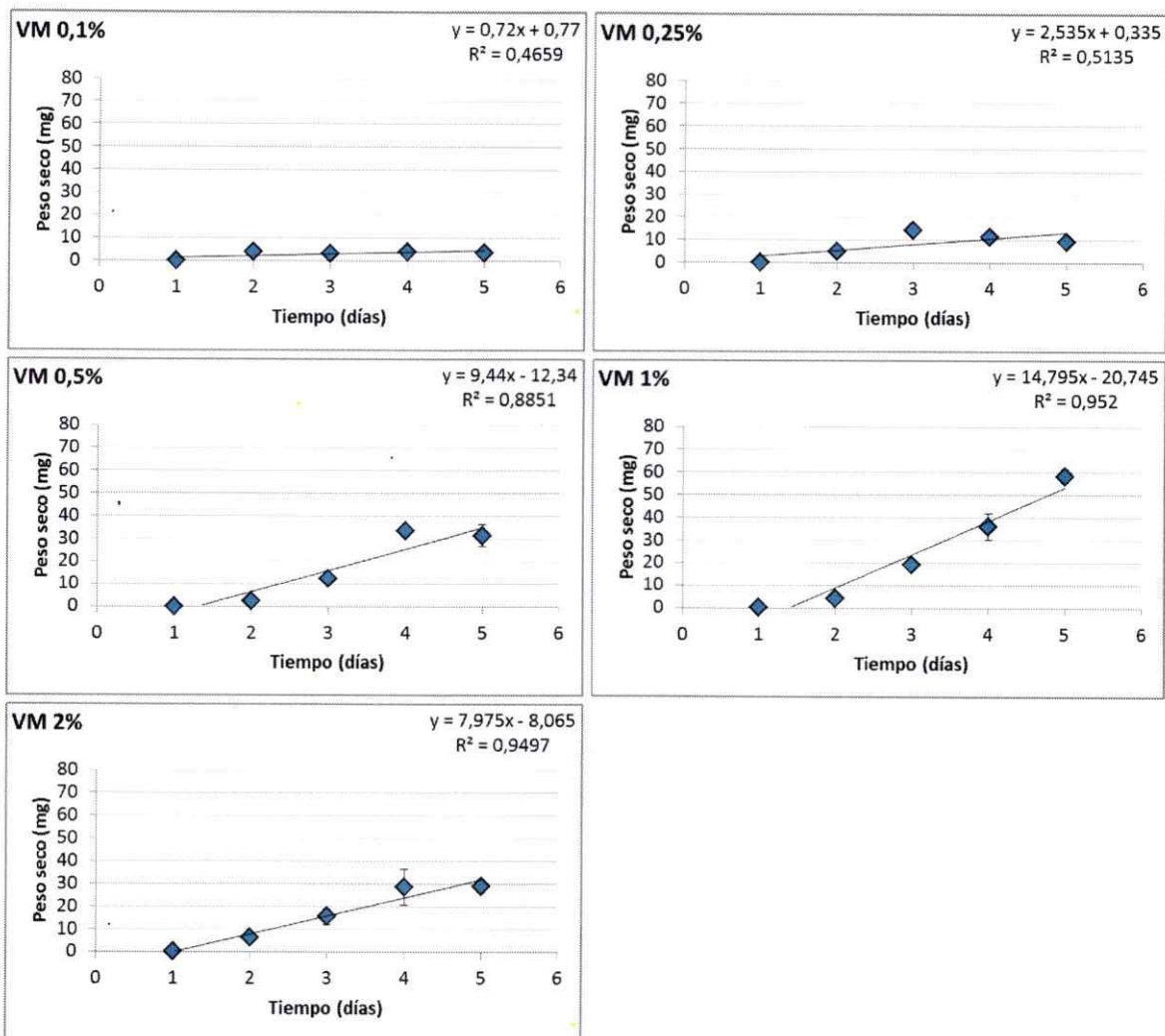


Figura Anexa 4. Curvas de peso seco versus tiempo para *Trichoderma novaezelandeae* en cinco concentraciones de medio salino Vogel suplementado con D-manitol (VM). Se presentan todas las gráficas con la misma escala para facilitar la comparación de las pendientes.



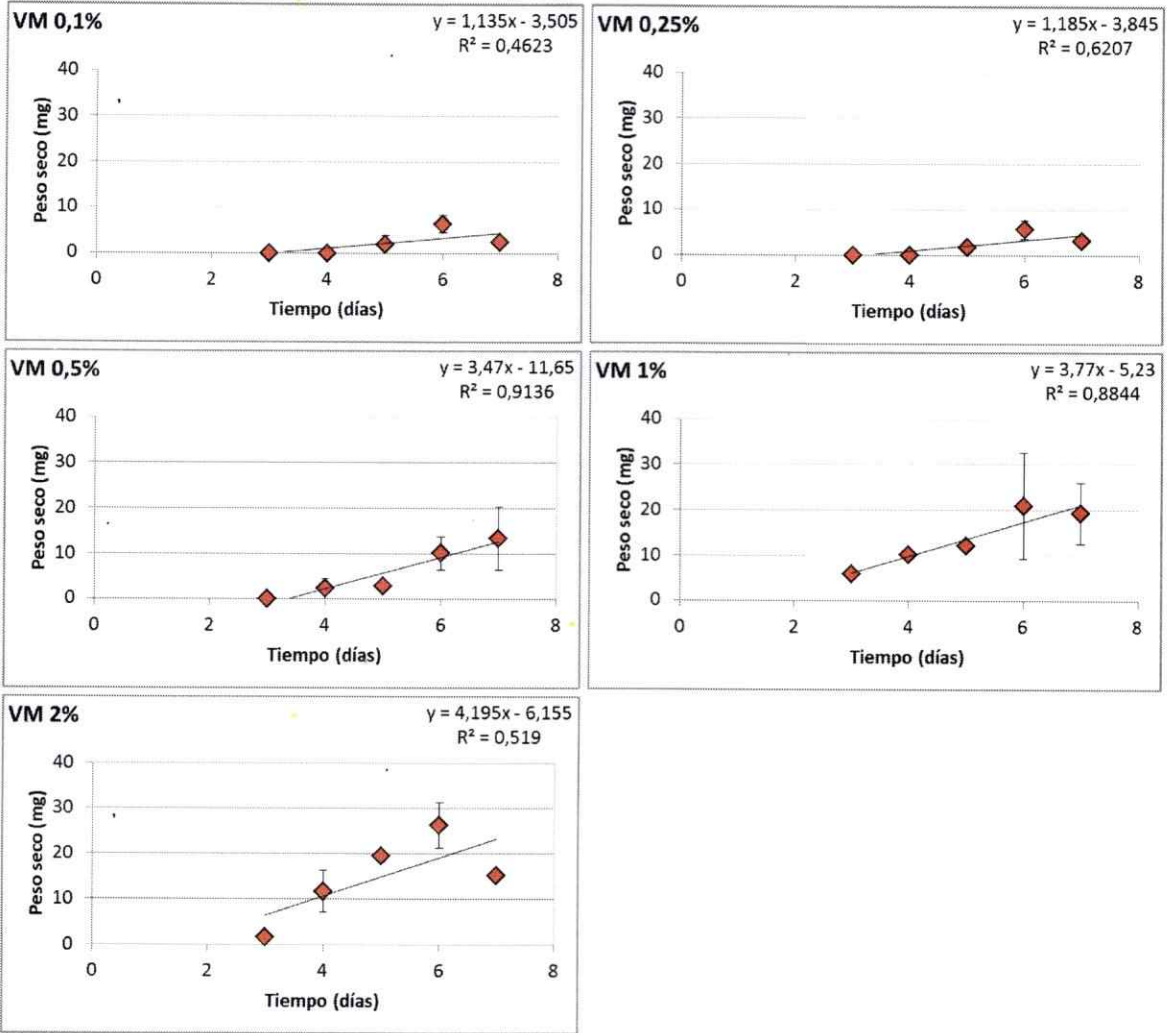


Figura Anexa 5. Curvas de peso seco versus tiempo para *Trichoderma harzianum* en cinco concentraciones de medio no definido Papa-Dextrosa (PD). Se presentan todas las gráficas con la misma escala para facilitar la comparación de las pendientes.

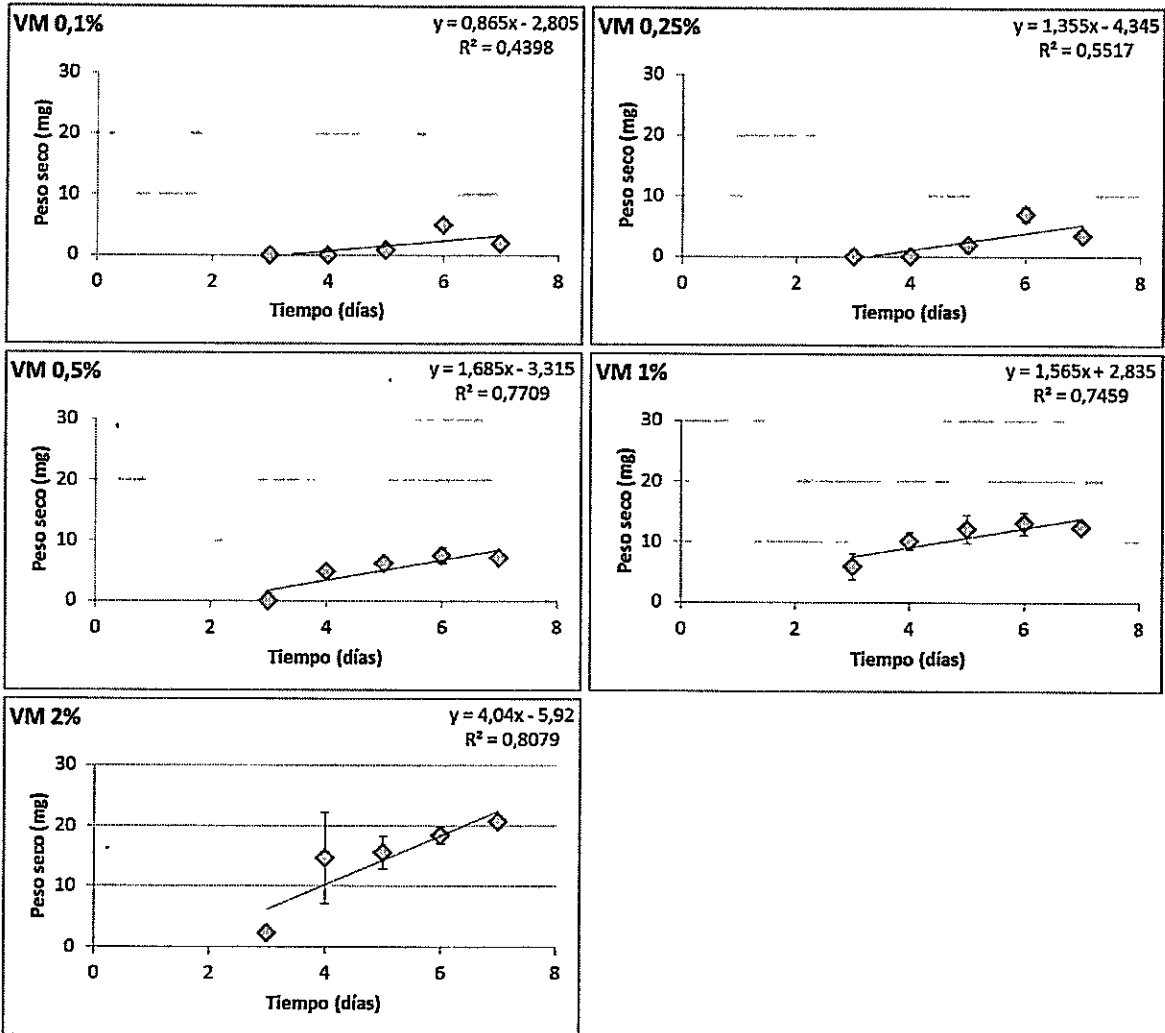


Figura Anexa 6. Curvas de peso seco versus tiempo para *Paecilomyces variotii* en cinco concentraciones de medio no definido Papa-Dextrosa (PD). Se presentan todas las gráficas con la misma escala para facilitar la comparación de las pendientes.

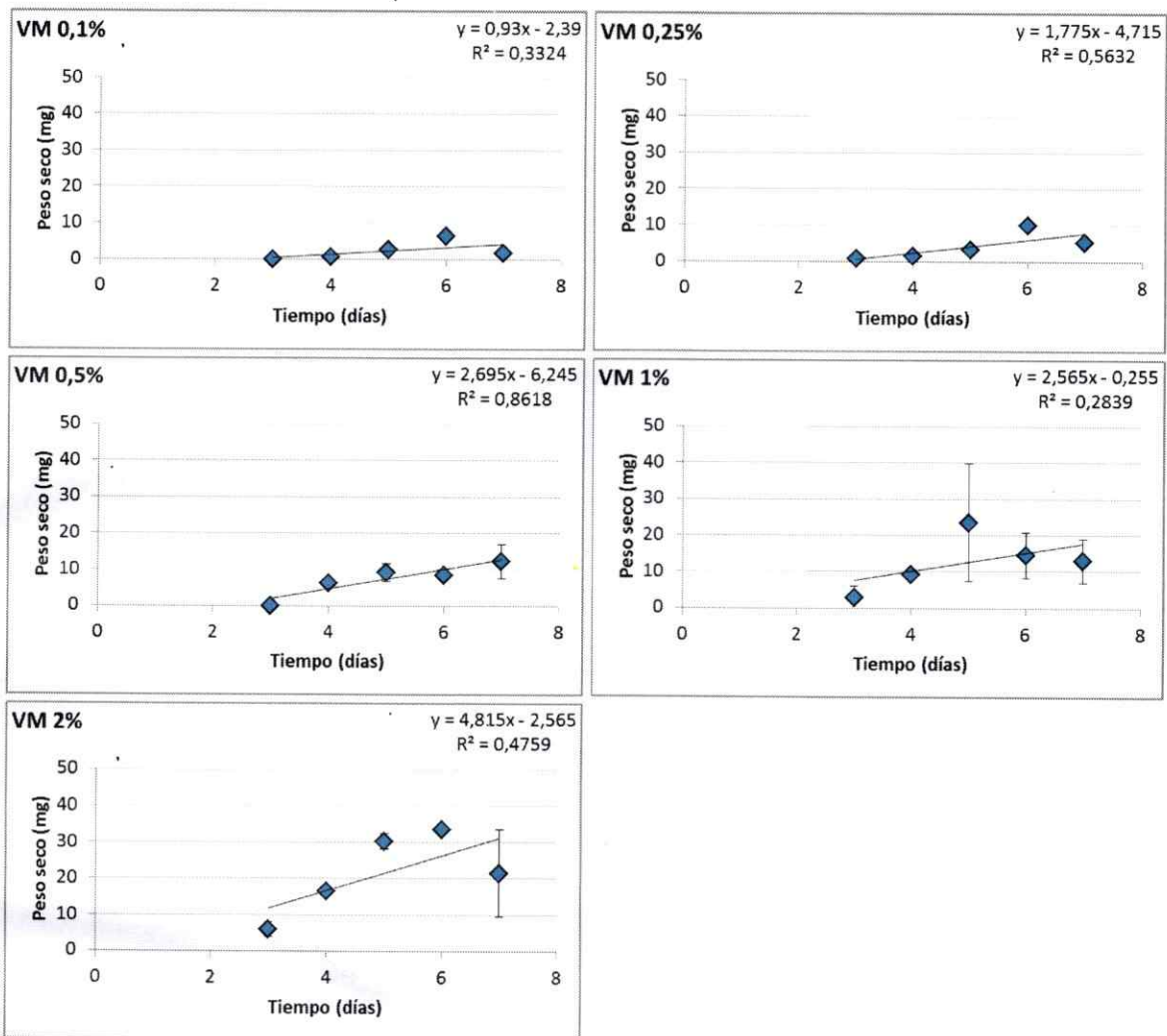


Figura Anexa 7. Curvas de peso seco versus tiempo para *Trichoderma novaezelandeae* en cinco concentraciones de medio no definido Papa-Dextrosa (PD). Se presentan todas las gráficas con la misma escala para facilitar la comparación de las pendientes.