

Evaluación de tres productos de control biológico comerciales a base de *Trichoderma* spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. *in vitro* con énfasis en pruebas de control de calidad

Gonzalo Salvador Zunino

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Diciembre, 2004

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Evaluación de tres productos de control
biológico comerciales a base de *Trichoderma*
spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. *in*
vitro con énfasis en pruebas de
control de calidad**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Gonzalo Salvador Zunino

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2004

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor

Gonzalo Salvador Zunino

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2004

Evaluación de tres productos de control biológico comerciales a base de *Trichoderma* spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. *in vitro* con énfasis en pruebas de control de calidad

Presentado por:

Gonzalo Salvador Zunino

Aprobado:

Phil Arneson, Ph. D.
Asesor principal

Abelino Pitty, Ph. D.
Coordinador del área de
Fitotecnia

Rogelio Trabanino, M. Sc.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador de la Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria.

María Mercedes Roca, Ph. D.
Asesor

Aurelio Revilla, M.S.A.
Decano Académico Interino

Alfredo Rueda, Ph. D.
Asesor

Kenneth Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A mis padres, Gonzalo y Zaira, por el inmenso amor y apoyo que me dan día a día y por ser mi ejemplo para ser una mejor persona.

A mi hermano Ricardo, por ser lo más significativo de mi vida.

A toda mi familia, por ser unida y amorosa siempre, por ser el apoyo más importante durante toda mi vida.

A Verónica, por estar siempre a mi lado y ser esa persona tan especial, amorosa y consejera en mi vida.

A todas las personas que estuvieron a mi lado apoyándome en cada momento vivido en Zamorano.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Arneson gracias por su dedicación, tiempo, apoyo, motivación, enseñanza y amistad.

Al Ing. Rogelio Trabanino por su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo.

Maria Mercedes Roca por su apoyo y amistad en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Alfredo Rueda por su contribución y apoyo para realizar el trabajo.

A la Ing. Melisa Castillo por brindarme su amistad y apoyo.

A la Ing. Yamile Martinez por su amistad y soporte en la elaboración del trabajo.

A toda la gente que me brindó su ayuda y apoyo durante estos años, V. Ballón, G. Lascano, J. Botto, F. Malo, S. Orego, J. Elizalde, A. Salas, F. Villacís, R. Ávila, L. Badani, A. Borjas, L. Mejía y E. Herrera.

A toda aquella persona que considero mi amigo, por ser mi apoyo en los momentos difíciles vividos en Zamorano.

A todos los profesores que me dieron la oportunidad de aprender y adquirir conocimientos.

A Zamorano porque me hizo una persona más realista y fuerte.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

Al fondo de Beca Salvador, por haberme brindado la oportunidad de estudiar en Zamorano.

RESUMEN

Salvador, G. 2004. Evaluación de tres productos de control biológico comerciales a base de *Trichoderma* spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. *in vitro* con énfasis en pruebas de control de calidad. Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 18 p

El control de calidad de productos biológicos es importante para determinar la viabilidad y eficiencia de los productos comerciales. Las pruebas *in vitro* son utilizadas como método de control de calidad. Los objetivos del estudio fueron comparar la viabilidad de Trichozam[®] con dos productos comerciales utilizados en Honduras (Mycobac[®] y Pro-selective[®]) y comparar su habilidad en la inhibición de los patógenos *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solana* *in vitro*. Se realizaron tres experimentos: 1) determinar la viabilidad de las conidias de los productos evaluados; 2) evaluar la eficiencia de los productos y aislamiento en el control de patógenos; 3) y analizar el mecanismo de acción de *T. harzianum*. En el primer experimento se determinó la concentración de cada producto y se verificaron los datos del fabricante; establecida la concentración de conidias de cada producto comercial, se evaluó la viabilidad de las conidias. La variable medida fue el número de colonias producidas a las 48 horas. Se usó un diseño completamente al azar. En el segundo experimento se realizaron dos ensayos, se sembró el micelio de *Trichoderma* spp. individualmente y con cada uno de los tres patógenos. Los aislamientos se evaluaron por una regresión del crecimiento micelial (mm/día), que demuestra la inhibición de *Trichoderma* spp. sobre los patógenos. El estudio microscópico determinó el mecanismo de acción de *T. harzianum*. El primer experimento determinó que los productos biológicos Trichozam[®] y Mycobac[®] tuvieron una alta viabilidad, al contrario Pro-selective[®] no la tuvo. El segundo experimento indicó que los tres productos y el aislamientos de *Trichoderma* spp. presentaron gran capacidad de antagonismo; por su rápida velocidad de crecimiento y habilidad en inhibir el crecimiento de patógenos. Sin embargo, dentro de las cepas y aislamientos evaluados existió una variabilidad antagónica que diferenció las cepas en su habilidad de inhibir los patógenos. En el tercer experimento los mecanismos de acción observados por *T. harzianum* fueron competencia por espacio, nutrientes y microparasitismo. De acuerdo con los experimentos realizados se determinaron tres metodologías para realizar el control de calidad para la evaluación de cepas de *Trichoderma* spp.

Palabras clave: Hifa, lisis, micelio, Rosa de Bengala.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras.....	xi

INTRODUCCIÓN.....	1
--------------------------	----------

MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
Localización del experimento.....	2
Descripción del los experimentos.....	2
Experimento I: Determinación de la viabilidad de las conidias de los productos comerciales a base de <i>Trichoderma</i> spp.....	2
Experimento II: Evaluación del crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. y la inhibición de los patógenos <i>Pythium</i> sp., <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Rhizoctonia solani in vitro</i>	4
Experimento III: Evaluación del mecanismo de acción de <i>Trichoderma harzianum</i> para el control de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> sobre un portaobjetos <i>in vitro</i>	6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
Experimento I.....	7
Experimento II.....	8
Ensayo I.....	8
Ensayo II.....	9
<i>Pythium</i> sp.....	9
<i>Rhizoctonia solani</i>	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	11
Experimento III.....	12

CONCLUSIONES	15
RECOMENDACIONES	16
BIBLIOGRAFÍA	17

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Especificaciones técnicas de las concentraciones de los productos comerciales.....	7
2. Número de colonias de los tratamientos por plato petri derivado de una concentración de conidias de 2×10^1 a las 48 horas de haber sido sembradas las conidias.....	7

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vista superior de un plato petri con medio de cultivo (PDA) para el estudio de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. y la inhibición <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	5
2. Diseño de cámara húmeda y medio de cultivo (PDA) para el estudio de mecanismos de inhibición de <i>Trichoderma harzianum</i> a <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	6
3. Crecimiento individual de las cepas y asilamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	8
4. Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. inhibida por <i>Trichoderma</i> spp.....	9
5. Crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> inhibida por <i>Trichoderma</i> spp.....	10
6. Inhibición del crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. (verde, derecha) sobre <i>Rhizoctonia solani</i> (café, izquierda) después de 7 días de sembrados en PDA.....	11
7. Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> inhibida por <i>Trichoderma</i> spp.....	12
8. Inhibición del crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> (verde, derecha) sobre <i>Fusarium oxysporum</i> (rosado, izquierda) después de 7 días de sembrados en PDA...	12
9. Esporas e hifas de <i>Trichoderma harzianum</i> parasitando <i>Rhizoctonia solani</i> (Magnificado X100).....	13
10. Enrollamiento típico de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre su huésped <i>Fusarium oxysporum</i> (Magnificado X100).....	14

INTRODUCCIÓN

La resistencia a fungicidas, contaminación ambiental y toxicidad, ha motivado a la búsqueda de otros métodos efectivos y no perjudiciales para combatir los patógenos de plantas (Nalimova 2003). Existe la necesidad de la utilización de productos biológicos que sean amigables al ambiente debido al uso excesivo de los agroquímicos.

El control de calidad de productos biológicos tiene una gran importancia para determinar la viabilidad y eficiencia de los productos que se comercializan. La producción se acompaña por un protocolo de control de calidad que incluye verificación de la pureza y la efectividad biológica del producto final, el cual está constituido por la biomasa del hongo, metabolitos y residuos del medio de cultivo (Nalimova 2003).

Se realizan pruebas *in vitro* para determinar la capacidad antagónica de un microorganismo con respecto a otro, esto refleja la capacidad y variabilidad genética del antagonista. Este tipo de prueba permite realizar la selección de cepas facilitando el trabajo, ya que no es probable que un antagonista sea eficiente en el laboratorio y no lo sea en el campo (Coutinho *et al.* 2000). La eficiencia de Trichozam[®] con relación a otros productos y un aislamiento nativo se evaluará mediante este tipo de pruebas, las cuales toman en cuenta su habilidad de crecimiento y antagonismo como un indicador de calidad.

Se realizaron pruebas de control de calidad *in vitro* de tres productos a base de *Trichoderma* spp. y de un aislamiento nativo, con el objetivo de desarrollar pruebas para elaborar un protocolo de control de calidad de Trichozam[®] (*Trichoderma harzianum*). Los objetivos específicos fueron, determinar la viabilidad y eficacia de Trichozam[®] en comparación con Mycobac[®] (Laverlam, Colombia) y Pro-selective[®] (Naturalmente Pureza, México), productos que son comercializados y usados por los agricultores en Honduras. Además se analizó la eficacia de estos productos para el control de los patógenos *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. El lugar se encuentra a 30 km de la ciudad capital Tegucigalpa, Departamento de Francisco Morazán.

DESCRIPCIÓN DEL LOS EXPERIMENTOS:

Este estudio fue dividido en tres experimentos para poder:

- I. Determinación de la viabilidad de las conidias de los productos evaluados.
- II. Evaluación del crecimiento de las cepas de los tres productos y aislamiento de *Trichoderma* spp. para el control de patógenos.
- III. Estudiar el mecanismo de acción de *Trichoderma harzianum*.

EXPERIMENTO I: Determinación de la viabilidad de las conidias de los productos comerciales a base de *Trichoderma* spp.

Tratamientos:

Los productos comerciales a base de *Trichoderma* spp. (tratamientos) de este experimento fueron seleccionados de distintas proveniencias de Latino América.

T1 = Tricho zam[®] (*T. harzianum*); Escuela Agrícola Panamericana, Honduras.

T2 = Mycobac[®] (*T. lignorum*); Laverlam, Colombia.

T3 = Pro-selective[®] (*T. harzianum*); Naturalmente Pureza, México.

Metodología del Trabajo

Se seleccionaron los productos a evaluar, una vez seleccionados se procedió a determinar la cantidad óptima de cada uno de ellos para poder realizar el conteo de conidias por gramo de producto.

1. Se efectuó el conteo de conidias por gramo de producto comercial para todos los tratamientos, para verificar la concentración por medio de una Cámara de Neubauer¹.

¹Cámara de Neubauer, Modelo Bright Line, profundidad de 1/10 mm, Boeco[®], Alemania

- Se realizó una dilución madre colocando 1 g del producto en un vaso de precipitado disolviéndolo en 200 ml de H₂O con un 1ml de solución Tween[®].
 - Posteriormente se realizaron dos diluciones más a partir de la dilución madre hasta llegar a una dilución óptima para facilitar el conteo de conidias en la Cámara de Neubauer.
 - Se realizó el conteo por número de conidias por cuadrante para poder obtener un promedio final y utilizarlo en la fórmula.
 - Por medio de la ecuación = $X(\text{promedio conidias contadas}) \times 1 \times 10^4 (\text{Constante}) \times 2 \times 10^2 (\text{Dilución Madre}) \times 1 \times 10^n (\text{Diluciones realizadas})$ se logró determinar la concentración de los productos.
2. Se prepararon platos petri (r = 90 mm) con un medio PDA (Agar Papa Dextrosa) con Rosa de Bengala (17 ppm) la misma que reduce la capacidad de extensión de las colonias y el antibiótico sulfato de estreptomicina (30 ppm).
 3. Establecida la concentración o cantidad de conidias que tiene cada producto, se continuó con la evaluación de la viabilidad de las conidias. Los productos evaluados fueron diluidos todos a una misma concentración de conidias/ml a 2×10^1 .
 4. Se realizó la siembra sobre el medio mencionado en el paso dos, utilizando un 1 ml de la dilución de suspensión de esporas realizada previo a este paso. Luego con una espátula de vidrio se esparció la suspensión en el medio. Posteriormente se sellaron los platos petri con parafilm y se dejaron incubando por 48 h a $22 (\pm) 2^\circ\text{C}$ en oscuridad. La variable medida fue el número de colonias por plato petri. Según la concentración debería haber 20 conidias por plato, entonces de acuerdo con la germinación de las conidias se determina la viabilidad.

Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, haciendo un total de nueve unidades experimentales. Se contó la cantidad de colonias a las 48 horas de tiempo incubación.

Diseño estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Statistical Analysis System[®] (SAS 1999). Se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) usando un Modelo Lineal General (GLM) y una separación de medias “Duncan” para medir la variable número de colonias por plato petri.

EXPERIMENTO II: Evaluación del crecimiento de *Trichoderma* spp. y la inhibición de los patógenos *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* *in vitro*.

Tratamientos:

Antagonistas:	Patógenos:
Trichozam [®] (<i>Trichoderma harzianum</i>)	<i>Pythium</i> sp.
Mycobac [®] (<i>Trichoderma lignorum</i>)	<i>Rhizoctonia solani</i>
Pro-selective [®] (<i>Trichoderma harzianum</i>)	<i>Fusarium oxysporum</i>
Aislamiento El Volcán (<i>Trichoderma</i> sp.)	

Pasos que se siguió para la realización del experimento:

1. Aislamiento de hongo benéfico (antagonista)

- a. Se aisló *Trichoderma* spp. de los productos comerciales Trichozam[®] (*T. harzianum*), Mycobac[®] (*T. lignorum*) y Pro-selective[®] (*T. harzianum*) utilizando 0.1g del producto comercial en un medio artificial de PDA (Papa Dextrosa Agar).
- b. Para el aislamiento de *Trichoderma* sp. silvestre se obtuvo una muestra de tierra del cerro El Volcán localizado en el departamento El Paraíso a una altura de 1707 (Latitud: 13,56447 ; Longitud: -86,54). La muestra de tierra se dispersó en un medio artificial de AA (Agar Agua), para luego obtener *Trichoderma* sp., para ser aislado.

2. Aislamiento de patógenos

- a. Se reactivó el hongo patógeno *Pythium* sp. de un suelo inoculado con el mismo, proveniente del laboratorio de fitopatología. Se utilizó un medio de crecimiento artificial de PDA (Papa Dextrosa Agar).
- b. *F. oxysporum* se resembró en PDA como medio de cultivo. La cepa madre fue proporcionada por el Laboratorio de fitopatología de Zamorano.
- c. *R. solani* se aisló en AA (Agar Agua) de una semilla de remolacha inoculada con una cepa madre proveniente del departamento de fitopatología de la Universidad de Lincon, Nebraska. La cepa fue proporcionada por el laboratorio de biodiversidad y fitomejoramiento de Zamorano, Honduras.

3. Establecimiento de los ensayos

Ensayo I:

Aislado el *Trichoderma* spp. de los productos y de la muestra de suelo utilizada, se evaluó el crecimiento individual de los antagonistas. Para realizar el experimento, se sembró

1mm² de agar con micelio de un cultivo aislado, descrito previamente en el paso uno, luego se colocó sobre el PDA, a un extremo del plato petri. Este procedimiento se realizó para cada *Trichoderma* spp. y se evaluó el crecimiento en mm/día por 10 días.

Ensayo II:

Los tres patógenos aislados se sembraron junto con uno de los *Trichoderma* spp. en un plato petri con PDA, a una distancia de 90 mm entre ellos. Se utilizó 1 mm² de agar con micelio de los patógenos aislados y de los antagonistas, luego se colocaron sobre el PDA, en extremos opuestos del plato petri se sembraron los dos hongos (Figura. 1). Se midió el crecimiento del micelio mm/día desde el punto de siembra hasta el crecimiento final diario y el crecimiento fue evaluado por 10 días. Este procedimiento se realizó para las distintas cepas y aislamiento de *Trichoderma* spp. con los patógenos *Pythium* sp, *R. solani* y *F. oxysporum*.

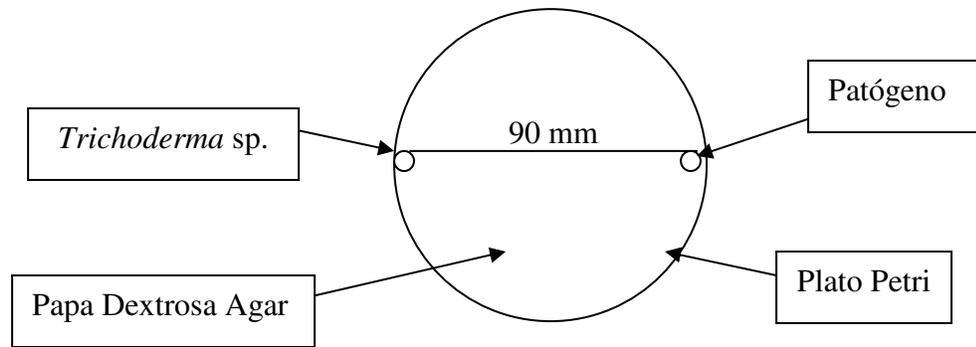


Figura 1. Vista superior de un plato petri con medio de cultivo (PDA) para el estudio de crecimiento de *Trichoderma* spp. y la inhibición *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.

Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). El diseño fue consistió por cuatro cepas de *Trichoderma* sp. y tres patógenos. Se realizaron tres repeticiones para evaluar cada cepa de *Trichoderma* sp. con cada patógeno, haciendo un total de 36 unidades experimentales.

Diseño estadístico

La toma de datos se realizó a diario después de la siembra hasta los 10 días. Se tomó en cuenta los días en que las cepas de *Trichoderma* sp. crecían individualmente. Posteriormente se evaluó el efecto que tiene *Trichoderma* spp. Se midió el crecimiento del micelio (mm/día) y se ajustó mediante un análisis de regresión cuadrática para las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y de los patógenos, utilizando el paquete estadístico MINITAB® (MINITAB 1999).

EXPERIMENTO III: Estudio del mecanismo de acción de *Trichoderma harzianum* para el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* sobre un portaobjetos *in vitro*.

Para poder observar la interacción y estudiar el mecanismo de inhibición entre *F. oxysporum* y *R. solani* con *Trichoderma* spp. se utilizó un arreglo especial diseñado anteriormente por Córdova (2003) de una cámara húmeda. De esta manera se pudo tener un crecimiento continuo de los dos hongos. El diseño consistió en un plato petri provisto de papel filtro sobre el cual se colocó un soporte hecho con una varilla de vidrio doblado en forma triangular para separar el portaobjeto del papel filtro. En el portaobjeto se colocaron 1 mililitro de PDA, se sembraron los dos hongos, en dos puntos separados uno del otro y seguidamente se colocó un cubreobjeto sobre el PDA. A los tres días se observó el crecimiento y la interacción entre los dos hongos (Figura. 2). Para la observación se utilizó un microscopio de luz con magnificación de X40 y X100 (Córdova 2003).

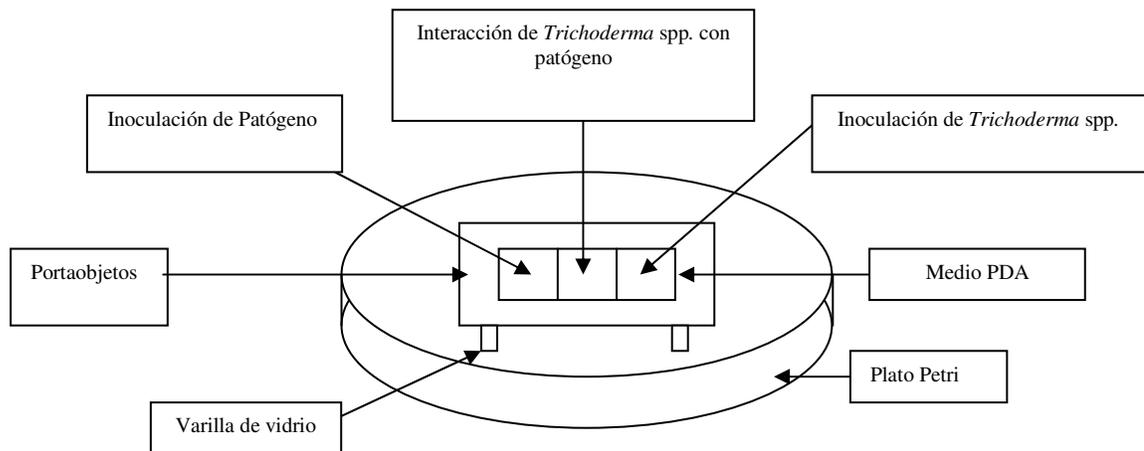


Figura 2. Diseño de cámara húmeda y medio de cultivo (PDA) para el estudio de mecanismos de inhibición de *Trichoderma harzianum* a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXPERIMENTO I: Determinación de la viabilidad de las conidias de los productos comerciales a base de *Trichoderma* sp.

Para realizar el experimento de la viabilidad de conidias de los productos, fue necesario confirmar la concentración de conidias por gramo de producto comercial utilizando una Cámara de Neubauer (Cuadro. 1)

Cuadro 1. Especificaciones técnicas de las concentraciones de los productos comerciales.

Producto	Concentración por paquete	Dosis g/ha	Concentración por gramo de producto	Concentración leída por Cámara de Neubauer
Trichozam [®]	3×10^{11}	240	1.25×10^9	1.1×10^{10}
Mycobac [®]	2×10^9	100	2×10^7	1.55×10^7
Pro-selective [®]	1×10^{11}	1000	1×10^8	3.95×10^7

Para facilitar el conteo de colonias se procedió a diluir los productos a baja concentraciones de conidias (2×10^1)². Determinada la concentración, se procedió a diluir los productos a una concentración de 2×10^1 . Por esta concentración se sabe que existe un promedio de 20 conidias por plato petri. De acuerdo al porcentaje de germinación de las conidias (colonias/plato) se puede determinar la viabilidad de los productos.

Se pudo observar que el producto Trichozam[®] y Mycobac[®] produjo una mayor cantidad de colonias con respecto el producto Pro-selective[®]. Estas diferencias fueron significativas, lo que determina que Trichozam[®] y Mycobac[®] tienen mayor porcentaje de viabilidad a las 48 horas (Cuadro. 2).

Cuadro 2. Número de colonias de los tratamientos por plato petri derivado de una concentración de conidias de 2×10^1 a las 48 horas de haber sido sembradas las conidias.

Productos	Colonias
Trichozam [®]	28 a
Mycobac [®]	19 b
Pro-selective [®]	0 c

Letras diferentes muestran diferencias significativas ($P < 0.05$)

² Arneson, P. 2004. Viabilidad de conidias. Zamorano, Honduras. EAP. Comunicación personal.

EXPERIMENTO II: Evaluación del crecimiento de *Trichoderma* spp. y la inhibición de los patógenos *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* *in vitro*.

Con un modelo de regresión se explica el crecimiento de *Trichoderma* sp. y la inhibición de los patógenos, el cual se logra con exactitud por medio de una ecuación, lo que demuestra el crecimiento diario de *Trichoderma* sp. individual y el efecto que tiene sobre el crecimiento en los patógenos.

Ensayo I

Crecimiento individual de las cepas y aislamiento de *Trichoderma* spp.

Crecimiento de *Trichoderma* spp.

Crecimiento de *Trichoderma* spp. (mm) = $-22 + 25.5 \text{ Días} - 1.47 \text{ Días}^2 + 7.67 \text{ Tricho zam} + 7.07 \text{ Mycobac}$; ($R^2 = 96\%$, $P \leq 0.001$)

Hubo una diferencia significativa en la tasa de crecimiento individual de las cepas y el aislamiento. El producto Pro-selective® y el aislamiento de la muestra de suelo del cerro El Volcán no tuvieron diferencia significativa en su crecimiento, lo que indica que dichos *Trichoderma* spp. fueron los que presentaron menor tasa de crecimiento (Figura. 3). El producto Mycobac® creció 7.07 (mm/día) más que los productos descritos anteriormente. El producto Tricho zam® tuvo la mayor tasa de crecimiento, ya que superó en crecimiento a los demás *Trichoderma* spp. por 7.67 (mm/día).

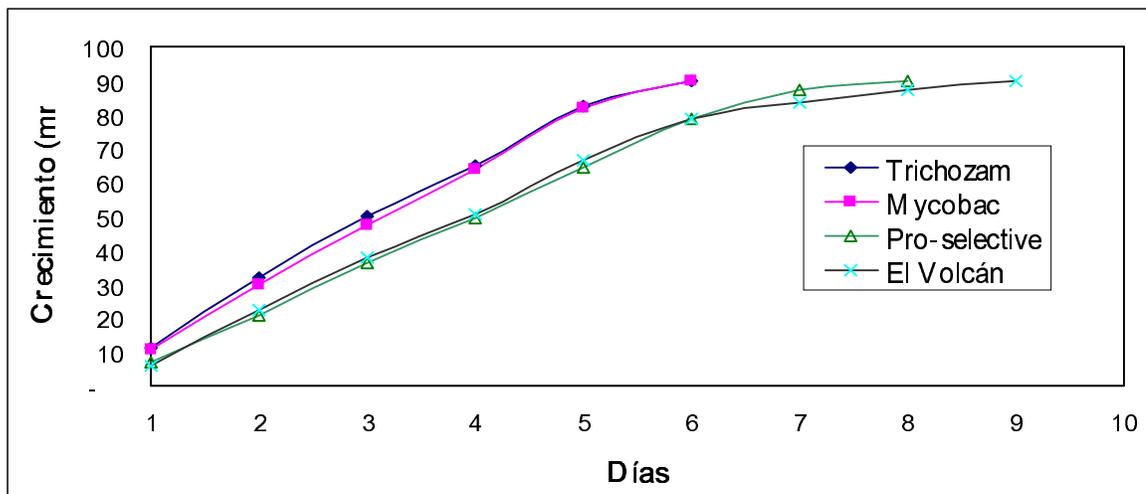


Figura 3. Crecimiento individual de las cepas y aislamiento de *Trichoderma* spp.

Ensayo II:

Pythium sp.

Crecimiento de *Pythium sp.*

Crecimiento de *Pythium sp.* (mm) = $-17.33 + 28.93 \text{ Días}$; ($R^2 = 94\%$, $P < 0.001$)

El crecimiento de *Pythium sp.* es muy virulento, el patógeno sin restricciones crece con mucha velocidad. A los cuatro días de ser sembrado el *Pythium sp.* en un plato petri con PDA el micelio llega a cubrirlo por completo.

Crecimiento de *Pythium sp.* con *Trichoderma spp.*

Crecimiento de *Pythium sp.* inhibida por *Trichoderma spp.* (mm) = $-19.8 + 51 \text{ Días} - 10.8 \text{ Días}^2 + .6 \text{ Días}^3 + 5.2 \text{ Pro-selective} - 7.27 \text{ Silvestre (El Volcán)} - 8.57 \text{ Tricho zam} - 7.9 \text{ Mycobac}$; ($R^2 = 90\%$, $P < 0.001$)

Existe una diferencia significativa en todas las cepas y en el aislamiento de *Trichoderma spp.* evaluados. La cepa de Pro-selective® tuvo diferencia significativa más grande con relación a las demás cepas y aislamiento de *Trichoderma sp.*, siendo esta la menos efectiva. El aislamiento de la muestra de suelo del cerro El Volcán supera al producto anterior, inhibiendo al patógeno por 7.27 (mm/día). La inhibición por Mycobac® fue de 7.9 (mm/día) sobre *Pythium sp.* El producto Trichozam® fue la cepa que tuvo mayor control sobre el patógeno, al progresar 8.57 (mm/día) más que el resto de cepas y aislamiento de *Trichoderma spp.* (Figura. 4). Las diferencias detectadas, se asemejan a las obtenidas por otros autores, demostrando la variabilidad de la actividad antagonista de los diferentes aislamientos de *Trichoderma spp.* (Cúndom *et al.* 2000). La velocidad de crecimiento presentada por las especies de *Trichoderma spp.* son motivo de utilización de este microorganismo como antagonista, para el control de fitopatógenos (Baker y Cook 1983^a). Las líneas de la regresión de la inhibición demuestran la variabilidad de los hongos en su habilidad como antagonistas sobre el patógeno *Pythium sp.*

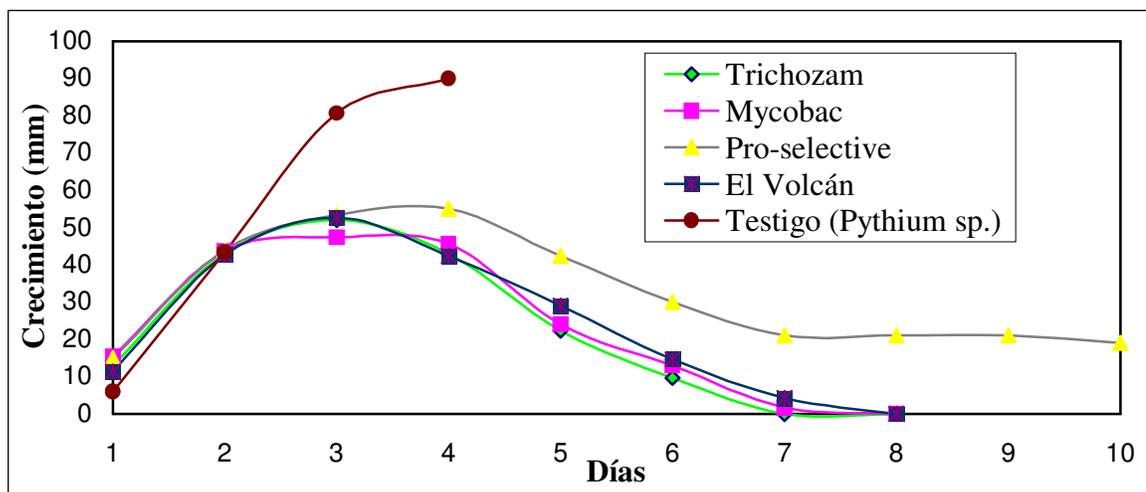


Figura 4. Crecimiento de *Pythium sp.* inhibida por *Trichoderma spp.*

Rhizoctonia solani

Crecimiento *R. solani*

Crecimiento de *R. solani* (mm) = $-22.5 + 28.7 \text{ Día}$; ($R^2 = 99.5\%$, $P < 0.001$)

El crecimiento de *R. solani* es fulminante, el patógeno individual a los cuatro días de ser sembrado en PDA logro cubrir el plato petri.

Crecimiento *R. solani* con *Trichoderma* spp.

Crecimiento de *R. solani* inhibida por *Trichoderma* spp. = $-33.4 + 41.9 \text{ Días} - 8.15 \text{ Días}^2 + .429 \text{ Días}^3 + 13.4 \text{ Tricho zam} + 17.8 \text{ Pro-selective}$; ($R^2 = 73\%$, $P < 0.001$)

Las tres cepas y el aislamiento de *Trichoderma* spp. presentaron diferencias en el crecimiento del micelio, en medio compartido con el aislamiento de *R. solani*. Los aislamientos de Mycobac[®] y el aislamiento de la muestra de suelo del cerro El Volcán no presentaron una diferencia significativa, por lo cual fueron las cepas que tuvieron el mejor control sobre el patógeno.

Existe una diferencia en el control del patógeno con respecto a las dos cepas restantes de *Trichoderma* spp. Tricho zam[®] tuvo un crecimiento menor con relación a las cepas anteriores, al solo inhibir 13.4 (mm/día).

Pro-selective[®] fue el biocontrolador que presentó menor eficiencia en su comportamiento, (Figura. 5). Con respecto al crecimiento micelial de *Trichoderma* spp., frente a los diferentes aislamientos de *R. solani* no manifestaron diferencias significativas entre sí, excepto con una cepa, que al presentar un crecimiento más rápido (Figura. 6), parecía tener un efecto superior en el contra del patógeno (Cúndom *et al.* 2000).

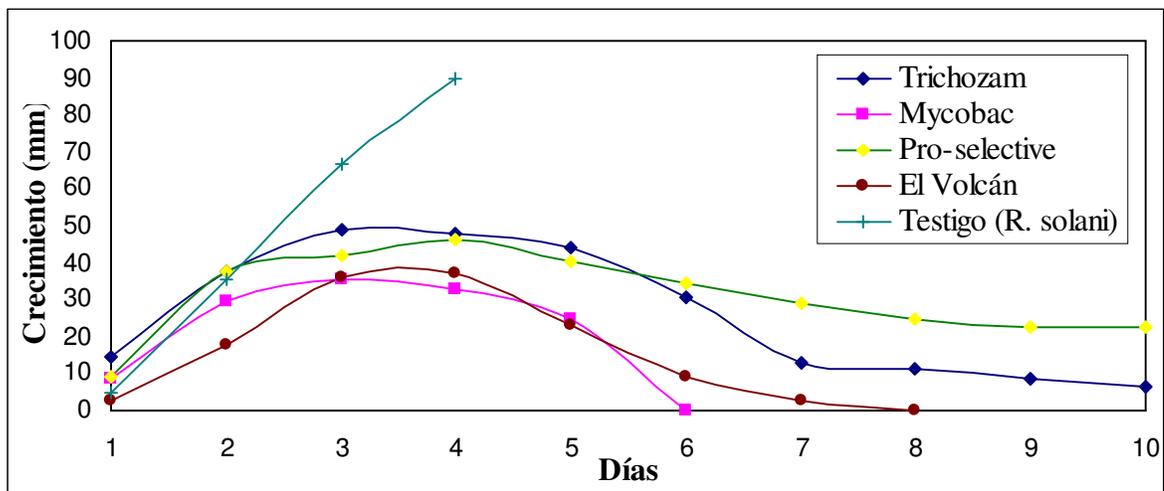


Figura 5. Crecimiento de *Rhizoctonia solani* inhibida por *Trichoderma* spp.

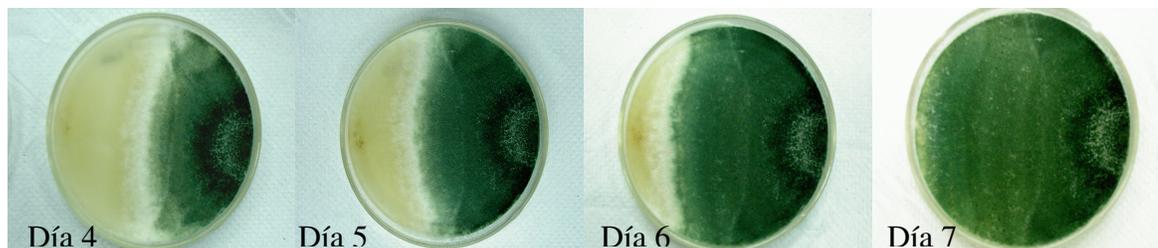


Figura 6. Inhibición del crecimiento de *Trichoderma* spp. (verde, derecha) sobre *Rhizoctonia solani* (café, izquierda) después de 7 días de sembrados en PDA.

Fusarium oxysporum

Crecimiento de *F. oxysporum*

Crecimiento de *F. oxysporum* (mm) = $-0.400 + 5.96 \text{ día}$; ($R^2 = 99\%$, $P < 0.001$)

El crecimiento de *F. oxysporum* es bien lento. Al parecer la cepa no tiene la habilidad de crecer rápido. Hasta los diez días que se evaluó el crecimiento de los hongos, el patógeno *F. oxysporum* no llegó a cubrir el plato petri.

Crecimiento de *F. oxysporum* con *Trichoderma* spp.

Crecimiento de *F. oxysporum* inhibida por *Trichoderma* spp. (mm) = $-2.32 + 6.2 \text{ Días} - .385 \text{ Días}^2 - 1.47 \text{ Tricho zam} - 4.6 \text{ Silvestre (El Volcán)}$; ($R^2 = 92\%$, $P < 0.001$)

Las tres cepas y aislamiento de *Trichoderma* spp. mostraron una diferencia en el crecimiento del micelio, en medio compartido con el aislamiento de *F. oxysporum*. Las cepas Pro-selective® y Mycobac® no mostraron diferencia en la inhibición del patógeno. La cepa Trichozam® obtuvo un buen resultado al inhibir el patógeno en 1.47 (mm/día) más que las cepas descritas anteriormente. El aislamiento de la muestra de suelo del cerro El Volcán tuvo el mejor crecimiento, al lograr inhibir en 4.6 (mm/día) más que los demás *Trichoderma* spp. Por el lento crecimiento del patógeno el biocontrolador (*Trichoderma* spp.) pudo desarrollarse sin impedimento. Sin embargo no llegó a crecer sobre el patógeno (Figura. 7), al contrario de lo observado con otros patógenos.

F. oxysporum es un hongo resistente a los antagonistas, pero no tiene la capacidad para igualar o superar la velocidad de crecimiento de *T. harzianum* (Córdova 2003). Las cepas y aislamientos de *Trichoderma* sp. Tienen un crecimiento constante hasta llegar al punto de encuentro del patógeno. No obstante ningún bio-controlador logra una lisis en *F. oxysporum*. *T. harzianum* se pone en contacto con hifas de otro organismo susceptible, segregar sustancias supresoras de crecimiento (Figura. 8), que hacen que el otro organismo detenga su crecimiento (Herrera 1998).

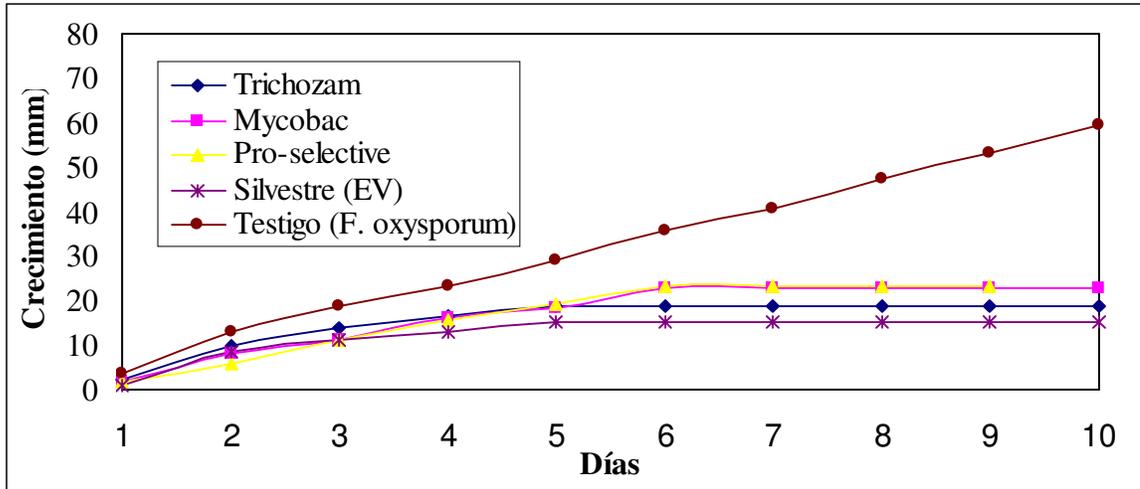


Figura 7. Crecimiento de *Fusarium oxysporum* inhibida por *Trichoderma* spp.

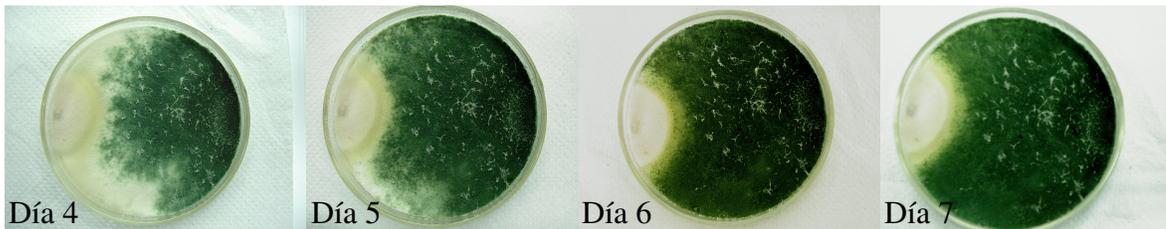


Figura 8. Inhibición del crecimiento de *Trichoderma harzianum* (verde, derecha) sobre *Fusarium oxysporum* (rosado, izquierda) después de 7 días de sembrados en PDA.

EXPERIMENTO III: Estudio del mecanismo de acción de *Trichoderma harzianum* para el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* sobre un portaobjetos *in vitro*.

Microscópicamente, se observó que *T. harzianum* produce más cantidades de esporas que se diseminan sobre las hifas de *R. solani*. Posteriormente germinan las hifas y parásitas el patógeno. Se observó que las hifas de *T. harzianum* se enrollaron en las hifas de *R. solani* y posteriormente causaron lisis, sin embargo no se observó penetración directa (Baker y Cook 1983^b). Al parecer (Figura. 9) existe destrucción de la hifa de *R. solani* por una hifa del antagonista. *T. harzianum* penetra a la hifa huésped aparentemente por la degradación parcial de la pared celular (Bailey *et al.* 1997).

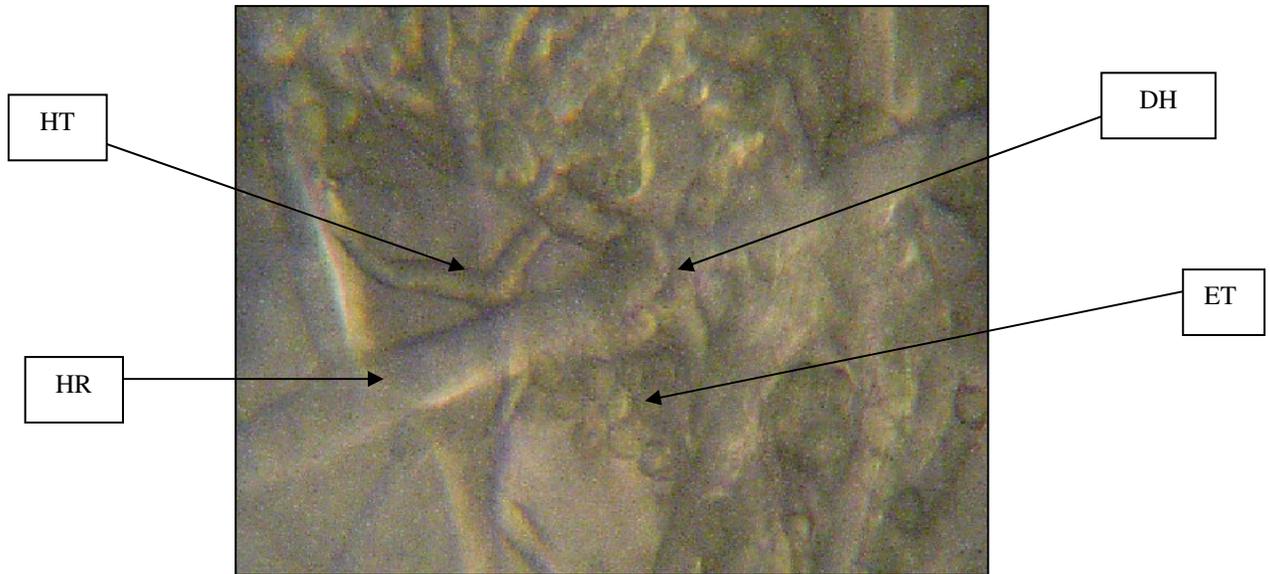


Figura 9. Esporas e hifas de *Trichoderma harzianum* parasitando *Rhizoctonia solani* (Magnificado X100).

ET: Esporas de *T. harzianum*; HT: Hifas de *T. harzianum*.; HR: Hifas de *R. solani*; DH: Destrucción de Hifa

En otros estudios de microscopía electrónica de los estadios tardíos de la interacción de *T. harzianum* con *R. solani* se demostró que las hifas del parásito hicieron contacto con su huésped y digirieron a su pared celular, resultando en una rápida vacuolación, colapso y desintegración del mismo (Biocontrol 2004).

En estudios anteriores, en el microscopio se pudo observar que *T. harzianum* esporula mayor cantidad de esporas que *F. oxysporum*. Posteriormente, la esporas de *T. harzianum* germina y produce hifas, que crecen rápidamente y se enrollan alrededor de la hifa del patógeno (Figura. 10), ofreciendo un bloqueo tanto en espacio como en nutrientes para *F. oxysporum* (Córdova 2003). De manera general, todos los aislamientos mostraron efecto micoparasítico, algunos por enrollamiento y otros por penetración de las hifas, obstruyendo de esta forma las funciones biológicas y fisiológicas del patógeno, además de detener su crecimiento (Andreu *et al.* 2004)

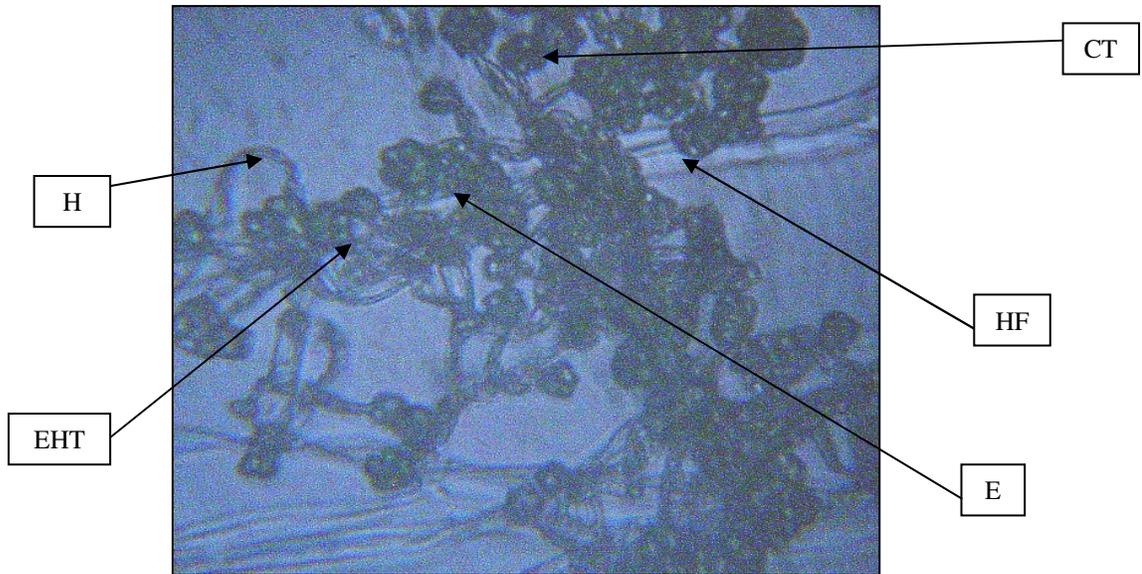


Figura 10. Enrollamiento típico de *Trichoderma harzianum* sobre su huésped *Fusarium oxysporum* (Magnificado X100).

CT: Conidioforos de *T. harzianum*; ET: Esporas de *T. harzianum*; HT: Hifas de *T. harzianum*; HR: Hifas de *F. oxysporum*; EHTF: Enrollamiento de hifas de *T. harzianum* sobre hifas de *F. oxysporum*

CONCLUSIONES

De acuerdo con los experimentos realizados se determinaron tres metodologías para realizar el control de calidad para la evaluación de cepas de *Trichoderma* spp.

Se comprobó que la viabilidad de Trichozam[®] y Mycobac[®] es efectiva ya que las conidias germinan sin problema. Al contrario, Pro-selective[®] tuvo una menor viabilidad; las esporas no germinaron a las 48 horas como se esperaba y sólo germinaron días después.

En condiciones *in vitro*, las tres cepas y el aislamiento de la muestra de suelo del cerro El Volcán de *Trichoderma* spp. demostraron una actividad antagónica efectiva con *Pythium* sp., *R. solani* y *F. oxysporum*. Las cepas de Trichozam[®], Mycobac[®] y el aislamiento fueron las que mejor crecimiento tuvieron sobre los patógenos, demostrando la mejor actividad antagónica.

Estudios microscópicos de la interacción de *T. harzianum*. con *R. solani* mostraron el mecanismo de acción por microparásitismo. Al parecer, las hifas del antagonista penetraron las hifas del patógeno y realizan un ahorcamiento que pudo haber sido precursor de la lisis que limita el crecimiento del patógeno.

Estudios microscópicos de la interacción de *T. harzianum* con *F. oxysporum* sugieren un mecanismo físico de acción por ahorcamiento y competencia de espacio. *T. harzianum* alcanzó al hongo susceptible y sus hifas se enrollaron alrededor de las hifas del patógeno, o crecieron a lo largo de las hifas, formando estructuras morfológicamente similares a apresorios.

RECOMENDACIONES

Realizar pruebas *in vitro* de distintas concentraciones de conidias de *T. harzianum* del producto biológico Trichozam[®] para controlar *Pythium* sp., *R. solani* y *F. oxysporum*.

Realizar pruebas en invernadero o en una casa malla similares a las realizadas en la laboratorio con las cepas y aislamientos de *Trichoderma* spp.

Realizar un análisis microscópico del mecanismo de acción de *T. harzianum* sobre *Pythium* sp.

Utilizar técnicas bioquímicas para identificar sustancias producidas por *T. harzianum* en el antagonismo de los patógenos *Pythium* sp., *R. solani* y *F. oxysporum*.

Evaluar los aislamientos con mejores resultados, en condiciones controladas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Andreu, C.M; Bernal, A; Fernández, O; Gonzáles, M; Moya, M.M. 2004. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* schlecht f.sp cubense (e.f.smith) snyd. & hans (en línea). Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central de Las Villas, Cuba. Consultado 25 abr 2004. Disponible en: <http://www.virtualcentre.org/es/enl/BTJ%20Taller/bernalalexander.htm>

Baker, F.K; Cook, R.J. 1983^a. Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. 433 p.

Baker, F.K; Cook, R.J. 1983^b. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. 539 p.

Bailey, A.M; Herrera, A; Herrera, J.L. 1997. Biología Molecular de Hongos de Importancia Agronómica (en línea). Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior, Consultado 1 oct 2004. Disponible: <http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/avanners/ene97/vol1605/vol605.html>

Biocontrol, 2004. Monografía de *Trichoderma* spp. (en línea). Bolo San Isidro, Grano de Oro, Colombia. Consultado 1 oct 2004. Disponible en: <http://www.control-biologico.com/monog.trichoderma.htm>

Córdova, M.B. 2003. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Trichozam® (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral® (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate. Tesis Ing. Agro. E.A.P. Honduras, E.A.P. p 31

Coutinho, M; Cúndom, M.A; Gutierrez, M.A; Mazza, S.M; Mazzanti, M.A. 2000. Actividad Antagónica *in vitro* de Hongos Saprofitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. (en línea). Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Sargento Cabral 2121 –(3400) Corrientes Argentina. Consultado 23 abr 2004. Disponible en: <http://www1.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-037.pdf>

Cúndom, M.A; Gutiérrez, S.A; Mazza, S.M; Mazzanti, M.A. 2000. Evaluación de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solana* *in vitro* e invernáculo. (en línea). Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Sargento Cabral 2121 – (3400) Corrientes Argentina. Consultado 30 sep 2004. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/5-Agrarias/A-051.pdf>

Herrera, A. 1998. Control Biológico (Avance y Perspectiva). Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES). México. Consultado 15 ago 2004. Disponible en <http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES>

MINITAB. 1999. Minitab stadistical software for Windows[®], Minitab Inc, USA.

Nalimova, M.S. 2003. Producción y aplicación de *Trichoderma spp.* como antagonista de hongos fitopatógenos (en línea). La Habana, Cuba. Consultado 30 oct. 2003. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/agro/produce/TRICHODE.htm>

SAS (SAS Institute Inc, US). 1999. SAS[®] User's Guide Statistics. Version 6.12. SAS Institute Inc, Cary, NC. 512 p.