



Eficiencia de Trichoderma harzianum y preparados microbiales sobre patógenos en cultivos

Philip Torres R.
Omar Guerrero G.

Resumen

Con el objeto de evaluar el efecto de *Trichoderma harzianum*, E.M. (Microorganismos Eficaces) y de AGROPLUX sobre el desarrollo de hongos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*, fue realizada la presente investigación en condiciones de laboratorio y se determinaron los efectos sobre el crecimiento micelial de los patógenos en cajas de Petri, con el PDA. Los resultados indican que *T. harzianum* presentó una acción de parasitismo con *R. solani* y *S. sclerotiorum*; en cambio con E.M. y AGROPLUX se observó la presencia de antibiosis representada en un halo alrededor del anillo de vidrio que contenía los productos mencionados, los cuales impidieron el crecimiento de los patógenos.

Palabras clave

Parasitismo, antibiosis, *trichoderma harzianum*, *R. solani* y *S. sclerotiorum*.

Abstract

With the object to evaluate the effect of *Trichoderma harzianum*, of E.M. (Effective Microorganisms) and of AGROPLUX on the development of fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*, was finished the present investigation in conditions of laboratory. Were determined the effects on the micelial growth of the pathogens in boxes of Petri with the PDA. The results indicate that *T. harzianum* it presented/displayed an action of parasitism with *R. solani* and *S. sclerotiorum*; however with E.M. and AGROPLUX was observed the presence of antibiosis represented in one pull ahead around the glass ring that contained mentioned products as they prevented the growth of the pathogens.

Key words

Parasitism, antibiosis, *trichoderma harzianum*, *R. solani* and *S. sclerotiorum*.

I. Introducción

La investigación busca evaluar el paquete tecnológico de FUNDASES con productos como el E.M. (Microorganismos Eficaces), AGROPLUX y el hongo *Trichoderma*, antagonista de patógenos vegetales, presentes en la mayoría de los suelos. El presente estudio pretendió determinar y describir la relación entre el control del inoculo y la incidencia de las enfermedades costra negra de la papa y el moho blanco de la lechuga, para evaluar el efecto del hongo *Trichoderma harzianum*, de E.M. (Microorganismos Eficaces) y de AGROPLUX en el desarrollo de organismos fitopatógenos *S. sclerotiorum* y *R. solani*, en condiciones de laboratorio e invernadero.

Como objetivos específicos fueron contemplados:

- Establecer el efecto del hongo *Trichoderma harzianum*, FUNDASES y ORIOS sobre el crecimiento de los organismos fitopatógenos *S. sclerotiorum* y *R. solani* in Vitro.
- Determinar el efecto de los Microorganismos Eficaces (E.M.) y de AGROPLUX sobre el crecimiento de los organismos fitopatógenos *S. sclerotiorum* y *R. solani* in Vitro.

II. Metodología

En el laboratorio de Agroecología, de la Corporación Universitaria Minuto de Dios (Uniminuto), se realizaron los procesos de aislamiento, purificación de los hongos patógenos para la obtención de colonias puras, la siembra de las cepas del hongo controlador y los diferentes enfrentamientos entre los hongos.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo de PDA (Papa-Dextrosa-Agar) se utilizó un elermeyer en el que se vertieron 1000 ml de agua destilizada, más 39 gramos de PDA en polvo, y se diluyó todo el medio de cultivo, al que se le puso un tapón de algodón y fue sometido a esterilización en autoclave, a 120° centígrados con 15 libras de presión, durante 45 minutos.

Con el medio a temperatura ambiente se llevó a la cámara de flujo laminar y en cajas de Petri de 90 mm se vertieron 20 ml de PDA por caja, y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta su solidificación.

Aislamiento de los patógenos

Los patógenos se fueron aislados a partir de esclerocios presentes en la base del tallo de la lechuga, síntoma de *Sclerotinia sclerotiorum* y de esclerocios en la epidermis del tubérculo de papa, síntoma de *Rhizoctonia solani*.

Con las muestras tomadas fueron empacadas en bolsas plásticas y se transportaron al laboratorio de agroecología de Uniminuto en la Sede de la Calle 90.

Obtención de colonias y purificación de colonias de los patógenos

Con las muestras recolectadas de los dos hongos se realizó su desinfección, poniendo las muestras en Hipoclorito de Sodio al 2%, por 1 minuto; luego se transfirieron a agua destilada por espacio de 1 minuto; y, finalmente, se transfirieron a papel filtro esterilizado, para su secado.

Mediante la utilización de cámara de flujo laminar se procedió a sembrar los hongos en cajas de Petri con el medio de cultivo, colocando cuatro muestras por caja y se incubaron a 25 grados centígrados, durante 8 días.

Se presentó el crecimiento de las colonias de los hongos, se descartaron las contaminantes y fueron tomadas las de crecimiento puro con base en una muestra del micelio y se colocó en una caja de Petri, para obtener una colonia pura de cada uno de los hongos.

Con la colonia pura de cada uno de los hongos, fueron tomadas muestras que se sembraron en cajas de Petri, en cinco repeticiones, en las que se evaluó diariamente el crecimiento radial del patógeno a temperatura ambiente, ubicando la porción de micelio crecido en agar, en el centro de la caja de Petri.

Obtención de las Colonias del antagonista *Trichoderma harzianum*

La obtención de las colonias del Antagonista, se realizó a partir de dos productos comerciales, de los laboratorios Fundases y Orius.

Se realizó una dilución en agua destilada de 10 ml de cada uno de estos productos, bajo condiciones de cámara de flujo laminar.

En una caja de Petri con el medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) se aplicó 10 ul de la dilución y, a través de un rayado, se realizó la distribución del contenido sobre la caja de Petri, y fueron llevadas a incubar a temperatura ambiente y en completa oscuridad.

Una vez presentado el crecimiento micelial en la caja, se realizó un repique bajo cámara de flujo para la obtención de una colonia pura de cada formulación comercial.

Ya purificadas las colonias de los antagonistas (*Trichoderma Fundases* y *TrichoD*), se realizó la siembra de una porción de micelio en cajas de Petri, con cinco repeticiones en las que fue evaluado diariamente el crecimiento radial del patógeno a temperatura ambiente, ubicando la porción de micelio crecido en agar, en el centro de la caja de Petri.

Enfrentamiento de los patógenos con los antagonistas

A partir de la colonia pura del patógeno de los antagonistas *Trichoderma Fundases* y *TrichoD* y, bajo condiciones de cámara de flujo laminar, fue tomada una muestra del micelio del patógeno que se ubicó cerca al borde de la caja de Petri con PDA, ejecutándose el mismo procedimiento en cinco cajas de Petri.

Luego, se tomó una muestra de micelio de cada producto comercial y se colocó en el otro extremo de la misma caja anterior donde se habían sembrado los hongos fitopatógenos y se incubaron a temperatura ambiente, entre 13° y 18° centígrados, en completa oscuridad.

La toma de datos se realizó diariamente sobre la base de la caja de Petri en la cual se observaba el crecimiento radial del patógeno y los controladores, teniendo en cuenta el momento de enfrentamiento y los efectos en los días siguientes después del encuentro. El procedimiento se realizó hasta cuando se registró un crecimiento individual de cada colonia en los hongos, porque cuando el antagonista avanzó en su crecimiento hasta invadir la colonia de los fitopatógenos, fueron suspendidas estas observaciones y se inició, la elaboración de placas para observar el posible parasitismo de *Trichoderma*, sobre los hongos fitopatógenos en estudio.

Procedimientos en laboratorio para evaluar Antagonismo

En condiciones de laboratorio, se tuvieron los siguientes tratamientos:

- T₁ = *S. sclerotiorum* vs T.h. FUNDASES
- T₂ = *S. sclerotiorum* vs TRICHOD
- T₃ = *R. solani* vs T.h. FUNDASES
- T₄ = *R. solani* vs TRICHOD
- T₅ = *S. sclerotiorum* vs E.M.
- T₆ = *R. solani* vs E.M.
- T₇ = *S. sclerotiorum* vs AGROPLUX
- T₈ = *R. solani* vs AGROPLUX
- T₉ = *S. sclerotiorum* vs E.M. + AGROPLUX
- T₁₀ = *R. solani* vs E.M. + AGROPLUX

III. Resultados

En las pruebas realizadas en el laboratorio se obtuvieron los resultados descritos a continuación.

Crecimiento de los hongos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*

El hongo *R. solani*, cubrió la caja de 90 mm de diámetro desde el punto de siembra hasta el borde en 4 días, con un crecimiento micelial promedio por día de 10.6 mm, mientras *S. sclerotiorum* la cubrió en 5 días con un crecimiento micelial promedio por día de 9.3 mm., como se muestra en la Figura 1.

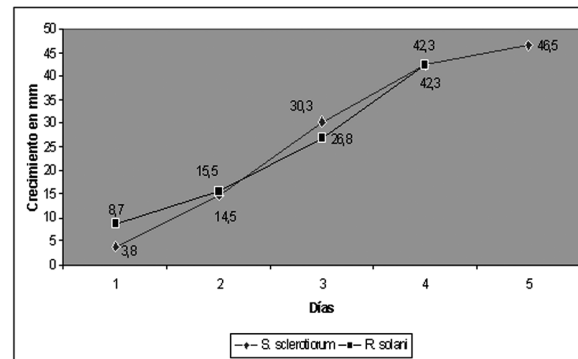


Figura 1. Promedio diario de crecimiento en mm de *S. sclerotiorum* y *R. solani*.

Como se observa en la Figura 1, los hongos fitopatógenos *R. Solani* y *S. sclerotiorum* presentaron un crecimiento micelial agresivo, por cuanto en 4 a 5 días cubrieron la totalidad de la caja, indicando unas buenas condiciones de temperatura y medio de cultivo para su desarrollo.

Crecimiento de *Trichoderma harzianum*

El producto comercial *Fundases*, cubrió la caja de Petri de 90 mm de diámetro, desde el punto de siembra hasta el borde en 5 días, con un crecimiento promedio por día de 8.7 mm, mientras el producto comercial *TRICHOD* lo hizo con un promedio de crecimiento diario de 8.9 mm, como se muestra en la Figura 2.

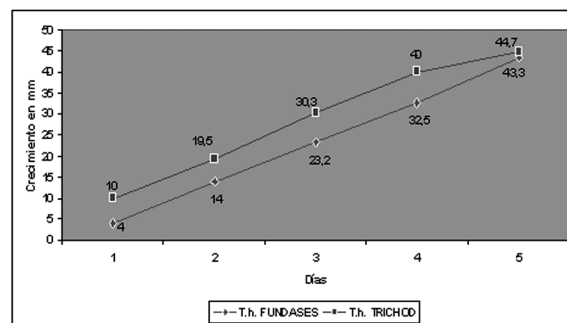


Figura 2. Promedio diario crecimiento en mm de *Trichoderma harzianum* productos comerciales *FUNDASES* y *TRICHOD*.

Como se observa en la Figura 2, el crecimiento y desarrollo de los dos productos comerciales de *T. harzianum* fueron muy similares; las condiciones del medio de cultivo y temperatura favorecieron un buen crecimiento micelial y esporulación abundante en ambos productos de *Trichoderma*, lo que indica que las condiciones del laboratorio empleadas para el desarrollo de un hongo antagonista fueron óptimas.

Efecto del *T. harzianum* – Fundases sobre *R. solani*
El encuentro entre *T. harzianum* – Fundases y *R. solani*, se presentó al cuarto día, cuando el *T. harzianum* – Fundases obtuvo un crecimiento micelial promedio de 34.8 mm, frente a 16.5 mm de *R. solani*, con un crecimiento promedio diario de 5.9 mm y 5.5 mm respectivamente, como se observa en la Figura 3.

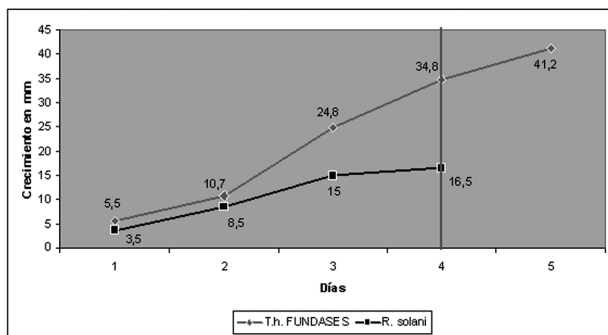


Figura 3. Promedio diario crecimiento en mm del producto comercial FUNDASES sobre *R. solani*.

Efecto de *T. harzianum* – TRICHOD sobre *R. solani*

En el cuarto día de medición se presentó el encuentro entre *T. harzianum* – TRICHOD y *R. solani*, cuando se encontraban con un crecimiento radial promedio de 45.2 mm y 20.2 mm, con un crecimiento promedio diario de 10.2 mm y 5.0 mm respectivamente, como se ve en la Figura 4.

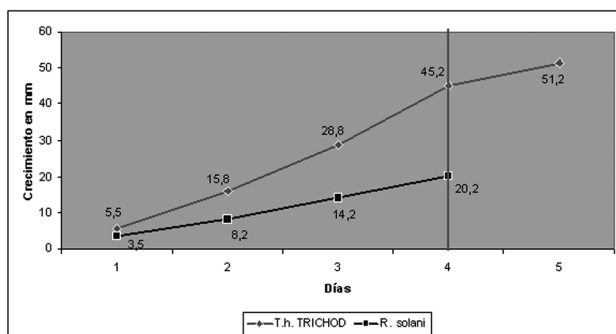


Figura 4. Promedio diario crecimiento en mm del producto comercial TRICHOD sobre *R. solani*.

En las Figuras 3 y 4 se observó que los dos productos comerciales de *Trichoderma* evaluados tuvieron un comportamiento similar en el parasitismo, alcanzando

al hongo *R. Solani* en 4 días, siendo hiperparásito y antagonista como lo afirman Reyes, Rodríguez, Pupo y Alarcón 2007; limitando el desarrollo de este hongo fitopatógeno en un 50%, es posible que haga primero un efecto antibiótico del antagonista limitando el crecimiento micelial de *R. solani* y luego efectúa un parasitismo eliminando el patógeno. (Figura 5). No se observaron diferencia del parasitismo entre el *Trichoderma* de Fundases y el TRICHOD del laboratorio Orius.

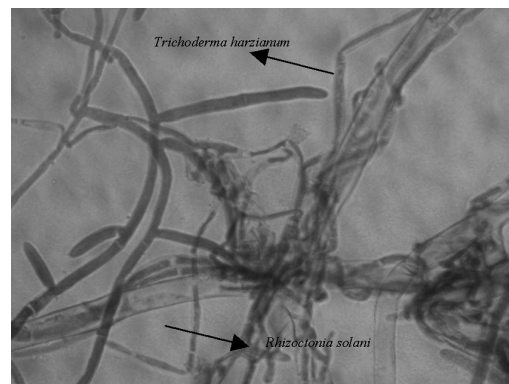


Figura 5. Parasitismo presentado por *T. harzianum* sobre *R. Solani*.

Como se muestra en la Figura 5, hay control por parte de *Trichoderma harzianum* ya que el micelio *Trichoderma* empieza a envolver al hongo patógeno y realiza ruptura de las hifas del hongo y empezando un parasitismo del mismo, ratificando lo dicho por Gutiérrez y Torres 1990, quienes afirman que el género *trichoderma* es un controlador natural del hongo *R. solani*. Efecto de *T. harzianum* – Fundases sobre *S. sclerotiorum*

Efecto de *T. harzianum* – Fundases sobre *S. sclerotiorum*

En cuanto al efecto de *T. harzianum* – Fundases sobre *S. sclerotiorum*, presentó el encuentro en el tercer día, obteniendo en el *T. harzianum* – FUNDASES un crecimiento radial promedio de 21.7 mm frente a un crecimiento de 26.5 mm de *S. sclerotiorum*, con un crecimiento promedio diario de 5.8 mm y 8.8 mm respectivamente, como se muestra en la Figura 6.

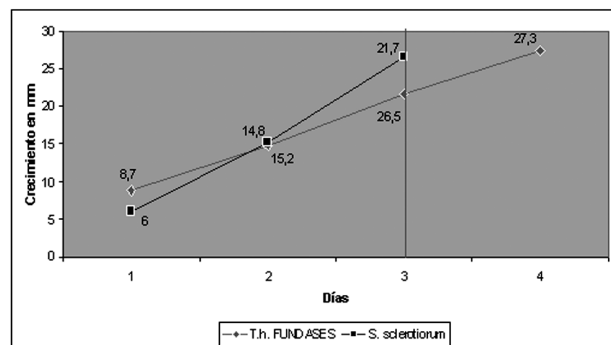


Figura 6. Promedio diario de crecimiento en mm del producto comercial FUNDASES sobre *S. sclerotiorum*.

Efecto de *T. harzianum* –TRICHOD sobre *S. sclerotiorum*

El encuentro de las colonias de *T. harzianum* – TRI-CHOD y *S. sclerotiorum*, se presentó en el tercer día, con un crecimiento promedio de 21.7 mm el *T. harzianum* – TRICHOD frente a un crecimiento de 26.5mm de *S. sclerotiorum*, con un crecimiento promedio diario de 5.8 mm y 8.8 mm respectivamente, como se muestra en la Figura 7.

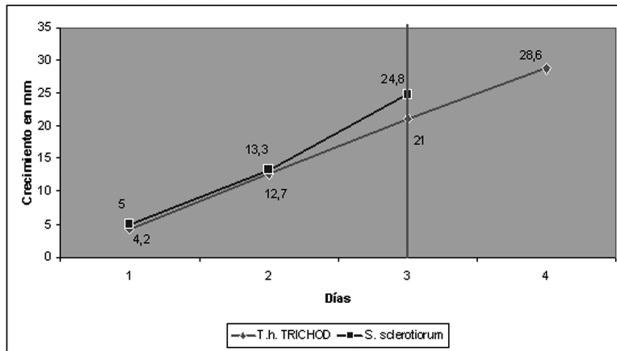


Figura 7. Promedio diario de crecimiento en mm del producto comercial TRICHOD sobre *S. sclerotiorum*.

Como se observa en las Figuras 6 y 7, los dos productos comerciales de *Trichoderma* tuvieron un comportamiento similar en su antagonismo con *S. Sclerotiorum*, sin embargo, a diferencia con *R. Solani* el hongo *Sclerotinia* tuvo un mayor desarrollo de la colonia, hasta el encuentro con el antagonista, lo que hace suponer que aquí no se presentó un efecto antibiótico que limitara el crecimiento de la colonia *S. sclerotiorum*, sino únicamente un efecto de parasitismo cuando el *Trichoderma* invadió la colonia del hongo fitopatógeno.

Efecto de Microorganismos Eficaces (E.M.) sobre *S. sclerotiorum*

El hongo patógeno *S. sclerotiorum*, se observó durante 6 días, se obtuvo que el hongo patógeno en presencia del E.M. tiene un crecimiento promedio de crecimiento de 7.4 mm diarios. (Figura 8)

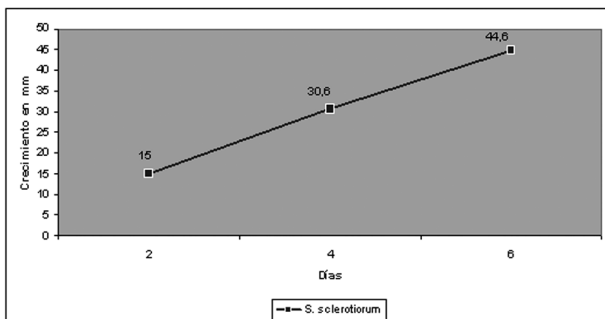


Figura 8. Promedio de crecimiento en mm de *S. sclerotiorum*, en presencia de E.M.

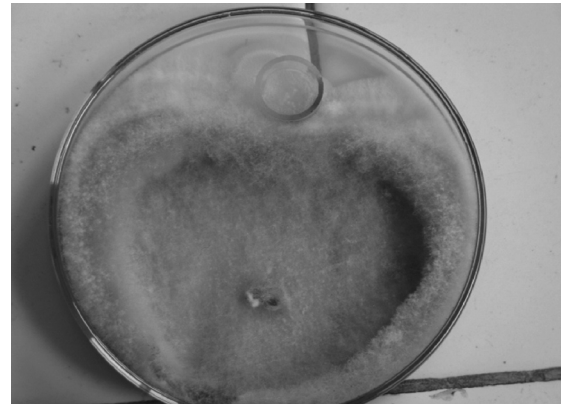


Figura 9. Colonia de *S. sclerotiorum* en presencia de E.M. con antibiosis.

En la Figura 9 se observa que en el enfrentamiento de la *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia del E.M., se presentó un efecto antibiótico representado en el no crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* alrededor del anillo con el E.M. Por otro lado, no se presentó desarrollo de esclerocios, característico de este hongo patógeno de plantas cuando se desarrolla en cajas de Petri con medio PDA.

Efecto de AGROPLUX sobre *S. sclerotiorum*

En presencia del AGROPLUX el hongo patógeno *S. sclerotiorum*, se observó durante 6 días, el cual obtuvo un crecimiento promedio de crecimiento de 10.3 mm diarios. (Figura 10)

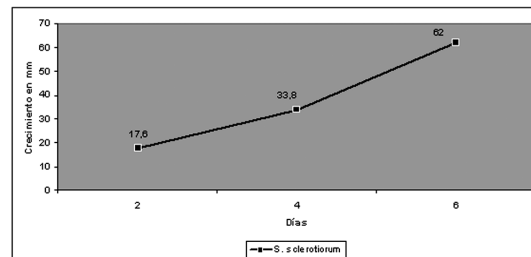


Figura 10. Promedio de Crecimiento en mm de *S. sclerotiorum* en presencia de AGROPLUX.



Figura 11. Colonia de *S. sclerotiorum* con deformación en presencia de E.M.

En la Figura 11, se observa una deformación en el crecimiento en forma de ondulaciones de la colonia de *S. sclerotiorum* en presencia del AGROPLUX, no se presenta formación de esclerocios.

Efecto de AGROPLUX con E.M. sobre *S. sclerotiorum*

En cuanto a la combinación de E.M. y AGROPLUX en presencia del hongo patógeno *S. sclerotiorum*, se observó durante 6 días, dicho hongo tuvo un crecimiento promedio de crecimiento de 10.3 mm diarios. (Figura 12)

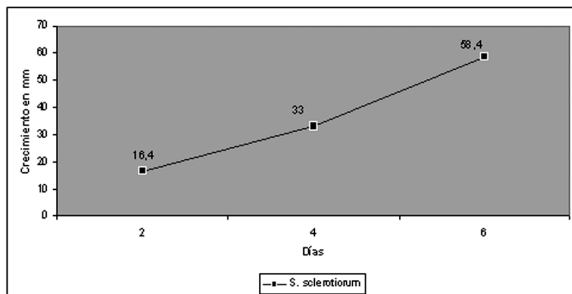


Figura 12. Promedio de crecimiento en mm de *S. sclerotiorum* en presencia de la combinación E.M. y AGROPLUX.

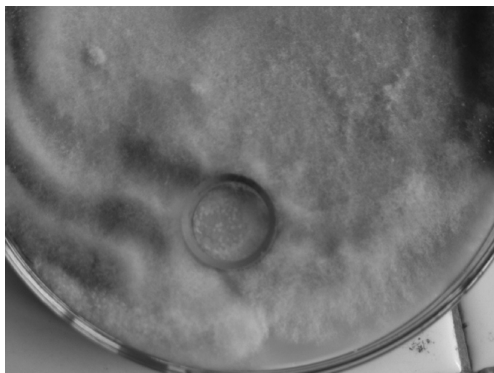


Figura 13. Colonia de *S. sclerotiorum* con deformación en presencia de la combinación de E.M. y AGROPLUX.

Efecto de Microorganismos Eficaces (E.M.) sobre *R. solani*

El efecto de E.M. sobre el hongo patógeno *R. solani*, se observó durante 6 días, el cual tuvo un crecimiento promedio de crecimiento de 8.8 mm diarios. (Figura 14)

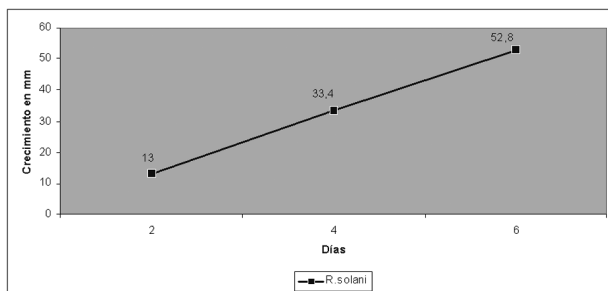


Figura 14. Promedio de Crecimiento en mm de *R. solani* en presencia de E.M.

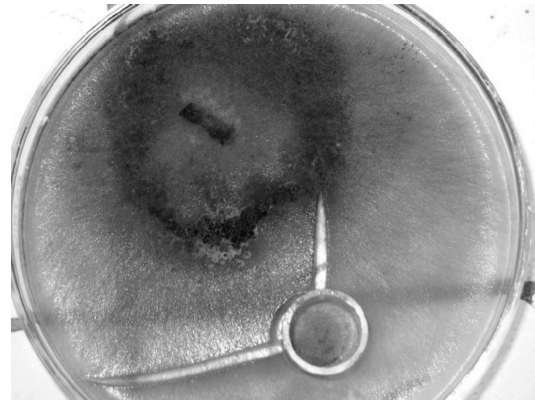


Figura 15. Colonia de *R. solani* en presencia de E.M.

Como se observa en la Figura 15, en presencia del E.M. hubo una deformación muy pequeña en el crecimiento en forma de ondulaciones de la colonia de *R. solani*.

Efecto de AGROPLUX sobre *R. solani*

Se observó durante 6 días al hongo patógeno *R. solani*, el cual tuvo un crecimiento promedio de 9 mm diarios en presencia de AGROPLUX. (Figura 16)

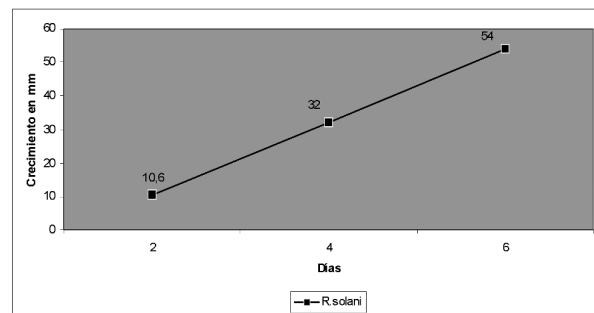


Figura 16. Promedio de Crecimiento en mm de *R. solani* en presencia de AGROPLUX.

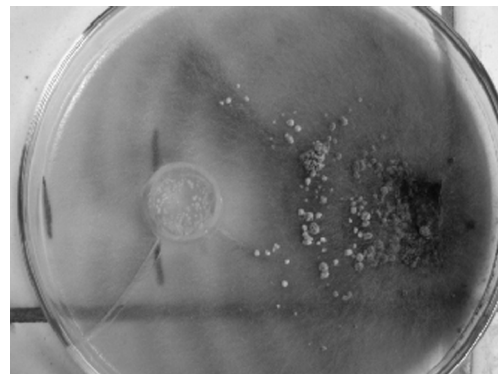


Figura 17. Colonia de *R. solani* con deformación en presencia de la combinación de AGROPLUX

En la Figura 17, en presencia del AGROPLUX se observó una deformación en el crecimiento en forma de ondulaciones de la colonia de *R. solani* y la formación blanca en los esclerocios de la colonia.

Efecto de AGROPLUX con E.M. sobre *R. solani*

La combinación de E.M. con AGROPLUX sobre el hongo patógeno *R. solani*, se observó durante 6 días, donde el tuvo un crecimiento promedio de crecimiento de 8.7 diarios. (Figura 18)

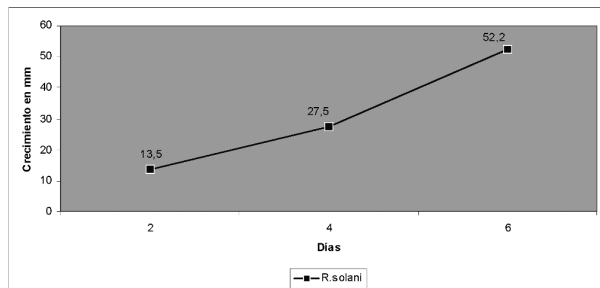


Figura 18. Promedio de Crecimiento en mm de *R. solani* en presencia de la combinación E.M. con AGROPLUX.

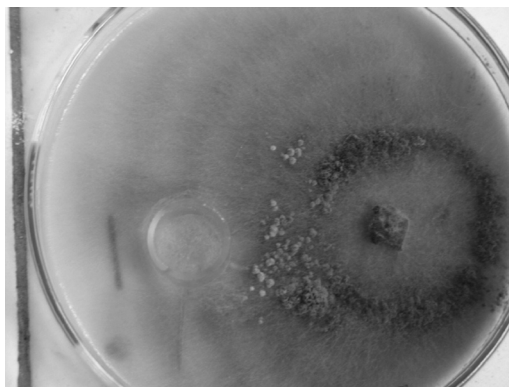


Figura 19. Colonia de *R. solani* en presencia de la combinación E.M. con AGROPLUX.

En la Figura 19, en presencia del E.M. con AGROPLUX se observó una deformación muy pequeña en el crecimiento en forma de ondulaciones de la colonia de *R. solani*. En cuanto al hongo *R. solani* no se encontraron estudios sobre los productos comerciales E.M. y AGROPLUX sobre su control en condiciones de laboratorio.

IV. Conclusiones

- Los hongos *R. solani* y *S. sclerotiorum* presentaron un crecimiento agresivo bajo condiciones de laboratorio cubriendo la caja de Petri de 90 mm en 4 y 5 días.
- El controlador biológico *Trichoderma harzianum* (FUNDASES y TRICHOD) tuvo un efecto antagónico frente a los patógenos *R. solani* y *S. sclerotiorum*, debido a que evitó el avance de los patógenos, por el mecanismo de parasitismo en condiciones de laboratorio.
- En condiciones de laboratorio, los productos AGROPLUX y E.M., presentaron un efecto antagónico frente a *R. Solani* y *S. sclerotiorum*, debido a que se observaron la deformación en el crecimiento de la colonia y la presencia de antibiosis.

V. Referencias

- [1] Bustamente, E. (1995). Control Biológico de patógenos en plantas. En *Curso Internacional de Manejo Integrado de Plagas* (pp. 19-31). San Juan de Pasto, Colombia.
- [2] Borda, F. & Arbeláez, G. (1993). Determinación del antagonismo del aislamiento T-95 de *T. harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumberinum* plantas de pepino Cohombro, *Revista de Agronomía Colombiana* 10(1), 45- 51.
- [3] Gutiérrez, P. Y Torres .H. (1990). Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Rhizoctonia binucleada*. *Fitopatología* 25, 45-50
- [4] Martín, C. & Torres, H. (1989). Control of *Rhizoctonia* and other soil-borne diseases of TPS. En *Fungal Diseases of the Potato. Report of Planning Conference on Fungal Diseases of the Potato* (pp. 191-205). Held at CIP, Lima, Perú.
- [5] Hooker, W.J. (1985). *Potato Diseases*. *American Phytopathological Society*. St. Paul. MN. USA.
- [6] Reyes, R. T., Rodríguez, G., Pupo, A. & Alarcón, L. (2007). Efectividad In Vitro de *Trichoderma Harzianum* para el bio-control de *Rhizoctonia Solana* Kühn y *Pyricularia Grises*, *Fl-TOSANIDAD*. 11(1), 29-23.

Philip Torres R. Ingeniero en Agroecología de la Corporación Universitaria Minuto de Dios (Uniminuto), Octubre 2008. Coordinador académico del Programa de Ingeniería Agroecológica; Auxiliar Administrativo del Programa de Ingeniería Agroecológica. ptorres@uniminuto.edu

Omar Guerrero G. M. Sc. en Fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia, 1978. Ingeniero Agrónomo de la Universidad Nariño, 1972. Fito patólogo Investigador del Instituto Colombiano Agropecuario ICA; Coordinador del Laboratorio de Diagnóstico Vegetal de Pasto - Tibaitatá (Cundinamarca), Instituto Colombiano Agropecuario ICA; Consultor del Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria IBTA en Enfermedades Radicales de las Leguminosas de Grano. Docente de microbiología y fitopatología en UNIMINUT; Docente de Microbiología, Patología de Semillas, Epidemiología Agrícola, y Fitopatología en la Universidad de Nariño. oguerrero@uniminuto.edu