

ANTAGONISMO *in vitro* DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma spp.* SOBRE EL
PATOGENO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary PROVENIENTES DE
CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) Y PAPA (*Solanum
tuberosum L.*) EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

DIANA MARIA CAICEDO
MARTHA LUCIA CHALPARIZAN

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2008

ANTAGONISMO *in vitro* DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma spp.* SOBRE EL
PATOGENO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary PROVENIENTES DE
CULTIVOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) Y PAPA (*Solanum
tuberosum L.*) EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

DIANA MARIA CAICEDO
MARTHA LUCIA CHALPARIZAN

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo

Director:
OSCAR BURBANO FIGUEROA
Biólogo con Énfasis en Microbiología

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2008

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad del autor”

Artículo 1º del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

NOTA DE ACEPTACION

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, 29 de Febrero del 2008

DEDICATORIA

Dedico con toda mi gratitud y amor a las personas que directa e indirectamente aportaron para la culminación de este trabajo y esta etapa de mi vida profesional:

A Dios por ser la fuerza e inspiración para continuar aun en los momentos más difíciles.

A mis padres, Jesús y Maria por ser mi ejemplo a seguir, por brindarme la vida y su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida.

A mis hermanos, en especial a mi hermana Miriam aunque no este ya con nosotros es mi fuerza espiritual y motor para seguir adelante venciendo la adversidad de estos tiempos.

A mis amigos y compañeros.

Muchas gracias.

Diana Maria.

AGRADECIMIENTOS

A nuestro Asesor Oscar Burbano, por su dedicación, colaboración y acompañamiento en el desarrollo de este trabajo.

A Luz Estela Lagos, por darnos la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación Genética de Patosistemas, en el cual adquirimos conocimientos y experiencias para nuestra vida.

A todos los docentes del Departamento de Biología en especial a Dolly Revelo y Milena Guerrero por la valiosa ayuda en la culminación de proyecto.

A Guido Villota, Mauricio Rodríguez, Oswaldo Arcos y Walter Vallejo por su amabilidad y colaboración durante la ejecución del proyecto.

A Carlos Betancourt docente de la Facultad de Ciencias Agrícolas, por su colaboración y asesoría en esta investigación.

A nuestras Jurados: Claudia Salazar y Luz Estela Lagos por sus correcciones y consejos

A todos los integrantes del grupo de investigación Genética de Patosistemas por su valiosa colaboración y apoyo.

A todos los agricultores quienes nos compartieron sus conocimientos en campo y nos facilitaron el material de trabajo.

A nuestros familiares y amigos por la motivación y apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. OBJETIVOS	24
1.1 OBJETIVO GENERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	
2. ANTECEDENTES	25
3. MARCO TEÓRICO	28
3.1 Importancia de <i>Phytophthora infestans</i>	28
3.1.1 Posición taxonómica de <i>Phytophthora infestans</i>	28
3.1.2 Morfología e identificación de las especies de <i>Phytophthora</i>	29
3.1.3 Biología de <i>Phytophthora infestans</i>	29
3.1.4 Sintomatología y desarrollo de la enfermedad	29
3.1.5 Control de la gota o tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>)	30
3.1.5.1 Métodos químicos que erradican o reducen la cantidad de inoculo de <i>Phytophthora infestans</i> .	30

3.1.5.2 Métodos biológicos que erradican o reducen la cantidad de inóculo de <i>Phytophthora infestans</i> .	31
3.1.5.3 Control genético.	32
3.2 ANTAGONISMO MICROBIANO	33
3.3 ASPECTOS GENERALES SOBRE <i>Trichoderma</i> spp.	33
3.3.1 Biología de <i>Trichoderma</i> spp.	34
3.3.2 <i>Trichoderma</i> como biocontrolador.	34
3.3.3 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	34
4. METODOLOGIA.	38
4.1 FASE CAMPO.	38
4.1.1 Área de estudio.	38
4.2 FASE LABORATORIO	39
4.2.1 Aislamiento y purificación de <i>Phytophthora infestans</i> .	39
4.2.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE <i>Trichoderma</i> spp.	39
4.2.3 Evaluación de la velocidad de crecimiento de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	39
4.2.4 Evaluación de la intensidad de esporulación	40
4.2.5 . Evaluación experimental del antagonismo <i>in Vitro</i>	40
4.3 DISEÑO ESTADISTICO.	40
5. RESULTADOS Y DISCUSION	41
5.1 AISLAMIENTO DE <i>Phytophthora infestans</i> OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO	41

5.2 Aislamiento De <i>Trichoderma</i> spp OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO	41
5.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Phytophthora infestans</i>	42
5.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> spp	44
5.5 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO E INTENSIDAD DE ESPORULACION.	52
5.6 ANTAGONISMO <i>in Vitro</i>	56
5.6.1.. Siembras opuestas.	56
5.6.2 Análisis estadístico entre los tratamientos de <i>Trichoderma</i> spp contra <i>Phytophthora infestans</i> Sb121.	58
5.6.3 Análisis estadístico entre los tratamientos de <i>Trichoderma</i> spp contra <i>Phytophthora infestans</i> St151	62
5.7 ESPECIFICIDAD ANTAGÓNICA	63
6. CONCLUSIONES	68
7. RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS.	74

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Aislamientos de <i>P. infestans</i>	41
Tabla 2. Aislamientos de <i>Trichoderma spp.</i> empleados en el presente estudio	41
Tabla 3. Características morfológicas de los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> Sb121 y St151.	42
Tabla 4. Características morfológicas de los aislamientos de <i>Trichoderma spp.</i>	44
Tabla 5. Prueba de significancia TUKEY para constantes cinéticas de invasión micelial para tratamiento con Sb121	58
Tabla 6. Prueba de significancia TUKEY para constantes cinéticas de invasión micelial para tratamiento con Sb151	62
Tabla 7. Prueba ANOVA Factorial para los diferentes tratamientos con <i>Trichoderma spp.</i> Sobre <i>Phytophthora infestans</i> Sb121 y St151 con intervalos de confianza del 95%	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento Sb121 correspondiente a <i>Phytophthora infestans</i> . Microfotografía 40X.	43
Figura 2. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento St151 correspondiente a <i>Phytophthora infestans</i> . Microfotografía 40X.	44
Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T4. Microfotografía 10X.	47
Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T5. Microfotografía 40X.	47
Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T6. Microfotografía 40X.	48
Figura 6. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T7. Microfotografía 40X.	48
Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T8. Microfotografía 40X.	49
Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T9. Microfotografía 40X.	49
Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T10. Microfotografía 10X.	50
Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T11. Microfotografía 10X.	50
Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T12. Microfotografía 10X.	51
Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T13. Microfotografía 40X.	51
Figura 13. Velocidad de crecimiento de los diez aislamientos de	53

Trichoderma spp.

Figura 14. Variación de la Intensidad de Esporulación a través del Tiempo	55
Figura 15. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de <i>Trichoderma spp.</i> Sobre <i>Phytophthora infestans</i> Sb121.	57
Figura 16. Constantes cinéticas de invasión micelial para cada uno de los aislados de <i>Trichoderma spp.</i> Sobre <i>Phytophthora infestans</i> Sb121 con intervalos de confianza del 95%	59
Figura 17. Aislamientos promisorios del antagonista <i>Trichoderma spp.</i> Sobre el patógeno <i>Phytophthora infestans</i> Sb121.	60
Figura 18. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de <i>Trichoderma spp.</i> Sobre <i>Phytophthora infestans</i> St151	61
Figura 19. Constantes cinéticas de invasión micelial para cada uno de los aislados de <i>Trichoderma spp.</i> Sobre <i>Phytophthora infestans</i> Sb121 con intervalos de confianza del 95%	63
Figura 20. Constantes cinéticas de invasión micelial para cada uno de los aislados de <i>Trichoderma spp.</i> Sobre <i>Phytophthora infestans</i> Sb151 con intervalos de confianza del 95%	64

LISTA DE MAPAS

Pág.

Mapa 1. Ubicación de las zonas de muestreo en el Departamento de Nariño.	38
---	----

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Composición medios de cultivo	74
Anexo B. Composición de Antibióticos.	75
Anexo C. Técnica de desinfección de muestras	76
Anexo D. Técnica del microcultivo	77
Anexo E. Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. Sobre <i>Phytophthora infestans</i> St151.	77
Anexo F. Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. Sobre <i>Phytophthora infestans</i> Sb121	78
Anexo G. Constantes cinéticas de crecimiento micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% <i>P. infestans</i> Sb121	78
Anexo H. Constantes cinéticas de invasión micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% <i>P. infestans</i> Sb151	79

GLOSARIO

AISLAMIENTO: acción de purificar un compuesto de una mezcla o una línea o cepa pura de un cultivo heterogéneo.

ANTAGONISMO: interacción de dos sustancias biológicamente activas que presentan acciones opuestas en un mismo sistema, como por ejemplo la de una sustancia que inhibe parcial o totalmente, o bien revierte el efecto de la otra.

ANTIBIOSIS: es la capacidad de un microorganismo de producir antibióticos o metabolitos secundarios que suelen ser tóxicos para otros ya que pueden detener su crecimiento o eliminarlos.

ANTIBIÓTICO: sustancia natural de peso molecular relativamente bajo, producida por un microorganismo, la cual en solución diluida inhibe el crecimiento o destruye otros organismos.

CELULOSA: polisacárido de elevado peso molecular constituido por largas cadenas no ramificadas de residuos de B-D-glucosa unidos por enlaces (1,4).

COMPETENCIA: en biología, término utilizado para describir la competencia entre dos organismos para unas mismas fuentes (tales como nutrientes, agua, luz, etc.), cuando éstas están en pequeñas cantidades.

CONTROL BIOLÓGICO: método de control de plagas mediante la interferencia con su ciclo biológico, atacándolas con preparados de origen biológico, o bien utilizando sus enemigos naturales para destruirlas.

ESPORA: pequeña forma reproductiva capaz de madurar. Por lo general son muy resistentes a condiciones ambientales extremas. Son usuales en microorganismos, hongos y plantas.

FITOPATÓGENO: es un microorganismo parásito de las plantas que le causan enfermedad y posteriormente la muerte.

FUNGICIDA: agente químico o biológico que mata hongos.

HIFA: filamento tubular que constituye la fase vegetativa de la mayoría de los hongos y muchas algas.

INÓCULO: cultivo iniciador de un organismo, o una mezcla de organismos, añadido a un medio para iniciar la producción de un número mayor.

LISIS: destrucción de una célula por rotura de su membrana o cubierta externa.

MICELIO: parte vegetativa de un hongo filamentoso. Consta de una masa de hifas.

MICOPARÁSITO: son hongos que parasitan a otros hongos y que desempeñan una función importante en la regulación de las poblaciones de sus hospederos.

OOSPORA: espora, de pared gruesa, es fase de latencia (reposo) que se desarrolla a partir de una oosfera fecundada.

PATÓGENO: microorganismo que infecta otra planta o animal produciendo síntomas de enfermedad o una respuesta tóxica.

SAPRÓFITO: organismo que se alimenta de materia orgánica muerta o en descomposición. Los saprófitos secretan enzimas que digieren los residuos orgánicos externamente y a continuación absorben los compuestos de bajo peso molecular que se forman. El término se aplica especialmente a hongos y bacterias.

Trichoderma: hongo que produce una putrefacción blanquecina y que es ampliamente utilizado en la producción de celulasas.

TUBÉRCULO: órgano subterráneo de almacenamiento y reproducción. Existen tanto tubérculos del tallo (patata) como de la raíz (dalia).

RESUMEN

Dentro de las enfermedades que afectan a cultivos de plantas del género *Solanum*, se encuentra la gota o tizón tardío causada por el patógeno *Phytophthora infestans*. Con el fin de implementar una estrategia de control biológico de esta enfermedad, se evaluó la efectividad de aislados de *Trichoderma spp*, realizando una serie de cultivos duales, mediante el empleo de diez cepas del antagonista aislados de suelos donde se encontró el pathogeny, contra dos cepas del patógeno provenientes de cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y papa (*Solanum tuberosum*) en el Departamento de Nariño.

El análisis de varianza, indicó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades promedio de invasión micelial, ya que el valor P de la prueba F es menor de 0.05, para ambos tratamientos. Permitted además discriminar a los aislamientos de *Trichoderma spp*. en tres grupos de acuerdo a su capacidad invasora, a partir de estos resultados se obtuvieron cuatro cepas de *Trichoderma spp* T9, T11, T12 y T13 que presentaron mayor velocidad de invasión micelial, con constantes cinéticas de crecimiento: 1.021, 0.787, 1.0127 y 0.831 respectivamente.

Los aislamientos del antagonista más agresivos fueron T9 y T12 ambos provenientes de suelos de cultivo de papa. Además la prueba ANOVA factorial demostró que no existe especificidad antagónica de las cepas de *Trichoderma spp* sobre las cepas de *P. infestans* correspondientes a los hospederos *S. betaceum* y *S. tuberosum*.

ABSTRACT

Inside the illnesses that affect to cultivations of plants of the generate *Solanum*, is the retarded stain caused by the pathology *Phytophthora infestans*. With the purpose of implementing a strategy of biological control of this illness, the effectiveness was evaluated of isolated of *Trichoderma spp*, carrying out a series of dual cultivations, by means of the employment of the isolated antagonist's of floors ten stumps where was the pathology, against two stumps of the pathology coming from cultivations of tree tomato (*Solanum betaceum*) and potato (*Solanum tuberosum*) in the Department of Nariño.

The analysis of variance showed that there are meaningful statistically differences among the mean velocities of mycelial invasion, since the value P of the test F is less than 0.05 for both treatments. It allowed to discriminate the isolations of *Trichoderma spp*. in three groups according to their invasive capacity, starting from these results four stumps of *Trichoderma spp* T9 was obtained, T11, T12 and T13 that presented bigger speed of mycelial invasion, with constant kinetic of growth: 1.021, 0.787, 1.0127 and 0.831 respectively.

The antagonist's isolations but aggressive they were T9 and T12 both coming from floors of potato cultivation. Also the test factorial ANOVA demonstrated that antagonistic specificity of the stumps of *Trichoderma spp* doesn't exist on the stumps of *P. infestans* corresponding to the host *S. betaceum* and *S. tuberosum*.

INTRODUCCION

En el Departamento de Nariño, la actividad agrícola de mayor importancia económica lo constituye el cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.*), donde se cultivan alrededor de 30.000 hectáreas por año, principalmente en los Municipios de Túquerres, Ipiales, Potosí, Pupiales y Pasto, generando un aporte en el PIB Agrícola del 5%. Otro de los cultivos de significancia en la economía agrícola, es el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), principalmente en los municipios del norte del Departamento. Sin embargo, estos cultivos presentan pérdidas económicas debido al ataque de diferentes plagas, especialmente el fitopatógeno *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío o gota, que ataca especialmente a plantas de la familia Solanaceae. (Pineda, 2000)

En respuesta a la creciente preocupación de la sociedad acerca del uso de plaguicidas químicos; los gobiernos de muchos países están cada vez más consientes de la problemática del manejo de Productos químicos en términos de impacto en el medio ambiente, así como los agricultores y consumidores de productos agrícolas. Dentro del manejo de este fitopatógeno en los últimos 25 años se ha desarrollado especial interés en el uso de microorganismos para el control biológico. (Benítez *et al.*, 2004)

Se ha demostrado que el hongo *Trichoderma spp* es utilizado como controlador de amplio rango de fitopatógenos, entre ellos *P. infestans*. Las especies del género *Trichoderma* son muy utilizadas debido a su ubicuidad, facilidad para ser aisladas, crecimiento rápido en gran número de sustratos, alta competencia por alimento, espacio y que no atacan las angiospermas (Hartly, 1989). *T. harzianum* ha sido el más efectivo y se ha encontrado que ataca a varias especies de hongos fitopatógenos de suelo que son de importancia agrícola y económica (Duque y Vergara, 2002).

Dentro del uso sostenible de los agroecosistemas y control de fitopatógenos, esta investigación tuvo como objetivo “Evaluar la especificidad antagónica y velocidad de invasión micelial *in Vitro* de aislamientos de *Trichoderma spp* sobre aislamientos de *P. infestans* provenientes de cultivos de *Solanum tuberosum L.*, y *Solanum betaceum* en el Departamento de Nariño”, donde se obtuvo cuatro aislamientos promisorios de *Trichoderma*: T9, T11, T12 y T13, con constantes cinéticas de crecimiento: 1.021, 0.787, 1.013 y 0.829 respectivamente.

Los resultados obtenidos se interpretaron por medio de un análisis de varianza ANOVA y un prueba de significancia Tukey del paquete estadístico SAS, mostrando una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos; Además la prueba ANOVA demostró que no existe especificidad antagónica de las cepas de *Trichoderma spp* sobre las cepas de *P. infestans* correspondientes a los hospedantes *S. betaceum* y *S. tuberosum*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de invasión micelial de aislamientos de *Trichoderma spp* sobre aislamientos de *P. infestans* provenientes de cultivos de papa (*Solanum tuberosum L*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el Departamento de Nariño.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los aislamientos de *Trichoderma spp* mas eficaces, determinado por la intensidad de esporulación y velocidad de crecimiento.
- Evaluar si existe especificidad del antagonista *Trichoderma spp* de *P. infestans* proveniente de diferentes hospedantes.
- Determinar los aislamientos de *Trichoderma spp* con mayor capacidad de invasión micelial sobre de *P. infestans*.

2. ANTECEDENTES

Villegas (1999) Evaluó en condiciones *in vitro* la capacidad antagónica de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora cactorum*, reportando 19 aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. aislamientos a partir de muestras de suelo de 50 fincas de la zona cafetera del departamento de Caldas con diferencias altamente significativas entre ellos, donde la mayor y menor velocidad de crecimiento registraron los 2,79 y 1,99 cm/día respectivamente.

Durman *et al.* (1999) Evaluaron a *Trichoderma* spp como antagonista de *Rhizoctonia solani* *in vitro* y como biocontrolador en plantas de tomate. Señalando que agregando al suelo las cepas de *Trichoderma* redujo significativamente al fitopatogeno disminuyendo la supervivencia y el crecimiento de los esclerocios. Además de promover el crecimiento de las plantas, la producción de enzimas degradativas esta directamente vinculada con el efecto antagonico.

Escobar *et al.* (2001) investigaron el grado de control *in vitro*, mediante antagonismo directo, metabolitos volátiles y difusibles, de diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* sobre cepas de *Rhizoctonia solani* aisladas de tomate, así como también la respuesta de las cepas antagonistas a temperatura, Fe³⁺, salinidad, y pH, con el objetivo de ser utilizadas a futuro en una formulación para el control biológico de enfermedades radicales del tomate. Se determinó que la mejor cepa antagonista correspondió a *T. harzianum* 650, la que siempre fue mas eficiente en el control de las cepas de *R. solani* que de *F. solani*. De las temperaturas evaluadas (10, 15, 20, 28 y 37°C), ninguna fue limitante para el desarrollo de todas las cepas de *T. harzianum*, siendo 23°C la temperatura mas adecuada para el crecimiento de estas. Las cepas de *T. harzianum* evaluadas crecieron mejor en ausencia de Fe³⁺ y salinidad y a pH 5,0.

Gajardo *et al.* (2001) evaluaron el efecto del ácido salicílico (SA) entre 0 y 100 mM sobre el desarrollo de una cepa del genero *Trichoderma*, seleccionada como antagonista de patógenos de tomate. Para ello se inoculó el hongo sobre medios agar-papa-dextrosa que contenían distintas concentraciones de SA, y se determinó diámetro de crecimiento del micelio y de la zona de esporulación. En forma paralela se analizó el efecto de las mismas concentraciones de SA sobre plántulas de tomate variedad pre-germinadas y colocadas sobre agarosa al 1%. Se evaluaron parámetros fisiológicos como porcentaje de sobrevivencia, longitud de radícula e hipocotilo en etapas tempranas del desarrollo de las plántulas. Los resultados muestran que concentraciones de SA de hasta 500 mM no afectan el desarrollo de las plántulas de tomate, y que SA hasta 1 mM no altera el desarrollo

de *Trichoderma spp* por lo que podría ser usado en formulaciones de biocontroladores.

Besoain *et al.* (2001) evaluaron la efectividad *in Vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* "TH". Se realizó una serie de cultivos duales, mediante el empleo de catorce cepas de *T. harzianum* y tres cepas de *Phytophthora parasítica* "PP". A partir de estos resultados se escogieron las tres mejores cepas de TH, a las que se les evaluó, *in Vitro*, su rango Optimo de pH, salinidad y temperatura, al igual que para las cepas de PP. Adicionalmente se evaluó la producción de metabolitos volátiles y difusibles de tres cepas de TH. El rango de pH optimo para el crecimiento de TH fue entre 5,5 y 6,0 afectándose su crecimiento entre 7,5 y 8,5; lo mismo ocurrió para PP. En cuanto a la salinidad el optimo para TH fue de concentración 0mM, el rango optimo de temperatura para TH oscilo entre 25 y 30°C, siendo detrimentales los extremos, 5°C y 35°C. Las tres cepas de TH produjeron tanto metabolitos volátiles y difusibles, sin existir diferencia significativa entre cepas.

Díaz y Velásquez, (2002) Evaluaron la capacidad antagónica *in vitro*, de 17 aislamientos de *Trichoderma spp.* frente a *Sclerotium cepivorum*, de los 17 aislamientos evaluados se escogieron 8 que corresponden a T22, T24, T25, T38, T39, T46, T47 y T48. Los cuales fueron escogidos por su promisoría actividad parasitaria, y se reprodujeron masivamente en cinco sustratos orgánicos: arroz, granos de trigo, afrecho de trigo, tamo de trigo y lombricompuesto, los cuales se evaluaron tomando en cuenta su aptitud para estimular la esporulación de *Trichoderma spp.* Se seleccionó el afrecho de trigo como el sustrato donde los diferentes aislamientos de *Trichoderma spp.* presentaron mayor esporulación y el cual sirvió como inoculante para la prueba de invernadero, de los ocho aislamientos de *Trichoderma spp.* utilizados en la prueba de invernadero, se destacó T38 como el aislamiento que redujo la mortalidad de las plantas de ajo e impidió el retraso del crecimiento en longitud de sus hojas.

Duque *et al.* (2002) Compararon diferentes tipos de tratamientos para el control de de la mancha foliar causada por *Ascochyta pisi* (Lib.) en el cultivo de la arveja (*Pisum sativum*), mediante el uso de productos biológicos y el manejo químico convencional; midieron la efectividad de la aplicación de cada una de las cepas de los hongos antagonistas y la mezcla de estas, frente al control químico, los fungicidas empleados fueron Propineb (Antracol WP 70) protectante y Fosetil Aluminio + Mancozeb de doble acción (Rhodax 70 WP). Los hongos antagonistas utilizados fueron: *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Trichoderma koningii* (Oudemans. A) y *Verticillium lecanii* (Zimmermann). Además, se evaluó la producción, incidencia, severidad y peso de vainas, el análisis estadístico indicó que hubo diferencias altamente significativas entre tratamientos. El análisis de

varianza para número de vainas por planta, número de granos por vaina, peso de granos por vaina y grado de infección de los hongos antagonistas no mostró diferencias significativas entre tratamientos. Con respecto a rendimiento y rentabilidad, el hongo *Verticillium lecanii* fue el mejor, pero sin alcanzar los resultados obtenidos con los productos químicos.

Ordóñez (2005) Evaluó la efectividad antagónica *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *P. infestans*. realizando una serie de cultivos y utilizando la técnica de siembras opuestas (patógeno – antagónico), empleando diez aislamientos de *Trichoderma* spp, procedentes de suelo de bosque, jardín, pradera, pajonal y de siembras caseras, frente a dos aislamientos de *Phytophthora infestans* (N00299 y N06399), provenientes de dos variedades cultivadas en el departamento de Nariño (parda pastusa y sabanera). Dos aislamientos presentaron los más altos promedios de invasión micelial Pi02 y Pi63 respectivamente. Además, valoró la capacidad inhibitoria de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de *Trichoderma* spp, comprobando que no existe ninguna relación entre el antibiótico producido por cada uno de los diez aislamientos de *Trichoderma* spp, con su capacidad inhibitoria frente a los aislamientos de *Phytophthora infestans*.

3. MARCO TEORICO

3.1 IMPORTANCIA DE *Phytophthora infestans*

El Oomycete *Phytophthora infestans*, agente causal de la gota (tizón tardío) de la papa, algunas hortalizas y frutales, ha sido reconocido desde épocas precolombinas, pero solo a partir de 1895, se tomó conciencia de su magnitud, dado que devastó los cultivos que eran la base de alimentación del pueblo Irlandés, causando hambruna que desencadenó en la muerte y la migración de la cuarta parte de la población. (Castaño, 1996).

P. infestans muestra una gran virulencia en especies de la familia solanaceae la enfermedad puede destruir el follaje y los tallos de éstas en cualquier momento durante la estación de crecimiento de las plantas. Puede atacar los tubérculos de papa y los frutos del tomate en el campo, así como en almacenamiento; la “gota” puede destruir totalmente todas las plantas de una zona de cultivo al cabo de una o dos semanas, sobre todo cuando las condiciones climáticas son favorables y no se aplica ningún método de control. (Agrios, 1985).

3.1. 1 Posición Taxonomica de *Phytophthora infestans* El género *Phytophthora* contiene cerca de 50 especies, muchas de ellas responsables de algunas de las enfermedades más destructoras, tanto en plantas silvestres como cultivadas (Brassier, 1992).

Según la NCBI (National Center for Biochnology Information) *Phytophthora infestans* se encuentra dentro de la siguiente clasificación:

REINO: Chromista
PHYLUM: Oomycota
CLASE: Myxomycetes
ORDEN: Peronosporales
FAMILIA: Pythiaceae
GÉNERO: *Phytophthora*
ESPECIE: *Phytophthora infestans* (Montagne) Bary (NCBI 2006)

3.1.2 Morfología e Identificación de las especies de *Phytophthora*

La identificación de algunas especies de *Phytophthora*, parece ser relativamente simple, pero las diferencias morfológicas con otras especies del mismo género son tan pequeñas y algunas características tan variables, que incluso los expertos consideran que el género es difícil de clasificar. Por esta razón, es necesario acudir a las técnicas de patrones isoenzimáticos y RFLPs de DNA nuclear y mitocondrial, para diferenciar las especies. Las estructuras somáticas (talos) de *Phytophthora* son llamadas micelio y están compuestos de filamentos hialinos "hifas" ramificado y cenocíticos (no septados), excepto en cultivos viejos, en los cuales algunas veces se pueden observar septas. En cultivos jóvenes, el citoplasma fluye libremente dentro del micelio. Las hifas se ramifican en ángulos aproximados de 90 grados y algunas veces se constriñen en la base. Aunque hay especies que tienen patrones de micelio característicos, éstos no son lo suficientemente útiles para diferenciar especies; como tampoco lo son el crecimiento y la forma de la colonia y el hinchamiento de las hifas (Rohner, 2002).

Los esporangios son esporas asexuales que se producen sobre pedúnculos llamados esporangióforos, los cuales difieren ligeramente de las hifas vegetativas, su desarrollo es indeterminado y se ramifican simpodialmente, lo cual es propio de *Phytophthora infestans*. Los esporangios varían en forma y tamaño, las formas son algo diferentes para una especie en particular, pero son a menudo variables en el rango: de esféricas, subesféricas, ovoides, ovalovoides, elipsoides, limoniformes (*P. infestans*), periformes, obperiformes (en forma de pera invertida), turbinadas (como un trompo), obturbinadas (trompo invertido). Los esporangios miden entre 29 x 19 a 59 x 31 micras (Rohner, 2002).

3.1.3 Biología de *Phytophthora infestans* Este patógeno se propaga sexual y asexualmente. La reproducción sexual sirve para proporcionar un estado de supervivencia a las esporas (oosporas) y generar nuevas combinaciones de genes. Sin embargo, este organismo ha tenido grandes explosiones de poblaciones epidémicas por la reproducción asexual, como parásito obligado, causando la gota o tizón tardío en cultivos de papa y tomate principalmente en muchas partes del mundo (Jaramillo, 2003).

3.1.4 Sintomatología y Desarrollo de la Enfermedad La espora precisa de unas condiciones de temperatura y humedad concretas. Cuando éstas se dan, la espora emite un tubo germinativo, penetrando en los tejidos del hospedante a través de los estomas, heridas, lenticelas o incluso

perforando la epidermis. A partir de este momento si se encuentra en un medio adecuado, el micelio progresa, se ramifica e invade las células o los espacios intercelulares, alimentándose a expensas de su hospedante. Al principio en la fase de incubación no se aprecian afecciones externas, pero a medida que esta avanza, aparecen (Gonstincan, 1998).

La enfermedad puede destruir el follaje y los tallos de la papa (y de las plantas de tomate) en cualquier momento durante la estación del crecimiento de las plantas. Puede atacar los tubérculos de la papa y a los frutos del tomate en el campo, los cuales se pudren en los terrenos de cultivo o cuando se los almacena, transporta o vende en el mercado. (Agrios, 2002).

El tizón tardío puede destruir totalmente todas las plantas de la zona de cultivo al cabo de una a dos semanas cuando las condiciones climáticas son favorables (humedad relativa alta y temperatura moderadamente baja) y cuando no se aplica ningún tipo de control. (Agrios, 2002).

El tipo de lesión en hojas varía con la temperatura, humedad, intensidad lumínica y variedad del hospedante. Los síntomas iniciales típicos se presentan como manchas pequeñas de color verde claro a verde oscuro, de forma irregular. Bajo condiciones ambientales favorables, las lesiones progresan, convirtiéndose en lesiones necróticas grandes de color castaño a negro purpúreo, que pueden causar la muerte de los folíolos y avanzar por los pecíolos hacia el tallo, finalmente la enfermedad puede causar la muerte de la planta afectada. Una vez los esporangios han germinado se requiere un periodo de 2 a 2.5 horas con temperaturas de 15 a 25° C, para que se produzca la penetración de los tubos germinales en los tejidos del hospedante. (Agrios, 1985)

3.1.5 Control de la Gota o Tizón Tardío

3.1.5.1 Métodos químicos que erradican o reducen la cantidad de inóculo de *Phytophthora infestans* Los métodos químicos tienen como propósito la protección de la planta de los fitopatógenos y en algunos casos, la reducción o erradicación de un patógeno que ya ha infectado a la planta. Los compuestos químicos inhiben la germinación, el crecimiento y la reproducción de los fitopatógenos o, pueden ser completamente letales a estos. El control químico puede estar enfocado a fungistáticos (inhiben la germinación de las esporas) o fungicidas que matan a las esporas, con acción

erradicante, pero que pueden causar fitotoxicidad de forma específica a los Oomycetes (Jaramillo, 2003).

Los compuestos químicos que se utilizan para el control del tizón tardío comprenden el mancozeb, metalaxyl, una combinación del metalaxyl y mancozeb, captafol, clorotalonil, polyram y hidroxido de sentina, así como varios compuestos de cobre que incluyen al Kocide, oxiclورو de cobre y el caldo bordeles. Por lo común, la aspersión al follaje disminuye considerablemente la infección de los tubérculos de la papa. Sin embargo, aun cuando las hojas y los tallos parcialmente marchitos sobrevivan a la temporada de cosecha, es necesario desechar los órganos aéreos de las plantas o bien destruirlos mediante aspersiones con compuestos químicos o mediante métodos mecánicos.

Los herbicidas que se utilizan para tal fin incluyen al dinoseb, diquat, paraquat, endothall, ametryn, varios compuestos inorgánicos como sulfato de cobre, arsenitos de sodio y potasio, ácido sulfúrico y ciertos compuestos dinitro. (Agrios, 2002).

3.1.5.2 Métodos biológicos que erradican o reducen la cantidad de inóculo de *Phytophthora infestans* El control biológico es una metodología utilizada para mantener en condiciones inocuas una población de organismos patógenos, empleando sus enemigos naturales quienes actuarán con actividades de competencia, amensalismo, parasitismo y capacidad depredadora, o también manipulando indirectamente para el fin, los productos metabólicos de los antagonistas como antibióticos, enzimas líticas (Deacon, 1988).

Existen buenas posibilidades de lograr una reposición de la actuación de los microorganismos antagónicos en el suelo, al favorecer su crecimiento poblacional mediante el estímulo de su saprofitismo a través de un mejoramiento de la fertilidad orgánica y de las características físicas de los suelos, lo cual es factible. Bajo estas condiciones, se puede desarrollar un plan de control biológico de microorganismos fitopatógenos habitantes de los suelos, sean saprofitos facultativos o parásitos obligados, teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- Conocimiento del patógeno, sus relaciones con la planta hospedera y el medio ambiente, su dispersión y persistencia.
- Identificación de los microorganismos que están asociados con el patógeno, ya sea favoreciéndolo o limitando su población.

- Estudio de aquellos microorganismos con capacidad antagónica, probando su efectividad y seleccionando aquellos promisorios.
- Observación del tipo de antagonismo que está operando.
- Estudios de persistencia de los antagonistas y determinación de los factores que inciden en ella.
- Comprobación experimental de los alcances del antagonismo, determinando las posibilidades de utilización masiva de aquellos microorganismos antagonistas con capacidad de reducir significativamente las poblaciones del patógeno (Sañudo *et al.* 1994)

3.1.5.3 Control Genético Consiste en utilizar la habilidad que tienen algunas variedades o especies vegetales que impiden el desarrollo de la enfermedad debido a sus características intrínsecas. La susceptibilidad del hospedante implica su incapacidad para defenderse del ataque del patógeno. Existen dos formas de resistencia de la planta de papa a *P. infestans*. La primera se caracteriza por desencadenar una respuesta de hipersensibilidad en forma de pequeñas lesiones necróticas y se denomina resistencia vertical. Está gobernada por 11 genes mayores (R) que interactúan con los genes de avirulencia del patógeno. Los 11 genes mayores conocidos a la fecha provienen principalmente de *S. demissum* aunque recientemente se han detectado dos nuevos genes (R12 y R13) procedentes de *S. berthaultii* lo que sugiere que el germoplasma de *Solanum* spp. puede tener más genes mayores (Sánchez *et al.*, 2000). Esta resistencia es específica para la raza, su herencia es de tipo cualitativo y no tiene mucha duración. El segundo tipo de resistencia está gobernada por genes menores de efecto aditivo y se denomina resistencia horizontal o de campo. La respuesta del hospedante no es de hipersensibilidad, en este caso la interacción con las razas del patógeno no es significativa, su herencia es de tipo cuantitativo y al ser gobernada por muchos genes es más estable. En las variedades con resistencia horizontal el inicio y el desarrollo de la enfermedad son mucho más lentos que en las variedades susceptibles, esto permite empezar con el control químico cuando se observan los primeros síntomas de la enfermedad. La integración de la resistencia genética y el control químico permiten reducir el uso de fungicidas, reducir el costo de producción, reducir daños a la salud humana y al medio ambiente (Pérez, 1996)

3.2 ANTAGONISMO MICROBIANO

En la naturaleza se ha observado que existen microorganismos que presentan propiedades antagónicas (antibiosis, privación de nutrientes, parasitismo entre otros), que permiten controlar en gran medida la población patógena, pero sin llegar a extinguirla; sin embargo, cuando se introduce inóculos en gran cantidad, pueden contrarrestar de manera promisoriosa los patógenos (Sañudo *et al.* 1994).

Así los hongos saprófitos antagonistas de enfermedades, incluyendo los organismos patógenos de plantas, pueden desarrollarse fácilmente en un medio de cultivo, de forma que pueden ser producidas grandes cantidades de esporas o fragmentos de micelio y posteriormente ser liberados al ambiente; estos inoculantes germinan o crecen para producir micelio activo que puede parasitar y por otra parte inhibir la enfermedad o plaga sin dañar a los organismos que no son hospedantes (Wainwright, 1995).

Teniendo en cuenta lo anterior resulta viable e importante trabajar con el género *Trichoderma*, cuyas especies aisladas frecuentemente de suelos agrícolas presentan un efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos ya sea por competencia, producción de antibióticos o parasitismo (Sañudo *et al.* 1994).

3.3 ASPECTOS GENERALES SOBRE *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo, en residuos de cultivos especialmente en aquellos que son atacados por otros patógenos (Harman *et al.* 2004).

Trichoderma spp. tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, a parte de esto produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitats donde los hongos causan enfermedad le permiten ser eficiente agente de control, de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos. Además su gran

variabilidad se constituye en un reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos (Benítez *et al.* 2004).

3.3.1 Biología de *Trichoderma* spp. agrupa a 33 especies, el hongo se identifica como una mota de color verde habitante natural del suelo. Visto al microscopio parece un árbol pequeño, que produce esporas o conidias asexuales, que aseguran la viabilidad del hongo en la próxima generación. *Trichoderma* spp. produce en el micelio, unos ensanchamientos, que luego toman forma globosa u ovoide llamadas clamidosporas, las cuales son bastante tolerantes a condiciones ambientales adversas y son consideradas estructuras de supervivencia, ya que pueden perdurar a través del tiempo (Esposito *et al.* 1998).

La mayoría de las células poseen numerosos núcleos (heterocarióticas), algunas pueden llegar a tener más de cien. Varios factores genéticos asexuales, como la combinación parasexual, mutación y otros procesos contribuyen a la variación de este género, cuyas especies, ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y con marcadas propiedades antagonistas, poseen representantes caracterizados por su alta producción de sustancias gaseosas, lo que permite diferenciar a estas últimas por un pronunciado aroma a coco que se desprende del cultivo (Harman *et al.* 2004).

3.3.2. *Trichoderma* como biocontrolador. el hongo *Trichoderma* spp. biorregulador y antagonista natural de muchos fitopatógenos, actúa como agente de control biológico, disminuyendo o eliminando la necesidad de utilizar fungicidas químicos (Harman *et al.* 2004).

3.3.3. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. la habilidad de trichoderma para reducir enfermedades causadas por fitopatógenos del suelo es bien conocida, muchos mecanismos son considerados en la interacción antagonista de trichoderma spp. entre ellos, competencia por nutrientes indispensables para la germinación de esporas o por sitios de infección, el micoparasitismo y la antibiosis con la producción de enzimas y metabolitos secundarios que son la llave en muchas interacciones que causan la destrucción del patógeno.

Micoparasitismo: el micoparasitismo se define como “la interacción antagonista entre dos hongos”; es decir el micoparasitismo de un hongo (hospedero) por otro hongo (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedero (Michel, 2001).

Los hongos micoparásitos se dividen en dos grupos: biotrópicos y necrotrópicos. Los biotrópicos tienen un rango restringido de hospedantes y producen estructuras

especializadas para absorber nutrientes, son capaces de obtener nutrientes de la célula viva del hospedero (Inbar y Chet, 1997), existen pocos casos de biocontrol de este tipo. El éxito de la destrucción de las células del hospedero depende de los factores externos, entre los cuales la nutrición es muy importante; sin embargo, al no tener requerimientos nutricionales específicos son satisfechos solamente por el hospedero. Los necrotropicos como *Trichoderma* matan a la célula antes o después de la invasión, excretan sustancias toxicas y utilizan sus nutrientes. Son capaces de existir indefinidamente como saprofitos y se caracterizan por su rápido crecimiento sobre gran variedad de sustratos, tienden a ser más agresivos y presentan un rango amplio de hospedantes extendidos a lo largo de todos los grupos taxonómicos y no son especializados en el modo de parasitismo. Su actividad antagónica es atribuida a la producción de antibióticos, toxinas o enzimas hidrolíticas, en proporciones que causan la muerte y la destrucción del hospedero (Inbar y Chet, 1997).

En el micoparasitismo son varias las enzimas producidas por *Trichoderma* capaces de hidrolizar las paredes celulares de numerosos hongos. Estas enzimas incluyen endoquitinasas, proteasas, glucosidasas, etc. Estas enzimas son inducidas por los diferentes polímeros que componen la pared de distintas estructuras de los hongos a los cuales ataca. Este proceso puede ser dividido en cuatro sucesos principales (Harman *et al.* 2004).

- Crecimiento quimiotrófico: donde exudados del patógeno atraen a *Trichoderma* spp.
- Reconocimiento: algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. son específicos a algunos fitopatógenos, y es en esta etapa donde el fenómeno de especificidad de ataque se define.
- Adhesión: una vez *Trichoderma* spp. ha reconocido al patógeno lo envuelve y se adhiere a las hifas cubriéndolo totalmente.
- Degradación: el paso final es la degradación de la pared celular del hongo fitopatógeno por medio de la producción de enzimas como proteasas y endohidrolasas.

Antibiosis: Esta ocurre cuando hay producción de metabolitos tóxicos o antibióticos de un organismo con acción directa sobre otro. Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir antibióticos en cultivos puros, lo

cual es la más fuerte evidencia de la posible acción de este tipo de compuestos como mecanismo de ataque de *Trichoderma* spp. bajo condiciones de campo. No obstante, para este hongo en particular, la producción de metabolitos está fuertemente ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo (Trosno *et al.* 1998). La antibiosis en *Trichoderma* spp., puede efectuarse por producción de enzimas hidrolíticas y por metabolitos secundarios volátiles o no volátiles (Jensen y Wolffhechel, 1995).

- Por enzimas hidrolíticas se sabe de la capacidad de especies de *Trichoderma* de producir enzimas hidrolíticas; entre ellas, celulasas, quitinasas, glucanasas, proteasas y xylaninas, las cuales en presencia del patógeno incrementan su actividad. Los aislados de *Trichoderma* spp. hidrolizan la gelatina, caseína, leche, carboximetilcelulosa y la quitina, lo que indica la presencia de una actividad de enzimas hidrolíticas de carácter proteolítico, celulolítico y quitinolítico.

- Por metabolitos secundarios: entre los metabolitos que produce *Trichoderma* spp. el 6-pentyl- α -pyrona (6PAP) es el más conocido y estudiado debido a su potente actividad antifúngica la habilidad de las cepas de *Trichoderma* para producirlo es variada entre las diferentes especies, aun entre cepas de la misma especie; además, una cepa en particular puede producir diferentes metabolitos a diferentes estados de desarrollo según las condiciones de cultivo. (Michel, 2001)

El 6PAP es un metabolito volátil que se caracteriza por su aroma a coco biosintetizado por especies de este género, y está asociado a propiedades antibióticas y su toxicidad está relacionada con su habilidad hidrofóbica, formando una capa hidrorrepelente sobre la pared celular, que impide la absorción de agua por la célula del patógeno (Scarselletti y Faull, 1994)

Diversas especies del género *Trichoderma* son productoras de antibióticos no volátiles como trichodermin, suzukacillin, alamethicin, gliotoxinas, glioroseina, aurathioglicidina, rubrogliocladina, viridina y antibióticos de amplio espectro como U₋₂₁₉₆₃ (Meyer y Reusser, 1967, citados por Diaz y Velasquez, 2002).

Competencia: Esta ocurre cuando dos o más organismos demandan un mismo recurso vital. La competencia entre agentes de biocontrol y el fitopatógeno puede resultar en control biológico por aniquilación de la población perjudicial, y puede darse a favor de *Trichoderma* spp. debido a su alta frecuencia de crecimiento y desarrollo (Benítez *et al.*, 2004).

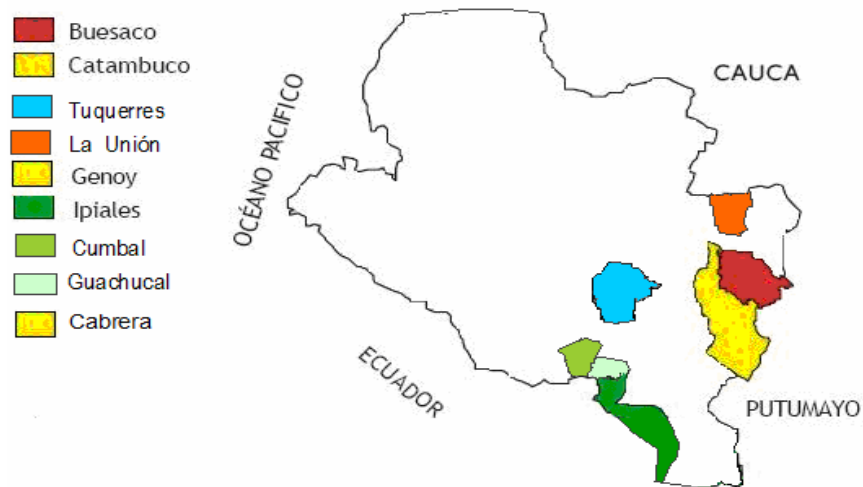
Una ventaja selectiva en la competencia por nutriente y espacio, dentro de su nicho ecológico la competencia por nutrientes en la superficie de la hoja es el principal mecanismo involucrado en el control de bacterias patógenas, en el caso de hongos es variable (Lindow y Wilson, 1998); de tal forma que la causa mas común de la muerte de un microorganismo es la por inanición, muchos microorganismos requieren de nutrientes exógenos para germinar, penetrar e infectar el tejido del hospedero principalmente carbono, nitrógeno y hierro.(Michel, 2001).

Estos tres mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada pareja de antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales (Rey *et al.* 2000).

4. METODOLOGÍA

4.1 FASE DE CAMPO

4.1.1 Área de estudio Para la obtención de los microorganismos de interés: *Trichoderma spp* y *Phytophthora infestans*, se recolectaron muestras vegetales y de suelo de los cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y papa (*Solanum tuberosum L.*) en el departamento de Nariño, en los municipios de Túquerres, Buesaco, Ipiales, Cumbal, Guachucal, La Unión y Pasto en los corregimientos de Cabrera, Catambuco y Genoy. (Ver Mapa 1)



Mapa 1. Ubicación de zonas de muestreo en el Departamento de Nariño.

4.2 FASE DE LABORATORIO

4.2.1 Aislamiento y purificación de *Phytophthora infestans*.

Se aisló *P. infestans* a partir de muestras de hojas y frutos que presentaron sintomatología del patógeno de los cultivos de las zonas de estudio. Primero se procedió a la desinfección de las muestras (ver anexo 2); después de que las muestras estuvieron respectivamente desinfectadas, las hojas se cortaron en trozos pequeños de 2.5mm x 2.5 mm con una parte afectada y una parte sana, luego se colocaron cada trocito en cajas petri (5 por caja) con agar V8 mix y agar tomate de árbol, se incubaron las cajas en forma invertida a una temperatura entre 10° y 15°C para facilitar la germinación de los esporangios, y a una intensidad lumínica de 16 horas y 8 horas de oscuridad hasta observar las primeras colonias fungosas. Seguidamente, se realizaron placas microscópicas de las colonias de hongos utilizando la técnica de microcultivo. Se observó al microscopio para confirmar las estructuras de *Phytophthora infestans*. Posteriormente se repicaron las colonias seleccionadas sustrayendo con un sacabocados pequeño a cajas de petri con agar V8 mix y agar tomate de árbol hasta que se logró la purificación completa.

4.2.2 Aislamiento y purificación de *Trichoderma spp.* Se aisló *Trichoderma spp.* a partir de muestras de suelo provenientes de los municipios mencionados anteriormente, por medio de diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} . Partiendo de la última dilución 10^{-6} , se inoculó en superficie y por triplicado 0.1 ml a una caja petri con agar peptona glucosa acidificado (APG) hasta la primera dilución, luego se esparció el inoculo con ayuda de un asa de vidrio estéril, rotándola en diferentes direcciones y de forma suave.

Se incubó a una temperatura ambiente hasta observar las primeras colonias fungosas. Seguidamente, se realizaron placas microscópicas de las colonias de hongos utilizando la técnica de microcultivo. Se observó al microscopio para confirmar las estructuras de *Trichoderma spp.*, teniendo en cuenta su morfología, disposición de las fiálides, esporulación y olor típico a coco, que ayudaron en la identificación. Luego se realizaron pases de las colonias seleccionadas del hongo en cajas de petri con agar peptona glucosa acidificado (APG) hasta que se logró su completa purificación.

4.2.3 Evaluación de la velocidad de crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma spp.*

Se evaluó la velocidad de crecimiento micelial (cm/día) en un periodo de ocho días. La medición del diámetro de crecimiento se hizo en los dos ejes (vertical y horizontal) donde se obtuvo un dato promedio de estas mediciones.

4.2.4 Evaluación de la intensidad de esporulación. Se evaluó la intensidad de esporulación por unidad de área de crecimiento con una duración de ocho días. Los esporangios se obtuvieron lavando las cajas del medio de cultivo APG con agua desmineralizada. Posteriormente se observó al microscopio 10 alícuotas de la suspensión resultante. Se contaron los esporangios utilizando la cámara neu bauer.

4.2.5 Evaluación experimental del antagonismo *in vitro*

Siembras opuestas de *Trichoderma spp.* y *Phytophthora infestans*. Las pruebas de antagonismo *in Vitro* entre *Phytophthora infestans* y los aislamientos de *Trichoderma spp.* se realizaron en cajas petri con medio de cultivo V8 mix y agar tomate de árbol con el fin de suministrar los requerimientos nutricionales al patógeno y con tres repeticiones por cada aislamiento del antagonista. Previamente sembrados en PDA, agar V8 mix y agar tomate de árbol, los aislamientos de *Trichoderma spp.* y *Phytophthora infestans* respectivamente, se incubaron a temperatura ambiente hasta que el micelio creció completamente sobre los medios de cultivo. Para la obtención de los inóculos, se cortó asépticamente el micelio de los bordes de las colonias con un sacabocados de 6mm de diámetro y se procedió a realizar las siembras. Para esto se utilizó la metodología de siembra en zonas opuestas.

Inicialmente, se inoculó el patógeno a 0.5cm. del borde de la caja, se dio a *Phytophthora infestans* una ventaja de crecimiento de 5 a 7 días, al cabo de los cuales se inoculó *Trichoderma spp.* Utilizando el mismo procedimiento. Los discos fueron colocados en extremos opuestos, se sellaron las cajas petri con papel cristaflex y se incubó a temperatura ambiente y de manera invertida. Diariamente (cada 24 horas), se midió el crecimiento de *Trichoderma spp.* sobre *Phytophthora infestans* en cm. de invasión micelial. El tratamiento se suspendió cuando uno de los aislamientos del hongo antagonista creció hasta el extremo opuesto sobre el crecimiento micelial del patógeno.

4.3 DISEÑO ESTADÍSTICO

En esta investigación se empleó un diseño irrestrictamente al azar con tres repeticiones. Para las pruebas de antagonismo “*in vitro*” se empleó el programa estadístico STATGRAPHICS plus versión 5.0 Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) Simple y Factorial, y la prueba Significancia TUKEY.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans* OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO.

En esta investigación se lograron purificar los siguientes aislamientos (ver tabla 1)

Tabla 1. Aislamientos de *Phytophthora infestans*.

AISLAMIENTO	HOSPEDANTE	VARIEDAD	LUGAR DE PROCEDENCIA
Sb120	Tomate de árbol	Amarillo	Genoy
Sb 121	Tomate de árbol	Amarillo	Genoy
St 127	Papa	Parada pastusa	Cabrera
St 128	Papa	Mambera	Cabrera
St151	Papa	Diacol Capiro	Catambuco
St 152	Papa	Parada pastusa	Catambuco
St 154	Papa	Parada pastusa	Catambuco

Se emplearon dos de los aislamientos de *P. infestans* obtenidos (Sb121 y St151) durante esta fase del proyecto correspondientes a los cultivos: (tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y papa (*Solanum tuberosum* L.)) de las diferentes zonas de estudio, los cuales presentaron una mayor velocidad de crecimiento.

5.2 AISLAMIENTOS DE *Trichoderma spp* OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO.

Después de la purificación se obtuvieron 10 aislamientos de *Trichoderma spp* con los cuales se realizaron los pruebas antagonicas (Ver tabla 2).

Tabla 2. Aislamientos de *Trichoderma spp* empleados en el presente estudio.

AISLAMIENTO	LUGAR DE PROCEDENCIA	UBICACION	TEMPERATURA PROMEDIO C°
T4	Túquerres	Cultivo de papa	10.8
T5	Catambuco	Cultivo de papa	16
T6	Florida	Cultivo tomate de mesa	17
T7	Genoy	Cultivo tomate de árbol	16

T8	Cabrera	Cultivo de papa	16
T9	Túquerres	Cultivo de papa	10.8
T10	Genoy	Cultivo tomate de árbol	16
T11	Túquerres	Cultivo de papa	10.8
T12	Catambuco	Cultivo de papa	16
T13	Buesaco	Cultivo tomate de árbol	18

Se emplearon todos los aislamientos de *Trichoderma spp* obtenidos durante esta fase del proyecto correspondientes a suelos de los cultivos: (tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y papa (*Solanum tuberosum L.*)) de las diferentes zonas de estudio.

5.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans*

Las características macroscópicas y microscópicas de las colonias de *Phytophthora infestans* que se aislaron en el laboratorio se describen en la tabla 3.

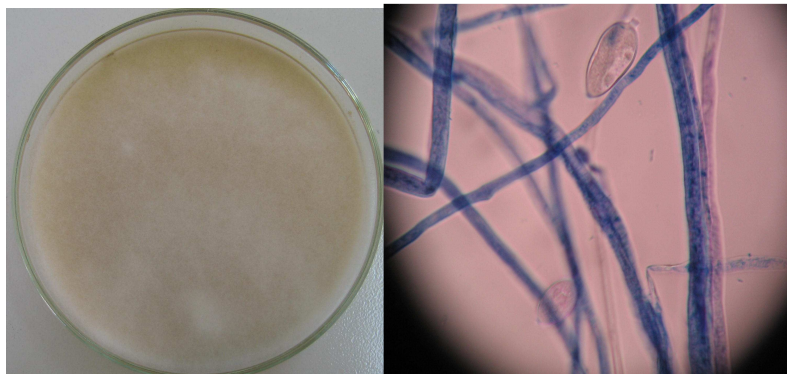
Tabla 3. Características morfológicas de los aislamientos de *Phytophthora infestans* Sb121 y St151

AISLAMIENTO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
Fig. 1. Sb121	Colonia de crecimiento micelial rápido, aéreo, irregular y de textura algodonosa.	Presenta micelio aseptado, hialino con zoosporangios limoniformes
Fig.2. St151	Colonia de crecimiento micelial lento, aéreo, irregular y de textura algodonosa.	Presenta micelio aseptado, hialino con zoosporangios limoniformes

Figura 1. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento Sb121 correspondiente a *Phytophthora infestans*. Microfotografía 40X.



Figura 2. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento St151 correspondiente a *Phytophthora infestans*. Microfotografía 40X.



5.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron diez aislamientos de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo. Las características macroscópicas y microscópicas de dichos aislamientos se describen en el tabla 4.

Tabla 4. Características morfológicas de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

AISLAMIENTO	CARACTERISTICAS	CARACTERISTICAS
-------------	-----------------	-----------------

	MACROSCOPICAS	MICROSCOPICAS
Fig.3. T4	Colonia de crecimiento rápido, con micelio denso y plano, el cual produce inicialmente una conidiación blanca que con el tiempo se torna verde, su reverso es de color amarillo y aroma parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados, ramificados en ramas largas que sostienen fiálides individuales, hinchadas y apiñadas.
Fig.4. T5	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de color blanco, que Presenta reverso de color amarillo y olor semejante a coco.	Presenta conidióforos delgados, con ramas primarias largas que sostienen fiálides solitarias
Fig.5. T6	Colonia de crecimiento rápido y regular, con micelio denso y irregular, el cual produce inicialmente una conidiación blanca que con el tiempo se torna verde intenso, su reverso es de color amarillo y aroma parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados, ramificados en ramas largas que sostienen fiálides individuales, hinchadas y apiñadas.
Fig.6.T7	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de color verde claro, esporulación inicialmente verde después de un tiempo presenta esporulación de color blanca Presenta reverso de color blanco y olor semejante a coco.	Presenta conidióforos delgados, ramificados en ramas largas que sostienen fiálides individuales, hinchadas y apiñadas

Fig.7. T8	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de color verde oscuro, con abundante esporulación su reverso es de color amarillo y aroma parecido a coco	Presenta conidióforos delgados, con ramas primarias largas que sostienen fiálides solitarias
Fig.8. T9	Colonia de crecimiento rápido y regular, con textura densa y plana de coloración verde. Presenta una esporulación amarillo verdosa que se extiende en toda la colonia después del crecimiento micelial. Su reverso es de color amarillo, aroma parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados y ramas primarias que sostienen fiálides individuales.
Fig.9. T10	Colonia de crecimiento rápido y regular, con micelio denso y plano ,el cual produce inicialmente una conidiación blanca que con el tiempo se torna verde, su reverso es de color amarillo y aroma parecido a coco	Presenta conidióforos delgados, con ramas primarias largas que sostienen fiálides solitarias
Fig.10. T11	Colonia de crecimiento rápido, con micelio denso y plano, el cual produce inicialmente una conidiación blanca que con el tiempo se torna verde, su reverso es de color amarillo y aroma parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados y ramas primarias que sostienen fiálides individuales.
Fig.11. T12	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de color	Presenta conidióforos delgados, ramas primarias con fiálides

	blanco, que Presenta reverso de color amarillo y olor semejante a coco.	individuales y apiñadas.
Fig.12. T13	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de color blanco, que Presenta reverso de color amarillo y olor semejante a coco.	Presenta conodióforos delgados, con ramas primarias largas que sostienen fiálides solitarias

Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T4. Microfotografía 10X.



Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T5. Microfotografía 40X.

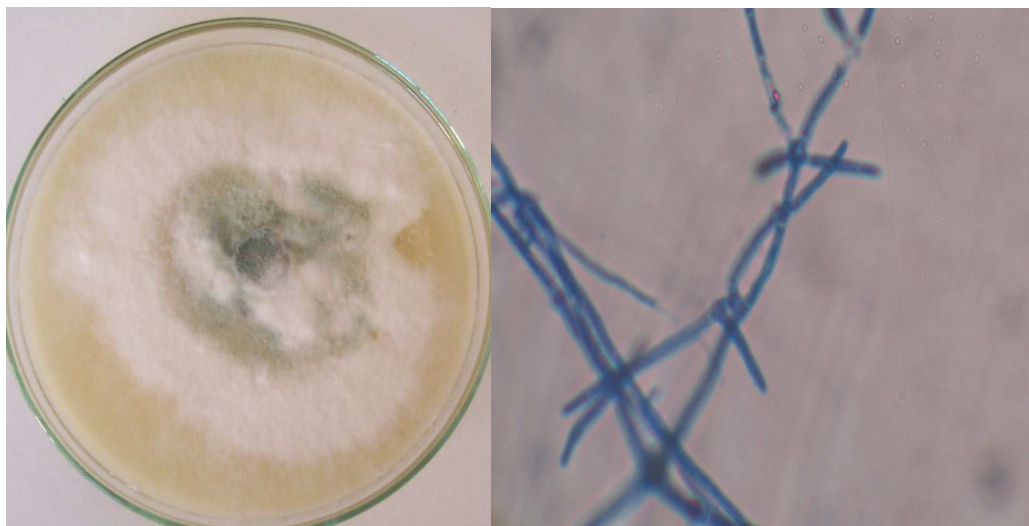


Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T6. Microfotografía 40X.

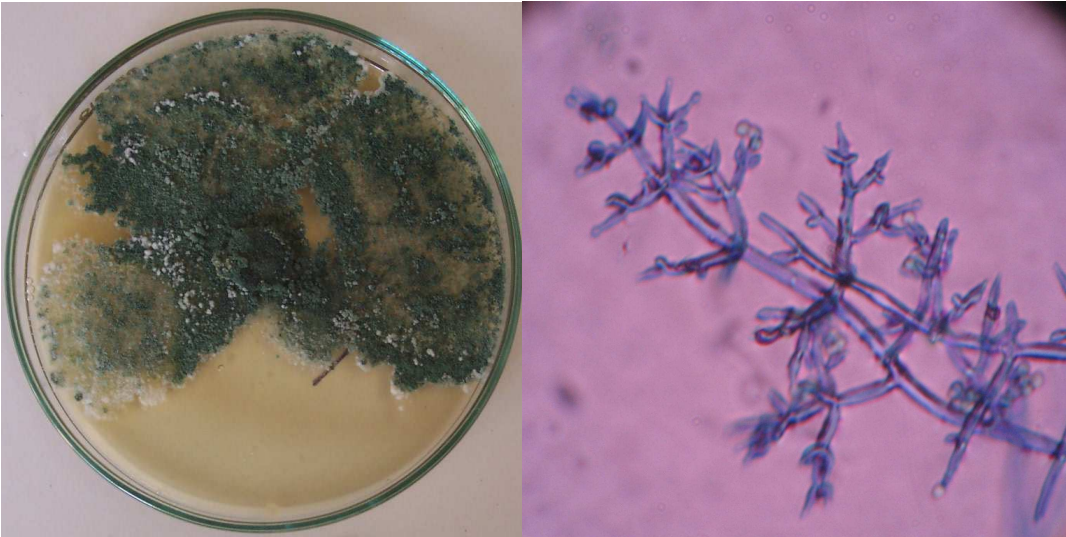


Figura 6. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T7. Microfotografía 40X.



Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T8. Microfotografía 40X.

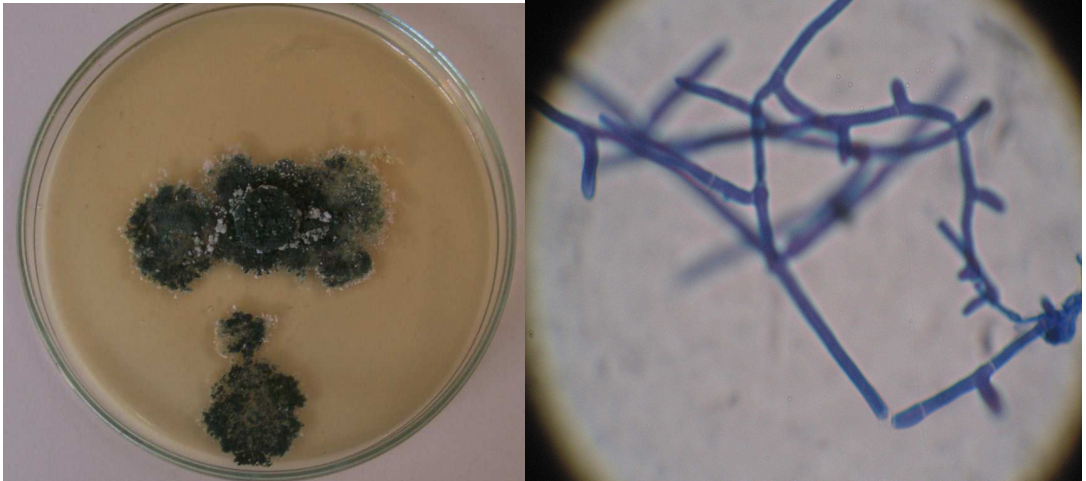


Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T9. Microfotografía 40X.

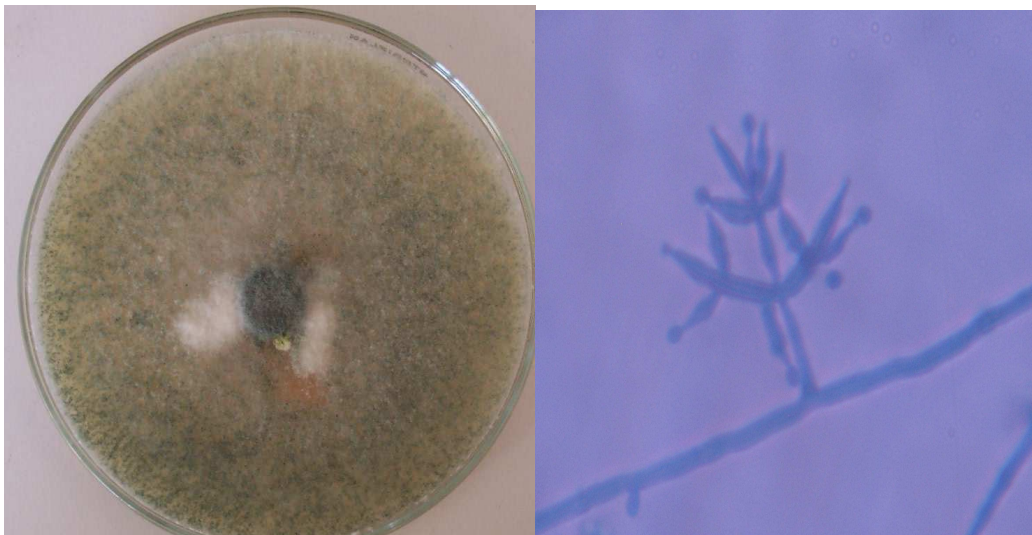


Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T10. Microfotografía 10X.



Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T11. Microfotografía 10X.

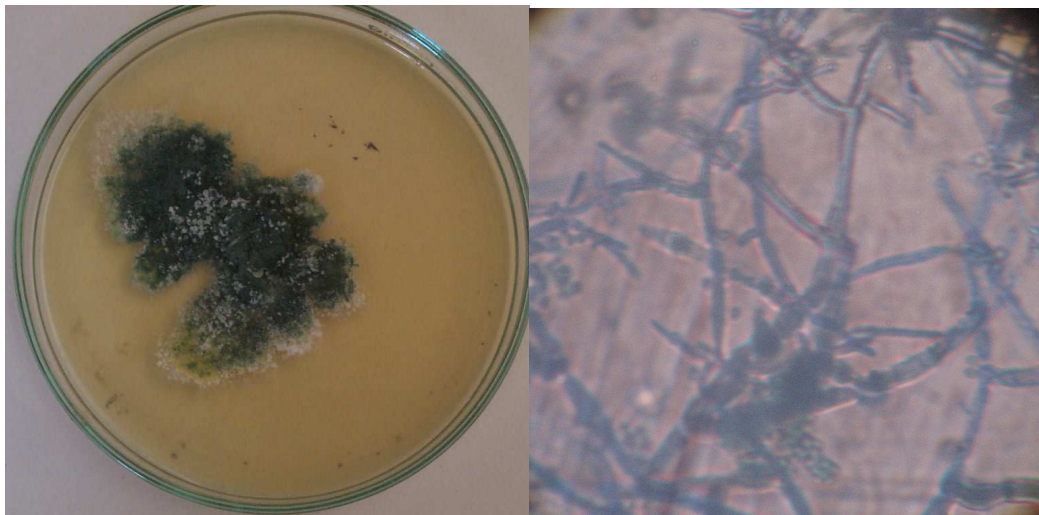


Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T12. Microfotografía 10X.

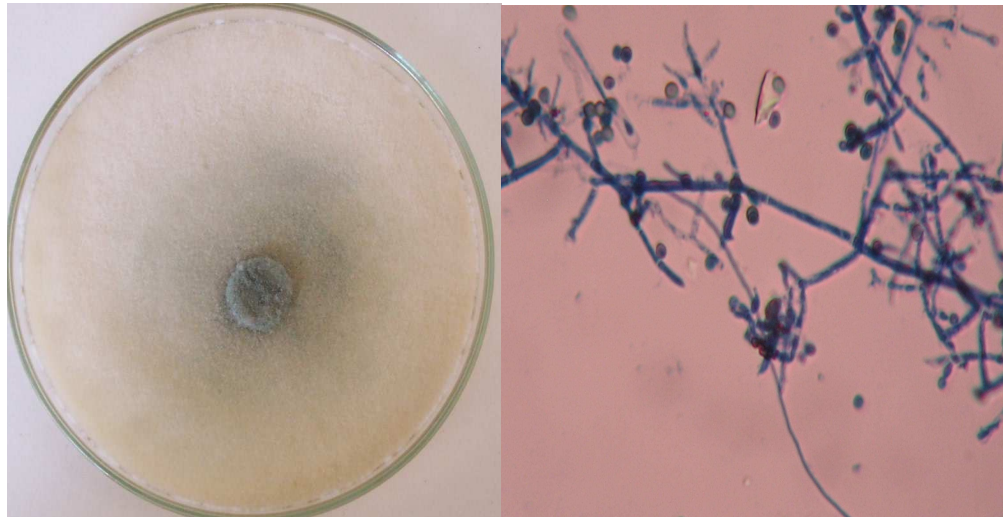
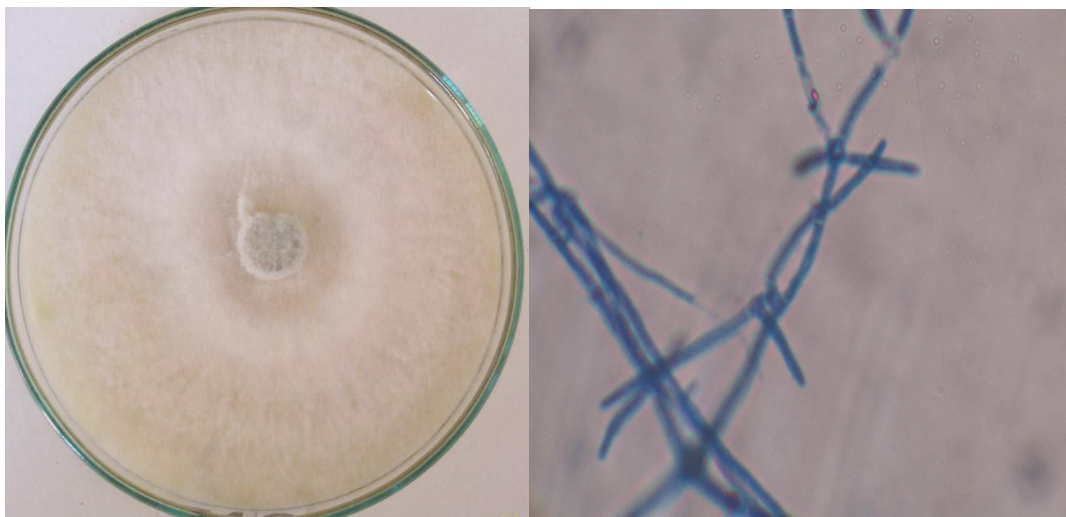


Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T13. Microfotografía 40X.

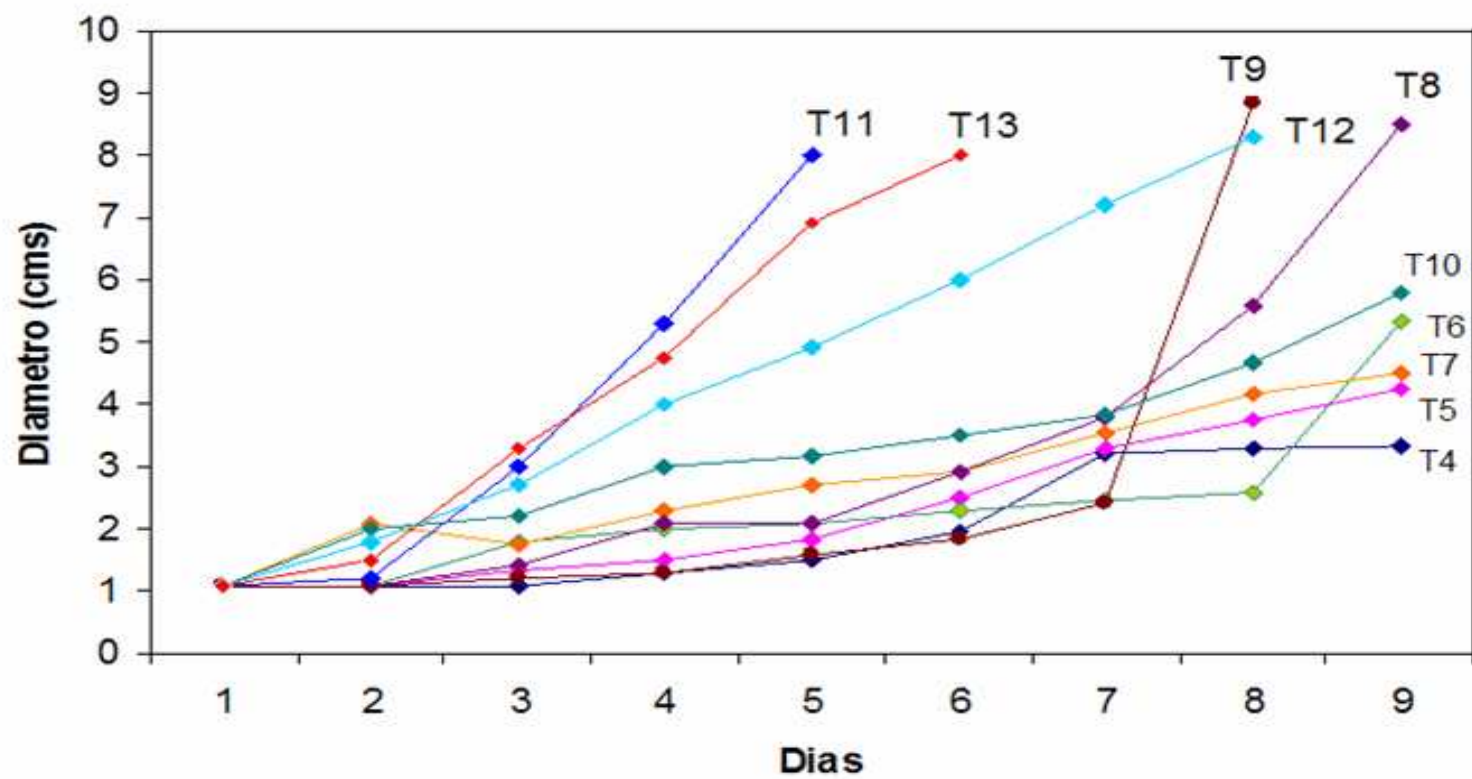


5.5 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO E INTENSIDAD DE ESPORULACION

Se evaluó la velocidad de crecimiento de las diez cepas de *Trichoderma spp.* (Ver Fig. 13). Por observación directa, se pudo evidenciar que la mayoría de los aislamientos presentaron un rápido crecimiento, también se observa la formación de dos grupos: (T8, T9, T11, T12 y T13) que mostraron mayor crecimiento cubriendo en su totalidad la caja en menos de ocho días, y (T4, T5, T6, T7 y T10) con crecimiento lento sin alcanzar el cubrimiento total de las cajas en el periodo anteriormente mencionado.

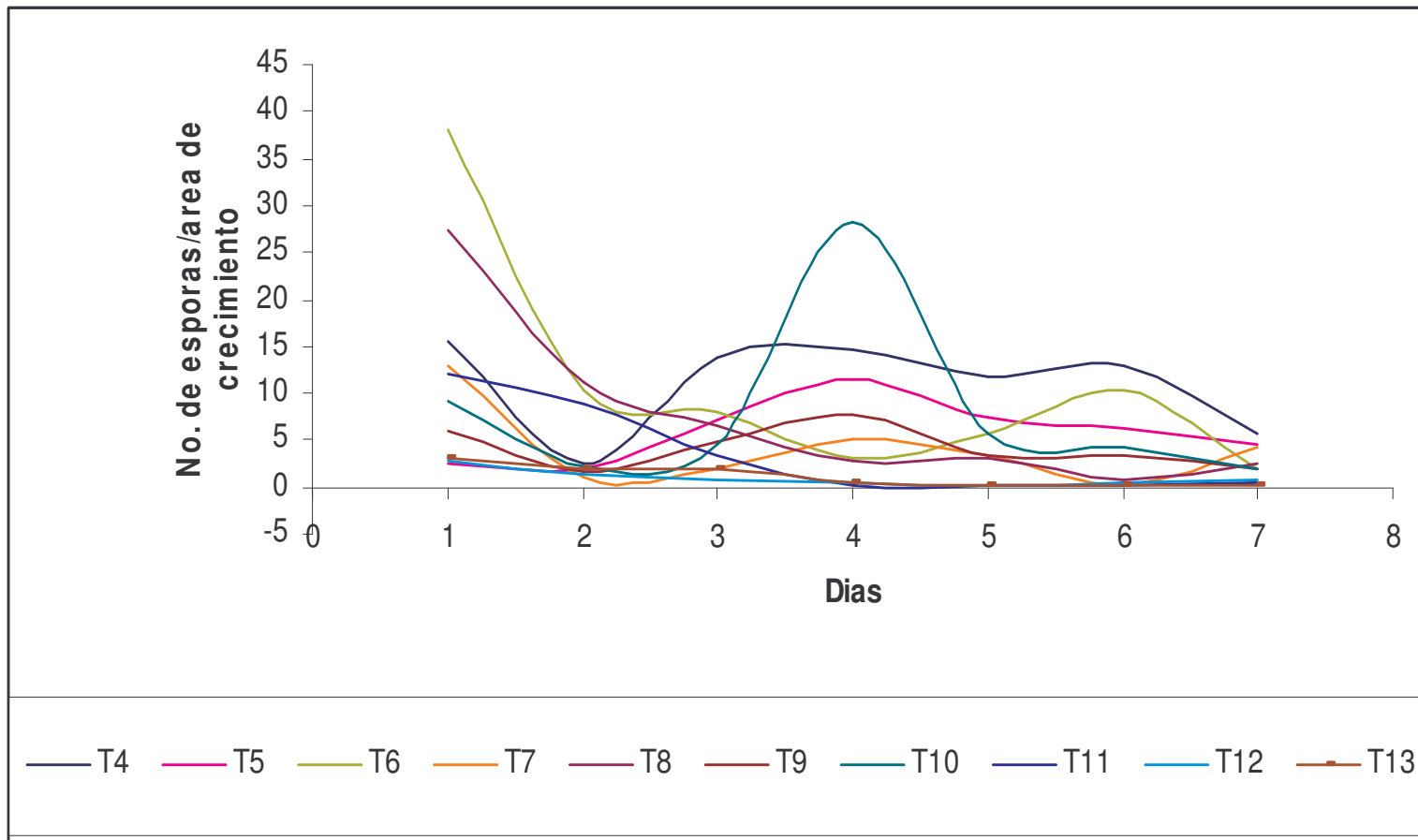
En la fig. 14, evidencia un periodo de largo de latencia del aislamiento T12 y crecimiento acelerado en intervalo de tiempo muy corto. Además solo presenta una mínima esporulación en los últimos días de la prueba. (Ver figura 12)

Figura 13. Velocidad de crecimiento de los diez aislamientos de *Trichoderma spp.*



Se analizaron la relación existente entre la intensidad de esporulación y la velocidad de crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp, encontrándose diferencias notables entre las mismas. Se observa que el crecimiento diametral diario de los aislamientos T9, T11, T12, Y T13 presentan una mayor velocidad de crecimiento y muy bajas tasas de esporulación. El aislamiento T4 presento la mayor producción de esporas diarias, pero se observo una menor velocidad de crecimiento; estos datos son el solapamiento de las constantes cinéticas de crecimiento y la producción de esporas ambos datos medidos diariamente. (Ver Fig.14)

Figura 14. Variación de la Intensidad de Esporulación a través del Tiempo.

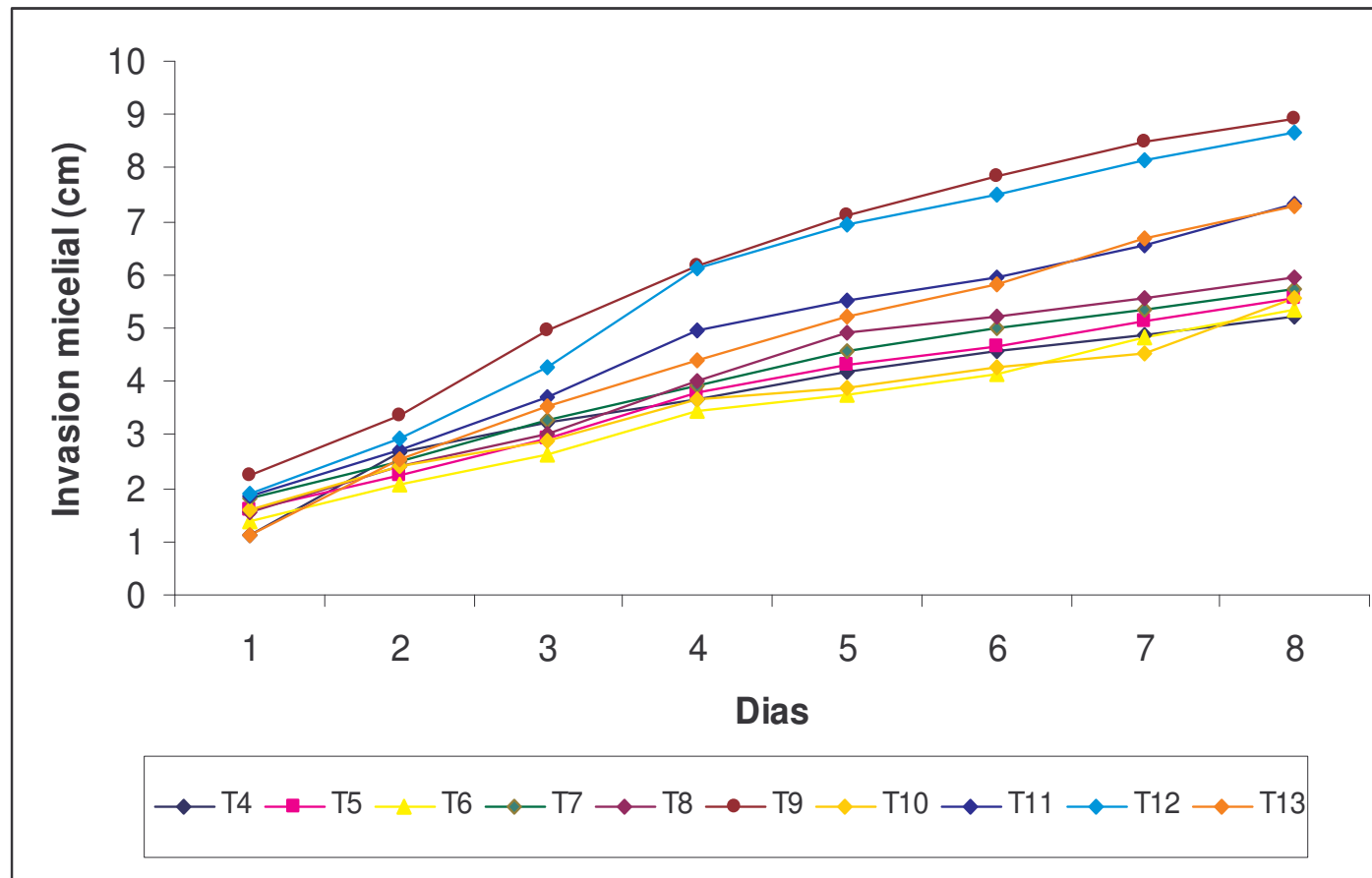


La intensidad de esporulación evaluada mediante el método de lavado diario y conteo de esporas permitió observar que la esporulación de cada una de las cepas de *Trichoderma* se da de manera diferente después del primer día de conteo, la diferencia más notable lo presentó el aislamiento T10 el cual tuvo su mayor producción de esporas en el día cuarto, esta característica posiblemente hace parte de su acción parasitaria.

5.6 ANTAGONISMO *in Vitro*

5.6.1. Siembras opuestas. En las (Fig. 15 y 18) se observa la variación en la invasión micelial de cada una de las diez cepas de *Trichoderma* spp. Frente a cada uno de los aislamientos de *P. infestans*. Una observación cualitativa mostró un rápido crecimiento de la mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* Sb121 y St151, además se pudo determinar diferencias antagonicas sobre ambos aislamientos del patógeno, siendo más agresivas en el aislamiento de *P. infestans* proveniente del hospedante *S. betaceum*, llegando el aislamiento T9 al cubrimiento total de la caja en ocho días, por orden de agresividad los aislamientos T12, T13 y T11 dieron una respuesta positiva para este tratamiento (ver Fig. 17).

Figura 15. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de *Trichoderma spp.* Sobre *Phytophthora infestans* Sb121.



5.6.2. Análisis estadístico para los tratamientos entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *P. infestans* Sb121.

Con el fin de comparar las diferencias entre las constantes cinéticas de crecimiento de los aislamientos antagónicos se realizó un análisis de varianza (ANOVA), el valor P de la prueba F fue menor de 0.05, asumiendo en consecuencia que existen diferencias estadísticamente significantes entre las cinéticas de crecimiento.

Tabla 5. Prueba de significancia TUKEY para constantes cinéticas de invasión micelial para tratamiento con Sb121

Tratamientos	Repeticiones	Vel invasion micelial	Grupos homogeneos
T10 Sb	3	0,521944	A
T4 Sb	3	0,540278	A
T6 Sb	3	0,545	A
T5 Sb	3	0,577222	A
T7 Sb	3	0,59	A
T8 Sb	3	0,647778	A B
T11 Sb	3	0,787056	B
T13 Sb	3	0,829444	B C
T12 Sb	3	1,01278	C
T9 Sb	3	1,02139	C

La prueba de significancia TUKEY (Tabla 5), permitió dividir a los aislamientos de *Trichoderma* spp. en tres grupos de acuerdo a su capacidad invasora. El primer grupo lo conforman T10, T4, T6, T5 y T7. El segundo grupo por T8, T11 y T13. y por ultimo T9 y T12, grupo mas invasivo con una constante cinética de crecimiento de 1.01278 y 1.02139. y el grupo menos invasivo fue el primero con constantes cinéticas de crecimiento entre 0.521944 y 0.59 respectivamente. En la figura 16 se puede observar las agrupaciones anteriores

Figura 16. Constantes cinéticas de invasión micelial para cada uno de los aislados de *Trichoderma* spp. Sobre *Phytophthora infestans* Sb121 con intervalos de confianza del 95%

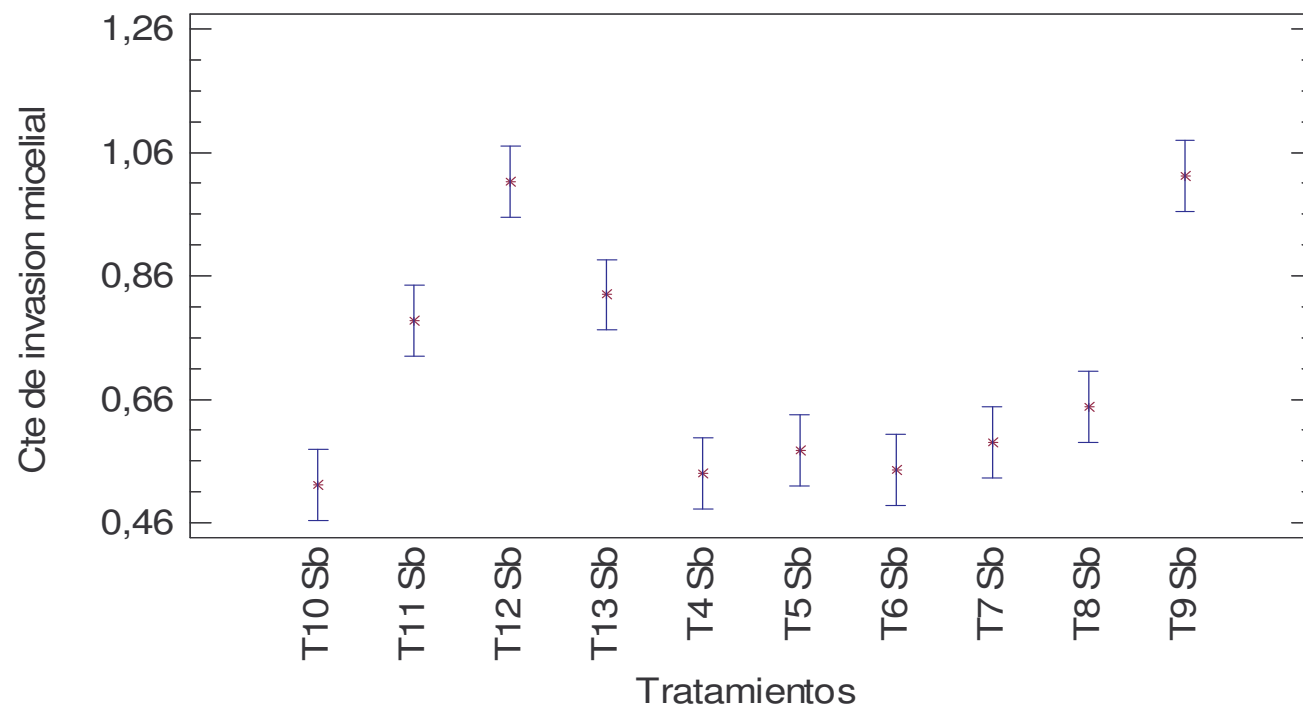
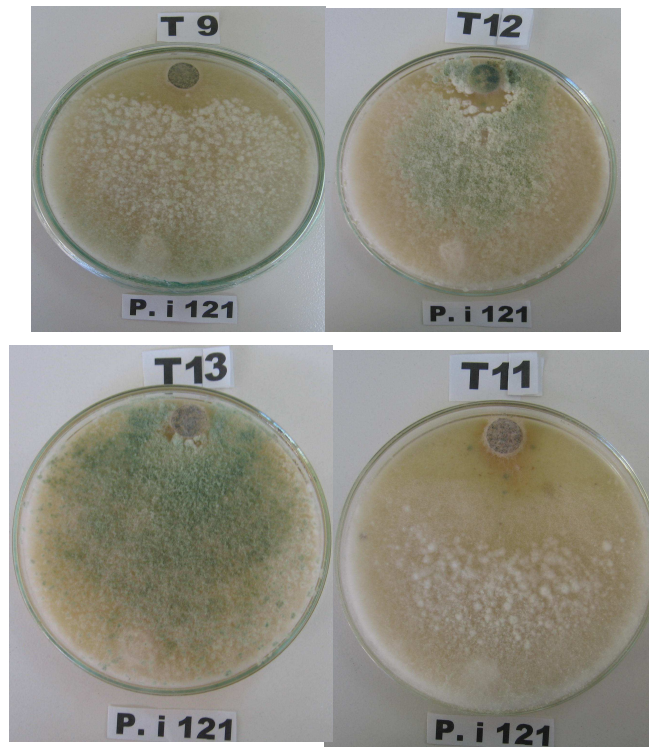
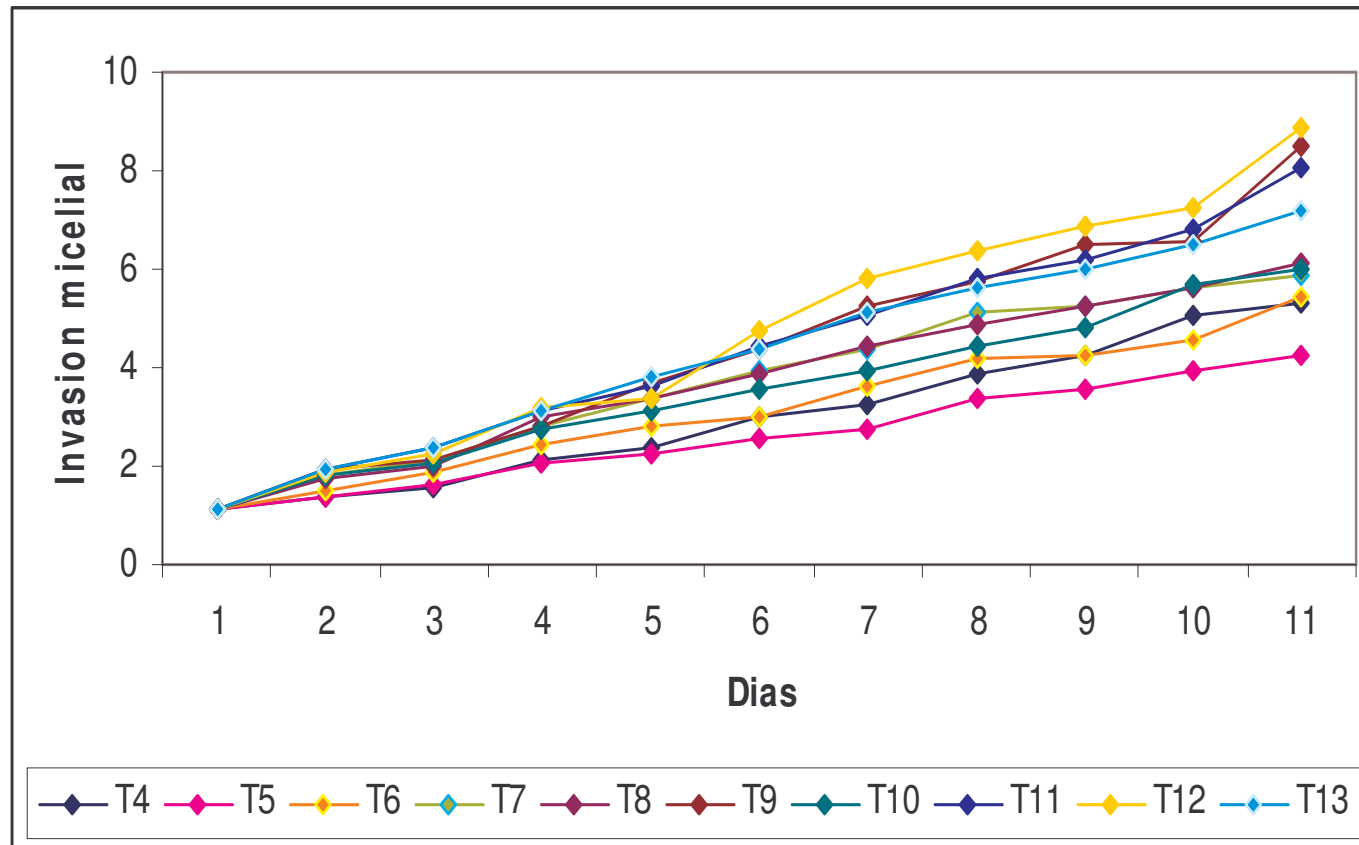


Figura 17. Aislamientos promisorios del antagonista *Trichoderma* spp. Sobre el patógeno *Phytophthora infestans* Sb121.



Para el caso del tratamiento contra el patógeno proveniente del hospedante *S. tuberosum*, se observó mayor agresividad del aislamiento T12, invadiendo totalmente a *P. infestans* en once días, por velocidad de invasión micelial sobre el patógeno, le siguen los aislamientos T9, T11 y T13 respectivamente. (Ver Fig. 20).

Figura 18. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de *Trichoderma* spp. Sobre *Phytophthora infestans* St151.



5.6.3 Análisis estadístico para los tratamientos entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *P. infestans* St 151.

Con el fin de comparar las diferencias entre las constantes cinéticas de crecimiento de los aislamientos antagónicos se realizó un análisis de varianza (ANOVA), el valor P de la prueba F fue menor de 0.05, asumiendo en consecuencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las cinéticas de crecimiento.

Tabla 6. Prueba de significancia TUKEY para constantes cinéticas de invasión micelial para tratamiento con St151

Tratamientos	Repeticiones	Vel invasion micelial	Grupos homogeneos
T5 Sb	3	0,34	A
T10 Sb	3	0,41	A B
T7 Sb	3	0,436	A B
T6 Sb	3	0,437	A B
T8 Sb	3	0,444	A B
T4 Sb	3	0,447	A B
T13 Sb	3	0,504	B C
T11 Sb	3	0,565	B C
T9 Sb	3	0,623	C
T12 Sb	3	0,634	C

La prueba de significancia TUKEY (Tabla 6), permitió dividir a los aislamientos de *Trichoderma* spp. En tres grupos de acuerdo a su capacidad invasora. El primer grupo lo conforman T12 y T9 El segundo grupo por T13 T11, T4, T6, T7, T8 y T10. El ultimo grupo por T5, siendo este el menos promisorio con una constante cinética de crecimiento de 0.340. El grupo mas invasivo fue el primero con constantes cinéticas de crecimiento entre 0.633 y 0.62306 respectivamente. En la figura 20 se puede observar las agrupaciones anteriores.

Figura 19. Constantes cinéticas de invasión micelial para cada uno de los aislados de *Trichoderma* spp. Sobre *Phytophthora infestans* St151 con intervalos de confianza del 95%

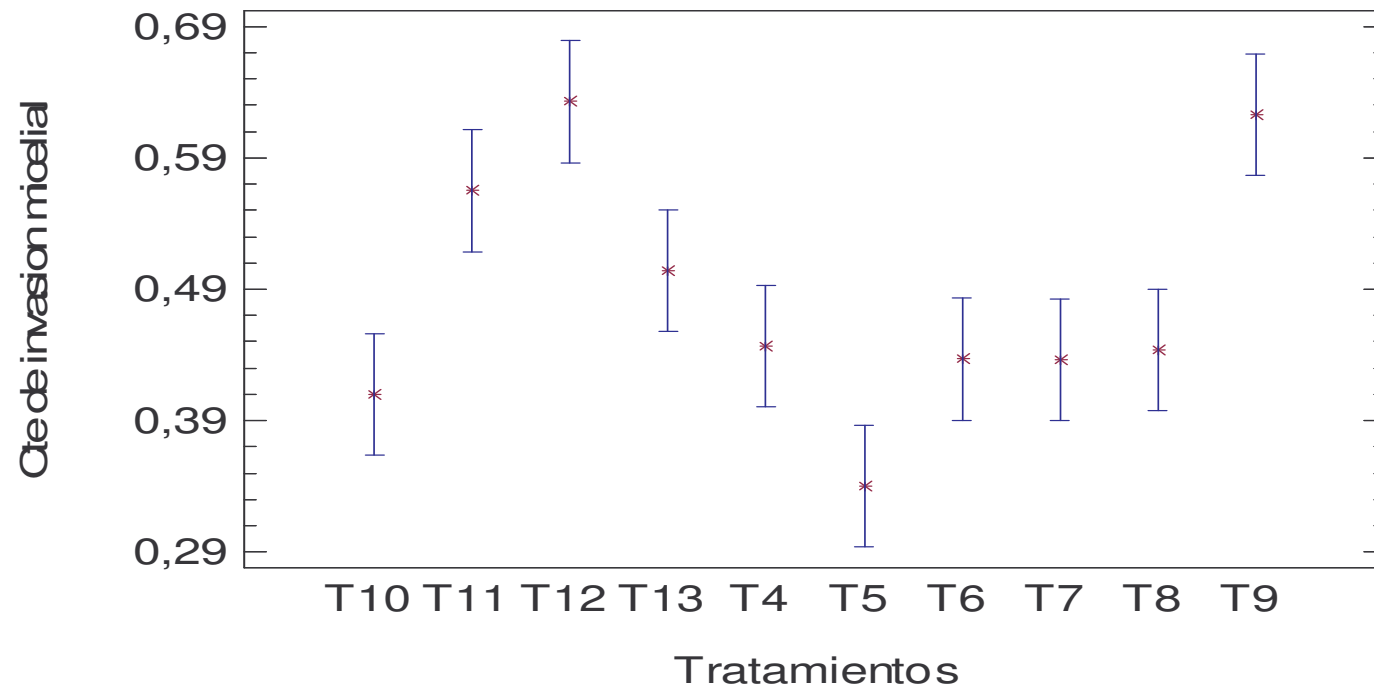
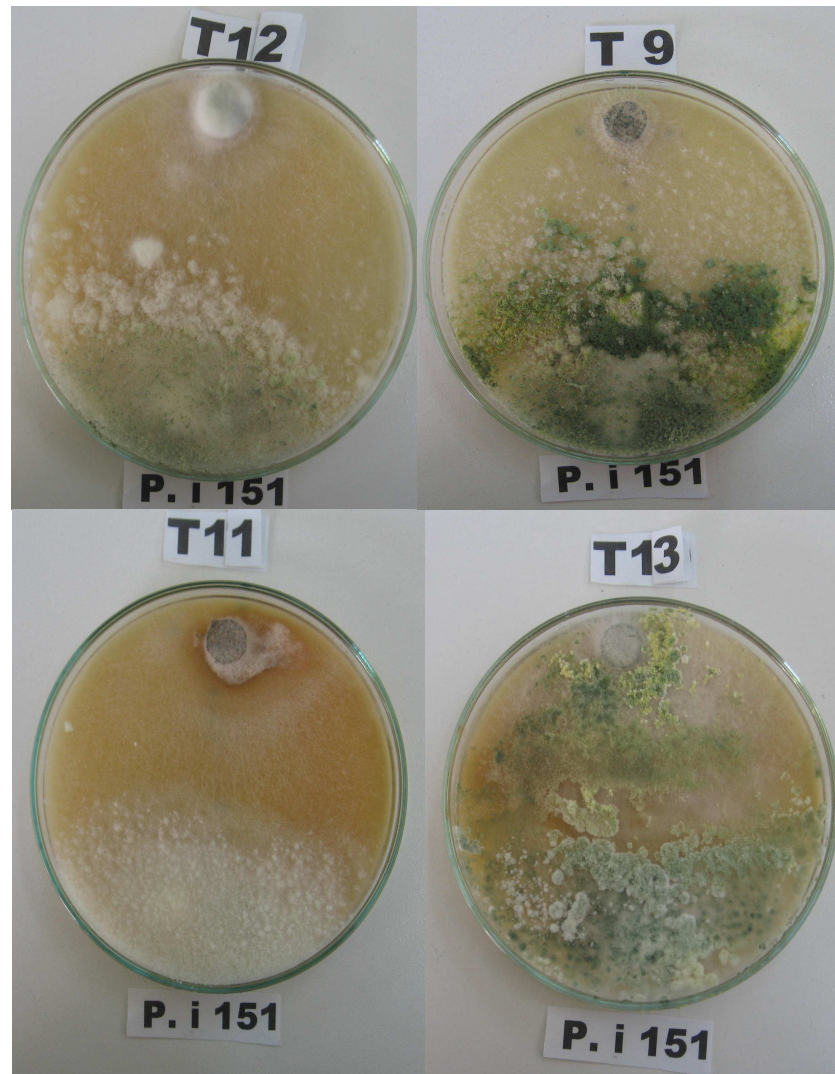


Figura 20. Aislamientos promisorios del antagonista *Trichoderma* spp. Sobre el patógeno *Phytophthora infestans* St151.



5.7 ESPECIFICIDAD ANTAGÓNICA

Con el fin de determinar la especificidad antagonista – patógeno aislados de un mismo lugar (cultivo de tomate árbol y papa) se realizó el antagonismo in Vitro el cual nos permitió observar diferencias en la velocidad de invasión micelial sobre el patógeno procedente de los hospederos (*S. tuberosum* y *S. betaceum*), estas diferencias son muestra de que existe una preferencia del antagonista pero no una especificidad. Además la prueba ANOVA factorial demostró que estas diferencias son el resultado del efecto de tanto del antagonista como de la procedencia del patógeno *P. infestans*. (Ver tabla 7).

Tabla 7. Prueba ANOVA Factorial para los diferentes tratamientos con *Trichoderma* spp. Sobre *Phytophthora infestans* Sb121 y St151 con intervalos de confianza del 95%

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Antagónico	1,08481	9	0,120535	31,99	0,0000
B: hospedero	0,748651	1	0,748651	198,70	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,10109	9	0,018901	5,02	0,0002
RESIDUOS	0,150708	40	0,00376771		
TOTAL CORR	2,15428	59			

Michel, 2001 afirma que en las relaciones entre hongos existe una secuencia principal que involucra procesos bioquímicos y hay un estímulo direccional hacia el patógeno antes del contacto mediante sustancias difusibles que participan en el reconocimiento y ataque al patógeno por el agente antagonista y en la interacción patógena – micoparásito.

Es preciso decir que esta no especificidad es de gran importancia para la optimización del biocontrol del fitopatógeno, se pueden utilizar estos hongos en biotecnología con el fin de implementar nuevos mecanismos de erradicación o

disminución del inoculo de *P. infestans* no solo en los cultivos de los hospederos estudiados (*S. tuberosum* y *S. betaceum*) además otros cultivos debido a que *Trichoderma spp.* Posee un amplio rango de acción.

De acuerdo con los datos estadísticos obtenidos en ambas pruebas antagónicas, se observa diferencias en la capacidad invasora en los diferentes tratamientos. Los aislamientos T9 y T12 mostraron las mayores constantes cinéticas ambos provenientes de suelo de cultivo de papa (ver tabla 2). Deacon, 1988. Afirma que dicho comportamiento se debe seguramente a las posibilidades parasitarias del micelio de *Trichoderma spp.* sobre el patógeno, siendo estas diferentes de acuerdo con la especie del antagonico, tales como la tolerancia a productos metabólicos secundarios (factores de envejecimiento) producidos por el patógeno y quizá la capacidad de tolerar niveles bajos de nutrientes, características que se demuestran por la capacidad de crecer en agar previamente colonizado. Nuestros resultados concuerdan con los publicados por (Ezziyani *et al*, 2004) quienes observaron en primer lugar un crecimiento progresivo de *Trichoderma* y un marcado efecto hiperparasitico, que se manifiesta por la inhibición del crecimiento micelial no solo por compartir el mismo sustrato sino también por que *T. harzianum* produce antibioticos y enzimas: (1,3 – glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) degradadores de la pared celular que juegan un papel importante en el micoparasitismo.

El micoparasitismo involucra una serie de eventos, que incluyen la localización del blanco, a través de un crecimiento quimiotrofico, reconocimiento, ataque, lisis y adquisición de nutrientes. La producción de enzimas hidrolíticas y los factores que influyen en estos eventos están relacionados entre si. (Chet, 1990; Bruce *et al*, 1995). El primer evento denominado reconocimiento esta influenciado por la interacción carbohidrato-lectina. Las lectinas producidas por *Trichoderma spp.* son glicoproteinas de origen no inmune que se aglutinan en la célula y/o precipitan los glicoconjugados del fitopatogeno. (Inbar y Chet, 1997). Se conoce que *Trichoderma spp* después de reconocer a su hospedero lo ataca, crece en espiral y produce un apresorio el cual lo ayuda a la penetración de la pared celular del hospedero (Goldman *et al*, 1994). En seguida de la adhesión el antagonista produce enzimas para realizar la degradación de la pared celular, las enzimas que participan son: las quitinasas, proteasas, glucanasas y celulasas, estas dos ultimas son las mas importantes debido a la composición de la celulosa y β glucanos en la pared celular del genero *Phytophthora*..

Las β - 1,3 –glucanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosidicos de las cadenas de β - 1,3 –glucanos; la degradacion de los glucanos por *Trichoderma* es frecuentemente controlada por una acción sinérgica de ambas endo y exo β -

1,3 –glucanasas, de hecho en la mayoría de los casos la β - 1,3 –glucanasas mas bien se encuentran como una sola enzima (Michel, 2001).

Mediante la transformación de *Trichoderma harzianum* con genes de quitinasas y glucanasas, (Rey *et al*, 2000) obtuvieron cepas con actividades enzimaticas muy superiores a las de la estirpe silvestre. No obstante, algunas de las enzimas producidas por los transformantes sufrieron procesos de proteolisis que se pueden evitar modificando las condiciones de cultivo. La obtención de enzimas hibridas mediante la fusion de los dominios unión a sustrato, es una alternativa al incremento de la dosis genica que tambien origina cepas con mayor capacidad litica. En los ensayos de antagonismo in Vitro, las cepas transformadas con genes de hidrolasas mostraron una capacidad antifungica sobre el fitopatogeno *Rhizoctonia solani* superior a la de la estirpe silvestre.

Como se ha indicado son varios los mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción. No obstante, un análisis de los mecanismos de *Trichoderma* principalmente el micoparasitismo revela que en todos ellos participan las enzimas hidroliticas de la pared celular. Así, la capacidad saprofitica de un microorganismo esta mediada por la cantidad de enzimas degradadoras de polimeros tales como la quitina o los glucanos. Teniendo en cuenta que la degradacion de la pared celular de los fitopatogenos esta mediada por la acción de las enzimas hidroliticas producidas por el antagonista, una buena estrategia de mejora podría ser el aumento de los niveles de enzimas hidroliticas del agente de biocontrol, ya que al modificar este parámetro se estaria actuando directamente sobre los tres mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* podría desplazar a los hongos fitopatogenos.

CONCLUSIONES

- En los diez aislamientos evaluados la intensidad de esporulación no tiene una relación directa con la velocidad de crecimiento.
- Los aislamientos de *Trichoderma* spp. T9 y T12, provenientes de suelos de cultivos de papa, mostraron una alta capacidad de invasión micelial sobre *Phytophthora infestans* proveniente de los hospederos *Solanum betaceum* y *Solanum tuberosum*
- Los aislamientos de *Trichoderma* spp. muestran mayor velocidad de invasión micelial sobre las cepas de *P. infestans* provenientes del hospedero *Solanum betaceum*.
- No existe un antagonismo específico del género *Trichoderma* spp sobre el patógeno *P. infestans* aislado de los dos hospederos utilizados en este estudio.
- La no especificidad es de gran importancia para optimización del control del fitopatógeno, tanto en los hospederos estudiados (*Solanum tuberosum* y *Solanum betaceum*), como en otros cultivos debido a que *Trichoderma* spp. Posee un amplio rango de acción.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la especificidad antagónica de *Trichoderma spp* procedente de suelo de otros cultivos, como lulo (*Solanum quítense*) y Tomate de mesa (*Solanum lycopersium*).
- Realizar el antagonismo in vivo (*in leaf* y en campo) de los aislamientos de *Trichoderma spp* sobre *Phytophthora infestans* provenientes de cultivos de la familia Solanáceae .
- Se sugiere desarrollar métodos eficaces para la obtención de los diferentes metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas producidos por *Trichoderma spp*. Con el fin de evaluar su acción antifúngica e implementar diversas técnicas para determinar el efecto inhibitorio sobre el patógeno.

BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, George. Fitopatología. 2 e.d México: Limusa, 1985. 405p

AGRIOS, George. Fitopatología. 2 e.d México: Limusa, 2002. 119 -121p

ARTEAGA, Maria. Fernanda. SAÑUDO, Benjamín y VALLEGO. Walter. Presencia de *Phytophthora* en cultivos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) y lulo (*Solanum quitoense*) en Nariño y Putumayo. En: Revista de Ciencias Agrícolas. Vol. XVII, No. 1. 2000. Pasto – Colombia.

BENÍTEZ, Tania., RINCÓN, Ana., LIMÓN, Carmen., CODÓN, Angela. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Department of Genetics, University of Sevilla, Spain. 2004.

BESOAIN, Ximena., RAGGI, Carla., GARCIA, Rodrigo., MONTEALEGRE, Jaime., y PEREZ, Luz. Comportamiento y control *in vitro* de *Phytophthora parasítica* mediante aislados de *Trichoderma harzianum*. En: X Congreso Nacional de Fitopatología – Resúmenes 2001.

BRASSIER, Carl. Evolutionary Biology of *Phytophthora*. USA: Annual Rev. Phytopathology, 1992. 250 p.

BRUCE, Alan., SRINIVASAN Uber., STAINES, Harry. y HIGHLEY, Thomas. . Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. And their role in biocontrol of wood decay fungi. International Biodeterioration and Biodegradation. 1995.

CASTAÑO, Jairo. Resúmenes. Manejo del tizón tardío de la papa: Estado actual. En: Papas Colombianas. 1996; 330 p.

CHET, Ilan. New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pest and diseases. En: Baker, R y Dunn P. (Eds): Mycoparasitism – recognition, physiology and ecology. 1990; 725 p.

DEACON, Jim. Introducción a la micología moderna. México: Limusa, 1988. 145 p.

DIAZ, Jenny., Y VELÁSQUEZ, Genie. Antagonismo de aislamientos de *trichoderma spp.* sobre el hongo *Sclerotium cepivorum* berk. causante de la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* l.). Pasto, 2002. Trabajo de Grado Presentado como requisito Parcial para optar El Título de Biólogo Con Énfasis En Microbiología. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología.

DUQUE, Andres., VERGARA, Jose., TORO, Henry. y CASTRO, Reinaldo. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Trichoderma koningii* (Oudemans. A) y *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas, sobre la mancha foliar causada por *Ascochyta pisi* (lib.) en el cultivo de la arveja *Pisum sativum* (L.) En: X Congreso Nacional de Fitopatología – Resúmenes 2001.

DURMAN, Sandra., MENENDEZ, Ana. y GOBEAS, Alicia. Evaluación de *Trichoderma spp* como antagonistas de *Rhizoctonia solani* in vitro y como biocontrolador en plantas de tomate. En: Revista Argentina de Micología. No. 31 1999; 13-18p.

ESCOBAR, Ricardo., MONTEALEGRE, Jaime. y HERRERA, Rodrigo. Selección *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* y respuesta a temperatura, Fe 3+, salinidad y pH con el fin de ser utilizadas en el control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate. En: X Congreso Nacional de Fitopatología – Resúmenes 2001.

ESPOSITA, Emanuel. y DA – SILVA, Martin. 1. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. Brasil: Critical review in microbiology, 220 p.

EZZIYYANI, Mohammed., PEREZ, Consuelo., AHMED, Sid., REQUENA, Maria y CANDELA, Maria. *Trichoderma harzianum* como fungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento(*Capsicum annum* L.), 2004 Universidad de Murcia. Facultad de Biología. Departamento de Biología Vegetal. Murcia. España.

GAJARDO, Ángela., MONTEALEGRE, Jaime., BESOAIN, Ximena., Y PEREZ, Luz. 2001. Efecto del ácido salicílico en el desarrollo de *Trichoderma harzianum*, un Bioantagonista de Patógenos de tomate. Fac. En: X Congreso Nacional de Fitopatología – Resúmenes 2001.

GONSTINCAN, Thomas.. Biblioteca de la agricultura. 2 ED. España: Idea Bookssa, 1998 120 p.

HARMAN, Gary., HOWELL, CHarles., VITERBO, Ada., CHET, Ilan., LORITO, Mateo. *Trichoderma* species opportunistic avirulent plant symbionts Cornell University,. Departments of Horticultural Sciences and Plant Pathology, Geneva. Enero 2004

HARTLY, Charles. Damping – off in forest nurseries. United States: Department of Agriculture. Bull, 1989. 160 p.

INBAR, Y., CHET, Ilan. Lectins and biocontrol: Critical Reviews in Biotechnology. 1997. 1-20p.

JENSEN, D y WOLFFECHET, H. The use of fungi, particularly *Trichoderma spp.* and *gliocladium spp.* to control root rot and damping-off diaeases En: Biological Control: Benefits and Risks. Series: Plant and microbial biotechnology research. 1995. 177 – 189 p. Cambrige University.

JARAMILLO, Sonia. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín, 2003. p. 137. Monografía de grado (Biologo). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

MARÍN, Mario. Y MIRA, Jhon.. Caracterización de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamiento de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, en diferentes piso térmicos y hospederos en el Departamento de Antioquia, 1998, 160p. Tesis Pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.

MICHEL, Alejandro. Cepas nativas de *Trichoderma spp.* Euascomycetes Hypocreales, su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxisporum* (Hyphomycetes: hyphales), 2001. trabajo de grado (Doctorado em Ciências Área Biotecnología). Universidad de Colima. México.

ORDÓÑEZ, Nelson. Antagonismo *in vitro* de Aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre el Patógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary causante del Tizón tardío en papa (*Solanum tuberosum L*), 2005 Trabajo de Grado (Biólogo Con Énfasis En Microbiología). Universidad de Nariño. Facultad De Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología.

PEREZ, Wilmer. Manejo Integrado del Tizón (MIP-Tizón). Serie Ficha Técnica 4/96 Fitopatología. 1996. PROINPA, Convenio IBTA- CIP – COSUDE.

PINEDA, Ricardo. Ministerio de Agricultura CEVIPAPA: Plan nacional de semillas. En: Papas Colombianas. Vol. 3 No.1 -2 (2000) 53 – 55p.

REY, Manuel., DELGADO, Jesus., RINCON, Ana ., LIMON, Carmen. y BETINEZ, Tania. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicida. En: Revista Iberoamericana de Micología. No. 17 (2000). 31-36p

ROHNER, Ana. Genetic characterisation of early-seasonal isolates of *Phytophthora infestans* from Switzerland. Institute of Plant Sciences ETH-Zurich, Switzerland April - October 2002.

SANCHEZ, George., SMART, Chert., SIMKO, Ilan., BONIERBALE, Mart., EWING, Elvin., MAY, GREENLAND, Gary. A. y W.E. FRY. 2000. Identification of two new R-genes to *Phytophthora infestans* from *Solanum berthaultii*. En: Phytopathology No.90 (2000). 68p.

SAÑUDO, Benjamín., CASTILLO, Guillermo y RAMIREZ, Bernardo. Principios del control biológico de: Universidad de Nariño, 1994.

TROSNO, Antonio. y GORDÓN, Luis. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. USA: Marcel Dekke, 442 p.

VILLEGAS, Bernardo. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma spp.* para el control de *Phytophthora cactorum* (Leb & Cohn) Schröeter causante de la Pudrición de la corona y raíz del manzano (*Malus domestica* Borkh), 1999. Tesis Maestría en Fitopatología Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.

WAINWRIGTH, Michael. Biotecnología de hongos. Primera edición. Editorial Acribia S.A. España. 1995 286 p.

GENBANK. 2006. www.ncbi.nih.gov/Taxonomy/Browser

ANEXOS.

Anexo. A Composición de medios de cultivo

AGAR TOMATE DE ARBOL

1 Litro

- 0.75 gramos de CaCO₃
- 9 gramos de Agar
- 9 gramos de Azúcar
- 200 ml de jugo de tomate
- 200 ml de extracto de arveja

Preparación: se diluye en 600 ml de agua destilada el CaCO₃, el Agar y el Azúcar, se deja hervir y se agrega el jugo de tomate y el extracto de arveja previamente esterilizados. Se mezcla y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 atmósferas de presión. Seguidamente se adiciona antibióticos (DMSO Y Rifampicina). Se deja enfriar (soportable al contacto con la mejilla, aproximadamente 50° C) y se sirve en cajas petri estériles. Se guardan en nevera envueltas en cristaflex por un tiempo no mayor a 20 días.

CALDO ARVEJA – SACAROSA

Composición

- 1 Litro de agua destilada
- 30 gramos de sacarosa
- 40 gramos de arveja seca ó
- 60 gramos de arveja fresca

Preparación: se deja hervir las arvejas en un litro de agua destilada durante 20 minutos; se filtra a través de gasa y en el líquido recibido se disuelve la sacarosa, se homogeniza la solución y se envasa en botellas de vidrio de 250 ml. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 atmósferas de presión. Se guardan en nevera por un tiempo no mayor a 15 días.

AGAR V8

Composición

- 850 ml de agua destilada
- 150 ml de Jugo V8*
- 1.50 gramos de Carbonato de Calcio
- 20 gramos de agar bacteriológico

Preparación: se diluye el Carbonato de Calcio en 100 o 250 ml del agua destilada que se utilizará para preparar el medio, con ayuda de una plancha de agitación durante 15 minutos, se agrega el jugo V8 y se completa con el resto de agua destilada requerida; se disuelve el agar y se hierve la solución para permitir una mejor disolución. Se esteriliza en autoclave, se deja enfriar (soportable al contacto con la mejilla, aproximadamente 50° C) y se sirve en cajas petri estériles. Se guardan en nevera envueltas en cristaflex por un tiempo no mayor a 20 días.

JUGO V8: producto importado por *fedco S.A.* Jugo vegetal utilizado básicamente en la alimentación de deportistas. *Ingredientes:* jugo de tomate, jugo de vegetales (zanahoria, apio, espinaca, perejil), agua, vitamina C. Después de abrir la lata se debe envasar el contenido en una botella de vidrio, tapar herméticamente y guardar en congelación.

AGAR PEPTONA GLUCOSA

Composición

Agua destilada 1 Litro
Peptona 6 gramos
Glucosa 10 gramos
Agar 20 gramos

Preparación: se disuelven en un litro de agua destilada el agar, la peptona y la glucosa; se hierve la solución y se esteriliza en autoclave. Para acidificar se agrega H₂SO₄ (0.5 N), 1 ml por cada 100 ml de medio, después de la esterilización y cuando la temperatura es aproximadamente de 50° C. Se sirve en cajas petri estériles, se recubren con papel cristaflex y se guardan en refrigeración por un periodo no mayor a 20 días.

Anexo B Composición de Antibióticos.

DMSO (Dimetil Sulfoxido) 100 ml.

4 pastillas de Ampicilina 500 mg
1 pastilla de Micostatina 500.000 u
1 gramo de benlate

Preparación: en 100 ml de agua destilada se disuelve la Ampicilina, Micostatina y benlate. Y de esta solución se adiciona 10 ml a un litro de medio.

Rifampicina 100 ml
1 pastilla de rifampicina 500 mg

Preparación. Se disuelve una pastilla de rifampicina en 40 ml de alcohol al 70%. Y de esta solución se adiciona 8 ml a un litro de medio.

Anexo C Técnica de desinfección



La desinfección se realiza con jabón antibacterial, alcohol al 70%, NaCl al 0.5% y varios enjuagues con agua destilada estéril, de la siguiente manera:

- Tres puff de protex liquido en 200ml de agua destilada estéril por un minuto.
- Enjuague con agua destilada estéril. 1 minuto.
- Etanol 70% por 10 segundos.

- Enjuague con agua destilada estéril por 1 minuto.
- NaCl al 0.5 % por 1 minuto.
- Enjuague con agua destilada estéril por 1 minuto.
- Enjuague con agua destilada estéril más 500 microlitros de antibiótico MIX por 30 segundos.
- Enjuague con agua destilada estéril por 1 minuto

Anexo D. Técnica del microcultivo

Materiales y reactivos

- Agua destilada estéril
- Asa de punta
- Azul de Lactofenol
- Caja petri con medio de cultivo (PDA)
- Cajas de petri estériles
- Cubreobjetos
- Pinzas metálicas
- Portaobjetos
- Tubo de ensayo estéril
- Varillas de vidrio en forma de V

Procedimiento: en un área correctamente limpia y cerca de un mechero tome el tubo de ensayo estéril e imprímalo sobre el agar. Tome el círculo de agar y colóquelo encima de la lámina portaobjetos, tome la colonia del hongo y siembre a los lados del mismo, coloque el cubreobjetos en alcohol y flameé al mechero, espere que se enfríe. Una vez frío el cubreobjetos colóquelo sobre el disco de agar y agregue agua destilada sin inundar la caja. Incubar a temperatura ambiente de 3 – 4 días. Después de la incubación, levante el cubreobjetos, colóquelo sobre el portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y observe al microscopio en 40X.

Anexo E. Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Sobre *Phytophthora infestans* St. 151

αισλα μιεντο	Χμ δε Ινωασιον μιχελιαλ διαρια											Χτε χρεχι μιεντο€	ξελοχιδ αδ προ μεδιο
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
T4	1,1	1,35	1,55	2,15	2,35	3,02	3,26	3,88	4,22	5,08	5,3	0,4391	0,38
T5	1,1	1,4	1,65	2,06	2,23	2,56	2,73	3,38	3,55	3,92	4,28	0,3165	0,29
T6	1,1	1,5	1,9	2,46	2,83	3,01	3,63	4,18	4,23	4,58	5,42	0,4105	0,39
T7	1,1	1,83	2,13	2,8	3,4	3,95	4,36	5,13	5,26	5,65	5,86	0,4917	0,43
T8	1,1	1,72	2	3,03	3,36	3,85	4,43	4,9	5,26	5,63	6,13	0,5035	0,45
T9	1,1	1,96	2,15	2,83	3,66	4,38	5,23	5,75	6,52	6,58	8,5	0,6909	0,67
T10	1,1	1,83	2,08	2,78	3,15	3,58	3,95	4,43	4,8	5,7	5,3	0,4467	0,38
T11	1,1	1,93	2,38	3,1	3,65	4,45	5,08	5,8	6,16	6,8	8,06	0,6586	0,63
T12	1,1	1,9	2,28	3,16	3,36	4,78	5,8	6,35	6,85	7,22	8,9	0,7528	0,7
T13	1,1	1,93	2,36	3,15	3,83	4,36	5,13	5,63	6	6,5	7,2	0,5996	0,55

Anexo F Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Sobre *Phytophthora infestans* Sb. 121

Αισλαμ ιεντο €	Χμ δε Ινωασιον μιχελιαλ διαρια								Χτε χρεχιμιε ντο€	€ξελο χιδαδ προμε διο
	1	2	3	4	5	6	7	8		
T4	1,1	2,68	3,22	3,67	4,16	4,56	4,86	5,2	0,51	0,52
T5	1,6 1	2,25	2,93	3,78	4,3	4,65	5,15	5,56	0,49	0,56
T6	1,3 8	2,05	2,63	3,46	3,75	4,13	4,83	5,36	0,5	0,55
T7	1,8	2,52	3,28	3,92	4,56	4,98	5,35	5,73	0,49	0,56
T8	1,5 5	2,43	3,03	4	4,9	5,2	5,55	5,96	0,55	0,64
T9	2,2 3	3,38	4,95	6,15	7,13	7,86	8,5	8,93	0,83	0,97
T10	1,6	2,43	2,9	3,66	3,9	4,28	4,51	5,56	0,49	0,5
T11	1,8 7	2,73	3,72	4,96	5,5	5,96	6,55	7,33	0,69	0,77
T12	1,9	2,93	4,26	6,12	6,93	7,5	8,13	8,66	0,85	0,99

T13	1,1	2,55	3,53	4,4	5,23	5,83	6,66	7,3	0,78	0,85
-----	-----	------	------	-----	------	------	------	-----	------	------

Anexo G Constantes cinéticas de crecimiento micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% *P. infestans* Sb121

Φυεντε	Γραδος δε λιβε ταδ	Συμα δε χυαδρα δος	χυαδραδ ο προμε διο	Φ Ρατ ιο	Π- παλ υε
Μοδελ	9	1.0082	0.112022	24.57	0.000
Ερρορ	20	0.0911675	0.004558		
Χορρεχτ εδ τοταλ	29	1.09936	37		

Anexo H Constantes cinéticas de invasión micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% *P. infestans* Sb151

Φυεντε	Γραδος δε λιβε ρταδ	Συμα δε χυαδρ αδος	χυαδραδ ο προμεδ ιο	Φ- Ρα τιο	Π- ζαλυε
Μοδελ	9	0.246725	0.027413 9	9.21	0.000
Ερρορ	20	0.0595409	0.002977		
Χορρεχτε δ τοταλ	29	0.306266	05		