

**ANTAGONISMO *in vitro* DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma spp.* SOBRE EL
PATOGENO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary CAUSANTE DEL TIZON
TARDIO EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.)**

RUBIO NELSON ORDOÑEZ BOLAÑOS

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

**ANTAGONISMO *in vitro* DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma spp.* SOBRE EL
PATOGENO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary CAUSANTE DEL TIZON
TARDIO EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.)**

RUBIO NELSON ORDÓÑEZ BOLAÑOS

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo
con énfasis en Microbiología**

**Director:
GUIDO ERNESTO VILLOTA CALVACHI
BIÓLOGO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

“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 Aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2005

AGRADECIMIENTOS

Sentimiento de **Gratitud** y **Afecto** hacia aquellas personas que me acompañaron en los diferentes momentos de mi carrera:

Guido Ernesto Villota Calvachi, Biólogo con énfasis en Microbiología Industrial. Laboratorista Universidad de Nariño y Director del trabajo de grado.

Luís Fernando Campuzano Duque, Ingeniero Agrónomo Ph.D., Director del Centro de Investigación Obonuco de CORPOICA Pasto.

Luz Estela Lagos Mora, M.Sc. Directora Programa de Biología. Universidad de Nariño.

Luís Alfredo Molina Valero, I.A., M.Sc. Profesor Titular Fitopatología. FACIA. Universidad de Nariño.

Jenny Maricel Díaz, Bióloga con énfasis en Microbiología. Estudiante de Medicina Veterinaria. Universidad de Nariño.

A la memoria de María Fernanda Arteaga Ortega, Bacterióloga del Colegio Mayor de Bogotá, D.C. Profesora área de Micología. Programa de Biología. Universidad de Nariño.

Cristina Ordóñez Bolaños, Estudiante de Física. Monitora sección Servicios Generales. Universidad de Nariño.

Martha Sofía González, M.Sc. Sistemática Vegetal. Universidad de Nariño.

María Elena Solarte, M.Sc. Jefe Sección de Laboratorios. Universidad de Nariño.

Oscar Alberto Burbano Figueroa, Biólogo con énfasis en Microbiología. Profesor Programa de Biología. Universidad de Nariño.

Susana Calpa Enríquez, Licenciada en Química. Especialista en Docencia Universitaria y Orientación Educativa. Laboratorista sección Química. Universidad de Nariño.

Walter Vallejo, Licenciado en Ciencias Sociales y Especialista en Ecología. Laboratorista de la Universidad de Nariño.

Álvaro Pazos Moncayo, M.Sc. Microbiología, Profesor Titular Programa de Biología. Universidad de Nariño.

DEDICATORIA

La investigación se asemeja a los largos meses de gestación, y la solución del problema al día del nacimiento. Investigar un problema es resolverlo.

Mao Tse-Tung

Este peldaño intelectual sólida base para mi trasegar hacia la cima del saber, es la conjugación de:

El apoyo afectivo, perenne e incondicional de mi madre.
Los sabios consejos de mi padre, quien con sus palabras llenas de rigidez pero matizadas de una inmensa ternura, siguió uno a uno mis pasos hasta el final.

El empuje y la alegría irradiante de mi preciosa hermana.

La lucha incesante por verme convertido en todo un profesional de mi abuelo
(Q.E.P.D.).

El toque mágico y sus palabras de aliento en los momentos críticos por culminar mi carrera de mi hada madrina, Reinita.

El dulce calor de hogar y la confianza de mi familia adoptiva, Hernández
Gómez.

La fuente de inspiración, admiración y respeto de mi único y gran amor,
Shakira.

A todas aquellas personas para quienes estudiar, aprender y ser mejores cada día es satisfacción de toda su vida.

Mil gracias

Rubio Nelson

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. OBJETIVOS	24
1.1 OBJETIVO GENERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
2. MARCO TEÓRICO	25
2.1 IMPORTANCIA DE <i>Phytophthora infestans</i>	25
2.2 POSICIÓN TAXONÓMICA DE <i>Phytophthora infestans</i>	26
2.3 MORFOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Phytophthora</i>	28
2.4 BIOLOGÍA DE <i>Phytophthora infestans</i>	29
2.4.1 Reproducción asexual	29
2.4.2 Reproducción sexual	30
2.5 SINTOMATOLOGÍA Y DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD	31
2.6 CONTROL DE LA GOTA O TIZÓN TARDÍO (<i>Phytophthora infestans</i>)	32
2.6.1 Control químico.	32
2.6.2 Control Biológico.	34
2.7 ANTAGONISMO MICROBIANO	35
2.8 ASPECTOS GENERALES SOBRE <i>Trichoderma</i> spp.	36
2.8.1 Biología de <i>Trichoderma</i> spp.	37
2.8.2 <i>Trichoderma</i> como biocontrolador.	38

2.8.3 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	39
3. MATERIALES Y METODOS	41
3.1 ACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Phytophthora infestans</i>	41
3.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE <i>Trichoderma</i> spp.	41
3.3 CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> spp.	42
3.4 EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL ANTAGONISMO <i>in Vitro</i>	43
3.4.1 Siembras opuestas de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Phytophthora infestans</i> .	43
3.4.2 Prueba de antibiosis.	44
3.5 DISEÑO ESTADÍSTICO	45
4. RESULTADOS Y DISCUSION	47
4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Phytophthora infestans</i>	79
4.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> spp.	48
4.3 ANTAGONISMO <i>in Vitro</i>	54
4.3.1 Siembras opuestas.	54
4.3.2 Prueba de antibiosis.	66
5. CONCLUSIONES	72
6. RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFIA	74
ANEXOS	79

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Características morfológicas de los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> 02 y 63.	47
Cuadro 2. Características morfológicas de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	49

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Fungicidas más utilizados en el manejo químico de la gota en papa.	32
Tabla 2. Algunos fitopatógenos controlados por <i>Trichoderma</i> spp.	38
Tabla 3. Datos de los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> 02 y 63 procedentes de variedades de papa cultivadas en el Departamento de Nariño.	41
Tabla 4. Datos de los lugares de recolección de las muestras de suelo.	42
Tabla 5. Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 02.	55
Tabla 6. Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 63.	56
Tabla 7. Promedios para las velocidades de invasión micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% Pi02	60
Tabla 8. Análisis de varianza para las velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi02	60
Tabla 9. Test de rangos múltiples para velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi02	61
Tabla 10. Promedios para las velocidades de invasión micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% Pi63	63
Tabla 11. Análisis de varianza para las velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi63	63
Tabla 12. Test de rangos múltiples para velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi63	64
Tabla 13. Frecuencias y porcentajes de inhibición observados en los diez tratamientos con antibióticos producidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre Pi02	66
Tabla 14. Test de Chi – cuadrado para Pi02.	66
Tabla 15. Frecuencias y porcentajes de inhibición observados en los diez tratamientos con antibióticos producidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre Pi63	68
Tabla 16. Test de Chi – cuadrado para Pi63	68

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Proceso de filtración de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	45
Figura 2. Representación esquemática de la metodología utilizada en esta investigación.	46
Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento Pi02 correspondiente a <i>Phytophthora infestans</i> . Microfotografía 20X.	47
Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento Pi63 correspondiente a <i>Phytophthora infestans</i> . Microfotografía 20X.	48
Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T1B. Microfotografía 20X.	50
Figura 6. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T2B. Microfotografía 20X.	50
Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T3B. Microfotografía 20X.	51
Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T4J. Microfotografía 20X.	51
Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T5J. Microfotografía 20X.	52
Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T6J. Microfotografía 20X.	52
Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T7PVG. Microfotografía 20X.	53
Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T8PVG. Microfotografía 20X.	53
Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T9SC. Microfotografía 20X.	54
Figura 14. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T10PaVG. Microfotografía 20X.	54
Figura 15. Antagonismo <i>in vitro</i> de los aislados de <i>P. infestans</i> 02 (izq.) y 63 (der.) frente a T3B y T4J, respectivamente.	57
Figura 16. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 02.	58
Figura 17. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 63	59
Figura 18. Promedios para las velocidades de invasión micelial para cada uno de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 02 con intervalos de confianza del 95%	62

Figura 19. Promedios para las velocidades de invasión micelial para cada uno de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 63 con intervalos de confianza del 95%	65
Figura 20. Distribución frecuencial de la inhibición observada para cada uno de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 02.	67
Figura 21. Distribución frecuencial de la inhibición observada para cada uno de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 63.	69
Figura 22. Efecto inhibitorio de los antibióticos extraídos de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Phytophthora infestans</i> 02 (izq.) y 63 (der.).	70

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Composición medios de cultivo	80
Anexo B. Técnica del microcultivo	82
Anexo C. Concentraciones de hipoclorito de sodio utilizadas en laboratorio	83
Anexo D. Concentración del fungicida fosetil – aluminio utilizado como control positivo en la prueba de antibiosis	84
Anexo E. Invasión micelial en cm/día pi63	86
Anexo F. Invasión micelial en cm/día pi02	87
Anexo G. <i>Prueba de Antibiosis entre Phytophthora infestans 63 - 02 y los diez aislamientos de Trichoderma spp.</i>	88
Anexo H. Test de rangos múltiples para las velocidades de invasión micelial por tratamiento pi63	89
Anexo I. Test de rangos múltiples para las velocidades de invasión micelial por tratamiento pi02	90
Anexo J. Ecuaciones lineales para las curvas de invasión micelial	91

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.

BIOMASA: masa celular producida durante la fermentación o peso total de la materia viva de una población.

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.

DIPLOIDE: un núcleo, célula u organismo que contiene $2n$ cromosomas (es decir, el doble del número haploide), que se aparean normalmente. Todos los cromosomas, excepto los sexuales, se hallan en pares homólogos, estructural y genéticamente similares, respecto al número y posición de los loci génicos. La mayoría de los animales son diploides, como lo son las generaciones esporofitas de las plantas que presentan alternancia de generaciones.

DIVERTÍCULO: tubo ciego que se ramifica a partir de un canal o una cavidad.

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

ESTEROL: alcohol esteroide. Ejemplos de esteroides son el colesterol y el ergosterol.

ESTOMA: pequeño poro presente en la epidermis de las partes aéreas de las plantas y a través del cual tiene lugar el intercambio de gases.

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

FUNGICIDA: agente químico o biológico que mata hongos.

FUNGISTASIS: es la supresión causada por el suelo a las esporas de los hongos debido a la presencia de metabolitos y enzimas producidas por la microbiota propia del suelo, por la descomposición de materia orgánica o por la falta de nutrientes. Las esporas solo germinan cuando el suelo se vuelve conductivo o sea que las condiciones son óptimas para ellas.

GAMETANGIO: estructura hallada en organismos vegetales que produce y alberga los gametos (por ejemplo, un anteridio, arquegonio u oogonio).

HAPLOIDE: dicese de un núcleo, célula u organismo que posee un único grupo de cromosomas desapareados, en número llamado haploide (n). Los gametos son haploides.

HETEROCARIOSIS: fenómeno en el que las células de un organismo poseen diversos núcleos de distinta dotación genética. Este fenómeno tiene lugar en algunos hongos y puede ser requisito para la reproducción sexual.

HIBRIDACIÓN: proceso por el cual una hebra del ácido nucleico se une con otra hebra complementaria mediante el apareamiento de bases. Cruce de dos animales, plantas u hongos de distinto origen o composición genética para obtener híbridos.

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.

LENTICELA: región de células dispuestas laxamente que se halla en la capa externa de la cubierta de las raíces y tallos (peridermo) de las plantas leñosas. Las células realizan el intercambio de gases.

LISINA: uno de los veinte aminoácidos comunes que se encuentran en las proteínas. Es un aminoácido esencial para el hombre. La lisina se produce por fermentación utilizando generalmente melazas como sustrato. Sus símbolos: Lys y K.

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 hifa

MICOLOGÍA: ciencia que se encarga del estudio de los hongos.

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

MUTACIÓN: cambio en la estructura del DNA o en el número de genes o cromosomas de una célula que da lugar a la expresión de una característica anormal. Las mutaciones se producen espontáneamente o por mutágenos químicos o radiaciones ionizantes. Las mutaciones ocurren tanto en los gametos como en las células somáticas. Las mutaciones en las células somáticas no se heredan.

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.

PESTICIDA: compuesto químico o agente biológico utilizado en el control de plagas y enfermedades.

Phytophthora infestans: microorganismo causante del tizón tardío o “gota” en la papa.

PLAGA: organismo inductor de enfermedad. A menudo, este término se aplica a un organismo que causa enfermedades o ataca cultivos agrícolas.

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

La enfermedad de la papa conocida comúnmente como tizón tardío y producida por el patógeno *Phytophthora infestans*, se ha incrementado significativamente en los últimos años ocasionando serias dificultades entre los agricultores de la región, especialmente minifundistas. Una vez constatado que en la región, el manejo de esta patología se realiza fundamentalmente a través de la aplicación de productos químicos, lo cual como es obvio, de un lado, incrementa la resistencia del patógeno y de otro, ocasiona efectos colaterales en el ecosistema y en la calidad de vida, pues afecta aspectos económicos (pérdidas, gastos en insumos, incumplimiento en el abastecimiento, etc.) e inherentes a la salud por consumo indirecto y/o contacto directo con los fungicidas.

Se evaluó la efectividad antagónica *in vitro* de aislados de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Se realizaron una serie de cultivos, utilizando la técnica de siembras opuestas (patógeno – antagónico), mediante el empleo de diez aislamientos de *Trichoderma* spp. procedentes de suelo de bosque, jardín, pradera, pajonal y de siembras caseras, frente a dos aislados de *Phytophthora infestans* (N00299 y N06399), provenientes de dos variedades cultivadas en el departamento de Nariño (parda pastusa y sabanera). Adicionalmente, se valoró la capacidad inhibitoria de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de *Trichoderma* spp. Para evaluar el ensayo, se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con tres repeticiones.

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. Permitió además discriminar a los aislamientos de *Trichoderma* spp. en cuatro grupos de acuerdo a su capacidad invasora, destacándose el aislado T5J como el grupo menos promisorio en ambos casos, tanto para Pi02 como Pi63. El análisis de frecuencias, mediante un test de Chi – cuadrado, estableció que el valor observado para cada antibiótico puede o no tener ninguna relación con su capacidad inhibitoria. Dichos valores, positivos o negativos, se presentaron aleatoriamente, lo que implicó que ninguno de los tratamientos fue totalmente positivo o negativo.

ABSTRACT

The retarded stain (*Phytophthora infestans*), a potato disease (*Solanum tuberosum* L.) which has increased in a meaningful way in last years, has arisen from serious difficulties among region farmers, especially those who are small farmsteaders. When it was possible to demonstrate the management of this pathology treated through the use of chemical products, increased the pathogen resistance on the one part, and on the other one, it causes secondary effects on the environment and on quality of life, because it affects economical aspects (losses, expenses, unfulfillment in the supply, and so forth) and those aspects which are together to health due to indirect consumption and/or direct contact with fungicides.

It was tested the antagonistic effectiveness *in vitro* from *Trichoderma* spp. isolations on *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. A series of cultivations were done, by using the technique of opposite sowings (pathogen – antagonist), through the use of ten isolations of *Trichoderma* spp. coming from forest, garden, meadowland, gleanings and home sowings, in front of two isolations of *Phytophthora infestans* (N00299 and N06399), coming from two cultivated varieties in the Department of Nariño (parda pastusa and sabanera). Additionally, the inhibitory capacity of antibiotic extracted from ten isolations of *Trichoderma* spp. A completely at random design with three repetitions was used.

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 to both treatments. It allowed to discriminate the isolations of *Trichoderma* spp. in four groups in agreement to its invasive capacity. The T5J was the most important with the least promissory group in both cases, not only to Pi02 but also to Pi63. The analysis of frequencies, through a squared Chi's test, established that the value seen to each antibiotic can have or not any relation with its inhibitory capacity. Those values, positive or negative, were showed in an aleatory way which implied all treatments were not completely positive or negative.

INTRODUCCIÓN

Ortiz *et al.*, reporta que:

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los alimentos más importantes en el mundo constituyéndose en producto básico de consumo doméstico en los países productores. En Colombia, es el principal cultivo de clima frío, ubicado en la región Andina entre los 2.000 y 3.200 metros de altitud, la cual corresponde a los altiplanos fríos y a los páramos, localizados principalmente, en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia¹.

Pineda afirma que:

Actualmente se siembran en el país 180.000 hectáreas, con una producción de más de 3 millones de toneladas por año. Los costos de producción por hectárea, superan los 5 millones de pesos y de éstos el 23% corresponde a gastos de fertilizantes y el 17% a costos de protección sanitaria del cultivo (Benavides, 2000). En el sur de Colombia se cultivan alrededor de 30.000 hectáreas por año, principalmente en los municipios de Guachucal, Potosí, Túquerres, Cumbal, Ipiales, Pupiales y Pasto; con un aporte en el PIB agrícola en Nariño del 5%²

Valbuena *et al.*, afirma que: ‘Este tubérculo cobra cada día mayor significancia dentro de los productos alimenticios, ocupando un privilegiado cuarto lugar, después de los cereales maíz, arroz y trigo’³ Piña *et al.*, sostiene que: ‘Sin embargo, este cultivo se ve sometido a una fuerte presión por plagas y enfermedades, siendo la “gota” o tizón tardío la enfermedad más limitante y de mayor importancia económica, causada por el fitopatógeno *Phytophthora infestans*’⁴

¹ ORTIZ, Luz Yineth; *et al.* Determinación del ácido abscísico en papa (*Solanum* sp.) como respuesta a bajas temperaturas. En: Agronomía Colombiana. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá : Vol. 18 No. 1-3. (Dic., 2001); p. 31

² PINEDA, R. 2000. Ministerio de Agricultura. CEVIPAPA. Plan Nacional de Semilla. En: Papas colombianas. Vol. 3 No. 1-2. (2000); p. 53-55.

³ VALBUENA, R y SÁNCHEZ DE LUQUE, C. Técnicas de termoterapia y cultivo *in vitro* para la obtención de material de papa (*Solanum spp.*) libre de virus. Tunja : INIAC. UPTC, 1986. p. 109-121.

⁴ PIÑA, R.N. y SANABRIA, J.N. Fitopatología En : CONGRESO NACIONAL DE FITOPATOLOGIA. (29° : 1998 : Bogotá). Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Bogotá : s.n., 1998. p. 50.

Según Erwin y Ribeiro:

El ataque por este patógeno es severo, ya que por muchos años ha causado pérdidas considerables en todas las áreas donde se cultiva este tubérculo y aún en la actualidad representa una amenaza por la aparición de nuevas epidemias y hambrunas, debido a la habilidad del patógeno para producir diferentes formas de inóculo, alta capacidad de penetrar e infectar al hospedante, su tendencia a sobrevivir en el suelo y en algunas especies, su amplio rango de hospedantes⁵

Benavides reporta que:

Un gran componente para incrementar rendimientos y calidad del cultivo de papa, es el manejo adecuado del tizón tardío, que se realiza fundamentalmente a través de la aplicación de productos químicos, lo cual asegura una buena producción, pero incrementa la resistencia del patógeno, se aumentan los costos, se pierde competitividad en el mercado y se incrementa el nivel de contaminación ambiental⁶

Villegas, afirma que: “Además se suman a estos los posibles efectos colaterales como el desequilibrio de la fauna benéfica natural, intoxicaciones de los operarios y presencia de residuos tóxicos en el producto cosechado”⁷

Hartly reporta que:

Ante esta problemática, se considera necesario evaluar otras alternativas de manejo económicas y menos contaminantes como el control integrado, incluyendo la utilización de microorganismos que son antagonistas de los agentes infecciosos y que desplazan a éstos de una manera natural. Dichos agentes biocontroladores presentan ventajas como su gran capacidad de reproducción y establecimiento por sí mismos en el ecosistema del suelo, como no ocurre cuando se aplican productos químicos⁸

Hartly⁹ La introducción de antagonistas a los patógenos de plantas se conoce desde la década de 1920, siendo las especies del género *Trichoderma* las más utilizadas, debido a su ubicuidad, facilidad para ser aisladas, crecimiento rápido en un gran número de sustratos, control de un amplio rango de patógenos, alta competencia por alimento, espacio y a que no

⁵ ERWIN, D.C. and RIBEIRO, O.K. Diseases worldwide. Paul. Minnesota : APS Press. The American Phythopatological Society. St., 1996. p. 1-6

⁶ BENAVIDES ROSERO, Miguel. Protección sanitaria del cultivo de la papa para programas de manejo integrado de plagas. En: Papas colombianas. FEDEPAPA. Vol. 3 No. 1. (2000); p. 62-63.

⁷ VILLEGAS JARAMILLO, Sonia. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín, 2003, p. 137. Monografía (Título obtenido). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

⁸ HARTLY, C. Damping – off in forest nurseries. United States : Departament of Agriculture. Bull, 1989. p. 1-99

⁹ Ibid., p. 1-99

atacan a las angiospermas Rey *et al.*, afirma que: “A ello se adiciona su efecto parasitario de estructuras fungosas diferentes y la producción de sustancias antibióticas que afectan el crecimiento o son líticas para muchos patógenos”¹⁰.

Wells *et al.*, afirma que: “La acción de *Trichoderma* como micoparásito natural fue demostrada por primera vez por Weindling en 1932 y su utilización en experimentos de biocontrol solo se registra hasta la década de 1970”¹¹. Zavaleta sostiene que: “El objetivo principal no es el de eliminar al patógeno responsable de la enfermedad sino más bien, a pesar de su presencia, se logre obtener rendimientos económicamente rentables para el agricultor, y segundo, entender más acerca de la naturaleza de la enfermedad y la fisiología de la planta”¹²

Dentro del contexto de una agricultura ecológica y del manejo integrado de plagas, este trabajo se propuso como objetivo: “Evaluar el efecto antagónico *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. procedentes de suelo sobre *Phytophthora infestans*”. La evaluación se llevo a cabo mediante la selección de aislados con capacidad parasítica y antibiótica, encaminada a entender la biología y el control del patógeno.

¹⁰ REY, Manuel; *et al.* Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. En: Revista Iberoamericana de Micología. No. 17. (2000); p. 31-36.

¹¹ WELLS, H.D.; BELL, D.K. and JAORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent for *Sclerotium rolfsii*. In: Phytopathology. (1972); p. 442-447.

¹² ZAVALETA MEJÍA, E. Control biológico de fitopatógenos. En : CURSO DE CONTROL BIOLÓGICO. (5° : 1994 : México). Memorias del V curso de control biológico. México : Sociedad mexicana de control biológico. p. 115-125.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antagónico de aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre el patógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary causante del “tizón tardío” en papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de laboratorio.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ? Activar los aislamientos N00299 y N06399 de *Phytophthora infestans* preservados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño para su posterior aplicación.
- ? Obtener aislamientos de *Trichoderma spp.* a partir de muestras de suelo.
- ? Seleccionar aislamientos de *Trichoderma spp.* con capacidad parasítica *in vitro* sobre *Phytophthora infestans*.
- ? Valorar la capacidad inhibitoria de los antibióticos extraídos de los aislados de *Trichoderma spp.* sobre *Phytophthora infestans*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 IMPORTANCIA DE *Phytophthora infestans*

La “gota” de la papa, causada por *Phytophthora infestans*, es el factor más limitante de la producción en casi todos los países cultivadores de este tubérculo. Castaño sostiene que: “Alrededor de 1820, este patógeno fue introducido a Europa, proveniente de América, para 1845 se constituyó como la principal enfermedad del cultivo de la papa, luego de causar la destrucción de extensos campos irlandeses cultivados con el tubérculo; ocasionando la conocida “hambruna de Irlanda””¹³ .

Según Agrios:

Phytophthora infestans muestra también una gran virulencia en otras 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. También 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, cuando las condiciones climáticas son favorables y no se aplica ningún método de control¹⁴

Castaño afirma que: “Actualmente la “gota” es la enfermedad más devastadora de la papa, por lo tanto, los cultivos de papa deben ser asperjados periódicamente con fungicidas para protegerlos del patógeno, el costo de dicho control se ha calculado en 1.8 billones de dólares en el mundo”¹⁵. Benavides y Moncayo aseguran que: “En Nariño el control de esta enfermedad genera costos semestrales superiores a los cuatrocientos mil pesos (\$400.000.00) por hectárea”¹⁶

¹³ CASTAÑO, Jairo. 1996. Resúmenes. Manejo del tizón tardío de la papa: Estado actual. en: Papas Colombianas. Colombia : s.n. p. 253-263

¹⁴ AGRIOS, G.N. Fitopatología. 2 e.d. México Limusa, 1985. p. 303-323

¹⁵ CASTAÑO, Op.cit., p. 253-263

¹⁶ BENAVIDES, Dexy y MONCAYO, Blanca. Caracterización aloenzimática de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Departamento de Nariño. San Juan de Pasto, 2002, p. 35. Trabajo de grado. (Biólogas). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de Biología.

2.2 POSICIÓN TAXONÓMICA DE *Phytophthora infestans*

Brassier, afirma que. "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"¹⁷

En los textos preparados por Raven, Evert y Eichhorn, ubican a *Phytophthora infestans* dentro de la siguiente clasificación:

REINO:	Cromista (grupo Stramenophyle)
PHYLUM:	Oomycota
CLASE:	Oomycetes
SUBCLASE:	Peronosporomycetidae
ORDEN:	Pythiales
FAMILIA:	Pythiaceae
GÉNERO:	<i>Phytophthora</i>
ESPECIE:	<i>Phytophthora infestans</i> ¹⁸

Villegas argumenta que: "El Phylum Oomycota, perteneciente al reino Cromista, comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas y los gametos masculinos, con paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa y tiene hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia del agua"¹⁹.

Raven, Evert y Eichhorn ²⁰Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos, Kamoun²¹ lo que fue confirmado por filogenias moleculares, basadas en las secuencias de RNA ribosomal, datos de los aminoácidos compilados para las proteínas de la mitocondria y cuatro proteínas que codifican para los genes cromosómicos, evidenciando que los Oomycetes adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos.

¹⁷ BRASSIER, C.M. Evolucionary Biology of *Phytophthora*. USA: Annual Rev. Phytopathology, 1992 p. 30

¹⁸ RAVEN, P.H., EVERT., R.F., and EICHHORM, S.E. 1999. Biology of Plants. Six edition. New York. W.H. Freeman and Company. 944. 370 p.

¹⁹ VILLEGAS JARAMILLO, Op.cit., p. 87

²⁰ RAVEN, EVERT y EICHORM, Op.cit., p. 30

²¹ KAMOUN, S. Basic Biology: Information of mechanisms that make *Phytophthora infestans* a pathogen. In: GILB'02 CONFERENCE Late blight: managing the global threat. Abstracts. 11-13 July. Germany. : s.n., 2002. 9 44.

Según Villegas:

Los Oomycetes, están relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios, por lo tanto sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide. Son conocidos como organismos “heterocontes”, lo que significa que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente. Los flagelos se presentan en pares, un flagelo largo y adornado con nastigonemas (pelos) distintivos (plumosos) y un flagelo más corto, delgado, cilíndrico y en forma de látigo o flecha²²

Griffith *et al.*, afirma que: “Las características que diferencian el género *Phytophthora* de los hongos se basan en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales contienen microfibrillas de celulosa con una matriz amorfa de B-1,3 glucano en vez de quitina, carencia de hipoxidación del esqualene a esteroides y diferencias en las vías metabólicas, como resultado de un sistema genético único”²³

Según Villegas:

La mayoría de las especies de Oomycetes se reproducen sexual y asexualmente: la reproducción asexual, es por medio de las zoosporas móviles cuyos flagelos son característicos y distintivos de las especies. La reproducción sexual es oogámica. El gameto femenino (oogonio) es relativamente grande, en forma de huevo no flagelado y es fecundado por el gameto masculino (anteridio) que es notablemente más pequeño y flagelado. La fertilización resulta en la formación de un cigoto con paredes gruesas (la Oospora, que le da el nombre al Phylum Oomycota) que puede entrar en estado de reposo y tolerar condiciones de estrés, permaneciendo inactiva o en reposo, cuando las condiciones no son favorables para la germinación.

Las esporas asexuales (zoosporas) son producidas en el esporangio, de manera más precisa el zoosporangio. Los esporangios se desarrollan sobre los esporangióforos, los cuales son similares en diámetro a las hifas. En algunas especies emergen nuevos esporangióforos a través de las bases de esporangióforos viejos, de las cuales se han liberado zoosporas uninucleadas.

Un grupo grande de este Phylum son acuáticos, saprófitos y parásitos, otros son terrestres como los géneros *Phytophthora* y *Pythium* estrechamente relacionados y pertenecientes a la familia *Pythiaceae*, los cuales causan enfermedades en plantas, pero requieren del agua líquida para la movilidad de las zoosporas en el suelo o en el follaje²⁴.

²² VILLEGAS JARAMILLO, Op.cit., p. 45

²³ GRIFFITH, G.W., SNELL, S. and SHAW, D.S. Late blight (*Phytophthora infestans*) on tomato in the tropics. USA : The Mycologist, 1995. p. 87-89

²⁴ VILLEGAS JARAMILLO, Op.cit., p. 137

2.3 MORFOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Phytophthora*

Erwin y Ribeiro *l* afirma que:

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, más aún para los que están relacionados con la taxonomía de este grupo. 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 hifas²⁵.

Abad sostiene que: “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*”²⁶

Waterhouse citado por Erwin y Ribeiro afirma que:

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 micras²⁷

Erwin y Ribeiro, sostienen que: “La zoospora está conformada por varias partes: el kinetosoma (cuerpo basal de la zoospora), la zona de transición que une el flagelo con el kinetosoma y el sistema del microtúbulo, que permite anclar el flagelo a la zoospora. Los

²⁵ ERWIN Y RIBEIRO, Op.cit., p. 1-6

²⁶ ABAD, G.J. *Phytophthora infestans* en la zona central del Perú: Razas, patotipos, especialización fisiológica, tipos de compatibilidad, resistencia de variedades y rangos de hospederos. Lima, Perú, 1983 p. 75. Tesis de grado (M.Sc. Mimeografiada). Universidad Nacional Agraria La Molina. Programa académico de graduados.

²⁷ ERWIN Y RIBEIRO, Op.cit., p. 1-6

anclajes de los flagelos de *Phytophthora infestans*, son significativamente diferentes, pues solo tienen cinco, mientras otras especies tienen seis”²⁸

2.4 BIOLOGÍA DE *Phytophthora infestans*

Villegas afirma que:

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 mundo²⁹

2.4.1 Reproducción asexual. Legard *et al.*, afirma que: “El esporangio (zoosporangio) es la unidad de reproducción asexual, el cual puede ser producido en abundancia en muchas especies huéspedes. Una sola lesión puede producir hasta 300.000 esporangios en una noche”³⁰ Smart *et al.*, reporta que: “Cada esporangio tiene de seis a diez núcleos, se desprenden fácilmente de los esporangióforos cuando maduran y son arrastrados por los vientos que los dispersan y los cambios de humedad relativa que los ayudan a germinar en los tejidos de las plantas huéspedes, mediante la germinación directa a través de un tubo germinativo o indirectamente al producir zoosporas”³¹

Castañó sostiene que:

Bajo condiciones favorables *Phytophthora* infecta el tejido susceptible, los esporangióforos emergen a través de los estomas y liberan numerosos esporangios. Estos pueden germinar directamente en los tejidos, o son diseminados por la lluvia y el viento generando ciclos secundarios de la enfermedad. La mayor esporulación se presenta con humedad relativa del 100% o cercana a ella y a temperaturas alrededor de 16 y 22° C. Los esporangios pierden viabilidad al cabo de 3 a 6 horas, con humedad relativa inferior al 80%³²

²⁸ Ibid., p. 1-6

²⁹ VILLEGAS, Op.cit., p. 137

³⁰ LEGARD, D.E., LEE, T.Y. and FRY, W.E. Phytopathology. USA : s.n. 1995. p. 1356 – 1361.

³¹ SMART, C.D. et. al. Molecular techniques and mystery of the potato late blight pathogen. Plant microbe interactions. Vol. 5. Edited by Gary Stacey and Noel Keen. 336 p. APS (American Phytopathology Society) Press. St. Paul Minnesota. United States of America, 2000 p. 21-41.

³² CASTAÑO, Jairo, Op.cit., p. 253-263

Aunque Andrivon³³ demostró que pueden permanecer viables en el suelo por varios meses dependiendo de las condiciones químicas, físicas y biológicas del suelo.

Castañó afirma que:

La germinación de los esporangios tiene una duración de 0.5 a 2 horas, se produce cuando hay rocío o presencia de agua sobre las hojas del hospedero y dentro de un intervalo de temperatura entre 10 y 15° C. Cuando los esporangios han germinado se requieren dos horas con una temperatura de 15 a 25° C para la penetración de los tubos germinales en los tejidos de la planta. Una vez dentro, el micelio se desarrolla con mayor rapidez a una temperatura entre 17 y 21° C, que también es óptima para que pueda esporular³⁴

2.4.2 Reproducción sexual. Según Smart *et al.*³⁵, la formación de oosporas es uno de los aspectos más relevantes del ciclo de vida de *P. infestans*. Como organismo heterotálico, son necesarios ambos tipos de apareamiento denominados A1 y A2 para la reproducción sexual. Galindo y Gallegly afirman que: “Las esporas se forman a medida que cada tipo de apareamiento responde a la hormona inducida por el tipo de apareamiento contrario, produciendo un oogonio y un anteridio”³⁶

Drenth *et al.* afirman que: “La meiosis ocurre inmediatamente antes del desarrollo de los gametangios, representando el único estado haploide del ciclo de vida de este organismo. La cariogamia se da entre estos dos núcleos haploides, formando una oospora diploide uninucleada de paredes gruesas, que puede servir además, como una estructura de supervivencia para el invierno en las zonas templadas”³⁷.

Henflig reporta que:

Las oosporas se forman cuando los micelios con distinto tipo de apareamiento A1 y A2, crecen juntos y uno de ellos puede formar células masculinas (anteridio) y el otro células femeninas (oogonio). El oogonio crece a través del anteridio permitiendo la fertilización. El oogonio fertilizado se convierte en una espora de descanso, que le permite resistir condiciones desfavorables como sequía, bajas temperaturas, ausencia de huéspedes. Las oosporas forman un tubo germinativo sobre el cual se forma un zoosporangio similar a los

³³ ANDRIVON, D. Biology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. Mini Rev. s.I. : sn. 1995. p. 85

³⁴ CASTAÑO, Op.cit., p. 253-263

³⁵ SMART et al, Op.cit., p.21-41

³⁶ GALINDO, J. and GALLEGLY, M.E. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. Phytopathology s.I. : s.n., 1960. p. 50

³⁷ DRENT, A., JANSSEN, E.M. and GOVERS, F. Formation and survival of spores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. USA : Plant Pathol, 1995. p. 44

de la reproducción asexual, el cual germina y las zoosporas resultantes pueden iniciar un nuevo ciclo de vida³⁸

2.5 SINTOMATOLOGÍA Y DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Gonstincan argumenta que:

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 hospedero 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 hospedero. Al principio en la fase de incubación no se aprecian afecciones externas, pero a medida que esta avanza, aparecen³⁹

Según Agrios:

El tipo de lesión en hojas varía con la temperatura, humedad, intensidad lumínica y variedad del hospedero. 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 púrpuro, que pueden causar la muerte de los folíolos y avanzar por los peciolo 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 hospedero. El micelio del patógeno se desarrolla con mayor rapidez dentro de un intervalo de temperatura de 17 a 21° C, el cual es también óptimo para que éste pueda esporular. Las temperaturas mayores de 30° C inhiben el desarrollo de *Phytophthora infestans* en el campo pero no lo destruyen, de ahí que puede esporular de nuevo cuando la temperatura y humedad sean favorables⁴⁰

³⁸ HENFLING, J.W. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. En : Boletín de Información Técnica 4. Lima Perú : Centro Internacional de la Papa (CIP), 1987. p. 25

³⁹ GONSTINCAN, T.J. 1. Biblioteca de la agricultura. 2 ed. España : Idea Bookssa, 1998. p. 45

⁴⁰ AGRIOS, Op.cit., p. 303-323

2.6 CONTROL DE LA GOTA O TIZÓN TARDÍO (*Phytophthora infestans*)

Villegas afirma que:

La forma más adecuada para enfrentar la gota (tizón tardío) de la papa, es mediante la utilización de todas las técnicas que conducen al manejo integrado de la enfermedad, como las medidas de prevención, mediante el cumplimiento de las normas sanitarias para el transporte de material vegetal, erradicación, las cuarentenas cuando se requieran, variedades resistentes, semillas sanas

Es importante que los agricultores protejan bien sus cultivos. Si este no es el caso un sistema de predicción basados en los sistemas de control de la gota, se vuelve riesgoso. Si algún agricultor permite que la gota se desarrolle en el campo, alcanzando niveles altos y liberación de esporas, se pueden desarrollar epidemias en los cultivos de los agricultores vecinos⁴¹.

2.6.1 Control químico. Según Villegas: “muchas enfermedades de las plantas tanto en el campo como en invernadero y en almacenamiento, solamente se controlan mediante el uso de sustancias químicas naturales o sintéticas. 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.”⁴²

Para el manejo químico del cultivo de papa se utilizan productos de diferente tipo: protectantes, translaminares y sistémicos (Tabla 1).

Tabla 1. Fungicidas más utilizados en el manejo químico de la gota en papa.

PROTECTORES (1)	TRANSLAMINARES (2)	SISTÉMICOS (3)
Vondozeb	Curzate	Ridomil Mz 58
Dithane M45	Fitoraz	Galben M8
Manzate 200	Curathane	Patafol
Antracol		Fosetil de Aluminio
Orthocide		

Fuente: Arango, 1994.

⁴¹ VILLEGAS, Op.cit., p. 137

⁴² Ibid., p. 137

- (1) Protegen por fuera
- (2) Se introducen al interior de la hoja, pero no protegen brotes nuevos.
- (3) Se introducen al interior de la hoja y se mueven protegiendo los brotes nuevos.

Calvo *et al.*, afirman que: ‘Con el propósito de combatir la enfermedad los agricultores realizan varias aspersiones de fungicidas por semana. Generalmente, durante la época lluviosa se realizan 2 ó 3 aplicaciones, tanto de fungicidas protectores como sistémicos’⁴³

Sánchez *et al.*, afirman que: ‘En los últimos años, se ha reducido el uso de fungicidas sistémicos con metalaxil, debido a que, los productores han observado una disminución de su efectividad. Este producto ha sido sustituido por otros ingredientes activos como propamocarb, oxadixil, fentin hidróxido y fosetilaluminio, los cuales se usan en secuencia o en combinación con otros protectores como mancozeb’⁴⁴

Entre los inconvenientes de utilizar productos químicos para el control de fitopatógenos están:

- ? La contaminación del medio ambiente, ya que dejan sustancias químicas residuales que suelen ser tóxicas.
- ? El uso prolongado de productos químicos produce resistencia en las plagas, las cuales son difíciles de eliminar.
- ? Afectan el desarrollo vegetativo de la planta, tanto su crecimiento como en su porte.
- ? Perjudican la salud humana de una forma directa, debido a que las sustancias residuales quedan en los frutos y se transforman en el organismo cuando son ingeridos. También la salud se ve afectada cuando se realizan las curas directas, puesto que los productos químicos penetran en la ropa o por el contacto directo con la piel o el gas que desprenden algunos de ellos, afectando el aparato respiratorio.
- ? Contaminan las aguas naturales, debido a que las lluvias o riegos arrastran estos productos que acaban en los ríos, lagos, aguas subterráneas y mares contaminándolos.

⁴³ CALVO, G.; *et. al.* Report of the advance about the validation of technologies of integrated pest management in tomato in the west of the central valley 1991-1992. Costa Rica : First report. CATIE, 1992. p. 99.

⁴⁴ SANCHEZ, et. al. Control microbiológico de *Phytophthora infestans* en tomate. En: Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. No. 51. (1999); p. 47-58.

Según Infoagro: “El control de plagas con productos químicos es cada vez más complicado. La exigencia por los consumidores en la reducción de la aplicación de estos productos es cada vez más notable. Los agroquímicos no siempre dan buenos resultados, por lo que, se presta mucha importancia a una agricultura más biológica”⁴⁵

2.6.2 Control Biológico. Deacon afirma que. “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, etc.”⁴⁶

Sañudo *et al.*, afirman que:

Existen buenas posibilidades de lograr una reposición de la actuación de los microorganismos antagonistas 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 saprófitos facultativos o parásitos obligados, teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- a. Conocimiento del patógeno, sus relaciones con la planta hospedera y el medio ambiente, su dispersión y persistencia.
- b. Identificación de los microorganismos que están asociados con el patógeno, ya sea favoreciéndolo o limitando su población.
- c. Estudio de aquellos microorganismos con capacidad antagonista, probando su efectividad y seleccionando aquellos promisorios.
- d. Observación del tipo de antagonismo que está operando.
- e. Estudios de persistencia de los antagonistas y determinación de los factores que inciden en ella.
- f. 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.

⁴⁵ INFOAGRO. Control biológico de plagas. [en línea] 2005. [citado Sep. 2004]. Disponible en Internet : <URL.http://www.infoagro.com>

⁴⁶ DEACON, J.W. Introducción a la micología moderna. México : Limusa, 1988. p. 35.

De acuerdo con el plan descrito el manejo microbiológico de fitopatógenos debe cumplir con los siguientes objetivos:

- a. Reducción del inóculo de un patógeno a niveles no económicos de incidencia y severidad.
- b. Disminución de la infección por el patógeno en el hospedero o de las oportunidades que tenga de llegar a los sitios de infección⁴⁷.

Entre las ventajas más relevantes del control biológico podemos mencionar:

? Los agentes de biocontrol están dotados de propiedades similares al patógeno, entre las que cabe destacar las de multiplicación y dispersión. Pueden actuar a varios niveles en el ciclo de la enfermedad, interfiriendo la supervivencia del patógeno en el ambiente externo, el desarrollo, la entrada y la transmisión del patógeno entre los hospederos; incluso el antagonista puede competir con el patógeno dentro del tejido del hospedero.

? A diferencia del control químico, en el control biológico, los efectos sobre el patógeno son más específicos además, sus repercusiones sobre el medio ambiente son menores por la biodegradabilidad de estas moléculas.

El control biológico también acarrea inconvenientes entre los que se destacan:

? Los agentes de control biológico son seres vivos, su colonización y multiplicación está inferida por el uso de muchos productos fitosanitarios, especialmente los antifúngicos y antibacterianos.

? Requiere mucha paciencia, entrenamiento y un mayor estudio biológico.

? Los resultados del control biológico en ocasiones no son tan efectivos como se espera, ya que los enemigos naturales atacan a unos tipos específicos de patógenos⁴⁸

2.7 ANTAGONISMO MICROBIANO

Deacon argumenta que: “En la naturaleza se ha observado microorganismos que con influencias desfavorables como la antibiosis, privación de nutrientes, el parasitismo y propiedades antagonicas, entre otras”⁴⁹, Sañudo *et al.*, afirma que: “controlan la magnitud

⁴⁷ SAÑUDO, Benjamín.; et. al. Fundamentos para el manejo microbiológico de suelos tropicales. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2001. p. 45

⁴⁸ CONTROLADORES BIOLÓGICOS. Perspectivas del control biológico de enfermedades de plantas. [en línea] 2005. [Citado aGOS., 2004]. Disponible en Internet : <URL.http://www.controladoresbiologicos.c>.

⁴⁹ DEACON, Op.cit., p. 35

de otra población pero sin llegar a extinguirla; sin embargo, cuando se introduce inóculos en gran cantidad, pueden contrarrestar de manera promisoría los patógenos”⁵⁰.

Villegas E. Bernardo sostiene que:

La relación de microorganismos en las hojas de papa es muy variada, existen muchos microorganismos que interactúan en la superficie de las hojas de papa entre los que se destacan *Cladosporium herbarum*, *Actinomyces sp.*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis*, *Choanephora sp.*, *Trichoderma koningi*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp* y *Curvularia siddiquii*, de los cuales algunos podrían convertirse en potenciales biocontroladores de enfermedades en papa, incluyendo el tizón tardío⁵¹.

Según Wainwright,

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 hospederos⁵²

Sañudo *et al.*, afirman que: “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”⁵³

2.8 ASPECTOS GENERALES SOBRE *Trichoderma spp.*

Según Biocontrol:

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

⁵⁰ SAÑUDO, Benjamín.; et. al. Fundamentos para el manejo microbiológico de suelos tropicales, Op.cit., p. 45

⁵¹ VILLEGAS E, Bernardo. 1996. Resúmenes. Manejo del tizón tardío de la papa: estado actual. En: Papas colombianas. p. 258-259

⁵² WAINWRIGTH, M. 1995. Biotecnología de hongos. Primera edición. Editorial Acribia S.A. España. p. 228

⁵³ SAÑUDO, Benjamín *et al.* Fundamentos de micología agrícola. San Juan de pasto : Universitaria. Universidad de Nariño, 2001. p. 201

desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos⁵⁴

Trosno *et al.*, afirman que:

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 cultivos⁵⁵

2.8.1 Biología de *Trichoderma* spp. Sañudo *et al.*, afirman que: “Es un hongo de hifas septadas, que presenta una o tres fiálides butiliformes sostenidas por conidióforos opuestos y largos, con un ligero abultamiento en la zona de septación. Estas sostienen conidias unicelulares que pueden ser redondas u ovoides, hialinas o pigmentada”⁵⁶

Según Esposita:

Género que agrupa a 33 especies, el hongo se identifica como una mota de color verde habitante natural del suelo que 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 tiempo⁵⁷.

Biocontrol reporta que:

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

⁵⁴ BIOCONTROL. Monografía *Trichoderma* spp. [en línea] 2004. [citado Sep., 2004]. Disponible en Internet : <URL.http://control-biologico.com> p. 25.

⁵⁵ TROSNO, A. y GORDON, L. Biological control with *Trichoderma* species. USA : Marcel Dekke, 1998. p. 442

⁵⁶ SAÑUDO, Benjamín *et al.* Fundamentos de micología agrícola. Op.cit., p. 201

⁵⁷ ESPOSITA, E. y DA – SILVA, M. 1. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. Brasil : Critical review in microbiology, 1998. p. 24, 89 – 88.

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 cultivo⁵⁸

2.8.2 *Trichoderma* como biocontrolador. El mismo autor reporta que: “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”⁵⁹

Tabla 2. Algunos fitopatógenos controlados por *Trichoderma* spp.

FITOPATÓGENOS CONTROLADOS	ENFERMEDAD	CULTIVO
<i>Armillaria spp.</i>	Pudrición de raíces	Frutales Amplio rango de cultivos como: papa, tomate, fríjol, fresa, mora, flores, tomate de árbol y causa pudriciones en postcosecha.
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Amplio rango de cultivos como: arveja, papa, tomate, fríjol, fresa, mora, flores, tomate de árbol y causa pudriciones en postcosecha.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Papa, tomate, fríjol, tomate de árbol, banana, arveja, maíz, clavel, entre otros.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitamientos vasculares	Maíz, fríjol, melón, ajonjolí.
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Carbón de las raíces.	Papa, pepino de agua
<i>Phytophthora infestans</i>	Gota	Tabaco, flores, frutales, etc.
<i>Phytophthora spp.</i>	Pudrición	
<i>Pythium spp.</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Amplio rango de cultivos.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Zanahoria, tomate, lechuga, repollo, café, papa, arveja, cebolla, ajo, pimentón, etc.
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Habichuela, tomate, lechuga, repollo, café, papa, arveja, cebolla, ajo, pimentón, etc.
<i>Rosellinia necatrix</i>	Pudrición blanca de raíces	Aguacate, manzano

Fuente: Herrera, Estrella y Carsolio, 1998; Chet & Inbar, 1994.

⁵⁸ Biocontrol, Op.cit., p. 25

⁵⁹ Ibid., p. 25

2.8.3 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. Biocontrol reporta que. “A parte de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional”⁶⁰

Harman reporta varios mecanismos demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma* actúa como biocontrolador, y son los siguientes:

? **Micoparasitismo.** Es el fenómeno por el cual un hongo coloniza a otro, cubriendo una gran cantidad de eventos en este tipo de interacción.⁶¹

Lorito afirma que: “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.”⁶². 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.

✍ **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.** Trosno *et al.*, afirman que:

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

⁶⁰ Ibid., p. 25

⁶¹ HARMAN, G.E. 2001. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. koningi*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system). [en línea]. 2001. [citado Agos., 2004]. Disponible en Internet: <URL : <http://www.birdhybrids.com/t-22.html>>

⁶² LORITO, M. Chytinolytic enzymes and their genes. In: *Trichoderma and Gliocladium*. En : Kubicek, C.P. & Harman, G.E. editors, 1998, Vol. 2. p.

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 micoparasitismo⁶³

Dennis y Webster afirman que: ‘Los antibióticos producidos por *Trichoderma spp.* pueden ser de naturaleza volátil, que son los antibióticos que se difunden en el aire y no volátiles que son antibióticos que pueden difundirse en el agua’⁶⁴. Robins *et al.*, Nickerson *et al.*, citados por Dennis y Webster, manifiestan que: ‘Como antibióticos volátiles *Trichoderma spp.* produce acetaldehído y otros compuestos cíclicos con propiedades fungicidas y fungistáticos (1971). Pero diversas especies son productoras de antibióticos no volátiles como trichodermin, suzukacillin, alamethicin, gliotoxinas, glioroseina, aurathioglicidina, rubrogliocladina, viridina y antibióticos de amplio espectro como U-21963’⁶⁵

? **Competencia.** Trosno *et al.*, afirman que: ‘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’⁶⁶

⁶³ TROSNO, *et. al.* Op.cit., p. 111-126

⁶⁴ DENNIS, C. y WEBSTER, J. . Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. USA : Trans. Br. Mycol. 1971 p. 57.

⁶⁵ Ibid., p. 25-39

⁶⁶ TROSNO, *et. al.* Op.cit., p. 442

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 ACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans*

Se emplearon los aislados N00299 y N06399 de *Phytophthora infestans* caracterizados genéticamente (Tabla 3). Dichos aislamientos se encontraban conservados en nevera a 4° C en tubos de ensayos con medio de cultivo inclinado de agar arveja.

Para efectos de trabajo en laboratorio se nombró al aislamiento N00299 como Pi02 y N06399 como Pi63, las iniciales Pi corresponden a la abreviatura de *Phytophthora infestans*.

Tabla 3. Datos de los aislamientos de *Phytophthora infestans* 02 y 63 procedentes de variedades de papa cultivadas en el Departamento de Nariño.

No.	Muestra	Municipio	Variedad	Tipo de apareamiento	Linaje clonal
2	N00299	Pasto	Parda Pastusa	A1	EC-1
22	N06399	Córdoba	Sabanera	A1	EC-1

Fuente: LAGOS MORA, Luz Estela. 2002

Se tomó con asa de punta parte del micelio conservado y se sembró en suspensión en medio líquido arveja – sacarosa (Anexo A); luego se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 a 7 días con inspección constante. Al cabo de este tiempo se presentó crecimiento y se repicó en cajas petri estériles con agar V8 (Anexo A), realizando cinco puntos distribuidos en forma de estrella, se incubó a temperatura ambiente por espacio de 8 días.

Posteriormente se realizó la conservación de las colonias que se obtuvieron en la reactivación; para esto, se utilizó tubos de ensayo con medio de cultivo inclinado de agar V8, dejando en la parte central una porción de micelio. Las cajas con las colonias activadas y los tubos cultivados se sellaron con papel osmótico (cristaflex) y se dejaron a temperatura ambiente entre 3 a 5 días más.

Se hicieron nuevos preservados (tubos con medio inclinado) para asegurar la viabilidad de las colonias de *Phytophthora infestans*.

3.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE *Trichoderma* spp.

Se aisló *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo de cinco lugares diferentes (Tabla 4) y para esto se utilizó el siguiente procedimiento:

Se pesó asépticamente 10 gramos de suelo y se lo agregó a 90 ml de agua destilada estéril. De esta primera dilución 10^{-1} se traspasó 1000 μ l (1 ml) a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril con ayuda de una transferipipeta de puntas azules, lográndose una dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta alcanzar la dilución 10^{-6} .

Tabla 4. Datos de los lugares de recolección de las muestras de suelo.

Lugar de Procedencia	Ubicación	Altura m.s.n.m.	Temperatura (°C)		Humedad Relativa (%)	
			Máx.	Min.	Máx.	Min.
Bosque de plantación de Eucalipto	SENA – Regional Nariño	2.620	22.5	21.0	64	55
Jardines	Universidad de Nariño	2.490	22.5	21.5	60	56
Pradera	Volcán Galeras	3.200	14.0	12.3	89	75
Pajonal	Volcán Galeras	3.500	13.6	12.3	82	68
Cultivos caseros de papa	Corregimiento de Catambuco	2.780	22.0	20	50	41

Partiendo de la última dilución 10^{-6} se inoculó en superficie y por triplicado 100 μ l a una caja petri con agar peptona glucosa acidificado (Anexo A) hasta la primera dilución; luego se esparció el inóculo con ayuda de una asa de vidrio estéril, rotándola en diferentes direcciones y en forma suave. Se incubó a temperatura ambiente hasta que se observó las primeras colonias fungosas.

Seguidamente se realizaron placas microscópicas de las colonias de hongos utilizando la técnica del microcultivo (Anexo B). Se observó al microscopio (objetivo 40X) y se confirmó 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 hicieron pases de las colonias seleccionadas del hongo en cajas petri con agar papa dextrosa (Anexo A), hasta que se logró su completa purificación.

3.3 CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. Se conservó en tubos inclinados con agar papa dextrosa (PDA) (Anexo A). Los tubos se cultivaron y almacenaron a temperatura ambiente ($\pm 14^\circ$ C) y cuando se observó un buen crecimiento de las colonias, se conservaron en refrigeración a una temperatura moderada de 4° C.

3.4 EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL ANTAGONISMO *in vitro*

3.4.1 Siembras opuestas de *Trichoderma spp.* y *Phytophthora infestans*. Las pruebas de antagonismo *in vitro* entre *Phytophthora infestans* (02, 63) y los aislamientos de *Trichoderma spp.* se realizaron en cajas petri con medio de cultivo V8, con el fin de suministrar los requerimientos nutricionales al patógeno y con tres repeticiones por cada aislamiento del antagonista.

Previamente se sembraron en PDA y agar V8 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 obtener los inóculos, se cortó asépticamente el micelio de los bordes de las colonias con un sacabocados de 6 mm de diámetro y se procedió a realizar la siembra. Para esto se utilizó la metodología de siembra en zonas opuestas.

Inicialmente, se inoculó el patógeno a 0.5 cm del borde de la caja, ofreciendo a *Phytophthora infestans* una ventaja de crecimiento de 4 días (96 horas), 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 incubaron 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. El tratamiento se suspendió cuando uno de los aislamientos del hongo antagónico creció hasta el extremo opuesto sobre el crecimiento micelial del patógeno. Además se hicieron observaciones cualitativas de la capacidad colonizadora de los aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre las colonias de *Phytophthora infestans*.

Para el cálculo de la velocidad de invasión micelial en cm/día se empleó la siguiente fórmula:

$$V = \frac{Xf - Xi}{t2 - t1}$$

Donde:

<i>V</i>	=	Velocidad de invasión micelial
<i>Xf</i>	=	Crecimiento final
<i>Xi</i>	=	Crecimiento inicial
<i>t2</i>	=	Tiempo final
<i>t1</i>	=	Tiempo inicial

3.4.2 Prueba de antibiosis. Para esta prueba se utilizó el método de cultivo sumergido que se emplea en la elaboración industrial de antibióticos. El crecimiento del microorganismo se realizó en toda la masa del medio de cultivo.

Según Burbano y León: “De cada colonia de los aislamientos de *Trichoderma spp.* se tomó un disco de agar con iguales características a los utilizados en la prueba de antagonismo directo, con una masa de 15 microgramos de micelio aproximadamente”⁶⁷, como inóculo inicial. según metodología propuesta por Sañudo⁶⁸ Estos discos se llevaron a botellas de vidrio estériles con el siguiente medio de cultivo: glucosa 1.0 g., peptona 0.5 g., solución salina estándar 1 ml., KH_2PO_4 0.5 g., harina de maíz 1 g y agua destilada 100 ml. Se ajustó a un pH de 7.0.

Este conjunto (medio líquido y micelio) se incubó a temperatura ambiente durante 30 días aproximadamente y en oscuridad, fue sometido a una agitación diaria (cada 24 horas) por media hora a 120 r.p.m. para proporcionar oxígeno y evitar la formación de grumos en el cultivo.

Después del periodo de incubación (crecimiento de cada colonia en el medio líquido) se procedió a filtrar, primero a través de gasa estéril y luego se utilizó embudos de tallo corto con papel filtro (589⁵ red ribbon, diámetro 110 mm) previamente esterilizados. El líquido obtenido (transparente y sin partículas en suspensión) se recogió en botellas de vidrio estériles. Todo este procedimiento se llevó a cabo sobre una superficie previamente desinfectada con hipoclorito de sodio a una concentración de 500 p.p.m. (Anexo C) y a la llama de mecheros dispuestos a los largo del mesón (Figura 1 y 2).

⁶⁷ BURBANO ROSERO, Edith Mariela y LEÓN GUEVARA, Olga Deyanira. Aislamiento y caracterización parcial de *Penicillium* y *Cephalosporium* a partir de aguas residuales y su acción *in vitro* sobre las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. San Juan de Pasto, 1998 p. 45 Tesis de grado. (Bióloga). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de Biología.

⁶⁸ SAÑUDO, Benjamín. Principios de control biológico de fitopatógenos San Juan de pasto : Universidad de Nariño, 1994. p. 201

Figura 1. Proceso de filtración de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de *Trichoderma* spp.



Luego se tomaron 15 ml de cada filtrado en cajas de petri estériles, donde se introdujeron discos de papel filtro que se elaboraron colocando de manera sucesiva una sobre otra cuatro hojas de papel filtro y con ayuda de una perforadora se obtuvo sensidiscos semejantes al comercial (diámetro 0.5 cm., peso 0.010 g). Se colocaron 30 sensidiscos por cada caja petri con 15 ml del filtrado. Se sometieron a esterilización con luz U.V. por 24 horas, mientras tanto se impregnaron del antibiótico.

Para comprobar el efecto de antibiosis se utilizó la metodología propuesta por Sañudo⁶⁹ en el 2001. Para esto se sembró el fitopatógeno con 4 días de anticipación en el centro de la caja petri con agar V8 y posteriormente se colocaron 4 discos de papel filtro impregnados con la suspensión. Se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad por espacio de 10 días. Al cabo de este tiempo se observó la presencia de halos de inhibición. En esta prueba se utilizó un control negativo con agua destilada y un control positivo con el fungicida Fosetil aluminio a una concentración de 2.0 p.p.m. (Anexo D) impregnados en discos de papel filtro estériles.

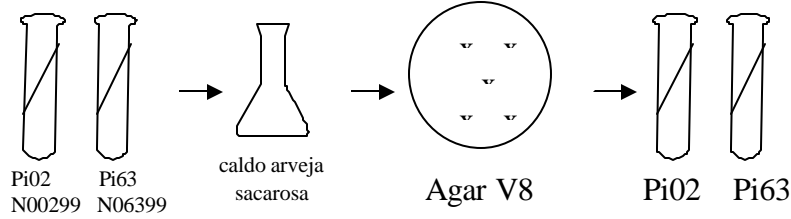
3.5 DISEÑO ESTADÍSTICO

En esta investigación se empleó un diseño irrestrictamente al azar con tres repeticiones. Los datos obtenidos se interpretaron mediante el programa estadístico Statgraphics plus versión 4.1, por medio de un análisis de varianza (ANDEVA), la prueba de significancia de Duncan y un análisis de frecuencias mediante un test de Chi – cuadrado.

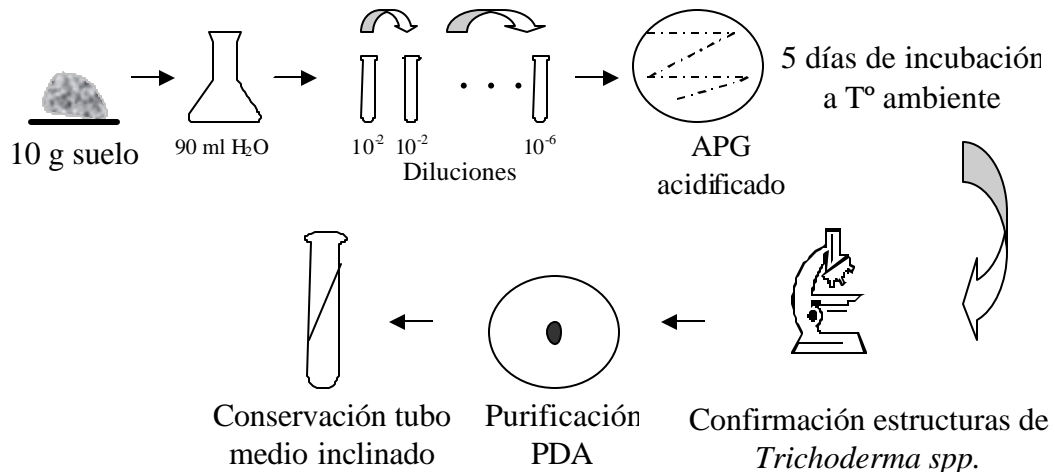
⁶⁹ SAÑUDO, Benjamín *et al.* Fundamentos de micología agrícola. Op.cit., p. 201

Figura 2. Representación esquemática de la metodología utilizada en esta investigación.

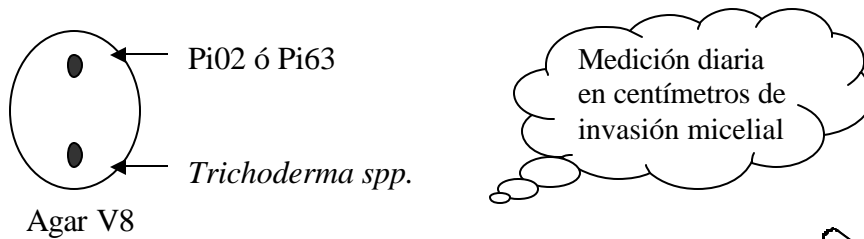
1. Activación y conservación de *Phytophthora infestans*



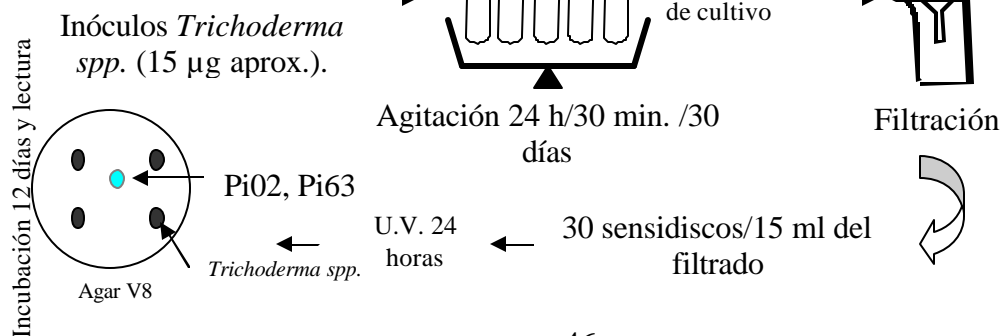
2. Aislamiento, purificación y conservación de *Trichoderma spp.*



3. Prueba de antagonismo (siembras opuestas)



4. Prueba de antibiosis



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans*

Las características macroscópicas y microscópicas de las colonias de *Phytophthora infestans* que se activaron en el laboratorio se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características morfológicas de los aislamientos de *Phytophthora infestans* 02 y 63.

Aislamiento	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
Pi02 Figura 3.	Colonia de crecimiento micelial lento, aéreo, irregular y de textura algodonosa.	Presenta micelio aseptado, hialino con zoosporangios limoniformes.
Pi63 Figura 4.	Colonia de crecimiento micelial lento, aéreo, irregular y de textura algodonosa.	Presenta micelio aseptado, hialino con zoosporangios limoniformes.

Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento Pi02 correspondiente a *Phytophthora infestans*. Microfotografía 20X.

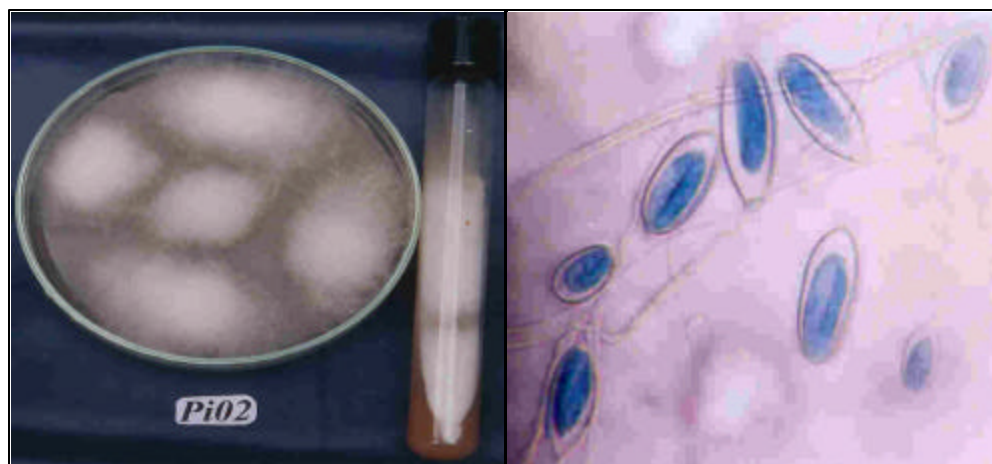


Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento Pi63 correspondiente a *Phytophthora infestans*. Microfotografía 20X.



4.2 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 cuadro 2.

Cuadro 2. Características morfológicas de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Aislamiento	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
T1B Figura 5.	Colonia de crecimiento rápido y regular, con micelio denso y plano, el cual produce inicialmente una conidiación blanca que con el tiempo se torna amarillo verdosa, su reverso es de color amarillo y aroma parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados, con ramas primarias largas que sostienen fiálides solitarias.
T2B Figura 6.	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de apariencia aterciopelada de color blanco, que posteriormente formará cúmulos blancos y amarillos. Presenta reverso de color amarillo y olor semejante a coco.	Presenta conidióforos delgados con ramas primarias que sostienen fiálides individuales.
T3B Figura 7.	Colonia de crecimiento rápido y regular, con textura densa y plana de coloración blanca. Presenta una esporulación amarillo verdosa que se extiende desde el centro de la colonia hasta los bordes. Su reverso es de color amarillo, aroma parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados y ramas primarias que sostienen fiálides individuales.
T4J Figura 8.	Colonia de crecimiento rápido, con micelio plano y denso. Presenta una esporulación verde difundida en toda la colonia. Su reverso es incoloro, aroma semejante a coco.	Presenta conidióforos delgados con ramas primarias que sostienen fiálides individuales y apiñadas.
T5J Figura 9.	Colonia de crecimiento rápido, con textura densa y plana. Presenta una esporulación verde distribuida en forma de anillos concéntricos a lo largo de la colonia, en los bordes se observa acumulaciones amarillas. El reverso de la colonia es incoloro y con olor parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados, ramificados en ramas largas que sostienen fiálides individuales, hinchadas y apiñadas.
T6J Figura 10.	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de apariencia aterciopelada, de color blanco que formará acumulaciones amarillas y esporulación verde en las zonas miceliales nuevas. Su reverso es de color amarillo, olor parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados, ramas primarias con fiálides individuales y apiñadas.
T7PVG Figura 11.	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de color blanco, con esporulación amarillo verdosa que se extiende a lo largo de la colonia. Su reverso es de color amarillo, olor parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados con ramas primarias que sostienen fiálides individuales y apiñadas.
T8PVG Figura 12.	Colonia de crecimiento rápido, con micelio aéreo, denso y de color blanco, con esporulación verde que se extiende sobre los bordes de la colonia. Su reverso incoloro, olor parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados, con ramas primarias largas que sostienen fiálides solitarias.
T9SC Figura 13.	Colonia de crecimiento rápido, regular, con micelio denso y plano, el cual produce inicialmente una conidiación blanca que con el tiempo se torna amarillo verdosa, su reverso es de color amarillo y olor parecido a coco.	Presenta conidióforos delgados, ramas primarias que sostienen fiálides individuales.
T10PaVG Figura 14.	Colonia de crecimiento rápido, regular, con micelio denso y plano, su reverso es incoloro y aroma semejante a coco.	Presenta conidióforos delgados y ramas primarias que sostienen fiálides individuales y apiñadas.

Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T1B. Microfotografía 20X.



Figura 6. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T2B. Microfotografía 20X.



Figura 7. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T3B. Microfotografía 20X.

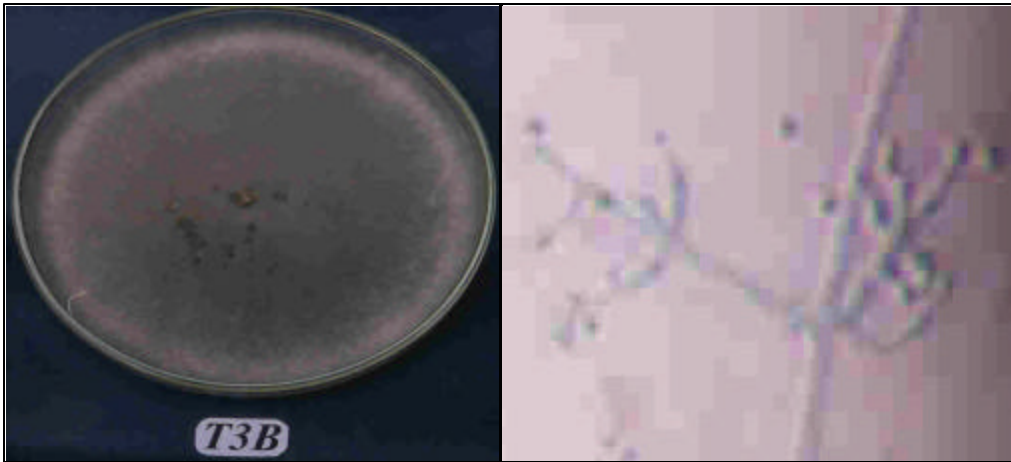


Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T4J. Microfotografía 20X.

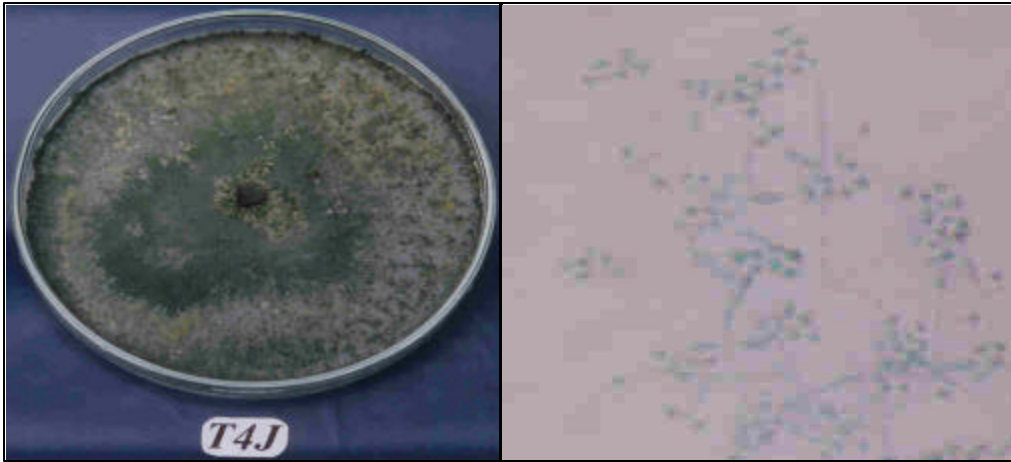


Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T5J. Microfotografía 20X.

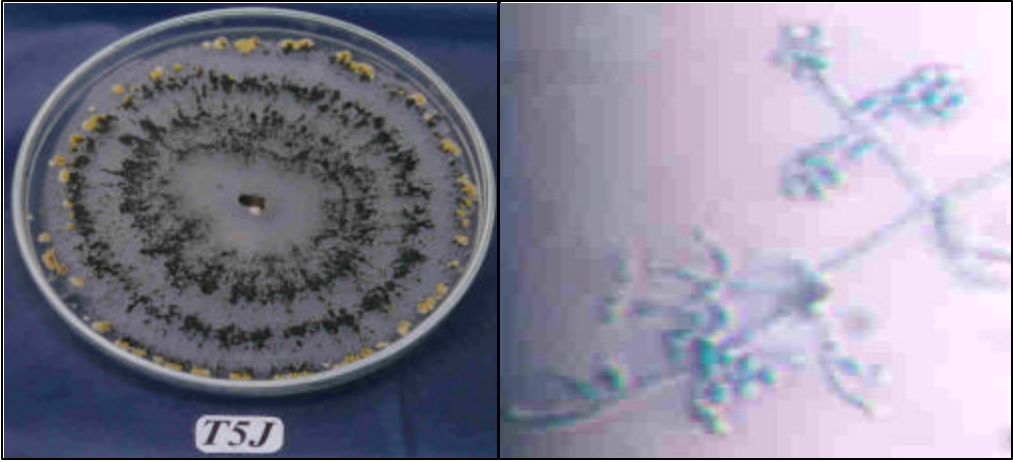


Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T6J. Microfotografía 20X.

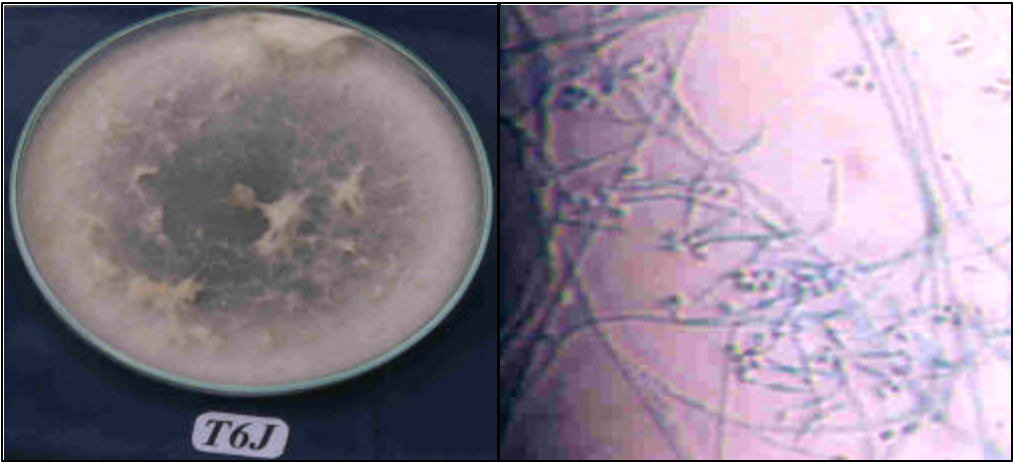


Figura 11. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T7PVG. Microfotografía 20X.

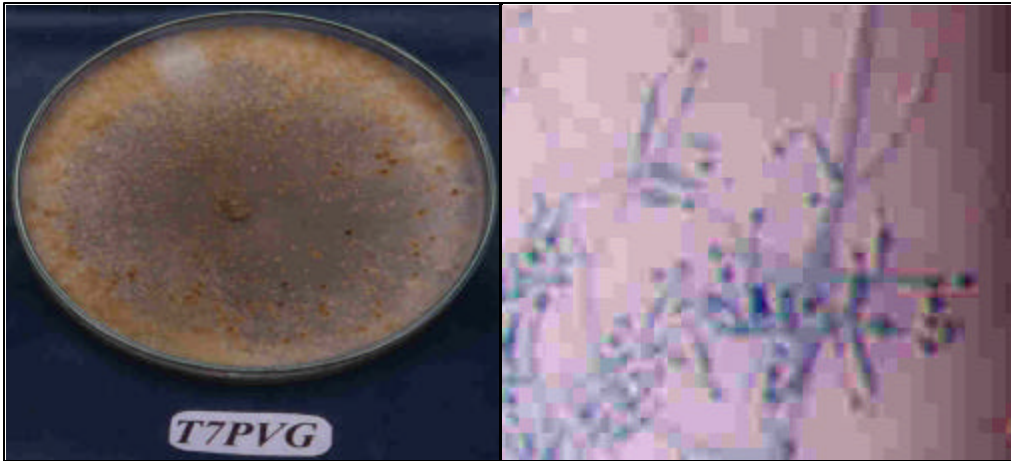


Figura 12. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T8PVG. Microfotografía 20X.



Figura 13. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T9SC. Microfotografía 20X.

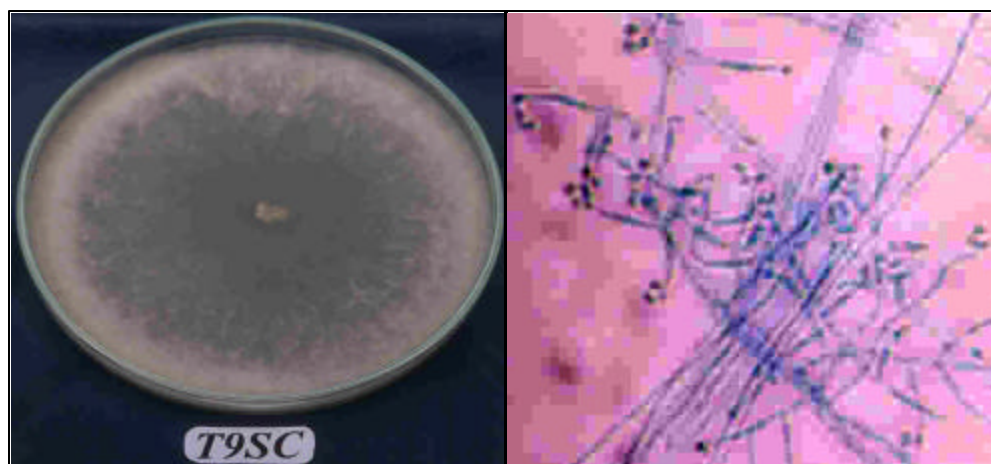
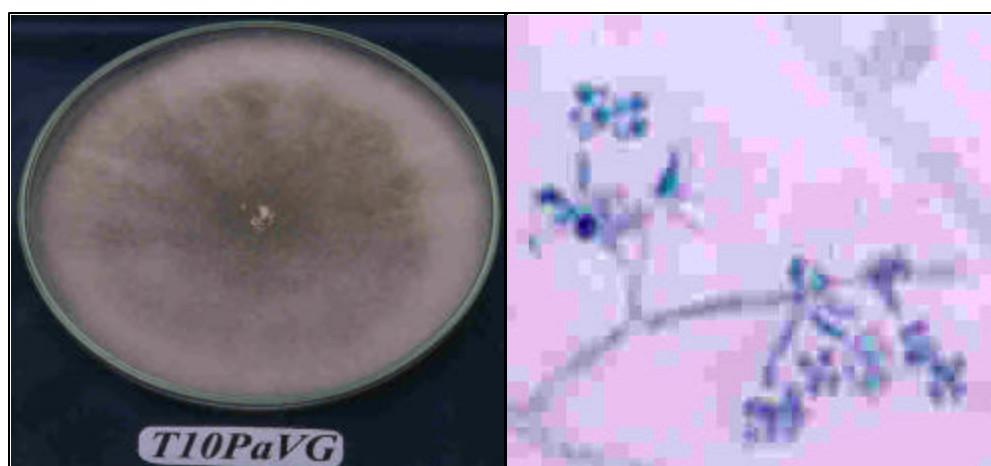


Figura 14. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento T10PaVG. Microfotografía 20X.



4.3 ANTAGONISMO *in vitro*

4.3.1 Siembras opuestas. Las tablas 5 y 6 (Figuras 16 y 17, Anexos E y F) evidenciaron la variación en la invasión micelial de cada una de las diez cepas de *Trichoderma* spp. frente a cada uno de los aislados de *P. infestans*. Una observación cualitativa mostró un rápido crecimiento de la mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 02 y 63, llegando al cubrimiento total de la caja en nueve días para ambos tratamientos (Figura 15).

Mandels, afirma que: “Las constantes de crecimiento expuestas en estas tablas se calcularon asumiendo un modelo de crecimiento lineal. Se tuvo en cuenta que el crecimiento de los hongos filamentosos está limitado esencialmente a la porción terminal de la hifa”⁷⁰. Villegas y Castaño argumentan que: “La extensión lineal de la hifa del hongo durante un cultivo en crecimiento ocurre a una velocidad constante, siguiendo una ecuación cinética de orden cero, en donde la velocidad de la reacción no depende de la concentración del sustrato. En este tipo de reacciones la constante específica de crecimiento es igual a la velocidad de crecimiento, es decir: $\frac{dx}{dt} = \mu$ ”⁷¹

Tabla 5. Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 02.

<i>Phytophthora infestans</i> 02 Vs. <i>Trichoderma</i>											
<i>Trichoderma</i>	Día (cm invasión)									Constante de crecimiento (μ)	Velocidad promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
T1B	0.27	0.97	1.70	2.80	3.50	4.53	5.43	6.30	7.07	0.873	0.85
T2B	0.27	0.77	1.40	2.33	2.77	3.50	4.17	4.93	5.63	0.678	0.67
T3B	0.00	0.50	1.37	2.40	3.33	4.47	5.23	5.83	6.73	0.879	0.84
T4J	0.00	0.40	1.00	1.70	2.50	3.50	4.13	4.90	5.63	0.735	0.70
T5J	0.00	0.10	0.47	0.87	1.23	1.43	1.63	1.83	2.00	0.268	0.25
T6J	0.37	1.07	2.27	2.87	3.53	4.47	5.27	6.07	6.70	0.799	0.79
T7PVG	0.17	0.60	1.50	2.13	2.77	3.57	4.20	4.83	5.37	0.672	0.65
T8PVG	0.27	0.83	1.83	2.87	3.73	4.97	5.87	6.63	7.37	0.933	0.89
T9SC	0.10	0.57	1.53	2.50	3.27	4.70	5.67	6.30	6.80	0.908	0.85
T10PaVG	0.33	0.97	2.00	2.97	3.83	5.17	6.23	6.93	7.50	0.954	0.90

⁷⁰ MANDELS, G.R. The Fungi: the fungal cell. Volume I. Edited by: G.C. Ainsworth & Alfred S. Sussman. Academy Press. Chapter 25: Kinetics of Fungal Growth. 1965. New York, 1965 p. 599 – 611

⁷¹ VILLEGAS E, Bernardo y CASTAÑO Z, Jairo. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schrbeter, causante de la pudrición de la corona y raíz del manzano (*Mallus domestica* Borkh.) en Caldas. En: Fitopatología. Caldas. No. 32. (Oct., 1999): p. 7.

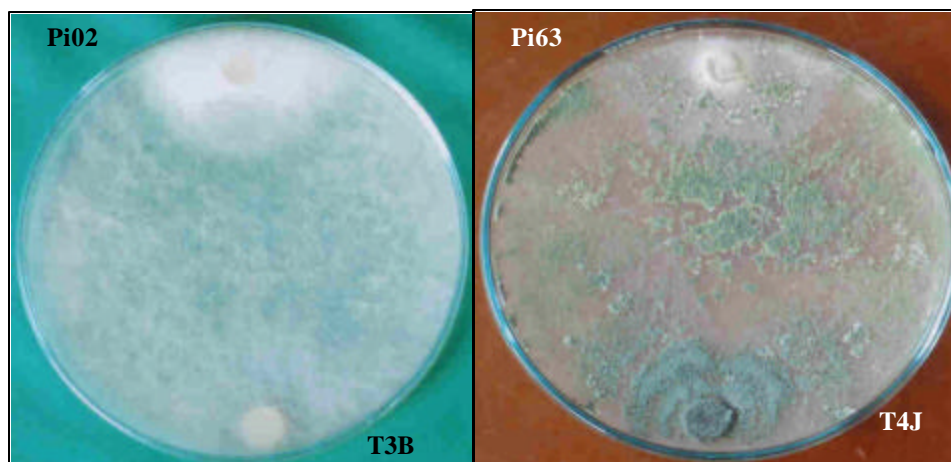
Tabla 6. Promedios de invasión micelial en centímetros/día y constantes de crecimiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 63.

<i>Phytophthora infestans</i> 63 Vs. <i>Trichoderma</i>											
<i>Trichoderma</i>	Día (cm invasión)									Constante de crecimiento(μ)	Velocidad promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
T1B	0.23	0.93	1.90	3.17	4.00	5.13	6.13	6.83	8.00	0.987	0.96
T2B	0.27	0.90	1.93	3.27	4.20	5.20	5.93	6.57	7.40	0.924	0.90
T3B	0.20	0.80	1.90	3.17	4.33	5.47	6.03	6.50	7.73	0.963	0.94
T4J	0.10	0.50	1.47	2.17	3.23	4.30	5.30	6.03	7.20	0.913	0.89
T5J	0.00	0.30	0.93	1.53	1.97	2.40	2.73	3.23	4.03	0.490	0.50
T6J	0.23	0.90	1.90	2.97	4.13	5.33	5.97	6.70	7.83	0.972	0.95
T7PVG	0.10	0.50	1.30	2.10	2.73	3.63	4.40	5.13	5.90	0.747	0.73
T8PVG	0.17	0.60	1.47	2.47	3.43	4.63	5.70	6.50	8.00	0.994	0.98
T9SC	0.20	0.90	1.87	3.03	3.87	4.83	5.47	5.80	6.40	0.808	0.78
T10PaVG	0.23	0.93	1.87	2.50	3.93	5.03	6.00	6.97	7.87	0.991	0.95

El aislamiento de *Trichoderma* spp. que presentó una mayor capacidad de invasión micelial frente a *P. infestans* 02 fue el aislado T10PaVG, con una velocidad de 0.954 cm/día, proveniente de pajonales del Volcán Galeras. En el caso de *P. infestans* 63 el aislado con mayor capacidad fue el T8PVG, con una velocidad de 0.994 cm/día, proveniente de praderas del Volcán Galeras. El aislamiento con menor capacidad de invasión micelial frente a los dos aislados de *P. infestans* fue T5J, proveniente de los jardines de la Universidad de Nariño, sede Torobajo.

Esto es también posible observarlo en las figuras 16 y 17, en donde los aislados con mayor capacidad de invasión micelial pueden identificarse por presentar las mayores pendientes. Caso contrario los aislamientos menos prometedores presentan curvas con escasa pendiente. En el anexo J pueden observarse las respectivas ecuaciones lineales para cada una de las curvas de invasión micelial.

Figura 15. Antagonismo *in vitro* de los aislados de *P. infestans* 02 (izq.) y 63 (der.) frente a T3B y T4J, respectivamente.



Según Villegas y Castaño:

Evaluaron en condiciones *in vitro* la capacidad antagonística de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora cactorum*, reportando 19 aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. aislados 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 2.798 y 1.99 cm/día respectivamente, en comparación con esta investigación las velocidades de crecimiento son mucho mayores, ya que la mayor velocidad solo alcanzó 0.994 cm/día en el tratamiento efectuado contra Pi63⁷².

⁷² Ibid., p. 7

Figura 16. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre *Phytophthora infestans* 02.

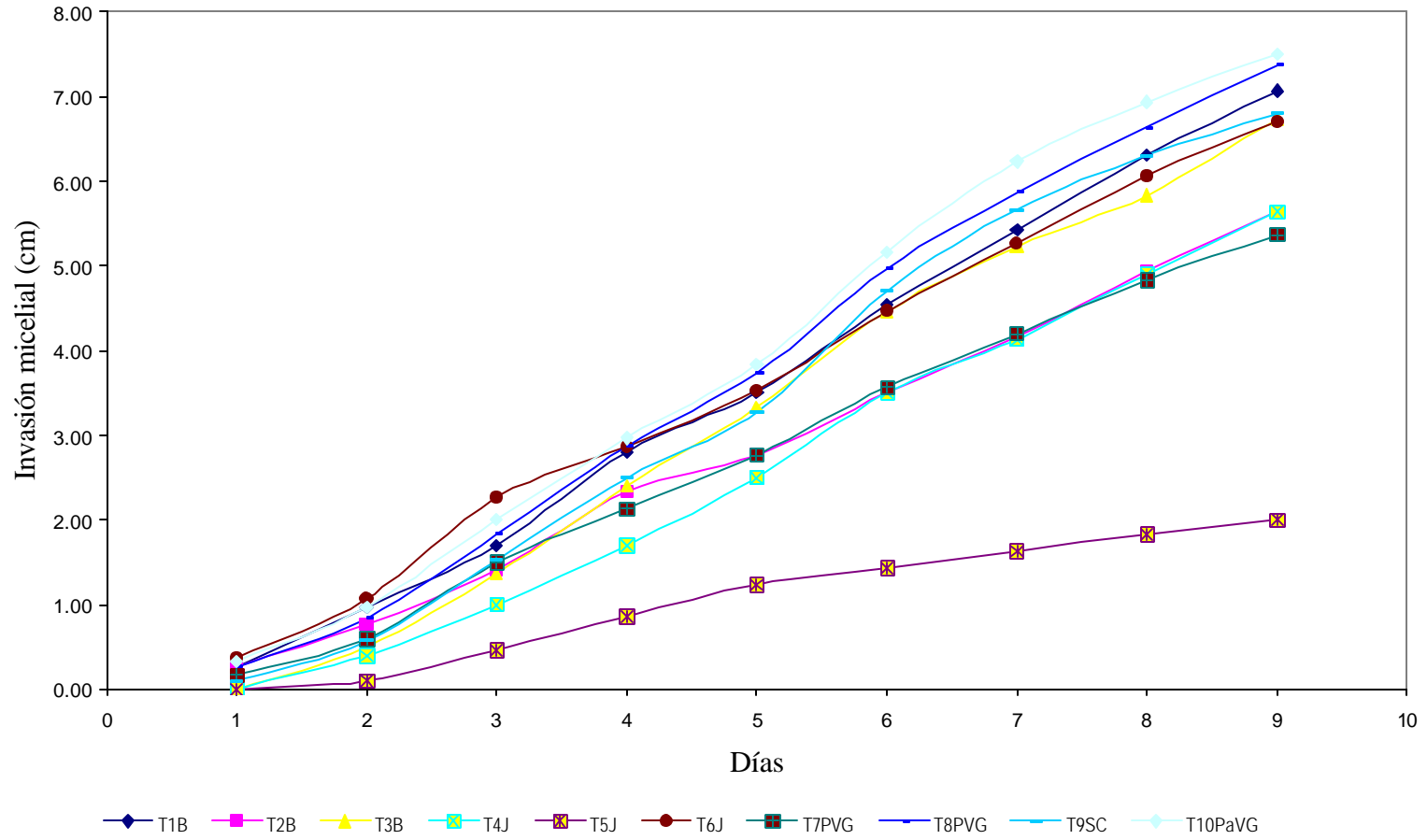
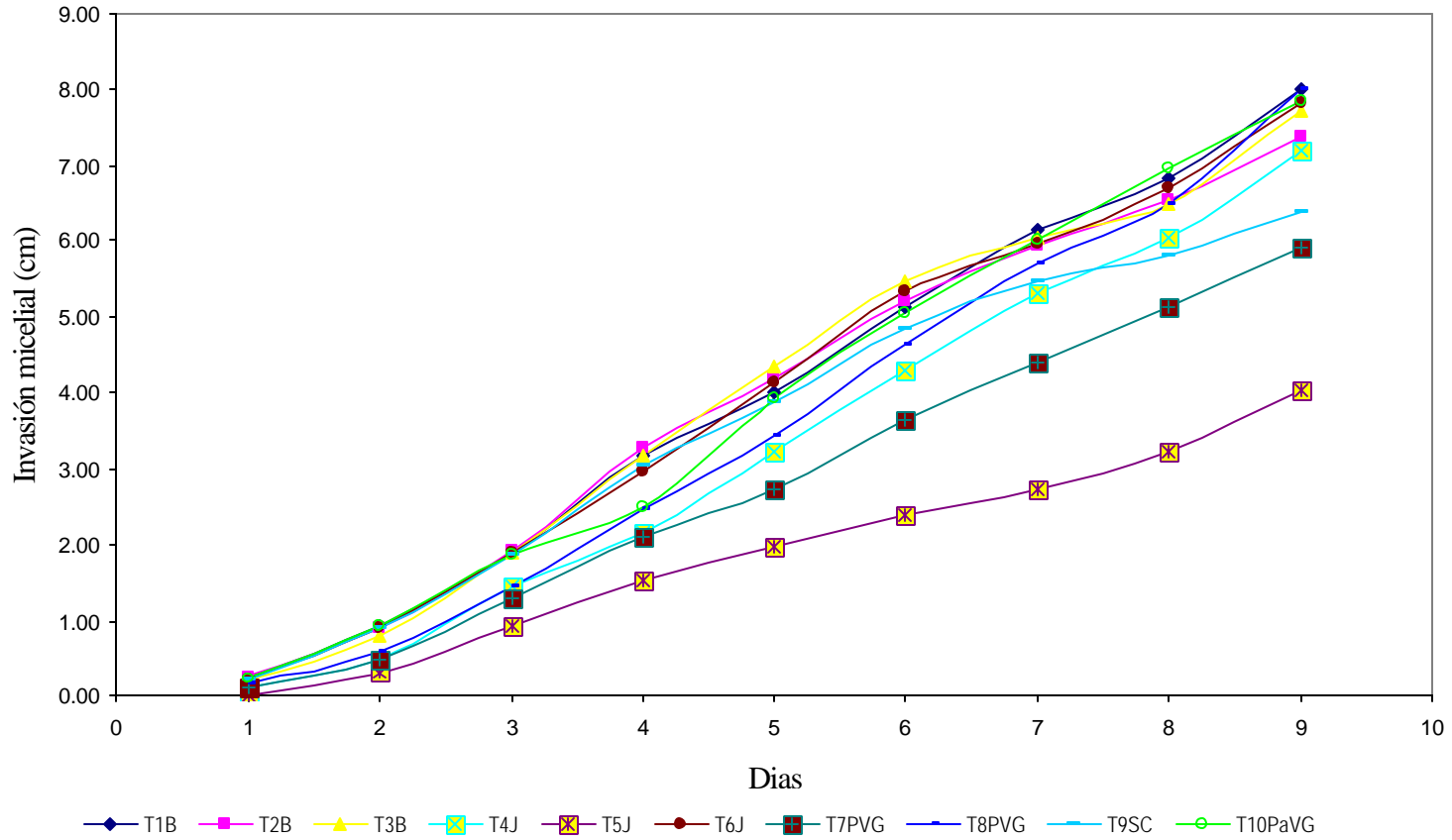


Figura 17. Curvas de invasión micelial para los aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre *Phytophthora infestans* 63



Análisis estadístico del tratamiento entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. & *P. infestans* 02. Para efectos de comparación entre las diferencias en las velocidades de invasión micelial se desarrolló un análisis de varianza (ANDEVA) y cuyos resultados se muestran a continuación:

Tabla 7. Promedios para las velocidades de invasión micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% Pi02

Tratamiento	Conteo	Promedio	Error estándar (individual)	Límite inferior	Límite superior
T10PaVG	24	0.895	0.575714	0.776738	1.01493
T1B	24	0.850	0.0385423	0.770269	0.929731
T2B	24	0.670	0.0401443	0.587788	0.753878
T3B	24	0.925	0.080138	0.759222	1.09078
T4J	24	0.704	0.0423406	0.616578	0.791755
T5J	24	0.250	0.0269191	0.194313	0.305687
T6J	24	0.791	0.0300463	0.729511	0.853822
T7PVG	24	0.650	0.0356106	0.576334	0.723666
T8PVG	24	0.845	0.0454364	0.751841	0.939826
T9SC	24	0.837	0.074165	0.684078	0.990922
Total	240	0.742			

Tabla 8. Análisis de varianza para las velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi02

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado promedio	Prueba – F	Valor – P
Entre grupos	8.35704	9	0.92856	15.42	0.0000
Al interior de los grupos	13.8479	230	0.0602083		
Total (corregido)	22.205	239			

En la tabla 7 se observa el promedio de las velocidades de invasión micelial para cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *P. infestans* 02 y los intervalos respectivos con un nivel de confianza del 95%. En la tabla 8 se puede apreciar que el valor P de la prueba F es menor de 0.05, asumiendo en consecuencia que existen diferencias estadísticamente significantes entre las velocidades promedio de invasión micelial.

Tabla 9. Test de rangos múltiples para velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi02

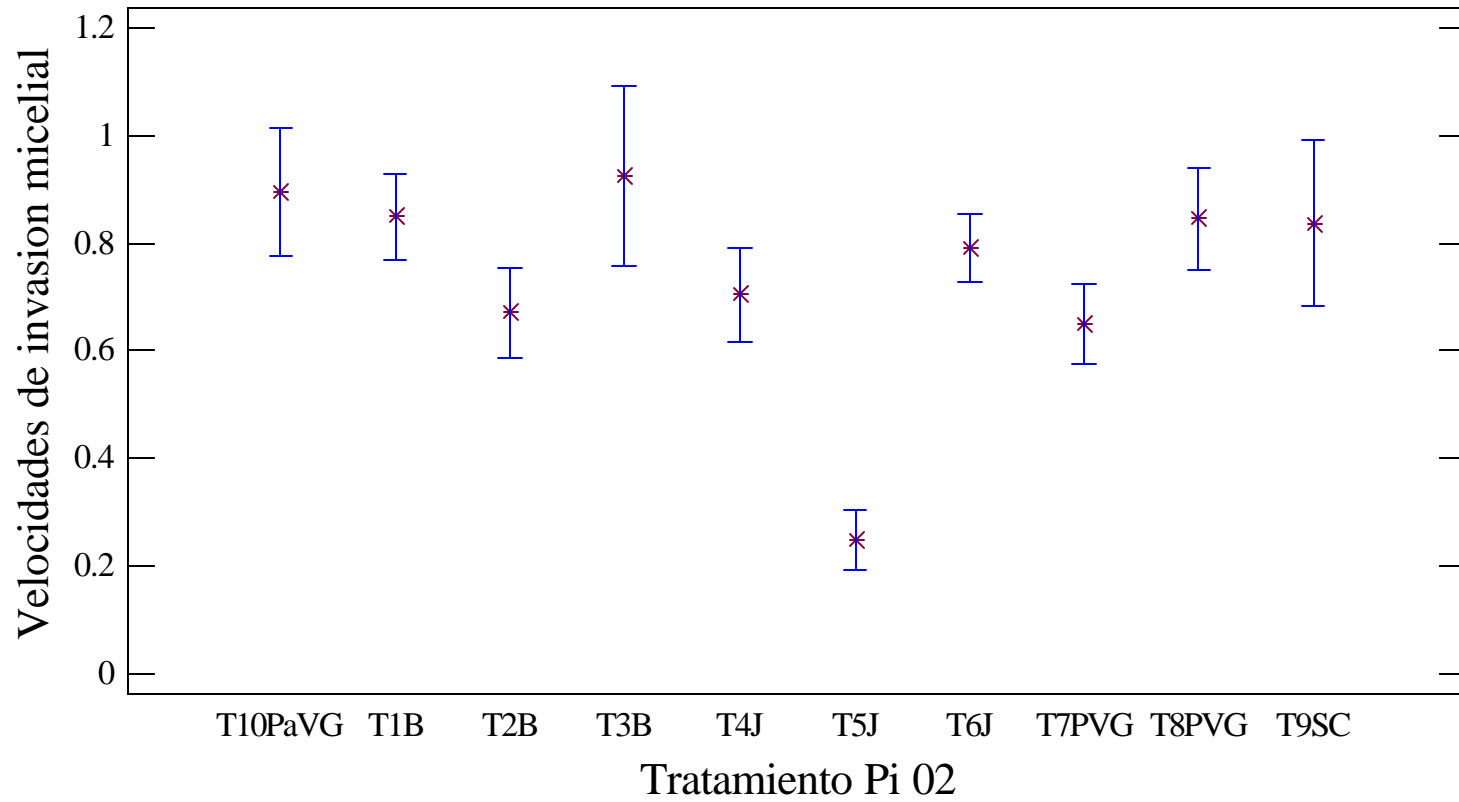
Nivel del método 95.0	Conteo porcentual	Promedio de Duncan	Grupos Homogéneos
T5J	24	0.25	X
T7PVG	24	0.65	X
T2B	24	0.670833	X
T4J	24	0.704167	XX
T6J	24	0.791667	XXX
T9SC	24	0.8375	XX
T8PVG	24	0.845833	XX
T1B	24	0.85	XX
T10PaVG	24	0.895833	X
T3B	24	0.925	X

El test de rangos múltiples (Tabla 9), permitió discriminar a los aislamientos de *Trichoderma* spp. en cuatro grupos de acuerdo a su capacidad invasora. El primer grupo está conformado por el aislamiento T5J. El segundo grupo por T7PVG, T2B, T4J y T6J. El tercer grupo por T4J, T6J, T9SC, T8PVG y T1B. El último grupo por T6J, T9SC, T8PVG, T1B, T10PaVG y T3B.

El grupo menos promisorio es el número uno conformado únicamente por un solo aislamiento, el T5J, con una velocidad de invasión micelial promedio de 0.25 cm/día. El grupo más promisorio fue el número cuatro con un rango de velocidad de invasión micelial de 1.09 a 0.68 cm/día. En la figura 18 y en el anexo I es posible observar en detalle las agrupaciones y comparaciones antes descritas.

En ambos casos, tanto para Pi02 y Pi63, el aislamiento de *Trichoderma* spp. menos promisorio fue T5J. Este aislamiento presentó un tipo particular de crecimiento, en el que esporulaba mientras crecía. Los demás aislamientos solo esporularon una vez habían cubierto por completo la caja de cultivo.

Figura 18. Promedios para las velocidades de invasión micelial para cada uno de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 02 con intervalos de confianza del 95%



Análisis estadístico del tratamiento entre los aislamientos de *Trichoderma* spp. & *P. infestans* 63. En este caso se aplicó las mismas pruebas estadísticas efectuadas para *P. infestans* 02.

Tabla 10. Promedios para las velocidades de invasión micelial por tratamiento con intervalos de confianza del 95% Pi63

Tratamiento	Conteo	Promedio	Error estándar (individual)	Límite inferior	Límite superior
T10PaVG	24	0.954	0.0607857	0.828422	1.07991
T1B	24	0.962	0.0429073	0.873739	1.05126
T2B	24	0.900	0.054507	0.787243	1.01276
T3B	24	0.941	0.0709451	0.794905	1.08843
T4J	24	0.887	0.0617711	0.759716	1.01528
T5J	24	0.504	0.033772	0.434304	0.57403
T6J	24	0.950	0.050361	0.84582	1.05418
T7PVG	24	0.725	0.035227	0.652127	0.797873
T8PVG	24	0.979	0.0616733	0.851586	1.10675
T9SC	24	0.775	0.0665533	0.637324	0.912676
Total	240	0.857			

Tabla 11. Análisis de varianza para las velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi63

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado promedio	Prueba – F	Valor – P
Entre grupos	4.86537	9	0.540597	7.38	0.0000
Al interior de los grupos	16.8396	230	0.0732156		
Total (corregido)	21.705	239			

En la tabla 10 se observa el promedio de las velocidades de invasión micelial para cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *P. infestans* 63 y los intervalos respectivos con un nivel de confianza del 95%. En la tabla 11 se puede observar que el valor P de la prueba F es menor de 0.05, asumiendo en consecuencia que existen diferencias estadísticamente significantes entre las velocidades promedio de invasión micelial.

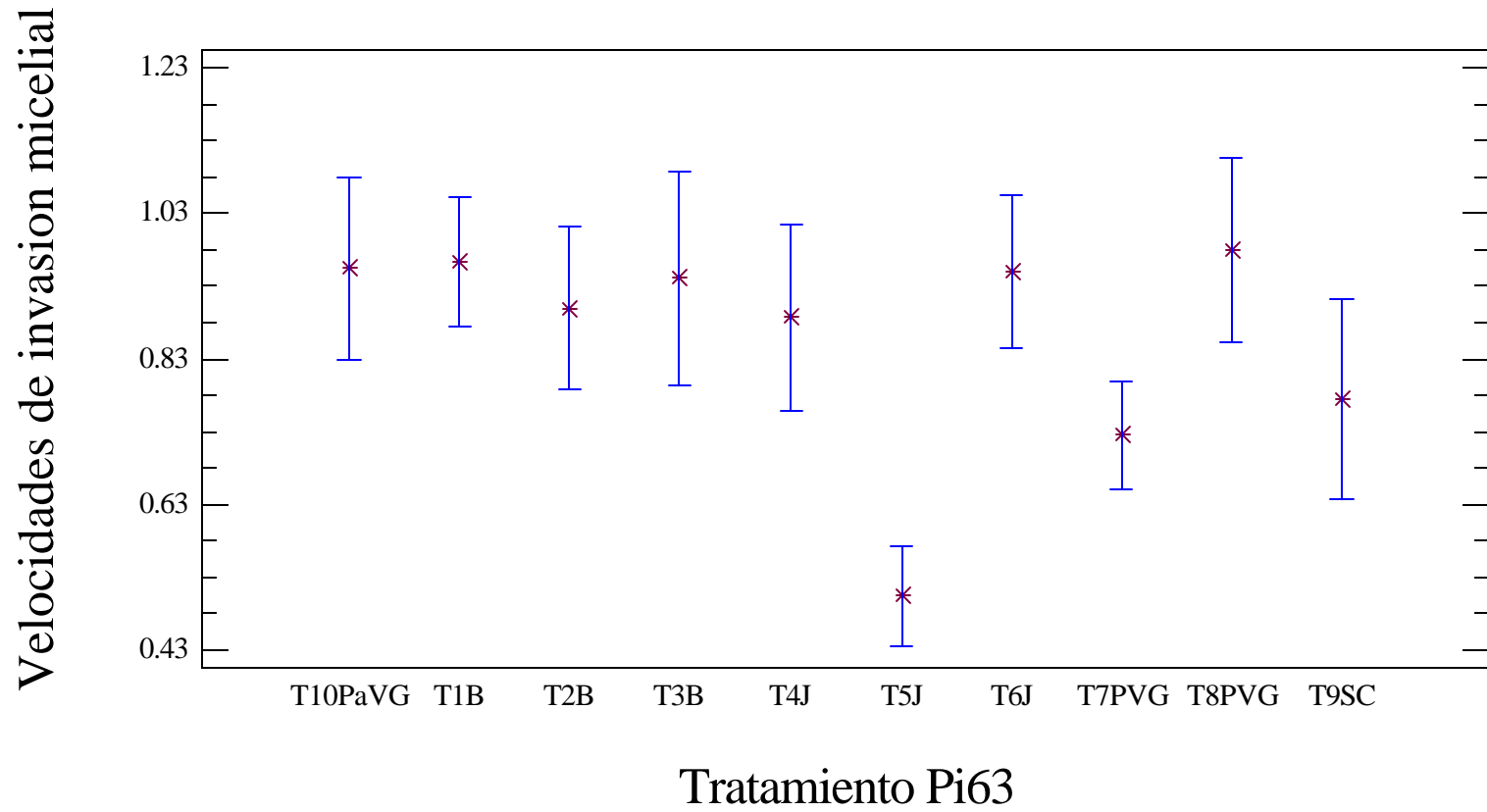
Tabla 12. Test de rangos múltiples para velocidades de invasión micelial por tratamiento Pi63

Nivel del método 95.0	Conteo porcentual	Promedio de Duncan	Grupos homogéneos
T5J	24	0.504167	X
T7PVG	24	0.725	X
T9SC	24	0.775	XX
T4J	24	0.8875	XX
T2B	24	0.9	XX
T3B	24	0.941667	XX
T6J	24	0.95	X
T10PaVG	24	0.954167	X
T1B	24	0.9625	X
T8PVG	24	0.979167	X

El test de rangos múltiples (Tabla 12) permitió discriminar a los aislamientos de *Trichoderma* spp. en cuatro grupos de acuerdo a su capacidad invasora frente a *P. infestans* 63. El primer grupo está conformado por el aislamiento T5J. El segundo grupo por T7PVG y T9SC. El tercer grupo por T9SC, T4J, T2B y T3B. El último grupo por T4J, T2B, T3B, T6J, T10PaVG, T1B y T8PVG.

El grupo menos promisorio es el numero uno conformado únicamente por un solo aislamiento, el T5J, con una velocidad de invasión micelial promedio de 0.50 cm/día. El grupo mas promisorio fue el numero cuatro con un rango de velocidad de invasión micelial de 1.11 a 0.76 cm/día. En la figura 19 y en el anexo H es posible observar en detalle las agrupaciones y comparaciones antes descritas.

Figura 19. Promedios para las velocidades de invasión micelial para cada uno de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 63 con intervalos de confianza del 95%



4.3.2 Prueba de antibiosis. Inicialmente la prueba de antibiosis se desarrolló con un enfoque cuantitativo, en donde el efecto antibiótico había de ser medido como halo de inhibición. Dado que no fue posible medir el halo, al no ser éste simétrico, se recurrió a una valoración cualitativa. Se determinó con base en controles positivo y negativo la presencia o no de inhibición, reportándose como positivo o negativo respectivamente (Figura 20, anexo G).

En consecuencia, para efectos de análisis estadístico se recurrió a una tabla de frecuencias y a un test de Chi – cuadrado para cada uno de los aislados de *P. infestans* (02 y 63).

Tabla 13. Frecuencias y porcentajes de inhibición observados en los diez tratamientos con antibióticos producidos por *Trichoderma* spp. sobre Pi02

Tratamiento	Negativos	Positivos	Total Fila
T10PaVG	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
T1B	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T2B	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T3B	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T4J	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T5J	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
T6J	1 3.33%	2 6.67%	3 10.00%
T7PVG	1 3.33%	2 6.67%	3 10.00%
T8PV	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
T9SC	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
Total	22	8	30
Columna	73.33%	26.67%	100.00%

Tabla 14. Test de Chi – cuadrado para Pi02.

Chi - cuadrado	Grados de libertad	Valor – P
9.55	9	0.3885

Figura 20. Distribución frecuencial de la inhibición observada para cada uno de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 02.

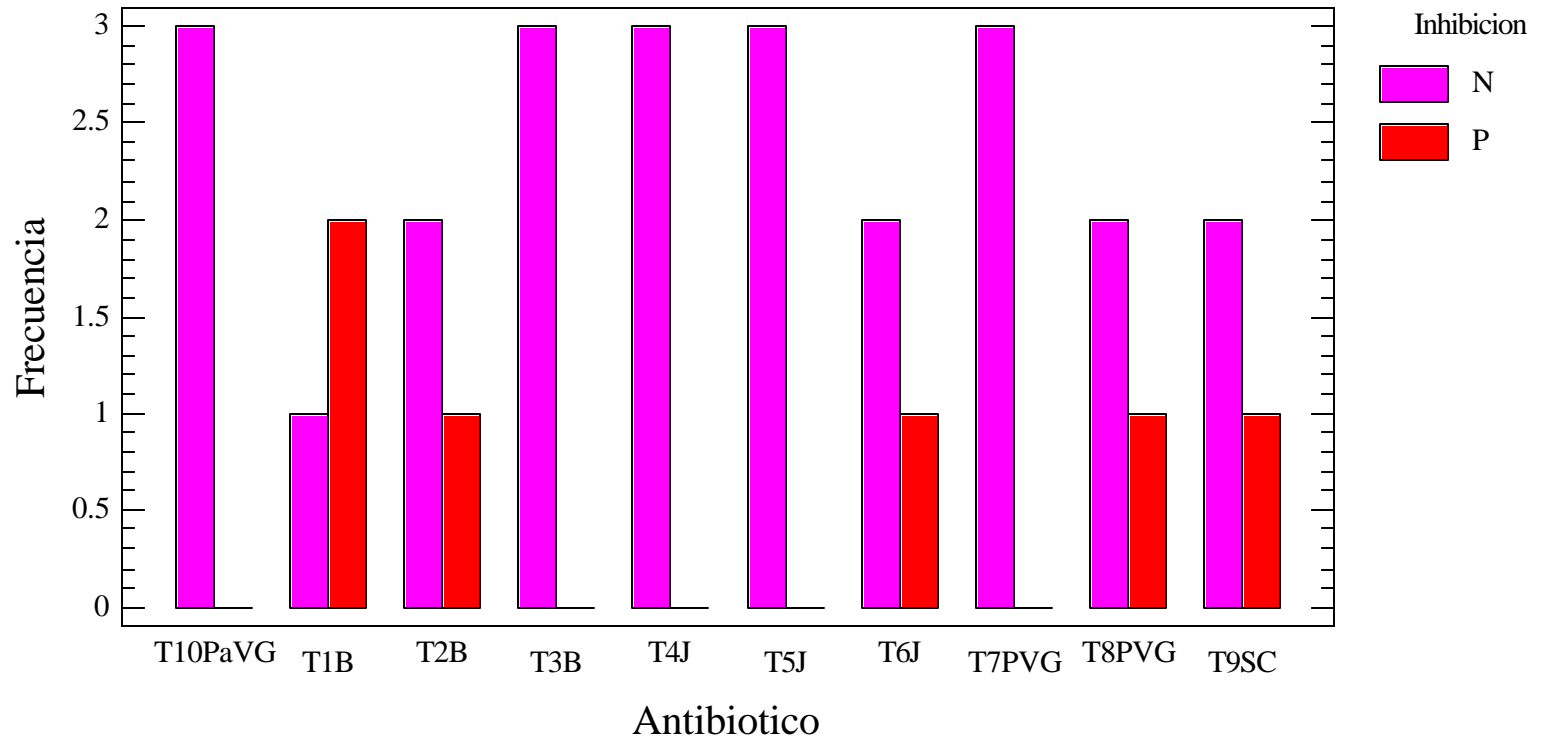


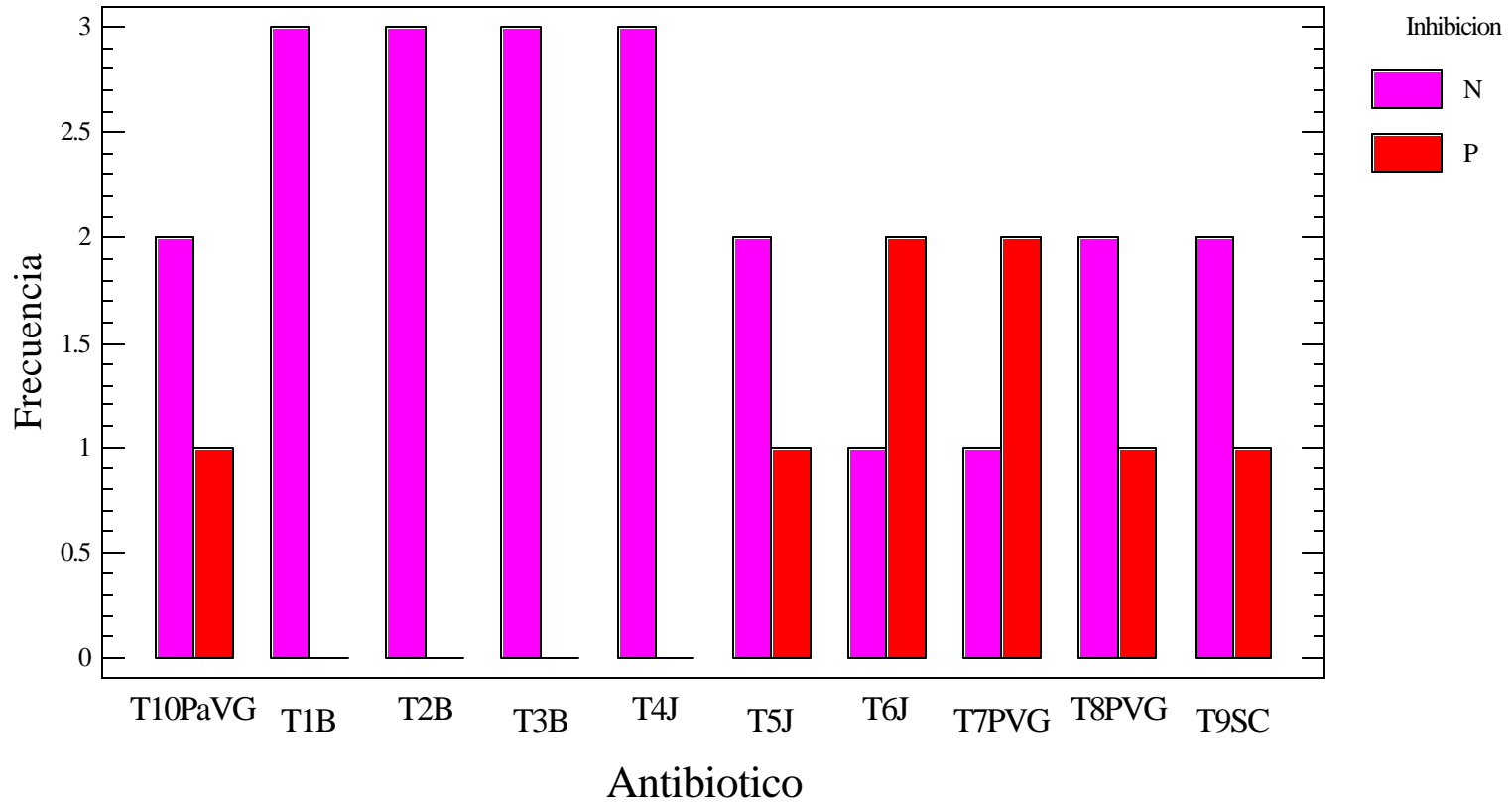
Tabla 15. Frecuencias y porcentajes de inhibición observados en los diez tratamientos con antibióticos producidos por *Trichoderma* spp. sobre Pi63

Tratamiento	Negativos	Positivos	Total Fila
T10PaVG	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T1B	1 3.33%	2 6.67%	3 10.00%
T2B	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
T3B	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T4J	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T5J	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T6J	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
T7PVG	3 10.00%	0 0.00%	3 10.00%
T8PVG	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
T9SC	2 6.67%	1 3.33%	3 10.00%
Total	24	6	30
Columna	80.00%	20.00%	100.00%

Tabla 16. Test de Chi – cuadrado para Pi63

Chi - cuadrado	Grados de libertad	Valor – P
9.17	9	0.4220

Figura 21. Distribución frecuencial de la inhibición observada para cada uno de los antibióticos extraídos de los diez aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 63.

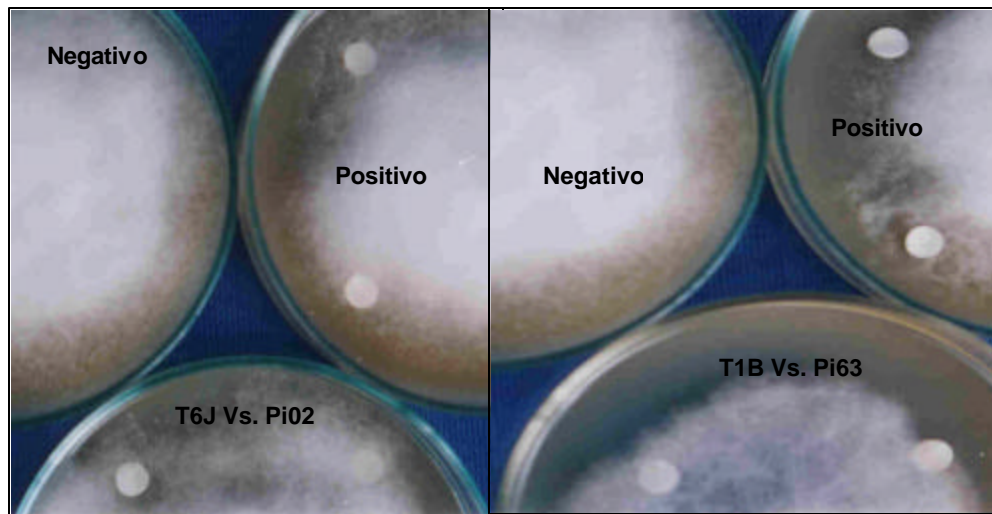


Las tablas y figuras de frecuencias muestran que tan a menudo cada uno de los antibióticos obtenidos a partir de los 10 aislamientos de *Trichoderma* spp. presentaron efectos positivos o negativos para la inhibición. El primer número en cada celda de la tabla es el conteo o frecuencia; el segundo número muestra el porcentaje de la tabla entera representado por esa celda.

En el caso de Pi02 se presentó un 73.33% de casos negativos, frente al 80.00% en el caso de Pi63. Pi02 fue inhibida con mayor frecuencia (6.67%) por los aislamientos T6J y T7PVG. Para Pi63 la mayor frecuencia de inhibición se presenta con el aislamiento T1B (6.67%). En ningún caso en las tres repeticiones se presentaron inhibiciones positivas, y esto se vio reflejado en el test de Chi - cuadrado.

El test de Chi – cuadrado lleva a cabo una prueba de hipótesis para determinar si se rechaza o no la idea de que las clasificaciones en filas y columnas son independientes. Dado que el valor de P, en las pruebas con Pi02 y Pi63, tuvo un valor superior a 0.10, no se puede descartar la hipótesis de que filas y columnas son independientes. En consecuencia, el valor observado para cada antibiótico puede no tener ninguna relación con su capacidad inhibitoria. La observación de las figuras 21 y 22 deja entrever que los positivos y los negativos están distribuidos aleatoriamente, lo que implica que ninguno de los tratamientos fue totalmente positivo o negativo.

Figura 22. Efecto inhibitorio de los antibióticos extraídos de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* 02 (izq.) y 63 (der.).



Muchos aislamientos de *Trichoderma* spp. producen antibióticos volátiles y no volátiles. Howell y Stipanovic en⁷³ aislaron y descubrieron un antibiótico, la glovirina a partir de *Gliocladium (Trichoderma) virens* que produjo una fuerte inhibición sobre *Pythium ultimum* y a especies de *Phytophthora*. Sivan *et al*⁷⁴. reportaron que el crecimiento de *Trichoderma* cultivado sobre una membrana de celofán colocada sobre el agar, posteriormente la membrana fue removida y el agar inoculado con *Pythium*, demostraron que el crecimiento del patógeno fue parcialmente inhibido.

Peltola *et al.*, afirman que. “*Trichoderma harzianum* es una de las especies fúngicas más estudiadas con propósitos de biocontrol, se sabe que produce compuestos volátiles y no volátiles efectivos contra fitopatógenos. Se asume que retarda la producción de moléculas de peptaibol, las cuales combinadas con la producción de enzimas hidrolíticas inhiben fuertemente el crecimiento de patógenos vegetales”⁷⁵.

No obstante, Ozbay & Newman, reportan que: La mayoría de los intentos para correlacionar *in vitro* la antibiosis producida por *Trichoderma* en contra de fitopatógenos con lo que realmente sucede en sistemas naturales han fallado. La revisión de literatura ha demostrado que las especies de *Trichoderma* secretan un número de antibióticos incluyendo: pironas, isocianatos, péptidos, peptaibols y trichotenos, ya sea o no que estos metabolitos antifúngicos son relativos al biocontrol bajo condiciones de campo

⁷³ HOWELL, C.R. and STIPANOVIC, R.D. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Canada : Canadian. J. Microbiology, 1983. p. 29.

⁷⁴ SIVAN, A., ELAD, Y. and CHET, I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology. USA : s.n., 1984 p. 74

⁷⁵ PELTOLA, Joanna. *et. al.* Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. In: Applied and environmental microbiology. (Aug. 2004);. p. 4996-5004

5. CONCLUSIONES

- ? De los diez aislamientos de *Trichoderma* spp., T5J, proveniente de suelo de jardín, mostró una baja capacidad de invasión micelial, presentando a su vez una menor pendiente en las curvas de crecimiento observadas en los tratamientos tanto para Pi02 como para Pi63.
- ? Los aislamientos T10PaVG y T8PVG presentaron los más altos promedios de invasión micelial y por ende las mayores pendientes en las curvas de crecimiento; con valores de 0.954 y 0.994 para los tratamientos entre Pi02 y Pi63 respectivamente.
- ? El análisis de varianza para las velocidades de invasión micelial de los tratamientos Pi02 y Pi63 arrojó un valor P de la prueba F menos de 0.05; asumiendo en consecuencia, que existen diferencias altamente significativas entre las velocidades promedio.
- ? Entre los grupos más promisorios que se destacaron por su gran capacidad invasora frente a Pi02 son los conformados por: T7PVG, T2B, T4J y T6J; T4J, T6J, T9SC, T8PVG y T1B; T6J, T9SC, T8PVG, T1B, T10PaVG y T3B.
- ? En el tratamiento frente a Pi63, los grupos más homogéneos son los conformados por los aislados T7PVG y T9SC; T9SC, T4J, T2B y T3B; T4J, T2B, T3B, T6J, T10PaVG, T1B y T8PVG; presentando una buena capacidad parasítica invasora.
- ? En el análisis de Frecuencias de la prueba de antibiosis, Pi02 presentó un 73.33% de casos negativos, frente al 80.00% en el caso de Pi63
- ? Pi02 fue inhibida con mayor frecuencia (6.67%) por los aislamientos T6J y T7PVG. Para Pi63 la mayor frecuencia de inhibición se presentó con el aislamiento T1B (6.67%).
- ? 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 aislados de *Phytophthora infestans* (02, 63); debido a que los resultados obtenidos están distribuidos de una manera aleatoria dentro de los tratamiento realizados.

6. RECOMENDACIONES

- ? Se debe comprobar la capacidad parasítica e invasora de los aislamientos de *Trichoderma* spp., llevando a cabo un ensayo *in vivo*.
- ? Se sugiere desarrollar mejores métodos para la extracción y concentración de antibióticos e implementar diversas técnicas para determinar el efecto inhibitorio sobre el patógeno.
- ? Es conveniente utilizar esporas de *Trichoderma* producidas en sistemas de fermentación sólidos, para evaluar la efectividad antagónica en campo.
- ? Debe de evaluarse la sensibilidad de los aislados de *Trichoderma* spp. frente a los fungicidas actualmente utilizados en el manejo químico del tizón tardío en papa.
- ? Se recomienda realizar un antagonismo *in vitro* entre los aislados de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes de otros hospederos como tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*).

BIBLIOGRAFIA

- ABAD, G.J. *Phytophthora infestans* en la zona central del Perú: Razas, patotipos, especialización fisiológica, tipos de compatibilidad, resistencia de variedades y rangos de hospederos. Lima, Perú, 1983 75 p. Tesis de grado (M.Sc. Mimeografiada). Universidad Nacional Agraria La Molina. Programa académico de graduados.
- AGRIOS, G.N. Fitopatología. 2 e.d. México : Limusa, 1985 405 . p.
- ANDRIVON, D. Biology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. Mini Rev. s.I. : sn. 1995. 140 p.
- ARANGO QUINTANA, Pablo. Manejo de gota en papa. En: Agricultura Tropical. Vol. 31 No. 1 (1994); 119-120
- BRASSIER, C.M. Evolucionary Biology of *Phytophthora*. USA: Annual Rev. Phytopathology, 1992 130 p.
- BENAVIDES, Dexy y MONCAYO, Blanca. Caracterización aloenzimática de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Departamento de Nariño. San Juan de Pasto, 2002. 135 p. Trabajo de grado. (Biólogas). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de Biología.
- BENAVIDES ROSERO, Miguel. Protección sanitaria del cultivo de la papa para programas de manejo integrado de plagas. En: Papas colombianas. FEDEPAPA. Vol. 3 No. 1. (2000); p. 62-63.
- BIOCONTROL. Monografía *Trichoderma* spp. [en línea] 2004. [citado Sep., 2004]. Disponible en Internet : <URL.<http://control-biologico.com>> p. 25.
- BRASSIER, C.M. 1992. Evolucionary Biology of *Phytophthora*. USA : Annual Rev. Phytopathology, 1992. 250 p.
- BURBANO ROSERO, Edith Mariela y LEÓN GUEVARA, Olga Deyanira. 1998. Aislamiento y caracterización parcial de *Penicillium* y *Cephalosporium* a partir de aguas residuales y su acción *in vitro* sobre las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Tesis de grado. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de Biología. San Juan de Pasto.
- CALVO, G.; *et. al.* Report of the advance about the validation of technologies of integrated pest management in tomato in the west of the central valley 1991-1992. Costa Rica : First report. CATIE, 1992. 270 p.

CASTAÑO, Jairo. Resúmenes. Manejo del tizón tardío de la papa: Estado actual. en: Papas Colombianas. Colombia : s.n. 1996. 330 p.

CHET, I. & INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. In: Applied biochemistry and Biotechnology . USA : s.n., 1994. 130 p.

CONTROLADORES BIOLÓGICOS. Perspectivas del control biológico de enfermedades de plantas. [en línea] 2005. [Citado aGOS., 2004]. Disponible en Internet : <URL.<http://www.controladoresbiologicos.cl>>.

COOMBS, J. Diccionario de Biotecnología. Barcelona : Labor, 1989. Barcelona. 423 p.

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

DENNIS, C. y WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 (1). 25-39.

DRENT, A., JANSSEN, E.M. and GOVERS, F. Formation and survival of spores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. USA : Plant Pathol, 1995. 187 p.

ERWIN, D.C. and RIBEIRO, O.K. Diseases worldwide. Paul. Minnesota : APS Press. The American Phytopathological Society. St., 1996. 130 p.

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

GALINDO, J. and GALLEGLY, M.E. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. Phytopathology s.I. : s.n., 1960. 130 p.

GRIFFITH, G.W., SNELL, S. and SHAW, D.S. Late blight (*Phytophthora infestans*) on tomato in the tropics. USA : The Mycologist, 1995. 150 p.

_____. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. USA : Applied of environmental microbiology. 1998 4014 p.

GONSTINCAN, T.J. Biblioteca de la agricultura. 2 ed. España : Idea Bookssa, 1998. 120 p.

HARMAN, G.E. 2001. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. koningi*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system). [en línea]. 2001. [citado Agos., 2004]. Disponible en Internet: <URL : <http://www.birdhybrids.com/t-22.html>>

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

HENFLING, J.W. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. En : Boletín de Información Técnica 4. Lima Perú : Centro Internacional de la Papa (CIP), 1987. p. 25

HERRERA ESTRELLA, A. y CARSOLIO, C. Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos: avance y perspectiva. s.p.i, 1998 204 p.

HOWELL, C.R. and STIPANOVIC, R.D. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Canada : Canadian. J. Microbiology, 1983. 220 p.

INFOAGRO. Control biológico de plagas. [en línea] 2005. [citado Sep. 2004]. Disponible en Internet : <URL.http://www.infoagro.com>

KAMOUN, S. Basic Biology: Information of mechanisms that make *Phytophthora infestans* a pathogen. In: GILB'02 CONFERENCE Late blight: managing the global threat. Abstracts. 11-13 July. Germany. : s.n., 2002. 944 p.

KO, W.H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. s.I. : Annual Review Phytopathology, 1988. 73 p.

LAGOS MORA, Luz Estela. 2002. Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en las zonas productoras de papa *Solanum tuberosum* L. en el Departamento de Nariño. Santiago de Calí, 2002. 134 p. Tesis de Maestría. (Bióloga). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

LEGARD, D.E., LEE, T.Y. and FRY, W.E. Phytopathology. USA : s.n. 1995. 1460 p.

LORITO, M. Chitinolytic enzymes and their genes. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. En : Kubicek, C.P. & Harman, G.E. editors, 1998, Vol. 2. 350 p.

MANDELS, G.R. The Fungi: the fungal cell. Volume I. Edited by: G.C. Ainsworth & Alfred S. Sussman. Academy Press. Chapter 25: Kinetics of Fungal Growth. 1965. New York, 1965 p. 780

ORTIZ, Luz Yineth; et. al. Determinación del ácido abscísico en papa (*Solanum* sp.) como respuesta a bajas temperaturas. En: Agronomía Colombiana. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá : Vol. 18 No. 1-3. (Dic., 2001); 31 p.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. In: Annual review of Phytopathology., 1985 54 p.

PELTOLA, Joanna. *et. al.* Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. In: Applied and environmental microbiology. (Aug. 2004); p. 4996-5004

PINEDA, R. 2000. Ministerio de Agricultura. CEVIPAPA. Plan Nacional de Semilla. En: Papas colombianas. Vol. 3 No. 1-2. (2000); p. 53-55.

PIÑA, R.N. y SANABRIA, J.N. Fitopatología En : CONGRESO NACIONAL DE FITOPATOLOGIA. (29° : 1998 : Bogotá). Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Bogotá : s.n., 1998. 80 p.

RAVEN, P.H., EVERT., R.F., and EICHHORM, S.E. Biology of Plants. Six edition. New York. W.H. Freeman and Company., 1999. 944. p.

REY, Manuel; *et a.l.* Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. En: Revista Iberoamericana de Micología. No. 17. (2000); p. 31-36.

SALUDCOOP, E.P.S. Manual de bioseguridad para todos los profesionales de la salud. Bogotá : SALUDCOOP, E.P.S., 2001. 70 p

SANCHEZ, et. Al. Control microbiológico de *Phytophthora infestans* en tomate. En: Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. No. 51. (1999); p. 47-58.

SAÑUDO, Benjamín.; et. al. Fundamentos para el manejo microbiológico de suelos tropicales. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2001. 130 p.

_____. Fundamentos de micología agrícola. San Juan de Pasto : Universitaria. Universidad de Nariño, 2001. p. 201

SAÑUDO, Benjamín. Principios de control biológico de fitopatógenos San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 1994. p. 201

SIVAN, A., ELAD, Y. and CHET, I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology. USA : s.n., 1984 270 p.

SMART, C.D.; SANDROCK, R.W. and FRY, R. 2000. Molecular techniques and mystery of the potato late blight pathogen. Plant microbe interactions. Vol. 5. Edited by Gary Stacey and Noel Keen. 336 p. APS (American Phytopathology Society) Press. St. Paul Minnesota. United States of America. p. 21-41

TROSNO, A. y GORDON, L. Biological control with *Trichoderma* species. USA : Marcel Dekke, 1998. 442 p.

URQUIJO, P.; RODRIGUEZ, Z. J. y SANTAOLALLA, G. Patología vegetal agrícola: enfermedades de las plantas. Barcelona : Salvat, 1961 . 182 p.

- VALBUENA, R. y SÁNCHEZ DE LUQUE, C. Técnicas de termoterapia y cultivo *in vitro* para la obtención de material de papa (*Solanum spp.*) libre de virus. Tunja : INIAC. UPTC, 1986. 220 p.
- VILLEGAS E, Bernardo. 1996. Resúmenes. Manejo del tizón tardío de la papa: estado actual. En: Papas colombianas. p. 258-259
- VILLEGAS E, Bernardo y CASTAÑO Z, Jairo. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma spp.* para el control de *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schrbeter, causante de la pudrición de la corona y raíz del manzano (*Mallus domestica* Borkh.) en Caldas. En: Fitopatología. Caldas. No. 32. (Oct., 1999): p. 7.
- VILLEGAS JARAMILLO, Sonia. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín, 2003, 137 p. Monografía (Biólogo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- WAINWRIGTH, M. Biotecnología de hongos. Primera edición. Editorial Acribia S.A. España. 1995 286 p.
- WELLS, H.D.; BELL, D.K. and JAORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent for *Sclerotium rolfsii*. In: Phytopathology. (1972); p. 442-447.
- ZAVALETA MEJÍA, E. Control biológico de fitopatógenos. En : CURSO DE CONTROL BIOLÓGICO. (5° : 1994 : México). Memorias del V curso de control biológico. México : Sociedad mexicana de control biológico. 225 p.



ANEXOS

Anexo A. Composición medios de cultivo

? 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 H_2SO_4 (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.

? AGAR PAPA DEXTROSA

Fórmula (gramos por Litro)

- Extracto de papa 4.0
- Glucosa 20.0
- Agar 15.0
- pH 5.6 ± 0.2

Preparación: se disuelven 39 gramos de PDA en un litro de agua destilada, se hierve la solución y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se sirve en cajas petri estériles y se guardan en refrigeración envueltas en papel cristaflex por un tiempo no superior a 30 días.

Anexo B. 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 C. Concentraciones de hipoclorito de sodio utilizadas en laboratorio

Superficies, mesas y equipos	500 p.p.m
Pisos (rutinario)	1.000 p.p.m
Material de vidrio	5.000 p.p.m
Derrames	10.000 p.p.m

Fuente: Saludcoop, E.P.S. 2001.

Para preparar la concentración de hipoclorito de sodio requerida, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración Hipoclorito} = \frac{\text{volumen en Litros a preparar} \times \text{p.p.m. requerida}}{\text{concentración del producto} \times 10}$$

Anexo D. Concentración del fungicida fosetil – aluminio utilizado como control positivo en la prueba de antibiosis

La muestra presenta una pureza del 80%, por lo tanto lo primero que se realiza es una corrección de pureza:

$$2 \text{ p.p.m. (100\%)} = 2 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$\begin{array}{cc} 2 \text{ mg} & 100\% \\ \text{X} & 80\% \end{array}$$

$$X = \frac{2 \text{ mg} \times 100\%}{80\%} = 2.5 \text{ mg} \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0.0025 \text{ g}$$

$$2 \text{ p.p.m. (80\%)} = 2.5 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Para mayor comodidad, es aconsejable preparar una solución a 500 p.p.m y luego diluirla hasta la concentración requerida, en este caso a 2 p.p.m.

$$500 \text{ p.p.m.} = 500 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0.5 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} 500 \text{ p.p.m.} \times V &= 2 \text{ p.p.m.} \times 1000 \text{ ml} \\ V &= 4 \text{ ml} \end{aligned}$$

Entonces: 4 ml + 996 ml de agua destilada estéril.

CONSIDERACIONES GENERALES

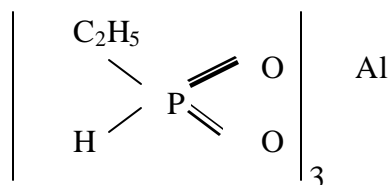
Nombre común: Fosetil de Aluminio
(Fosetil – Al o Efosite – Al)

Nombre químico: (IUPAC CAS)
Aluminio tris-o-ethylphosphonato

Grupo químico: Alcoyl – fosfonatos

Fórmula empírica: $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{AlO}_9\text{P}_3$

Fórmula estructural:



Presión de vapor: menos de 10^{-7} Pa
Solubilidad: 111.3 g/L en agua (pH: 6.0).

El Fosetil – Al tiene la característica de activar ciertos mecanismos de defensa que existen en las plantas atacadas por patógenos estimulando la producción de sustancias fungitóxicas y/o fungistáticas. El Fosetil – Al una vez aplicado es absorbido por las plantas y se transloca en forma ascendente y descendente, controlando la enfermedad en raíz, tallos, rebrotes y hojas de plantas afectadas.

Anexo E. Invasión micelial en cm/día pi63

<i>Phytophthora infestans</i> 63 Vs. <i>Trichoderma</i>											
<i>Trichoderma</i> spp.		Día (cm invasión)									Promedio
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
T1B	1	0.20	1.00	1.90	3.20	4.00	5.10	6.10	6.90	8.10	8.00
	2	0.20	0.90	1.90	3.20	4.00	5.20	6.20	6.80	7.90	
	3	0.30	0.90	1.90	3.10	4.00	5.10	6.10	6.80	8.00	
T2B	1	0.30	1.00	2.00	3.40	4.40	5.50	6.30	6.90	7.90	7.40
	2	0.30	1.00	2.00	3.40	4.40	5.50	6.30	6.90	7.90	
	3	0.20	0.70	1.80	3.00	3.80	4.60	5.20	5.90	6.40	
T3B	1	0.20	0.90	2.00	3.10	4.20	5.00	5.60	6.20	7.30	7.73
	2	0.20	0.70	1.80	3.30	4.50	5.80	6.50	6.80	8.20	
	3	0.20	0.80	1.90	3.10	4.30	5.60	6.00	6.50	7.70	
T4J	1	0.10	0.60	1.40	2.00	2.90	3.80	4.80	5.70	6.40	7.20
	2	0.10	0.50	1.50	2.20	3.40	4.60	5.60	6.20	7.90	
	3	0.10	0.40	1.50	2.30	3.40	4.50	5.50	6.20	7.30	
T5J	1	0.00	0.30	1.00	1.60	2.00	2.50	2.80	3.30	4.00	4.03
	2	0.00	0.30	0.90	1.50	1.90	2.30	2.70	3.20	4.00	
	3	0.00	0.30	0.90	1.50	2.00	2.40	2.70	3.20	4.10	
T6J	1	0.30	1.00	1.90	2.90	3.90	5.00	5.60	6.40	7.80	7.83
	2	0.20	0.80	1.80	3.00	4.20	5.50	6.10	6.80	7.80	
	3	0.20	0.90	2.00	3.00	4.30	5.50	6.20	6.90	7.90	
T7PVG	1	0.10	0.50	1.30	2.10	2.80	3.80	4.70	5.50	6.20	5.90
	2	0.10	0.50	1.30	2.10	2.60	3.50	4.00	4.60	5.50	
	3	0.10	0.50	1.30	2.10	2.80	3.60	4.50	5.30	6.00	
T8PVG	1	0.20	0.70	1.50	2.50	3.50	4.70	5.70	6.40	8.00	8.00
	2	0.10	0.50	1.40	2.40	3.40	4.60	5.80	6.60	8.00	
	3	0.20	0.60	1.50	2.50	3.40	4.60	5.60	6.50	8.00	
T9SC	1	0.20	0.90	1.80	2.70	3.90	5.20	6.20	6.40	6.80	6.40
	2	0.20	0.90	1.80	3.20	3.70	4.50	5.20	5.50	6.20	
	3	0.20	0.90	2.00	3.20	4.00	4.80	5.00	5.50	6.20	
T10PaVG	1	0.20	0.90	1.80	2.50	3.80	4.80	5.70	6.20	7.50	7.87
	2	0.30	1.00	1.90	2.50	4.00	5.00	6.20	7.30	8.00	
	3	0.20	0.90	1.90	2.50	4.00	5.30	6.10	7.40	8.10	

Anexo F. Invasión micelial en cm/día pi02

<i>Phytophthora infestans</i> 02 Vs. <i>Trichoderma</i>											
<i>Trichoderma</i>	Día (cm invasión)										Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
T1B	1	0.20	0.90	1.60	2.60	3.20	4.00	4.90	5.50	6.40	7.07
	2	0.30	1.00	1.80	3.00	3.80	5.10	6.00	7.00	7.80	
	3	0.30	1.00	1.70	2.80	3.50	4.50	5.40	6.40	7.00	
T2B	1	0.30	0.70	1.20	2.00	2.40	3.00	3.50	3.90	4.60	5.63
	2	0.20	0.80	1.50	2.50	3.00	3.80	4.50	5.40	6.00	
	3	0.30	0.80	1.50	2.50	2.90	3.70	4.50	5.50	6.30	
8T3B	1	0.00	0.40	1.10	2.00	2.70	3.30	4.00	4.50	5.50	6.73
	2	0.00	0.60	1.60	2.80	4.00	5.40	6.30	7.00	7.80	
	3	0.00	0.50	1.40	2.40	3.30	4.70	5.40	6.00	6.90	
T4J	1	0.00	0.40	1.00	1.70	2.60	3.80	4.70	5.60	6.20	5.63
	2	0.00	0.40	1.10	1.80	2.50	3.40	4.00	4.50	5.30	
	3	0.00	0.40	0.90	1.60	2.40	3.30	3.70	4.60	5.40	
T5J	1	0.00	0.10	0.50	1.00	1.50	1.50	1.70	1.90	2.00	2.00
	2	0.00	0.10	0.40	0.70	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	
	3	0.00	0.10	0.50	0.90	1.20	1.60	1.80	2.00	2.20	
T6J	1	0.40	1.10	2.00	2.90	3.40	4.20	5.00	5.80	6.30	6.70
	2	0.30	0.90	1.70	2.50	3.30	4.30	5.20	5.90	6.60	
	3	0.40	1.20	3.10	3.20	3.90	4.90	5.60	6.50	7.20	
T7PVG	1	0.20	0.60	1.40	1.90	2.50	3.20	3.70	4.40	4.90	5.37
	2	0.10	0.50	1.60	2.40	3.10	4.00	4.90	5.50	6.00	
	3	0.20	0.70	1.50	2.10	2.70	3.50	4.00	4.60	5.20	
T8PVG	1	0.30	0.80	1.70	2.60	3.30	4.30	5.50	6.30	7.20	7.37
	2	0.30	0.90	2.00	3.20	4.20	5.70	6.30	6.90	7.50	
	3	0.20	0.80	1.80	2.80	3.70	4.90	5.80	6.70	7.40	
T9SC	1	0.10	0.60	1.70	2.90	3.90	5.20	6.30	6.90	7.40	6.80
	2	0.00	0.50	1.30	2.00	2.70	3.70	4.40	5.10	5.70	
	3	0.20	0.60	1.60	2.60	3.20	5.20	6.30	6.90	7.30	
T10PaVG	1	0.30	0.90	2.00	3.10	4.00	5.20	6.40	7.00	7.70	7.50
	2	0.30	1.00	2.10	3.10	4.00	5.50	6.80	7.40	7.80	
	3	0.40	1.00	1.90	2.70	3.50	4.80	5.50	6.40	7.00	

Anexo G. Prueba de Antibiosis entre *Phytophthora infestans* 63 - 02 y los diez aislamientos de *Trichoderma* spp.

Pi63 Vs. *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i>	T1B	T2B	T3B	T4J	T5J	T6J	T7PVG	T8PVG	T9SC	T10PaVG
Replica 1	N	N	N	N	N	N	P	N	P	P
2	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Pi02 Vs. *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i>	T1B	T2B	T3B	T4J	T5J	T6J	T7PVG	T8PVG	T9SC	T10PaVG
Replica 1	P	N	N	N	N	P	N	P	N	N
2	P	P	N	N	N	N	N	N	P	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Negativo

P: Positivo

Anexo H. TEST DE RANGOS MÚLTIPLES PARA LAS VELOCIDADES DE INVASIÓN MICELIAL POR TRATAMIENTO PI63

CONTRASTE	DIFERENCIA
T10PaVG – T1B	-0.00833333
T10PaVG – T2B	0.0541667
T10PaVG – T3B	0.0125
T10PaVG – T4J	0.0666667
T10PaVG – T5J	*0.45
T10PaVG – T6J	0.00416667
T10PaVG – T7PVG	*0.229167
T10PaVG – T8PVG	-0.025
T10PaVG – T9SC	*0.179167
T1B – T2B	0.0625
T1B – T3B	0.0208333
T1B – T4J	0.075
T1B – T5J	*0.458333
T1B – T6J	0.0125
T1B – T7PVG	*0.2375
T1B – T8PVG	-0.0166667
T1B – T9SC	*0.1875
T2B – T3B	-0.0416667
T2B – T4J	0.0125
T2B – T5J	*0.395833
T2B – T6J	-0.05
T2B – T7PVG	*0.175
T2B – T8PVG	-0.0791667
T2B – T9SC	0.125
T3B – T4J	0.0541667
T3B – T5J	*0.4375
T3B – T6J	-0.00833333
T3B – T7PVG	*0.216667
T3B – T8PVG	-0.0375
T3B – T9SC	0.166667
T4J – T5J	*0.383333
T4J – T6J	-0.0625
T4J – T7PVG	*0.1625
T4J – T8PVG	-0.0916667
T4J – T9SC	0.1125
T5J – T6J	*-0.445833
T5J – T7PVG	*-0.220833
T5J – T8PVG	*-0.475
T5J – T9SC	*-0.270833
T6J – T7PVG	*0.225
T6J – T8PVG	-0.0291667
T6J – T9SC	*0.175
T7PVG – T8PVG	*-0.254167
T7PVG – T9SC	-0.05
T8PVG – T9SC	*0.204167

*Denotan un diferencia estadísticamente significativa

Anexo I. Test de rangos múltiples para las velocidades de invasión micelial por tratamiento pi02

CONTRASTE	DIFERENCIA
T10PaVG – T1B	0.0458333
T10PaVG – T2B	*0.225
T10PaVG – T3B	-0.0291667
T10PaVG – T4J	*0.191667
T10PaVG – T5J	*0.645833
T10PaVG – T6J	0.104167
T10PaVG – T7PVG	*0.245833
T10PaVG – T8PVG	0.05
T10PaVG – T9SC	0.0583333
T1B – T2B	*0.179167
T1B – T3B	-0.075
T1B – T4J	0.145833
T1B – T5J	*0.6
T1B – T6J	0.0583333
T1B – T7PVG	*0.2
T1B – T8PVG	0.00416667
T1B – T9SC	0.0125
T2B – T3B	*-0.254167
T2B – T4J	-0.0333333
T2B – T5J	*0.420833
T2B – T6J	-0.1208333
T2B – T7PVG	0.0208333
T2B – T8PVG	*-0.175
T2B – T9SC	*-0.166667
T3B – T4J	*0.220833
T3B – T5J	*0.675
T3B – T6J	0.133333
T3B – T7PVG	*0.275
T3B – T8PVG	0.0791667
T3B – T9SC	0.0875
T4J – T5J	*0.454167
T4J – T6J	-0.0875
T4J – T7PVG	0.0541667
T4J – T8PVG	-0.141667
T4J – T9SC	-0.133333
T5J – T6J	*-0.541667
T5J – T7PVG	*-0.4
T5J – T8PVG	*-0.595833
T5J – T9SC	*-0.5875
T6J – T7PVG	0.141667
T6J – T8PVG	-0.0541667
T6J – T9SC	-0.0458333
T7PVG – T8PVG	*-0.195833
T7PVG – T9SC	*-0.1875
T8PVG – T9SC	0.00833333

*Denotan un diferencia estadísticamente significativa

Anexo J. Ecuaciones lineales para las curvas de invasión micelial

Pi63 – Pi02 Vs. *Trichoderma* spp.

Tratamiento Vs. *Phytophthora infestans* 63

T1B	$y = 0.987x - 0.896$
T2B	$y = 0.924x - 0.659$
T3B	$y = 0.963x - 0.802$
T4J	$y = 0.913x - 1.200$
T5J	$y = 0.490x - 0.546$
T6J	$y = 0.972x - 0.862$
T7PVG	$y = 0.747x - 0.869$
T8PVG	$y = 0.994x - 1.309$
T9SC	$y = 0.808x - 0.445$
T10PaVG	$y = 0.991x - 1.027$

Tratamiento Vs. *Phytophthora infestans* 02

T1B	$y = 0.873x - 0.748$
T2B	$y = 0.678x - 0.526$
T3B	$y = 0.879x - 1.076$
T4J	$y = 0.735x - 1.034$
T5J	$y = 0.268x - 0.279$
T6J	$y = 0.799x - 0.372$
T7PVG	$y = 0.672x - 0.569$
T8PVG	$y = 0.933x - 0.845$
T9SC	$y = 0.908x - 1.046$
T10PaVG	$y = 0.954x - 0.777$
