

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS  
ESCUELA DE AGRONOMIA**

**Memoria de Título**

**UTILIZACIÓN DE MUTANTES DE *Trichoderma harzianum* (Rifai) PARA EL  
CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (Kühn) EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum*  
Mill.)**

**LUIS ILDEFONSO VALDERRAMA COLLAO**

**Santiago, Chile**

**2007**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS  
ESCUELA DE AGRONOMIA**

**Memoria de Título**

**UTILIZACIÓN DE MUTANTES DE *Trichoderma harzianum* (Rifai) PARA EL  
CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (Kühn) EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum*  
Mill.)**

**CONTROL OF *Rhizoctonia solani* (Kühn) WITH *Trichoderma harzianum* (Rifai)  
MUTANTS IN TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

**LUIS ILDEFONSO VALDERRAMA COLLAO**

**Santiago, Chile**

**2007**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMIA**

**UTILIZACIÓN DE MUTANTES DE *Trichoderma harzianum* (Rifai) PARA EL  
CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (Kühn) EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum*  
Mill.)**

Memoria para optar al título profesional de:  
Ingeniero Agrónomo  
Mención: Sanidad Vegetal

**LUIS ILDEFONSO VALDERRAMA COLLAO**

Profesor Guía Sr. Jaime R. Montealegre A. Ingeniero Agrónomo	Calificaciones 7,0
Profesores Evaluadores Sr. José Luis Henríquez S. Ingeniero Agrónomo, M. S., Ph. D.	6,9
Sr. Pablo A. Alvarado V. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	6,8
Colaborador Sr. Rodrigo A. Herrera C. Ingeniero Agrónomo	

**Santiago, Chile**

**2007**

A mi amada Madre, mis queridos hermanos y a mis queridísimos sobrinos

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al proyecto Fondecyt 1040531-04 por financiar la presente Memoria de Título.

Agradezco al Sr. Jaime R. Montealegre A. por su buena disposición, su profesionalismo, entusiasmo, por otorgarme la independencia de poder decidir en algunas partes de la investigación, por hacer todo con la debida anticipación y por entregarme la posibilidad de trabajar en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal, en donde me he formado de mejor manera.

Agradezco al personal del laboratorio, especialmente a la Sra. Lula y a Natalia, por su incondicional apoyo.

A mis queridos compañeros y amigos que me acompañaron durante la realización de ésta investigación, al Ñoño, al Marino, al Fabiancito, a la pancha y al Mauricito. A los demás integrantes de los “Ganchitos”, al José, al Peyuco, al Rafa, al Titín, al Alvin, al Pancho, al Rogelio, al Pipo, al Miranda, al Coke, a mi gran amigo Vicho, al Peláo y a la niñas, que tantos buenos recuerdos tengo de ellos.

A mis nuevos y queridos compañeros de trabajo del Laboratorio: A la Paulita por su eterna buena onda y disposición. A la Cata, por su preocupación en las comidas de terreno, por su buena disposición, por prestarme la tercera temporada de “Lost” y por su amistad. A la Javi, por su preocupación en lo personal, por verme como su hermano mayor, por prestarme los CDs de inglés y por sobre todo por su amistad. A la Sole, por su buena disposición, por enseñarme ortografía, por escucharme, por ser tan eficiente en lo que hace y por su amistad, al Felipe por ser usuario de Word avanzado y ayudarme con la numeración de las páginas.

Al Sr. José Luis Henríquez S. por su profesionalismo, sus excelentes ideas y por sus críticas constructivas, siempre tan bienvenidas.

Al Sr. Rodrigo A. Herrera C. por su eterna buena disposición, por su profesionalismo, por sus críticas, por enseñarme a querer ser mejor, tanto en lo profesional como en el ámbito personal, por su confianza y por su amistad.

A Carolina E. Fernández A. por su infinito apoyo, por creer en mi, por darme su amistad y por sobre todo, por entregarme su amor.

A mis hermanos por sus sabios consejos, por su incondicional apoyo, por su amistad y por darme unos hermosos sobrinos, a los que espero éste trabajo les sirva de inspiración.

A mis padres por su gran esfuerzo, por guiarme cuando era pequeño, por darme la libertad de poder ser como soy, por su amor y por su ayuda.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
Palabras clave	1
<b>ABSTRACT</b>	2
Key words	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
Objetivos	5
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	6
Lugar donde se desarrolló la investigación	6
Obtención de microorganismos	6
Metodología	6
<b>Inocuidad en plantas de tomate</b>	7
Preparación de suspensiones de conidias	7
Inmersión de raíces y transplante de plantas	7
Mantención de plantas	8
Diseño experimental	8
<b>Efectividad de mutantes en el control de <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de tomate</b>	8
Preparación del bioantagonista	8
Unidades formadoras de colonias de los pellets	9
Inoculación del suelo de las macetas	9
Mantención de plantas	10
Escala de calificaciones para canchros y desarrollo radicular	11
Diseño experimental	12
Efecto residual de los tratamientos en el suelo	13
Medios de cultivo selectivos utilizados	13
<b>Persistencia y capacidad antagónica de cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> en el suelo</b>	13
Inoculación de frascos viales	13
Temperaturas de mantención	14
Reaislamiento de inóculos	14
Cultivos duales	15
Diseño experimental	15
Normas de bioseguridad	16
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	17
<b>Inocuidad en plantas de tomate</b>	17
Inocuidad de cepas mutantes en plantas de tomate cv. 92.95	17
Inocuidad de cepas mutantes en plantas de tomate cv. Góndola	18
<b>Efectividad de mutantes en el control de <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de tomate</b>	20
Efectividad de mutantes en plantas de tomate cv. 92.95	20
Rendimientos en biomasa relacionados	21
Efectividad de mutantes en plantas de tomate cv. Góndola	23
Rendimientos en biomasa relacionados	24
Efecto residual de los tratamientos en el suelo	25

<b>Persistencia y capacidad antagónica de cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> en el suelo</b>	26
Persistencia de cepas mantenidas a 22 °C	26
Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a 22 °C	27
Persistencia de cepas mantenidas a 5 °C	28
Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a 5 °C	28
Persistencia de cepas mantenidas a temperatura ambiente	29
Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a temperatura ambiente	30
<b>CONCLUSIONES</b>	31
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	32
<b>APÉNDICES</b>	36

## RESUMEN

*Rhizoctonia solani* es un importante fitopatógeno que ataca al cultivo del tomate bajo condiciones de invernadero. Su control aún se realiza a través del uso de Bromuro de Metilo, producto altamente cuestionado por degradar la capa de ozono.

Como estrategia de biocontrol a esta enfermedad, se evaluaron mutantes de *Trichoderma harzianum*, obtenidos desde cepas silvestres (previamente caracterizadas y seleccionadas por su buena actividad biocontroladora *in vitro* e *in vivo*, sobre *R. solani*), luego de tratarlas con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinio (NG) o luz ultravioleta (UV A 320 nm o C 256 nm).

Se estudió la inocuidad de los mutantes en plantas de tomate cvs. 92.95 y Góndola, susceptibles a *Rhizoctonia solani*, mediante inmersión de raíces en suspensiones de conidias. Se evaluó altura, peso fresco y seco de las plantas, resultando la totalidad de las cepas inocuas. Se estudió también la efectividad en el control de la cancrrosis causada por el patógeno, para lo cual las cepas de *Trichoderma harzianum* fueron aplicadas como pellets de alginato de sodio (1,7 g pellet/L suelo) al suelo de macetas, previamente inoculado con el patógeno, y se compararon con un tratamiento testigo (sin bioantagonista) y con un tratamiento fungicida (pencycuron). Los parámetros evaluados fueron peso fresco y seco de las plantas, cancrrosis, desarrollo radical y mortalidad. En las plantas del cultivar 92.95, los mutantes Th 11A 80.1 y Th 12A 10.1 controlaron mejor la cancrrosis del cuello que el mutante Th 11C 40.1, que los fenotipos silvestres Th 650 y Th 12 y que el testigo, incluso fueron mejores que el tratamiento fungicida respecto al desarrollo radical; sin embargo, en el cultivar Góndola no se observaron diferencias entre los tratamientos. Además se estudió la persistencia de las cepas bioantagonistas en dos suelos (Antumapu y La Palma) a tres temperaturas de almacenaje (22 °C, 5 °C y ambiental) y su mantención del antagonismo *in vitro* sobre el fitopatógeno, durante 180 días. Se evaluó número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial. Todas las cepas persistieron en ambos suelos a las tres temperaturas estudiadas y no perdieron su capacidad antagonista.

Palabras clave: Bioantagonismo, Bromuro de Metilo, Control biológico.

## ABSTRACT

*Rhizoctonia solani* is an important plant pathogen of tomatoes under glasshouse conditions; Methyl Bromide, a highly questioned chemical for depleting the ozone layer, is still used in the control of this pathogen.

Mutants of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol strategy for disease control were evaluated. Mutants were previously obtained after treatment with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NG) or UV light A (320 nm) or C (256 nm).

A potted tomato trial under glasshouse conditions was conducted. Parameters evaluated were height, canker formation, root growth, mortality, fresh and dry weight of tomato plants cvs. 92.95 and Góndola. All strains were innocuous to both tomato seedling cvs. Effectivity was studied applying pellets of different *Trichoderma* strains (1.7 g pellet/L soil) to a soil previously inoculated with *R. solani* and comparing to an untreated control, and to a fungicide treatment. Th 11A 80.1 and Th 12A 10.1 mutants controlled *R. solani* better than Th 11C 40.1, Th 650, Th 12 and untreated control in cv. 92.95; while in cv. Góndola no differences were observed. The strains persisted in two soil types at three storage temperatures for 180 days, without losing their antagonist capacity.

Key words: Bioantagonism, Methyl Bromide, Biological control.

## INTRODUCCIÓN

Dentro del rubro hortícola el tomate es, a nivel nacional, el cultivo más importante tanto por sus niveles de consumo, como por su superficie plantada. La superficie destinada a tomates de consumo fresco es de 7.301,1 ha, de las cuales 1.073,4 son de producción en invernaderos fríos, los que están ubicados principalmente en la V Región (INE, 2001). Dada las condiciones de monocultivo que existen en la mayoría de los invernaderos, este cultivo es afectado por numerosos patógenos entre los que se encuentra *Rhizoctonia solani* (Kühn), uno de los agentes causales del complejo del “Damping-Off” de plantines, además de causar daños en raíces, tallos y frutos (CORFO, 1990; De Souza, 1992; Agrios, 1996; Apablaza, 2000).

Existen diversas cepas de *Rhizoctonia solani* (Kühn) con distinta patogenicidad y especificidad en cuanto a hospedero, y que se clasifican en grupos de anastomosis (GA). Para determinar a que GA pertenecen, se hacen enfrentamientos entre micelios con hongos de GA conocido, cuando las hifas de distinto micelio entran en contacto, pueden ocurrir cuatro tipos de reacciones (C0: no hay interacción, C1: solo contacto hifal, C2: reacción de muerte y C3: fusión perfecta), asociando las dos últimas reacciones a micelios que corresponden al mismo GA (MacNish *et al.*, 1993; Sneh *et al.*, 1996).

Se han descrito 14 GA para este fitopatógeno (Ogoshi, 1996; Carling *et al.*, 2002). Según Reyes (2000), en tomates cultivados bajo invernadero en la V Región, se han detectado los grupos de anastomosis 2-1 y 4, a este último pertenece *Rhizoctonia solani* cepa 618, que es una de las más agresivas en esa zona (Montealegre *et al.*, 2003).

Este patógeno inverna en forma de micelio melanizado o esclerocios en el suelo, distribuyéndose de manera heterogénea, principalmente entre los primeros 15 a 20 cm de profundidad (Sneh *et al.*, 1991; Apablaza, 2000).

El control de *Rhizoctonia solani* y de otras enfermedades y plagas del suelo aún se realiza a través del uso de fumigantes químicos, específicamente el Bromuro de Metilo sólo o en mezcla con Cloropicrina (Apablaza, 2000), cuya utilización es altamente cuestionada por ser un producto que degrada la capa de ozono. Su uso según el Protocolo de Montreal, se prohibirá para Chile a partir del año 2015 (Ristaino y Thomas, 1997).

La tendencia actual, en el control de plagas y enfermedades, es utilizar procedimientos de control que garanticen una máxima efectividad, sin provocar las alteraciones a nivel ecológico que se generan por el empleo excesivo de agroquímicos (Díaz, 1996); ello no sólo por los efectos que algunos agroquímicos pueden producir en el medioambiente, sino también por las exigencias de ciertos grupos de consumidores, tanto en el mercado interno, como en los países a los cuales Chile exporta parte de su producción hortofrutícola (Montealegre, 2004).

Considerando lo antes expuesto, se hace imprescindible la búsqueda de nuevas opciones para el control de estos patógenos, que sean efectivas y económicamente viables.

El control biológico es actualmente una subdisciplina establecida en la ciencia de la Fitopatología (Paulitz y Bélanger, 2001). En este sentido, una estrategia que está dando un buen resultado es la utilización de microorganismos antagonistas de fitopatógenos, que los desplazan de una manera natural (Gullino y Garibaldi, 1995; Chet *et al.*, 1997; Benítez *et al.*, 1998).

Las especies del género *Trichoderma* son los hongos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas (Papavizas *et al.*, 1982; Papavizas, 1985; Rey *et al.*, 2000), ello, considerando que son especies ampliamente distribuidas en el mundo. Están presentes en casi todos los suelos, y no atacan a plantas cultivadas (Papavizas *et al.*, 1990; Sivan y Chet, 1993). En el caso del cultivo del tomate, el uso de *Trichoderma harzianum* (Rifai) ha permitido vislumbrar las posibilidades de control alternativo frente al método convencional, sobre enfermedades que se originan del suelo (Besoain *et al.*, 2004).

Los mecanismos por los cuales los hongos del género *Trichoderma* desplazan a los fitopatógenos son fundamentalmente: competencia directa por el espacio y nutrientes, producción de metabolitos antibióticos volátiles y difusibles y parasitismo directo sobre el hongo fitopatógeno (Chet *et al.*, 1997; Benítez *et al.*, 2004).

Sin embargo, es necesario potenciar estos mecanismos con el fin de obtener cepas de *Trichoderma harzianum* (Rifai) que sean mejores agentes de control biológico que las ya existentes, para lo cual se han seguido varias estrategias encaminadas a aumentar sus actividades enzimáticas (quitinasas y glucanasas), involucradas en la degradación de la pared celular de los fitopatógenos (Pérez *et al.*, 2004), logrando cepas con actividades enzimáticas muy superiores a las de los fenotipos silvestres (Rey *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2004) (Figura 1).

Los hongos mutantes de *Trichoderma harzianum* (Rifai) NG-7 obtenido de la cepa Th-650 (Pérez y Morales, 2003); Th 11C 40.1, Th 11A 80.1 obtenidos de la cepa Th 11 y Th 12A 10.1 obtenido de la cepa Th 12 (Besoain *et al.*, 2004) fueron seleccionados en un estudio previo como bioantagonistas promisorios en el control *in vitro* de *Rhizoctonia solani* (Kühn) (Arias, 2005).

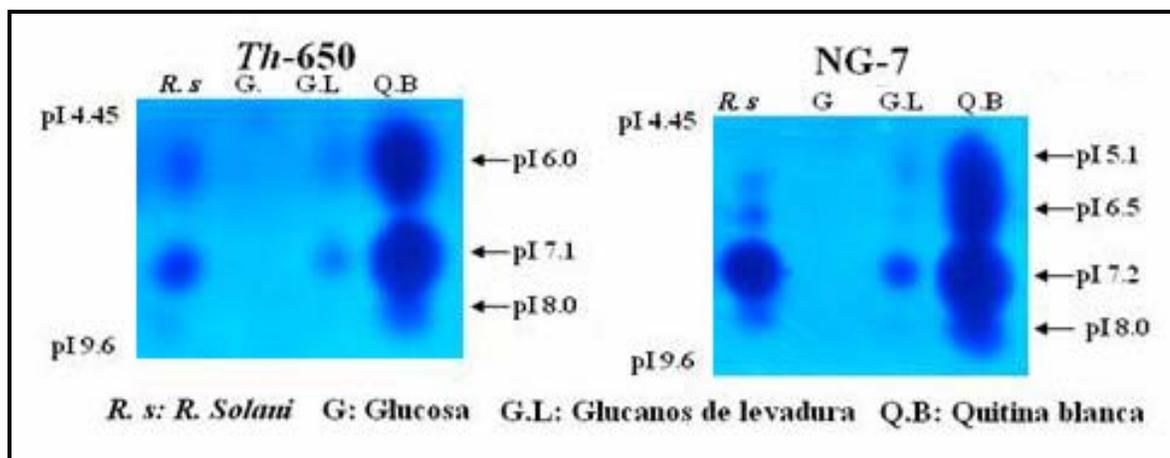


Figura 1. Pérez *et al.*, 2004. Patrones isoenzimáticos de actividad endoquitinasa del hongo *Trichoderma harzianum* (Th 650) y su mutante (NG7) (rango pH 3-10). Nótese la mayor actividad enzimática en el mutante NG7 comparada con la del fenotipo silvestre Th 650 cuando se utilizó como única fuente de carbono al fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (R.s).

En base a estos antecedentes los objetivos de la presente memoria de título fueron:

Determinar la inocuidad de cepas mutantes de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en plantas de tomate de dos cultivares con susceptibilidad a *Rhizoctonia solani* (Kühn).

Evaluar la efectividad de las cepas mutantes de *Trichoderma harzianum* (Rifai), para determinar el grado de control *in vivo* sobre el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Kühn) cepa 618 inoculado en suelo con plantas de tomate susceptibles a la enfermedad.

Determinar la persistencia de las cepas de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en dos suelos mantenidos a tres temperaturas diferentes de almacenaje y bajo esas condiciones evaluar como se comportan en la mantención de su capacidad antagónica *in vitro* sobre el fitopatógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar donde se desarrolló la investigación

La Memoria de Título se desarrolló en el Laboratorio e Invernadero de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, disponiéndose de los materiales, equipos e infraestructura de éste laboratorio.

### Obtención de microorganismos

Los microorganismos *Rhizoctonia solani* cepa 618, los mutantes de *Trichoderma harzianum* y sus cepas parentales, fueron obtenidos desde el cepario del laboratorio, antes mencionado (Cuadro 1). Además, se dispuso de plantas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola sin resistencia a *Rhizoctonia solani*, suelo del Campus Antumapu de la Universidad de Chile, correspondiente a la serie Mapocho (CIREN, 1996) y suelo de la Estación Experimental La Palma de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso perteneciente a la serie La Palma (Martínez, 1981), a los cuales se les realizó un análisis físico y químico (Apéndices I y II).

Cuadro 1: Cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en el estudio.

Cepa parental	Mutante	Agente mutagénico
Th 650	NG 7 <sup>1</sup>	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinio
Th 11	Th 11C 40.1 <sup>2</sup>	Luz UV-C (256 nm)
	Th 11A 80.1 <sup>2</sup>	Luz UV-A (320 nm)
Th 12	Th 12A 10.1 <sup>2</sup>	Luz UV-A (320 nm)

<sup>1</sup>/ Mutante proporcionado por la Universidad Andrés Bello. <sup>2</sup>/ Mutantes proporcionados por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, cuya numeración que sigue a la letras A ó C, corresponde a los minutos de aplicación de luz ultravioleta y el número que sigue después de la puntuación, corresponde a la repetición.

### Metodología

En este estudio se realizaron tres bioensayos; una prueba de inocuidad, otra de efectividad y una última de persistencia de cepas de *Trichoderma harzianum* bajo distintas condiciones de temperatura y sustratos.

## Inocuidad en plantas de tomate

### Preparación de suspensiones de conidias

Utilizando la metodología empleada por Besoain *et al* (2004), se prepararon suspensiones de conidias en agua destilada estéril ( $5 \times 10^5$  conidias/mL), cosechadas desde cultivos realizados en placas de Petri con agar papa dextrosa (APD) a 22 °C de cada una de la cepas de *Trichoderma harzianum* (Cuadro 1).

### Inmersión de raíces y transplante de plantas

Una vez disponibles las siete suspensiones correspondientes a cada una de las siete cepas de *Trichoderma harzianum* en investigación, y considerando a cada suspensión como un tratamiento (Cuadro 2), las raíces de las plantas de tomate fueron sumergidas en ellas durante 15 minutos, en donde se mantuvieron en constante agitación con un agitador magnético, luego se transplantaron a vasos plásticos de 250 mL con sustrato estéril, constituido de 1/3 de suelo Antumapu, 1/3 de arena (esterilizados con Bromuro de Metilo en dosis de 75,5 cc/m<sup>2</sup>) y 1/3 de perlita (esterilizada en autoclave a 121 °C durante 20 minutos), el transplante coincidió con el momento en que las plantas de tomate alcanzaron el estado fenológico de tres a cinco hojas verdaderas (Figura 2).

Cuadro 2: Tratamientos realizados en bioensayo de inocuidad en plantas de tomate.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
T <sub>0</sub> (testigo)	Inmersión en agua destilada estéril
Th 650	Inmersión en suspensión de conidias cepa Th 650
NG7	Inmersión en suspensión de conidias cepa NG7
Th 12	Inmersión en suspensión de conidias cepa Th 12
Th 12A 10.1	Inmersión en suspensión de conidias cepa Th 12A 10.1
Th 11	Inmersión en suspensión de conidias cepa Th 11
Th 11A 80.1	Inmersión en suspensión de conidias cepa Th 11A 80.1
Th 11C 40.1	Inmersión en suspensión de conidias cepa Th 11C 40.1



Figura 2. A. inmersión de raíces en suspensión de conidias en agitación. B y C. transplante a sustrato estéril. D. plántula de tomate dispuesta en vaso plástico y mantenida bajo condiciones semicontroladas de invernadero.

### Mantenimiento de plantas

Las plantas se mantuvieron bajo condiciones semicontroladas de invernadero, cuyas temperaturas promedio fluctuaron entre 18 y 25,8 °C y se regaron con agua destilada, según las necesidades del cultivo. Se evaluaron al mes de realizado el transplante determinándose su altura, medida desde el cuello hasta el ápice de crecimiento más alto, peso fresco y seco de la parte aérea y peso fresco de raíces.

### Diseño experimental

Se realizó un bioensayo por cada cultivar de tomate y el diseño experimental para cada uno consistió de un modelo completamente aleatorizado que incluyó 8 tratamientos con 6 repeticiones (Cuadro 2). La unidad experimental fue 1 plántula de tomate dispuesta en un vaso plástico. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y cuando se detectaron diferencias significativas se les realizó la prueba de comparación múltiple de Dunnett's.

### Efectividad de mutantes en el control de *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate

#### Preparación del bioantagonista

Las cepas bioantagonistas empleadas en este bioensayo fueron aplicadas en forma de pellets de alginato de sodio, para lo cual se empleó la metodología de elaboración de pellets usada por Besoain *et al* (2004) (Figura 3), modificada por la adición a la mezcla de los pellets de 200 ppm del antibiótico Strepto Plus (Sulfato de Estreptomina, Clorhidrato de Oxitetraciclina) (AFIPA, 2006) para evitar posibles contaminaciones bacterianas.

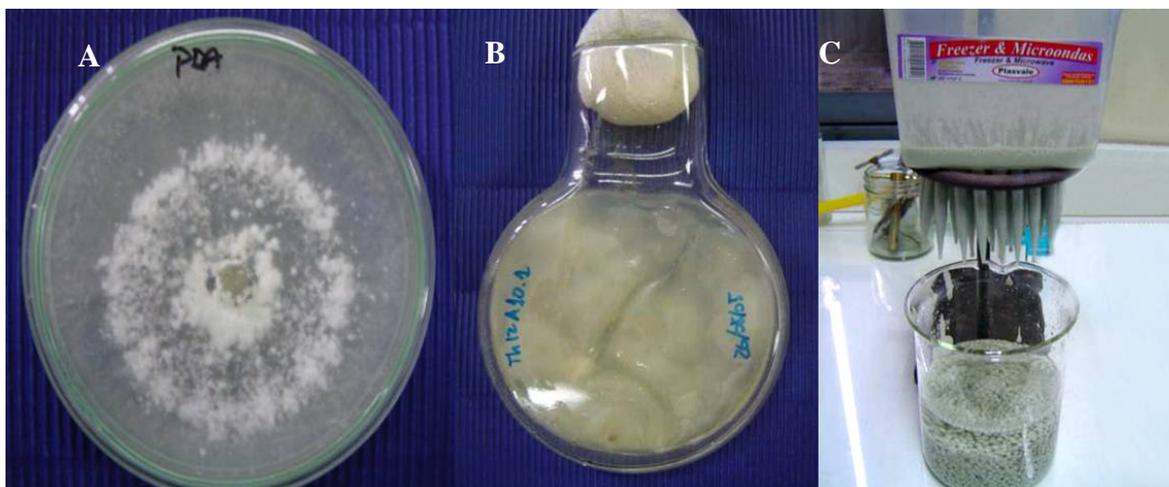


Figura 3. Proceso de pelletización de las cepas de *Trichoderma harzianum*. A. cultivo del hongo desarrollado en placa de Petri con APD. B. desarrollo del micelio del hongo en el medio de cultivo líquido específico. C. depósito de múltiples salidas de gotero desembocando en solución de  $\text{CaCl}_2$  3% p/v para la formación de los pellets.

### Unidades formadoras de colonia de los pellets

Una vez que los pellets estuvieron disponibles, se les determinó el número de UFC/g mediante la metodología de siembra por extensión descrita por Madigan *et al* (2003) en placas de Petri con APD, incubadas a 22 °C durante 72 horas (Cuadro 3).

Cuadro 3: Unidades formadoras de colonia por gramo de pellets de cepas de *T. harzianum*.

Tipo de microorganismo	Cepa	UFC / g pellets
Mutantes	Th 12A 10.1	564.188
	Th 11A 80.1	788.875
	Th 11C 40.1	1.038.813
	NG 7	511.156
Fenotipos silvestres	Th 12	375.000
	Th 11	115.969
	Th 650	494.938

### Inoculación del suelo de las macetas

Las plantas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola se dispusieron en macetas con 2,3 L de suelo proveniente del Campus Antumapu esterilizado con Bromuro de Metilo y posteriormente inoculado con *Rhizoctonia solani* 618.

Para la inoculación del suelo, se utilizó la metodología empleada por Santander (2001), en que el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* cepa 618 se hizo crecer en semillas de avena estériles, autoclavadas dos veces a 121 °C durante 20 minutos, dejando un intervalo de 24 horas entre una esterilización y otra, e incubadas por siete días en cámara de cultivo a 22

°C. Una vez que el micelio se desarrolló profusamente en las semillas, se molieron y con ellas se inoculó el suelo de las macetas en dos dosis: 7 g de inóculo/maceta y 21 g de inóculo/maceta (Figura 4), concentrando este inóculo en el volumen cercano al pan de raíces y tallo principal de las plantas de tomate, que se transplantaron a las macetas al estado fenológico de tres a cinco hojas verdaderas.

### Mantenimiento de las plantas

Las plantas de tomate se mantuvieron bajo condiciones semicontroladas de invernadero donde las temperaturas promedio de suelo fluctuaron entre los 20,9-28,6 °C y fueron regadas con agua destilada, según las necesidades del cultivo.



Figura 4. Proceso de inoculación del suelo de las macetas. A. semillas de avena en matraz para ser esterilizadas. B inóculo del fitopatógeno desarrollado en semillas de avena estériles. C. espacio dejado en suelo para inoculación. D. inoculación del fitopatógeno al suelo. E. inoculación de la cepa bioantagonista en forma de pellet. F. mezcla de los inóculos con el suelo del volumen cercano al pan de raíces y cuello de la plántula de tomate y posterior transplante.

Los pellets se depositaron al momento del trasplante, fueron bien mezclados con el suelo del volumen cercano al pan de raíces y cuello de la plántula, en una cantidad de 1,7 gramos de pellet/L de suelo (4 g pellets/maceta) (Figura 4).

Los tratamientos efectuados correspondieron a cada cepa de *Trichoderma harzianum* aplicada al suelo de las macetas en forma de pellets en interacción con el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* 618, comparados con un tratamiento testigo, donde sólo se inoculó el fitopatógeno y con un tratamiento fungicida, donde además de inocular al hongo fitopatógeno al suelo, se le aplicó el fungicida pencycuron (Cuadro 4).

Cuadro 4: Tratamientos realizados en el bioensayo de Efectividad de mutantes.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
T <sub>0</sub> (testigo)	Plántula en suelo solo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup>
T <sub>1</sub> (fungicida)	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pencycuron <sup>2</sup>
Th 650	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pellets <sup>3</sup> Th 650
NG7	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pellets <sup>3</sup> NG7
Th 12	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pellets <sup>3</sup> Th 12
Th 12A 10.1	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pellets <sup>3</sup> Th 12A 10.1
Th 11	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pellets <sup>3</sup> Th 11
Th 11A 80.1	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pellets <sup>3</sup> Th 11A 80.1
Th 11C 40.1	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 <sup>1</sup> + pellets <sup>3</sup> Th 11C 40.1

1/. Fitopatógeno inoculado al momento del trasplante. 2/. Fungicida específico para hongos del género *Rhizoctonia*, aplicado al suelo según recomendaciones del fabricante (0,15 cc/maceta). 3/. Bioantagonistas depositados al momento del trasplante como pellets de alginato de sodio.

Se evaluó mortalidad de plantas, nivel de cancrrosis en la zona del cuello y desarrollo radical, peso fresco y seco de la parte aérea y peso fresco de raíces al estado de cuaja del cuarto a quinto racimo frutal.

### **Escala de calificaciones para cancrrosis y desarrollo radical**

Para la evaluación de cancrrosis de la zona del cuello y desarrollo radical de las plantas de tomate sometidas a los distintos tratamientos se ideó una escala de calificaciones de cada parámetro (Figuras 5 y 6).



Figura 5. Escala de calificaciones utilizada para determinar nivel de canchrosis en la zona del cuello de las plantas. 0: 0% área afectada (planta sana); 1: <5% área afectada (enfermedad leve); 2: 5%-30% área afectada (enfermedad moderada); 3: 30%-60% área afectada (enfermedad importante); 4: 60%-90% área afectada (enfermedad grave) y 5: >90% área afectada (planta muerta).

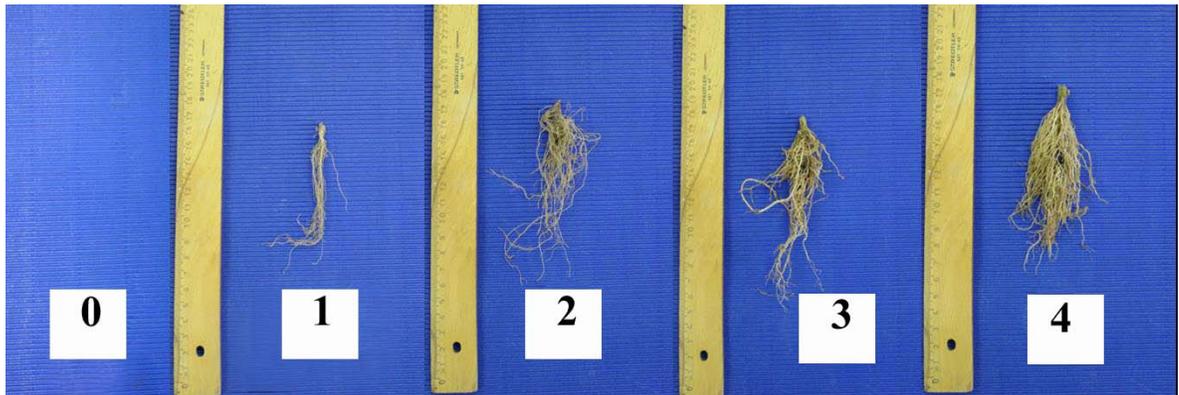


Figura 6. Escala de calificaciones utilizada para evaluar desarrollo radical de las plantas. 0: nulo desarrollo (planta muerta); 1: pobre desarrollo (planta debilitada); 2: moderado desarrollo (planta estable); 3: buen desarrollo (planta saludable) y 4: muy buen desarrollo (planta saludable).

### Diseño experimental

Se realizó un bioensayo por cada cultivar de tomate y el diseño experimental de cada bioensayo consistió de un modelo completamente aleatorizado que incluyó 9 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. La unidad experimental fue 1 plántula de tomate dispuesta en una maceta. Para los parámetros peso fresco y seco de la parte aérea y peso fresco de raíces los tratamientos fueron sometidos a un análisis de varianza y cuando se detectaron diferencias significativas se les realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para

los parámetros cancrisis de la zona del cuello y desarrollo radical los tratamientos fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por comparación de a pares según prueba Mann-Whitney.

### **Efecto residual de los tratamientos en el suelo**

A modo de observación y con el objetivo de registrar la persistencia de las cepas inicialmente inoculadas en el suelo de las macetas, al momento de levantar éste bioensayo (dos meses después del trasplante) se tomó un gramo de suelo de la zona próxima al pan de raíces, el cual fue conservado a 5 °C durante dos meses hasta la realización de una siembra por extensión en medios selectivos para *Trichoderma harzianum* y para *Rhizoctonia solani*. Luego de 72 horas se registraron las UFC/g de suelo recuperado y se comparó macroscópicamente su desarrollo en placa de Petri con el desarrollo de las cepas inicialmente inoculadas.

### **Medios de cultivo selectivos utilizados**

El medio de cultivo selectivo utilizados para recuperar cepas de *Trichoderma harzianum* fue el descrito por Williams *et al* (2003) y para *Rhizoctonia solani* se utilizó el medio agar-benomil-ácido tánico, descrito por Singleton *et al* (1992).

### **Persistencia y capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma harzianum* en el suelo**

Este bioensayo se montó en frascos viales y se utilizaron dos tipos de suelo, uno proveniente del Campus Antumapu y otro de la Estación Experimental La Palma (véase apéndices I y II). Cada frasco contuvo 5 mL de un tipo de suelo húmedo estéril (esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos).

### **Inoculación de frascos viales**

Los frascos con suelo se inocularon con 0,009 g de pellets molidos en un mortero de cada una de las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en esta investigación. La dosis de pellet utilizada fue equivalente a la dosificación de pellet utilizada en el bioensayo de efectividad de mutantes montado en macetas (Cuadro 5).

Cuadro 5: Unidades formadoras de colonia inoculadas por tratamiento en frascos viales.

Tratamiento	UFC/0,009 g pellet <sup>1</sup>
Th 12A 10.1	5.078
Th 11A 80.1	7.100
Th 11C 40.1	9.349
NG 7	4.600
Th 12	3.375
Th 11	1.044
Th 650	4.454

1/ Unidades formadoras de colonia obtenidas del cálculo para 0,009 g de pellet según referencia del Cuadro 3.

### Temperaturas de mantención

Una vez que los frascos con suelo fueron inoculados y sellados, se sometieron a tres temperaturas diferentes de almacenaje, temperatura de refrigeración (5 °C), temperatura óptima de crecimiento micelial del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* 618 (22 °C) (Madrid, 2002) y temperatura ambiental de laboratorio que en promedio fluctuaron entre 19,3-24 °C (Figura 7).

### Reaislamiento de inóculos

Luego del almacenaje, desde el suelo de los frascos viales se recuperó 1 g de suelo, reaislando así inóculos de las cepas, en tres oportunidades (a los 90, 120 y 180 días) para la realización de una siembra por extensión de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  en un medio de cultivo selectivo para *Trichoderma harzianum* (Williams *et al.*, 2003) dispuesto en placa de Petri, que permitió medir la persistencia del hongo en UFC/g de suelo recuperado en cada oportunidad.

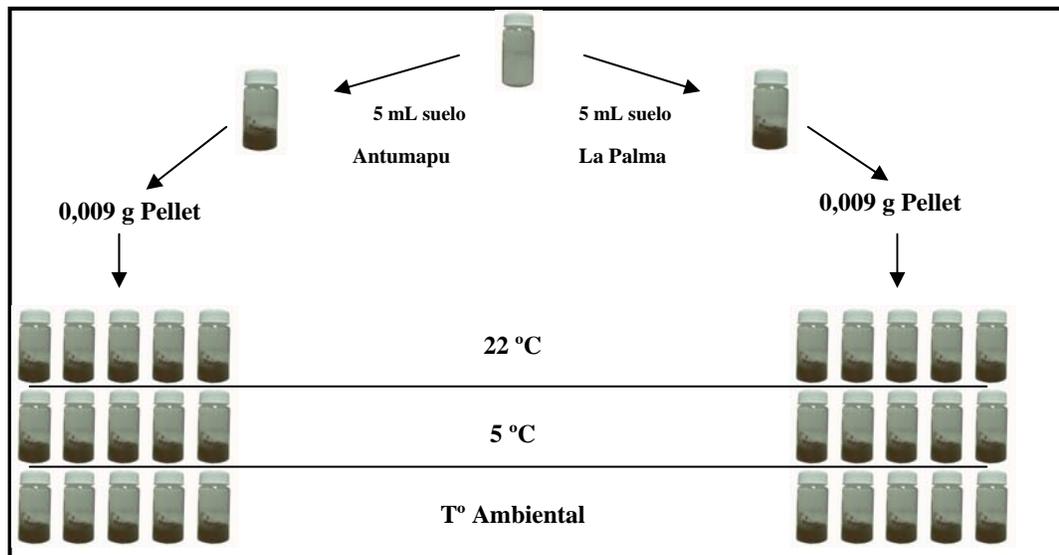


Figura 7. Esquema del bioensayo de Persistencia de las cepas de *Trichoderma harzianum*.

## Cultivos duales

A las colonias de recuperadas, siguiendo la metodología empleada por Arias (2005), se les realizó pruebas *in vitro* de antagonismo directo sobre la cepa 618 de *Rhizoctonia solani* con el objetivo de evaluar la mantención en el tiempo de la capacidad antagonista de estas cepas de *Trichoderma harzianum*.

El cultivo dual se realizó en una placa de Petri con APD a pH 6,5 (óptimo del fitopatógeno según Madrid (2002)), en donde los discos de APD de 5 mm de diámetro con micelio de cada hongo utilizados para el enfrentamiento en placa se obtuvieron con un sacabocados desde los márgenes de cultivos de 4 días de edad, y se colocaron frente a frente a 4 cm en forma equidistante del centro de la placa.

Las placas se incubaron a 22 °C, temperatura óptima de *Rhizoctonia solani* 618 (Madrid, 2002). El tratamiento testigo consistió sólo en un disco con micelio del fitopatógeno creciendo libre sobre el medio APD. La evaluación de la prueba se efectuó cuando el crecimiento del testigo cubrió toda la placa, momento en que se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971) presentada en la Figura 8.

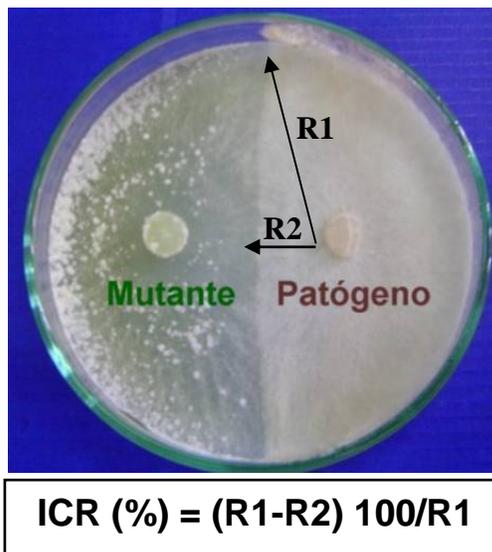


Figura 8. Interacción entre cultivos duales. R1 distancia más lejana recorrida por el fitopatógeno. R2 distancia recorrida por el fitopatógeno hacia el bioantagonista.

## Diseño experimental

El diseño experimental de este bioensayo consistió en un modelo completamente aleatorizado que incluyó 7 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. La unidad experimental fue 1 placa de Petri. Todos los resultados obtenidos en porcentaje fueron modificados mediante transformación angular de Bliss, los cuales se analizaron mediante

análisis de varianza y cuando se detectaron diferencias estadísticas significativas se realizó la prueba de comparación Múltiple de Tukey.

### **Normas de bioseguridad**

Por normas de bioseguridad el suelo, los medios de cultivo, las plantas y los materiales utilizados en todos los bioensayos fueron esterilizados en autoclave antes de su liberación al medio ambiente, por considerar la utilización de microorganismos mutantes. El suelo utilizado en el bioensayo de efectividad de mutantes montado en macetas, por su gran volumen, se esterilizó con Bromuro de Metilo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inocuidad en plantas de tomate

#### Inocuidad de cepas mutantes en plantas de tomate cv. 92.95

Los resultados de la prueba de inocuidad de las cepas de *Trichoderma harzianum* mutantes y silvestres inoculadas en el pan de raíces de las plantas de tomate del cultivar 92.95 mostraron que respecto a la altura de las plantas se observó que tanto las cepas silvestres de *Trichoderma harzianum* como las mutantes estudiadas, no fueron diferentes del tratamiento testigo (T<sub>0</sub>) (Figura 9), y lo mismo se observó al evaluar el peso fresco de raíces (Cuadro 6).

Sin embargo, cuando se evaluó el peso fresco de la parte aérea de las plantas, las cepas mutantes Th 11C 40.1 y NG 7 fueron diferentes del tratamiento testigo registrando menores pesos que éste, situación que se corrobora al analizar el peso seco de la parte aérea, solo que esta vez les acompaña con el mismo efecto la cepa silvestre Th 650 (Cuadro 6).

Cuadro 6: Inocuidad de cepas de *T. harzianum* en plantas de tomate del cv. 92.95.

Cepa	Altura		Peso fresco parte aérea		Peso seco parte aérea		Peso fresco raíces	
	(cm)		(g)		(g)		(g)	
<b>Th 12A 10.1</b>	43,6	a	7,4	a	0,37	a	3,4	a
<b>Th12</b>	42,9	a	7,6	a	0,35	a	3,7	a
<b>Th 11A 80.1</b>	42,8	a	7,9	a	0,37	a	3,0	a
<b>T<sub>0</sub> (testigo)</b>	41,8	a	8,4	a	0,47	a	3,1	a
<b>Th 11C 40.1</b>	41,2	a	6,8	b	0,18	b	2,5	a
<b>Th 650</b>	40,8	a	7,3	a	0,22	b	3,9	a
<b>NG 7</b>	40,3	a	7,0	b	0,25	b	3,1	a
<b>Th 11</b>	39,2	a	7,2	a	0,33	a	3,0	a

Letras iguales en las columnas implica que no existen diferencias estadísticamente significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación múltiple de Dunnett's,  $p \geq 0,05$ .

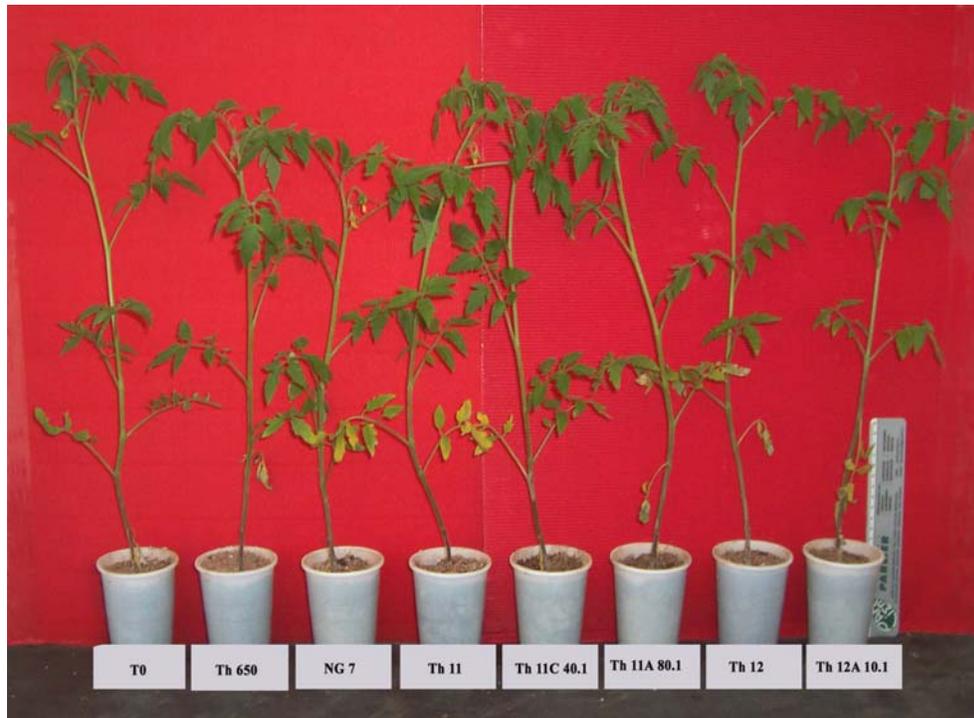


Figura 9. Inocuidad de cepas de *T. harzianum* en plantas de tomate del cultivar 92.95.

### Inocuidad de cepas mutantes en plantas de tomate cv. Góndola

En el cultivar Góndola, respecto de la altura de plantas, peso fresco y seco de la parte aérea, todas las cepas de *Trichoderma harzianum* se comportaron igual que el tratamiento testigo (Figura 10). En cambio cuando se evaluó el peso fresco de raíces sólo la cepa mutante NG 7 fue diferente del tratamiento testigo y registró un mayor desarrollo radical que éste.

Cuadro 7: Inocuidad de cepas de *T. harzianum* en plantas de tomate del cv. Góndola.

Cepa	Altura		Peso fresco parte aérea		Peso seco parte aérea		Peso fresco raíces	
	(cm)		(g)		(g)		(g)	
<b>Th 11</b>	33,6	a	7,3	a	0,25	a	4,1	b
<b>Th 11A 80.1</b>	33,0	a	7,7	a	0,50	a	4,0	b
<b>Th 11C 40.1</b>	31,9	a	7,8	a	0,45	a	3,8	b
<b>T<sub>0</sub> (testigo)</b>	31,8	a	8,0	a	0,38	a	3,9	b
<b>Th 12</b>	30,5	a	7,3	a	0,40	a	3,5	b
<b>NG 7</b>	29,0	a	8,1	a	0,35	a	5,8	a
<b>Th 650</b>	28,4	a	6,9	a	0,22	a	4,5	b
<b>Th 12A 10.1</b>	27,9	a	8,0	a	0,37	a	4,6	b

Letras iguales en las columnas implica que no existen diferencias estadísticamente significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación múltiple de Dunnett's,  $p \geq 0,05$ .



Figura 10. Inocuidad de cepas de *T. harzianum* en plantas de tomate del cultivar Góndola.

En general, las cepas de *Trichoderma harzianum* estudiadas en esta investigación generaron algunas diferencias respecto de lo sucedido con el tratamiento testigo en ambos cultivares de tomate, pero no en términos de altura ni de mortalidad de plantas, por lo tanto, no se asoció a ninguna de estas cepas con muerte de plantas, resultando entonces la totalidad de ellas inocuas para éstos cultivares de tomate.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Santander (2001) en su ensayo en bandejas sembradoras, donde la cepa 34 de *Trichoderma polysporum* mejoró incluso el porcentaje de emergencia de plantas de tomate respecto al tratamiento testigo.

También concuerda con la investigación realizada por Riquelme *et al* (2005) quienes observaron que cepas de *Trichoderma harzianum* proveídas por Bioinsumos Nativa generaron diferencias significativas en rendimientos aéreos y radicales en plantas de *Fragaria chiloensis* (L.), sin embargo, ninguna de las cepas investigadas les provocó mortalidad de las plantas de frutilla.

### **Efectividad de mutantes en el control de *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate**

Con la dosis menor de inóculo del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* 618 (7 g de inóculo/maceta), no se presentó un buen desarrollo de la enfermedad en las plantas de tomate; por ello, los resultados de éste bioensayo, que se presentan a continuación, están referidos sólo a aquellos obtenidos cuando se utilizó la dosis alta de inóculo (21 g de inóculo/maceta), equivalentes a 800.000 UFC/g inóculo.

#### **Efectividad de mutantes en plantas de tomate cv. 92.95**

En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos por los tratamientos en plantas de tomate del cultivar 92.95. Cuando se evaluó el nivel de canchrosis en la zona del cuello de las plantas, destacaron los tratamientos con las cepas mutantes Th 11A 80.1 y Th 12A 10.1, que ejercieron mejor control de la enfermedad que el tratamiento con el mutante Th 11C 40.1, que el tratamiento con la cepa silvestre Th 650 y que el tratamiento testigo ( $T_0$ ). En cuanto al desarrollo radical de las plantas las cepas mutantes anteriormente mencionadas, fueron mejores incluso que el tratamiento fungicida ( $T_1$ ) y que los tratamientos, Th 650, Th12 y el testigo.

Lo anterior, también confirmó que no hay una relación directa entre la cantidad de propágulos por unidad de peso de los tratamientos bioantagonistas (UFC/g pellet) y su grado de control de la enfermedad producida por *Rhizoctonia solani*, ya que, los mutantes Th 11A 80.1 y Th 12A 10.1 con aproximadamente la mitad de UFC/g pellet (Cuadro 3), respecto del mutante Th 11C 40.1, lograron un mejor control de la canchrosis del cuello y un mejor nivel de desarrollo radical de las plantas que éste.

Los niveles de enfermedad alcanzados por las plantas explican los porcentajes de mortalidad registrados, en donde se observó de modo general que los mutantes tuvieron buenos efectos, ya que, mostraron nula mortalidad excepto la cepa Th 11C 40.1 que registró un 20%, tal como lo muestra la Figura 11, en donde el tratamiento testigo ( $T_0$ ) obtuvo un 100% de mortalidad de plantas, seguido por los fenotipos silvestres Th 12 y Th 650 con 80% y 60% de mortalidad, respectivamente. Lo anterior, destaca la mutación de la cepa Th 650, por medio de agente mutagénico N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinio realizada por Pérez y Morales (2003), ya que, el mutante NG 7 obtenido de la cepa Th 650, presentó nulos niveles de mortalidad. El tratamiento con fungicida ( $T_1$ ) sólo presentó un 20% de mortalidad, al igual que el tratamiento con el fenotipo silvestre Th 11.

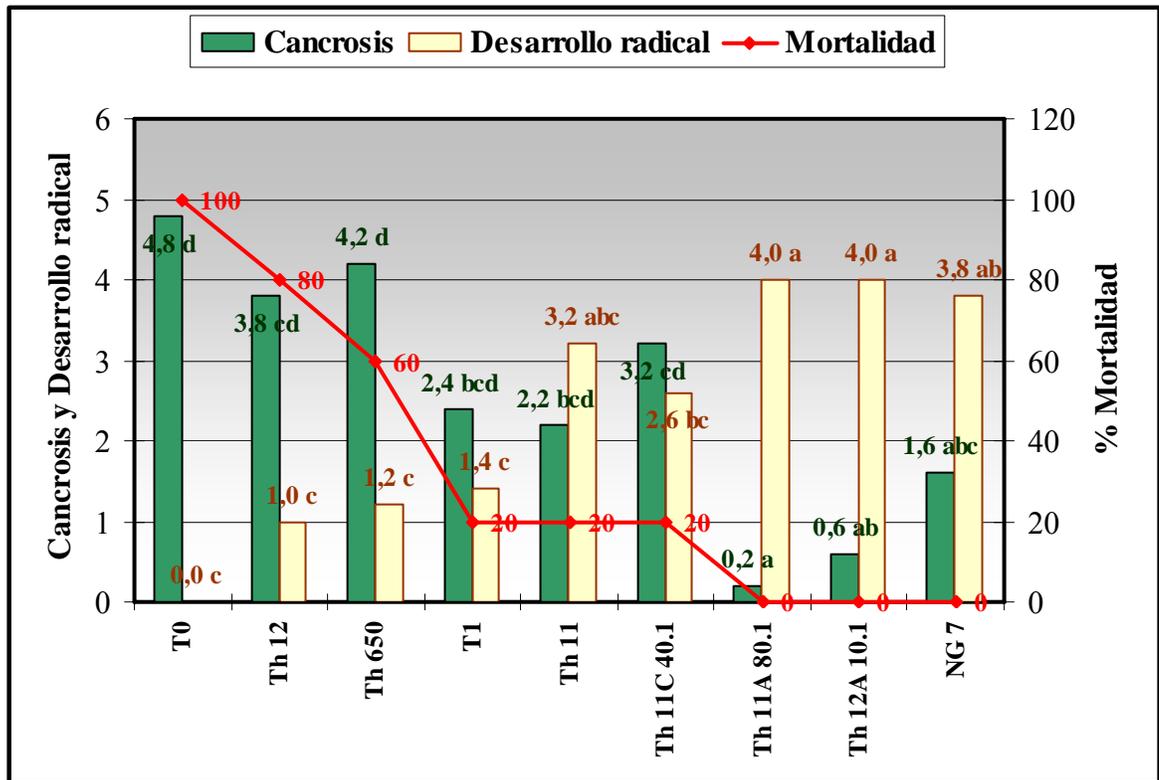


Figura 11. Cancrosis, desarrollo radical y mortalidad de plantas de tomate cv. 92.95.

### Rendimientos en biomasa relacionados

Los resultados de mortalidad obtenidos por los tratamientos generaron diferencias significativas entre ellos a la hora de evaluar peso fresco de la biomasa desarrollada por las plantas, tal como se muestra en el Cuadro 8, en donde para peso fresco de la parte aérea, los mutantes Th 12A 10.1 y Th 11A 80.1 obtuvieron, en promedio, los mayores rendimientos y se diferenciaron estadísticamente de los tratamientos Th 650, T<sub>0</sub> y Th 12. Destaca, en este caso, la gran diferencia entre la cepa mutante Th 12A 10.1 y su cepa parental Th 12.

Estos resultados no concuerdan con el ensayo en macetas con suelo bromurado realizado por Santander (2001), en el cual el mejor grado de control de la enfermedad provocada por *Rhizoctonia solani* lo obtuvo con la cepa Th 650 en plantas de tomate de la variedad Cal Ace. Esto se podría explicar por la carga de inóculo del fitopatógeno utilizada en dicho trabajo que fue tres veces menor (7 g de inóculo/maceta 2,3 L) que la utilizada en ésta investigación, lo que podría sugerir hasta qué carga de inóculo del fitopatógeno puede ser efectiva dicha cepa.

Al evaluar el peso seco de la parte aérea de las plantas de tomate, el comportamiento estadístico de los tratamientos, como era de esperar, fue similar al del parámetro de peso fresco (Cuadro 8). En cuanto a peso fresco de raíces, el tratamiento testigo y el tratamiento Th 12 fueron los que presentaron menores pesos del sistema radical, diferenciándose de los

tratamientos Th 12A 10.1, Th 11A 80.1, Th 11C 40.1, Th 11 y NG 7, esto se explica por los niveles de mortalidad de las plantas de los tratamientos T<sub>0</sub> y Th 12 que fueron muy altos, confirmando la relación inversa entre nivel de daño (cancrosis) y rendimientos en biomasa encontrada por Santander (2001) (véase Figura 11 y 12).

Cuadro 8: Efecto de los tratamientos en rendimientos de plantas de tomate cv. 92.95.

Cepa	Peso fresco parte aérea		Peso seco parte aérea		Peso fresco raíces	
	(g)		(g)		(g)	
<b>Th 12A 10.1</b>	47,34	a	9,60	a	3,72	a
<b>Th 11A 80.1</b>	46,48	a	9,20	a b	4,52	a
<b>NG 7</b>	38,62	a b	7,98	a b	3,46	a
<b>Th 11</b>	38,06	a b	5,38	a b c	3,68	a
<b>T<sub>1</sub><sup>1</sup></b>	30,58	a b	8,20	a b	1,36	a b
<b>Th 11C 40.1</b>	27,00	a b c	7,10	a b	4,08	a
<b>Th 650</b>	18,94	b c	5,02	a b c	1,40	a b
<b>T<sub>0</sub><sup>2</sup></b>	04,36	c d	3,76	b c	0,02	b
<b>Th 12</b>	03,72	d	0,70	c	0,28	b

Letras iguales en las columnas implica que no existen diferencias estadísticamente significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación múltiple de Tukey,  $p \geq 0,05$ . 1/. T<sub>1</sub> (*R. solani* + Pencycuron (0,15 cc/maceta)). 2/. T<sub>0</sub> (Solo *R. solani* 618).

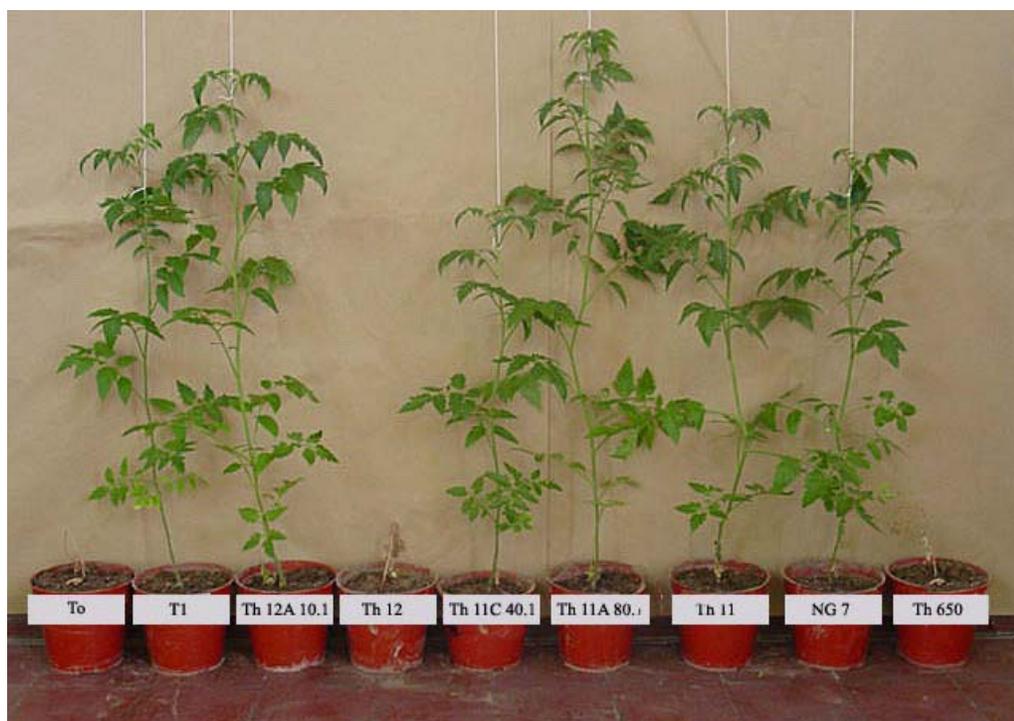


Figura 12. Efectividad de cepas de *Trichoderma harzianum* en plantas de tomate cv. 92.95.

### Efectividad de mutantes en plantas de tomate cv. Góndola

La Figura 13 muestra el efecto de los tratamientos en las plantas del cultivar Góndola, en donde se observó que para los parámetros de canchrosis y desarrollo radical no se registraron diferencias significativas entre ellos, esto explica de modo general la menor mortalidad experimentada por éste cultivar de tomate respecto a lo sucedido en el cv. 92.95, lo que podría asociarse a alguna característica de mayor resistencia del cultivar Góndola al fitopatógeno *Rhizoctonia solani* 618.

Esta diferencia, en cuanto a la susceptibilidad al fitopatógeno *Rhizoctonia solani* entre distintos cultivares de plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) también fue registrada por Gutiérrez *et al* (2006), quienes observaron que los cultivares DOR-454, MEX-E-62, DOR-470, DOR-500, DOR-227, Victoria y Tacarigua fueron menos afectados por tres aislados de *Rhizoctonia solani*, en cuanto al desarrollo foliar y diámetro de las lesiones en los hipocotílos de las plantas, que otros aislados de *Rhizoctonia solani*.

A pesar de no existir diferencias en enfermedad entre los tratamientos, se registró mortalidad de plantas, presentándose en los tratamientos testigo (T<sub>0</sub>) y Th 11A 80.1 con una mortalidad del 40% cada uno. El fenotipo silvestre Th 650 tuvo un 20% de mortalidad de plantas, al igual que el tratamiento con fungicida (T<sub>1</sub>) que nuevamente alcanzó un 20% de mortalidad. Los tratamientos Th 11, Th 11C 40.1, Th 12, Th 12A 10.1 y NG 7 presentaron nula mortalidad de plantas (Figura 13).

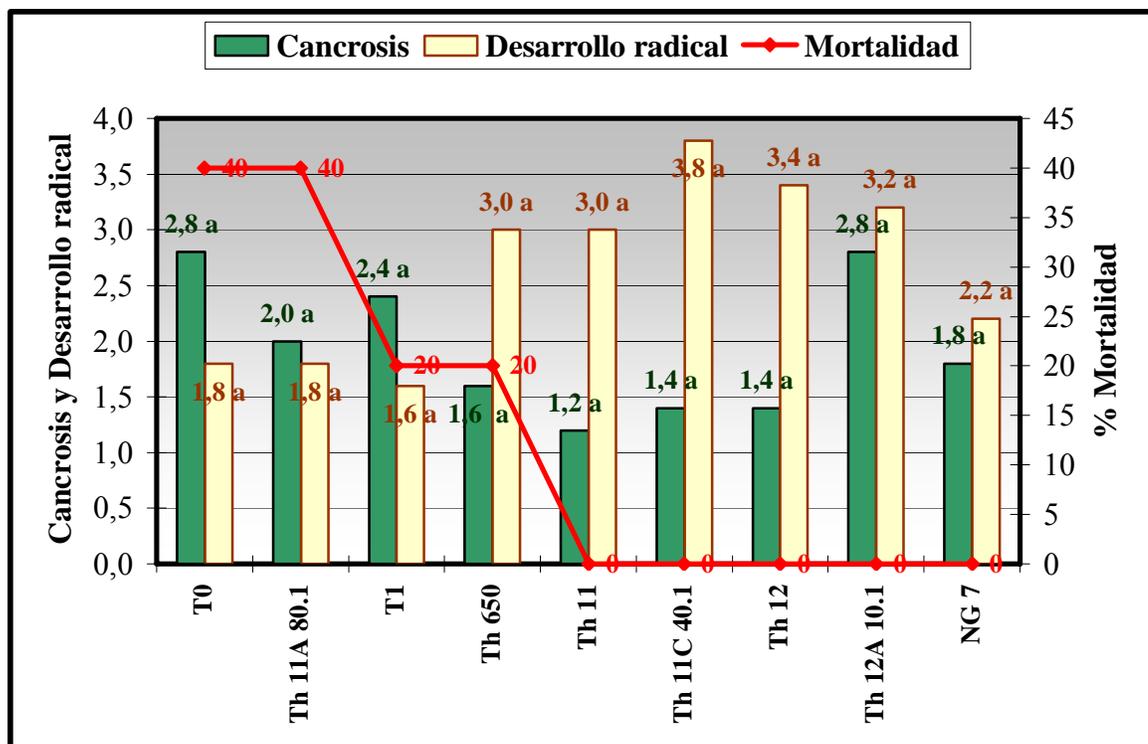


Figura 13. Cancrosis, desarrollo radical y mortalidad de plantas de tomate cv. Góndola.

Para comparar el nivel de mortalidad observado en el tratamiento con fungicida ( $T_1$ ) con su efectividad *in vitro*, se realizó un ensayo sobre la cepa 618 de *Rhizoctonia solani*, donde se diluyó el fungicida pencycuron en medio de cultivo APD dispuesto en placa de Petri, se utilizó la dosis comercial recomendada para el fungicida (2 cc/L) y se observó una completa inhibición en el crecimiento miceliar del fitopatógeno (Figura 14). Lo anterior indicaría que la efectividad *in vivo* del tratamiento con el fungicida pencycuron no es igual a la observada *in vitro* lo que se podría explicar por que el fungicida estuvo actuando en un medio cerrado, como lo es una placa de Petri.



Figura 14. Efectividad *in vitro* del fungicida pencycuron diluido en medio de cultivo APD.

### Rendimientos en biomasa relacionados

El menor nivel de enfermedad generada por *Rhizoctonia solani* 618 en las plantas de tomate del cultivar Góndola no generó diferencias significativas entre los tratamientos para los parámetros de peso de la biomasa desarrollada por las plantas (Cuadro 9).

Cuadro 9: Efecto de los tratamientos en rendimientos de plantas de tomate cv. Góndola.

Cepa	Peso fresco parte aérea		Peso seco parte aérea		Peso fresco raíces	
	(g)		(g)		(g)	
<b>Th 12A 10.1</b>	35,80	a	4,40	a	3,62	a
<b>Th 11A 80.1</b>	31,82	a	3,82	a	2,50	a
<b>NG 7</b>	29,82	a	4,24	a	3,46	a
<b>Th 11</b>	28,18	a	4,54	a	2,04	a
<b>T<sub>1</sub><sup>1</sup></b>	27,24	a	5,00	a	3,00	a
<b>Th 11C 40.1</b>	26,68	a	3,84	a	3,48	a
<b>Th 650</b>	26,12	a	5,12	a	1,92	a
<b>T<sub>0</sub><sup>2</sup></b>	21,94	a	4,86	a	2,16	a
<b>Th 12</b>	18,88	a	3,52	a	2,44	a

Letras iguales en las columnas implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA. 1/.  $T_1$  (*R. solani* + Pencycuron (0,15 cc/maceta)). 2/.  $T_0$  (Solo *Rhizoctonia solani* 618).

Esto concuerda con los resultados del trabajo en invernadero con plantas de tomate de la línea CL5915-206D efectuado por Le *et al* (2003), quienes no obtuvieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, representados por cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens*, en el control de la muerte repentina del tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.

### **Efecto residual de los tratamientos en el suelo**

En general, se observó que todas las muestras de suelo colectadas y que estuvieron sometidas a los tratamientos que incluyeron la utilización de cepas de *Trichoderma harzianum* registraron persistencia de las mismas, recuperándose un gran número de colonias de éstos bioantagonistas (Figura 15), lo que contrastó con lo sucedido con la recuperación de colonias del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* 618, en donde la cepa del fitopatógeno sólo se observó en el suelo colectado del tratamiento testigo ( $T_0$ ) y del tratamiento fungicida ( $T_1$ ), que no incluyeron la inoculación de bioantagonistas al suelo (Cuadro 10).

Lo anterior era esperable, por la nula competencia a la que estuvo sometida la cepa del fitopatógeno al no estar presente los bioantagonistas.



Figura 15. Colonias de *Trichoderma harzianum* recuperadas desde suelo en medio selectivo (Williams *et al*, 2003) dispuesto en placa de Petri.

Cuadro 10: Colonias registradas de *Trichoderma harzianum* y *Rhizoctonia solani* 618.

Cepas	Propágulos inoculados de <i>T. harzianum</i>	Propágulos inoculados de <i>R. solani</i> 618	Propágulos recuperados de <i>T. harzianum</i>	Propágulos recuperados de <i>R. solani</i> 618
	(UFC/4g de pellets)	(UFC/21g de inóculo)	(UFC/g de suelo)	
<b>Th 12A 10.1</b>	2.256.752	16.800.000	2.235.000	0
<b>Th 12</b>	1.500.000	16.800.000	2.282.500	0
<b>Th 11A 80.1</b>	3.155.500	16.800.000	385.000	0
<b>Th 11C 40.1</b>	4.155.252	16.800.000	702.500	0
<b>Th 11</b>	463.876	16.800.000	287.500	0
<b>NG 7</b>	2.044.624	16.800.000	1.197.500	0
<b>Th 650</b>	1.979.752	16.800.000	967.500	0
<b>T<sub>0</sub></b>	n.c.	16.800.000	0	837.000
<b>T<sub>1</sub></b>	n.c.	16.800.000	0	80.000

n.c.: no corresponde

### Persistencia y capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma harzianum* en el suelo

#### Persistencia de cepas mantenidas a 22 °C

Los resultados de persistencia en suelo de las cepas de *Trichoderma harzianum* inoculadas en frascos viales con 5 ml de suelo Antumapu y La Palma, mantenidas a 22 °C mostraron que para el mutante Th 12A 10.1 las UFC registradas en suelo Antumapu fueron diferentes en el tiempo expresando su máximo a los 120 días, en cambio en el suelo La Palma no se detectaron diferencias durante los 180 días. El mutante Th 11A 80.1 registró un comportamiento similar al anterior en ambos suelos. El mutante Th 11C 40.1 no presentó diferencias significativas en el tiempo en el suelo Antumapu lo que contrastó rotundamente con el suelo La Palma en donde se incrementó hasta la última medición, esto se podría explicar quizás por una mayor adaptación del mutante al pH del suelo La Palma (6,9) que del suelo Antumapu (7,8) (Apéndice II) (Cuadro 11).

Esto que coincide con los trabajos realizados por Escobar *et al* (2000) y Sepúlveda (1990) en donde se menciona que el pH óptimo para el crecimiento y producción de biomasa es cercano a pH 5,5.

La cepa mutante NG 7 tuvo, en el suelo Antumapu, su máxima cantidad de UFC a los 180 días, aunque solo fue diferente de las UFC registradas a los 90 días, situación que no se corroboró en el suelo La Palma donde no se registraron diferencias estadísticas significativas en el tiempo. Para Th 12 en suelo Antumapu no existieron diferencias significativas, pero si en el suelo La Palma, en donde el máximo se registró al sexto mes que fue mayor a lo registrado a los 90 días. La cepa silvestre Th 11 presentó un comportamiento muy similar al anterior en ambos tipos de

suelo. Para la cepa Th 650 se observó, en ambos suelos, su máximo número de UFC a partir de los 120 días, manteniéndose el efecto hasta los 180 días (Cuadro 11).

Cuadro 11: Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) recolectado desde frascos viales mantenidos a 22 °C.

Días	Mutantes				Fenotipos silvestres			
	Th 12A 10.1	Th 11A 80.1	Th 11C 40.1	NG 7	Th 12	Th 11	Th 650	
Antumapu	90	49.950 b	65.800 b	87.600 a	38.350 b	29.500 a	9.750 a	37.250 b
	120	212.200 a	262.000 a	302.500 a	215.500 ab	145.200 a	81.000 a	255.000 ab
	180	14.000 b	228.000 ab	528.000 a	232.000 a	330.000 a	226.000 a	324.000 a
La Palma	90	52.500 a	87.000 a	230.000 c	112.400 a	545.000 b	385.000 b	78.300 b
	120	129.300 a	95.600 a	350.000 b	187.000 a	950.000 ab	756.000 b	165.000 a
	180	108.000 a	100.000 a	1.158.000 a	292.000 a	1.738.000 a	1.322.000 a	210.000 a

Letras iguales en las columnas de cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación múltiple de Tukey,  $p \geq 0,05$ .

### Capacidad antagonica de las cepas mantenidas a 22 °C

El Cuadro 12 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) de *Rhizoctonia solani* obtenido mediante cultivos duales entre las colonias de *Trichoderma harzianum* mantenidas a 22 °C con la cepa 618 del fitopatógeno, en donde se observó que no existieron diferencias significativas en el tiempo, manteniéndose la agresividad del bioantagonista sobre *Rhizoctonia solani*.

Al respecto, Arias (2005) logró mayores porcentajes de ICR en su prueba de antagonismo directo entre el mutante Th 11A 80.1 y la cepa 618 de *Rhizoctonia solani*.

Cuadro 12: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia solani* obtenido por cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas en suelo a 22 °C.

Días	Mutantes				Fenotipos silvestres			
	Th 12A 10.1	Th 11A 80.1	Th 11C 40.1	NG 7	Th 12	Th 11	Th 650	
Antumapu	90	57,42 a	55,55 a	54,21 a	49,28 a	54,44 a	48,50 a	54,35 a
	120	55,89 a	55,32 a	54,29 a	48,93 a	54,51 a	48,84 a	53,48 a
	180	56,07 a	53,77 a	51,32 a	51,06 a	53,65 a	50,03 a	53,86 a
La Palma	90	48,06 a	55,22 a	50,42 a	43,11 a	57,17 a	53,36 a	55,01 a
	120	45,08 a	54,68 a	50,33 a	45,54 a	56,96 a	53,47 a	54,73 a
	180	48,38 a	54,99 a	50,11 a	46,25 a	55,01 a	51,85 a	51,50 a

Datos en porcentaje obtenidos mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971) y transformados según transformación angular de Bliss. Letras iguales en las columnas de cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA.

### Persistencia de cepas mantenidas a 5 °C

La persistencia de las cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas a temperatura de refrigeración (5 °C) mostró que para los mutantes Th 12A 10.1, Th 11C 40.1 el máximo número de UFC se consiguió a partir de los 120 días en ambos suelos, situación que se mantuvo hasta los 180 días. El mutante NG 7 siempre incrementó sus UFC en el tiempo, alcanzando el máximo a los 180 días en ambos suelos. La cepa Th 11A 80.1 registro, en suelo Antumapu, un aumento a partir de los 120 días, que se mantuvo hasta los 180 días, sin embargo en el suelo La Palma consiguió su máximo a los 180 días (Cuadro 13).

Para las cepas silvestres Th 12 y Th 11 las UFC registradas alcanzaron un máximo a partir de los 120 días, para la primera de ellas, situación que se mantuvo hasta los 180 días y para la segunda a los 180 días en ambos tipos de suelo. La cepa Th 650 presentó su mayor número de UFC a los 180 días, en suelo Antumapu, situación que en el suelo La Palma se alcanzó a partir de los 120 días, ya que, la persistencia en suelo del hongo es igual en las últimas dos mediciones (Cuadro 13).

Cuadro 13: Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) recolectado desde frascos viales mantenidos a 5 °C.

Días	Mutantes				Fenotipos silvestres			
	Th 12A 10.1	Th 11A 80.1	Th 11C 40.1	NG 7	Th 12	Th 11	Th 650	
Antumapu	90	50.770 b	70.990 b	93.490 b	44.800 c	35.000 b	10.430 b	45.000 c
	120	489.000 a	689.500 a	852.000 a	387.500 b	321.000 ab	95.600 b	404.500 b
	180	514.000 a	504.000 a	888.000 a	660.000 a	534.000 a	936.000 a	582.000 a
La Palma	90	65.000 b	110.000 c	420.000 b	155.000 c	130.000 b	415.000 b	81.000 b
	120	310.000 a	270.000 b	810.000 a	370.000 b	390.000 ab	610.000 b	475.000 a
	180	514.000 a	498.000 a	876.000 a	712.000 a	572.000 a	1.116.000 a	556.000 a

Letras iguales en las columnas de cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación Múltiple de Tukey,  $p \geq 0,05$ .

Lo anterior concuerda con la idea de una mayor conservación en el tiempo de las cepas dada por una temperatura de refrigeración, encontrada por Küçük y Kivanç (2005).

### Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a 5 °C

La capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas a 5 °C se mantuvo sin diferencias en el tiempo, es decir, a ésta temperatura los bioantagonistas también se mantuvieron agresivos sobre la cepa 618 de *Rhizoctonia solani* (Cuadro 14).

Cuadro 14: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia solani* obtenido por cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas en suelo a 5 °C.

	Días	Mutantes				Fenotipos silvestres		
		Th 12A 10.1	Th 11A 80.1	Th 11C 40.1	NG 7	Th 12	Th 11	Th 650
Antumapu	90	52,49 a	54,42 a	54,81 a	49,51 a	53,51 a	47,58 a	55,25 a
	120	52,74 a	54,56 a	55,07 a	50,95 a	53,57 a	48,03 a	55,37 a
	180	53,15 a	54,09 a	54,86 a	51,00 a	52,56 a	49,09 a	54,75 a
La Palma	90	50,41 a	52,46 a	50,95 a	49,47 a	52,68 a	47,71 a	55,30 a
	120	49,54 a	52,38 a	50,95 a	50,92 a	51,83 a	48,27 a	54,50 a
	180	49,82 a	50,80 a	51,86 a	48,78 a	53,93 a	49,09 a	56,79 a

Datos en porcentaje obtenidos mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971) y transformados según transformación angular de Bliss. Letras iguales en las columnas de cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA.

### Persistencia de cepas mantenidas a temperatura ambiente

Las cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas a temperatura ambiental de laboratorio mostraron que para el mutante Th 12A 10.1 las UFC en suelo Antumapu alcanzaron su máximo a los 120 días y en el suelo La Palma no se detectaron diferencias durante los 180 días de estudio, tal como ocurrió con este mutante cuando se mantuvo a 22 °C (Cuadro 15).

En suelo Antumapu el mutante Th 11A 80.1 registró su máximo a partir de los 120 días manteniéndose el efecto hasta los 180 días, sin embargo en suelo La Palma el máximo se registró al sexto mes. El mutante Th 11C 40.1 presentó diferencias significativas las tres veces en que se registraron sus UFC en el suelo Antumapu incrementándose en el tiempo, el suelo La Palma el máximo solo se verificó a los 180 días (Cuadro 15).

Cuadro 15: Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) recolectado desde frascos viales mantenidos a temperatura ambiente.

	Días	Mutantes				Fenotipos silvestres		
		Th 12A 10.1	Th 11A 80.1	Th 11C 40.1	NG 7	Th 12	Th 11	Th 650
Antumapu	90	48.700 b	67.050 b	84.400 c	36.100 b	48.200 b	10.100 b	38.800 b
	120	203.100 a	266.200 a	330.100 b	262.700 a	136.700 b	74.600 b	215.100 a
	180	52.000 b	316.000 a	516.000 a	342.000 a	1.064.000 a	790.000 a	20.000 b
La Palma	90	105.000 a	125.000 b	94.000 b	210.000 b	75.000 c	325.000 b	370.000 a
	120	120.000 a	170.000 b	230.000 b	510.000 a	340.000 b	410.000 b	205.000 a
	180	158.000 a	334.000 a	530.000 a	450.000 ab	926.000 a	772.000 a	118.000 a

Letras iguales en las columnas de cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación Múltiple de Tukey,  $p \geq 0,05$ .

El mutante NG 7, en suelo Antumapu, incrementó su número de UFC a partir del cuarto mes y en el suelo La Palma el comportamiento fue similar. El fenotipo silvestre Th 12, en suelo Antumapu, alcanzó el máximo a partir de los 180 días, al igual que en el suelo La Palma, donde las UFC aumentaron en cada medición. La cepa silvestre Th 11 registró un comportamiento similar al de la cepa Th 12 en ambos tipos de suelo. La cepa Th 650 registró, en suelo Antumapu, un máximo al cuarto mes y luego disminuyó, pero en el suelo La Palma no se generaron diferencias significativas durante los 180 días (Cuadro 15).

### Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a temperatura ambiente

A temperatura ambiente tampoco hubo diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial generado por las cepas de *Trichoderma harzianum*, tal como lo muestra el Cuadro 16.

En general, en todas las cepas evaluadas se observó un buen nivel de persistencia en suelo a las tres temperaturas estudiadas, recuperando colonias hasta por lo menos los 180 días de inoculadas las cepas en ambos suelos, lo que concuerda con lo realizado por Küçük y Kivanç (2005) quienes lograron recuperar colonias hasta las 24 semanas a una temperatura de almacenaje de 4 °C, pero que discrepa de lo obtenido cuando la temperatura de almacenaje fue de 30 °C, en donde solo recuperó colonias hasta la sexta semana.

Cuadro 16: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia solani* obtenido por cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas en suelo a temperatura ambiente.

Días	Mutantes				Fenotipos silvestres			
	Th 12A 10.1	Th 11A 80.1	Th 11C 40.1	NG 7	Th 12	Th 11	Th 650	
Antumapu	90	49,96 a	50,34 a	50,64 a	50,74 a	50,94 a	51,81 a	52,94 a
	120	49,53 a	50,24 a	54,49 a	50,78 a	51,94 a	51,45 a	51,94 a
	180	52,69 a	49,77 a	53,88 a	50,32 a	50,34 a	50,73 a	53,72 a
La Palma	90	53,81 a	56,28 a	59,87 a	54,38 a	58,15 a	52,95 a	60,20 a
	120	54,03 a	56,55 a	57,12 a	54,19 a	57,29 a	51,85 a	58,56 a
	180	54,06 a	56,57 a	57,47 a	54,44 a	55,97 a	55,44 a	56,73 a

Datos en porcentaje obtenidos mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971) y transformados según transformación angular de Bliss. Letras iguales en las columnas de cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA.

## CONCLUSIONES

Todas las cepas de *Trichoderma harzianum* estudiadas son inocuas para las plantas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola, al no causar daño o muerte de plantas.

Los mutantes Th 11A 80.1 y Th 12A 10.1 son mejores agentes de biocontrol de la cancrrosis del cuello causada por *Rhizoctonia solani* que el mutante Th 11C 40.1, los fenotipos silvestres Th 650 y Th 12 y que el tratamiento testigo T<sub>0</sub>, en las plantas de tomate del cultivar 92.95. Incluso son mejores que el tratamiento control con fungicida T<sub>1</sub> (pencycuron) en cuanto al desarrollo radical observado en las plantas.

En las plantas de tomate del cultivar Góndola las cepas de *Trichoderma harzianum* no generaron diferencias en cancrrosis ni en desarrollo radicular. Tampoco generaron diferencias en peso de la biomasa desarrollada por las plantas.

Las cepas de *Trichoderma harzianum* tienen un efecto de persistencia en los suelos Antumapu y La Palma por, al menos, 180 días a las temperaturas de mantención estudiadas y mantienen sus capacidad antagónica sobre el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* 618.

**BIBLIOGRAFÍA**

- AFIPA. 2006. Asociación Nacional de Fabricantes e Importadores de Productos Fitosanitarios, AG. Manual fitosanitario 2006-2007. 1160 p.
- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. (2º ed) Editorial Limusa S.A. México. 838 p.
- APABLAZA, H. G. 2000. Patología de cultivos epidemiología y control holístico. Ediciones Universidad Católica de Chile. 347 p.
- ARIAS, D. M. 2005. Efecto *in vitro* de mutantes de *Trichoderma* spp. en el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) y *Phytophthora nicotianae* aislados de tomate. Memoria de título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 45 p.
- BENITEZ, T.; DELGADO-JARANA, J.; RINCON, A.; REY, M.; LIMON, M. 1998. Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (ed.) Recent Research Developments in microbiology. Trivandrum, India, Research Signpost 2: 129-150.
- BENITEZ, T.; RINCON, A.; LIMON, M.; CODON, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Department of genetics, University of Sevilla, Spain. International Microbiology; 7: 249–260.
- BESOAIN, X.; LEFEVER, LL.; ARAYA, A.; MONTEALEGRE, J. y PEREZ, L.M. 2004. Evaluación de mutantes de *Trichoderma harzianum*, producidos bajo la acción de luz negra y luz ultravioleta. XIV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Chile, 30 Nov.-3 Dic.
- CARLING, D.E.; KUNINAGA, S. and BRAINARD, K.A. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA – internal transcribed spacers sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 (AG-2) and AG BI. Phytopathology, 92: 43–50.
- CHET, I.; IBAR, J.; HADAR, I. 1997. Fungal antagonist and mycoparasites. In: Wicklow DT & Soderstrom B (eds.) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships, New York, Springer Verlag, 165-192.
- CIREN. 1996. Descripción de suelos materiales y símbolos. Estudio agrológico Región Metropolitana. Publicación CIREN N° 115. 431 p.
- CORFO, 1990. Enfermedades del tomate en invernadero frío. Valparaíso, Chile. 53 p.

DE SOUZA, N. 1992. Control biológico de enfermedades de las plantas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 4 p.

DENNIS, C. y WEBSTER, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 363-369.

DIAZ, R. 1996. Comparación entre el uso de la solarización y el Bromuro de Metilo en el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) y malezas en un suelo destinado al monocultivo del tomate. Memoria de título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 81 p.

ESCOBAR, P.; MONTEALEGRE, J. y HERRERA, R. 2000. Selección *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* y respuesta a temperatura,  $Fe^{+3}$ , salinidad y pH con el fin de ser utilizadas en el control de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate.

GULLINO, M. and GARIBALDI, A. 1995. Le difficili alternative al bromuro di metile. *Informatore Agrario* 51(43): 65-70.

GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, M.S. y SALIH, A. 2006. Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia solani* (Kühn) que inducen pudriciones radicales en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioagro* 18 (1): 63-72.

INE 2001. VI Censo agropecuario. Disponible en: [http://www.ine.cl/censo\\_agrop/601.htm](http://www.ine.cl/censo_agrop/601.htm) 18/03/2005.

KÜÇÜK, Ç. and KIVANÇ, M. 2005. Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* conidia. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (5), pp. 483-486.

LE, H.T.T.; BLACK, L.L. and SIKORA, R.A. 2003. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol of tomato sudden caused by *Pythium aphanidermatum* following flooding in tropical hot season. *Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University*, 68(4b), pp. 463-474.

MACNISH, G.C.; CARLING, D. y BRAINARD, K. 1993. Characterización of *Rhizoctonia solani* AG-8 from bare patches by pectic isozyme and anastomosis techniques. *Phytopathology* 83: 922-927.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. y PARKER, J. 2003. Brock Biología de los Microorganismos. Décima Edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 1096 p.

MADRID, A. 2002. Control Biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Mediante el uso de *Trichoderma* spp. Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 83p.

- MARTÍNEZ, A. 1981. Proyecto de implementación de un sistema de riego tecnificado en la Estación Experimental "La Palma", Quillota. Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso. 102 p.
- MONTEALEGRE, J.; REYES, R.; BESOAIN, X.; PEREZ, M.L. y HERRERA, R. 2003. Identificación de Grupos de Anastomosis de Cepas de *Rhizoctonia solani* (Kühn) Aisladas de tomates en la V región de Chile. Boletín Micológico 18: 47-51.
- MONTEALEGRE, J. 2004. Métodos alternativos para el control de enfermedades de plantas en Chile. In: Manejo Ecológico de DoenÇas de Plantas./ Marciel j. Stadnik & Viviane Talamini (Ed.) – Florianópolis, SC: CCA/UFSC, Capítulo 11.
- OGOSHI, A. 1996. The genus *Rhizoctonia*. In *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Edited by B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate, and G. Dijst. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. Pp. 1 – 9.
- PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A. and ABD-EL MOITY TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology. 72: 126-132.
- PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathology. 23: 23-54.
- PAPAVIZAS, G.C.; ROBERTS, D.P. and KIM, K.K. 1990. Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. Can J. Microbiol. 36: 484-489.
- PAULITZ, T.C. and BELANGER, R.R. 2001. Biological Control in Greenhouse Systems. Annu. Rev. Phytopathology. 39 : 103-33.
- PEREZ, L.M. y MORALES, M.P. 2003. Obtention of *Trichoderma harzianum* Th<sub>650</sub> mutants with antagonistic capacity against *Fusarium oxysporum*. En: Resúmenes XIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Marbella, Chile.
- PEREZ, L.M.; BESOAIN, X.; REYES, M. y MONTEALEGRE, J. 2004. Caracterización de mutantes de *Trichoderma harzianum*. XIV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Chile, 30 Nov.- 3 Dic.
- REY, M.; DELGADO-JARANA, J.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C. y BENITEZ, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Rev. Iberoam. Micology. 17: S31-S36.
- REYES, V. R. 2000. Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en tomate mediante el empleo de antagonistas bacterianos. Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 81 p.

RIQUELME, V. R.; RETAMALES, A. J. y SANDOVAL, B. C. 2005. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento aéreo y radical en *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. Sometida a condiciones de estrés. Dspace Universidad de Talca. Item 1950/1490. Disponible en: <http://dspace.utalca.cl/handle/1950/1490>. 09/08/2006.

RISTAINO, J. and THOMAS, W. 1997. Agriculture, methyl bromide and the ozone hole can we fill the gaps?. *Plant Disease* 81 (9): 964-977.

SANTANDER, A. C. 2001. Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en *Lycopersicon esculentum* Mill. Mediante *Bacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. Memoria de título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 88 p.

SEPULVEDA, CH. G. 1991. Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* cepa V. Memoria de título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 60 p.

SINGLETON, L.; MIHAIL, J. and RUSH, C. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 265 p.

SIVAN, A. and CHET, I. 1993. Integrated control of Fusarium crown rot of tomato. *Crop Protection*. 12: 380 – 386.

SNEH, B.; LEE, B. and AKIRA, O. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 133 p.

SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. and DIJST, G. 1996. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 559 p.

WILLIAMS, J.; CLARKSON, J.M.; MILLS, P.R. and COOPER, R.M. 2003. A selective medium for quantitative re-isolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. *Applied and Environmental Microbiology*. P. 4190 – 4191.

## APÉNDICES

Apéndice I: Análisis textural de los tipos de los suelos utilizados en la investigación.

Suelo	Tamaño y Diámetro de partículas Hidrometro Bouyoucos			Clase de textura
	% Arena 2-0,05 mm	%Limo 0,05-0,002 mm	% Arcilla < 0,002 mm	
<b>Antumapu</b>	12,8	46,4	40,8	Arcilla-Limosa
<b>La Palma</b>	60,7	21,1	16,2	Franco-Arenoso

Según datos obtenidos por laboratorio de suelos, INIA La Platina.

Apéndice II: Análisis de fertilidad de los suelos utilizados en la investigación.

Suelo	pH	C.E. mS/cm	M.O. %	N disponible mg/kg	P disponible mg/kg	K disponible mg/kg
<b>Antumapu</b>	7,8	1,6	2,8	63	30	192
<b>La Palma</b>	6,9	5,3	2,3	95	126	408

Según datos obtenidos por laboratorio de suelos, INIA La Platina.