

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

MEMORIA DE TITULO

**EFECTO *in vitro* Y EN INVERNADERO DE CEPAS MEJORADAS DE
Trichoderma spp. EN EL CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (Kühn)**

FABIAN ANDRES OCHOA ANTILEO

Santiago – Chile

2008

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

MEMORIA DE TITULO

**EFFECTO *in vitro* Y EN INVERNADERO DE CEPAS MEJORADAS DE
Trichoderma spp. EN EL CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (Kühn)**

**CONTROL OF *Rhizoctonia solani* (Kühn) WITH *Trichoderma spp.* IMPROVED
STRAINS *in vitro* AND in GLASSHOUSE**

FABIAN ANDRES OCHOA ANTILEO

**Santiago – Chile
2008**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

EFEECTO *in vitro* Y EN INVERNADERO DE CEPAS MEJORADAS DE
***Trichoderma spp.* EN EL CONTROL DE *Rhizoctonia solani* (Kühn)**

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

FABIAN ANDRES OCHOA ANTILEO

Profesor Guía

Calificaciones

Sr. Jaime R. Montealegre A.
Ingeniero Agrónomo

Profesores Evaluadores

Sr. José Luis Henríquez S.
Ingeniero Agrónomo, M. S., Ph. D.

Sr. Ricardo Pertuzé C.
Ingeniero Agrónomo, Ph. D..

Santiago-Chile
2008

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme su apoyo incondicional durante toda mi vida. Gracias a Él se pudo realizar esta memoria de título.

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

Agradezco al Sr. Jaime R. Montealegre A. por su buena disposición, apoyo y por darme la posibilidad de aprender sobre la Fitopatología. También quiero agradecer la paciencia con la que esperó la realización de esta memoria de título.

Agradezco a Natalia y Sra. Lula por su apoyo incondicional en la parte práctica de este estudio.

A los nunca bien ponderados: “Los Ganchitos”, con los que vivimos tantas experiencias que nos hicieron mejores personas y muy buenos “ganchitos”. A los que me acompañaron, o más bien se quedaron, en la realización de esta investigación: Luisito, Sole, Mauricito, Pancha, Cata, Javi. Especial mención para Luis por apoyarme muy de cerca y ayudarme siempre. Gracias amigo mío.

Al Sr. Rodrigo A. Herrera C. por su apoyo y amistad. Por ayudarme a decidir: “¡Ya basta!, debo titularme”. Gracias por el profesionalismo demostrado en cada momento que necesité aclarar alguna duda y por sobre todo, por su amistad.

A mis amigos de la vida, los que me apoyaron con sus consejos y sabias palabras. Cristián M., Gonzalo, Rodrigo, Cristián G., Jorge V., Jorge M., Pablo N., y sus respectivas señoras que también estuvieron al tanto de mis pasos.

A Mabel García, mi amore, quien me apoyó desde los comienzos de esta investigación y creyó en que sería un profesional. Me entregó su perseverancia, amistad y lo más importante, su inconmensurable amor.

Agradezco a mis padres, Fernando y Olga, por su infinito amor y ayuda, consejos, esfuerzo, principios y valores. En fin, el hombre que soy hoy se lo debo a lo que ellos hicieron antes. Gracias viejito. Gracias viejita.

A mis hermanos, por su incondicional apoyo en cada momento que los he necesitado y que también fueron parte de esta investigación. Gracias Leticia y Valentin.

A mis amados padres, mis amados hermanos y mi amada Mabel.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Palabras clave	1
ABSTRACT	2
Key words	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Lugar donde se desarrolló la investigación	6
Obtención de microorganismos	6
Evaluación in vitro	7
Caracterización de las cepas mejoradas	8
Antagonismo in vitro a través de cultivos duales	8
Producción de metabolitos volátiles	9
Producción de metabolitos difusibles	10
Bioensayos	11
Inocuidad en plantas de tomate	11
Tratamientos y Diseño experimental	11
Procedimiento	12
Evaluaciones	12
Análisis estadístico	12
Efectividad de cepas mejoradas de <i>Trichoderma spp.</i> en el control de <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de tomate	13
Tratamientos y Diseño experimental	13
Procedimiento	13
Elaboración de pellets de <i>Trichoderma spp.</i>	13
Inoculación del suelo en macetas	15
Evaluaciones	16
Análisis estadístico	16
Viabilidad en el suelo de cepas parentales y mejoradas	17
Tratamientos y Diseño experimental	17
Procedimiento	17
Evaluaciones	18
Análisis estadístico	18
Normas de seguridad	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Evaluación in vitro	19
Antagonismo in vitro a través de cultivos duales	19
Producción de metabolitos volátiles	23
Producción de metabolitos difusibles	27
Bioensayos	31
Inocuidad en plantas de tomate	31
Inocuidad de cepas mejoradas en plantas de tomate cv. 92.95	31
Inocuidad de cepas mejoradas en plantas de tomate cv. Góndola	32
Efectividad de cepas mejoradas de <i>Trichoderma spp.</i> en el control de <i>Rhizoctonia solani</i> en plantas de tomate	34
Efectividad de cepas mejoradas en plantas cv. 92.95	34
Rendimiento en biomasa	35
Efectividad de cepas mejoradas en plantas cv. Góndola	36
Rendimiento en biomasa	37

Viabilidad en el suelo de cepas parentales y mejoradas de <i>Trichoderma harzianum</i> en el suelo	38
Viabilidad de cepas mantenidas a 22°C	38
Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a 22°C	39
Viabilidad de cepas mantenidas a 5°C	40
Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a 5°C	40
Viabilidad de cepas mantenidas a Temperatura ambiente	41
Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a Temperatura ambiente	41
Análisis de los mejores biocontroladores	42
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
APÉNDICES	49

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la capacidad biocontroladora de cepas mejoradas de *Trichoderma* spp. obtenidas a través de fusión de protoplastos y aplicación de N-metil-N-nitro-N-Nitrosoguanidinio (NG) en cepas silvestres previamente caracterizadas y seleccionadas por su buena capacidad biocontroladora en *Rhizoctonia solani*. Se evaluó su efecto in vitro a través de antagonismo directo en cultivos duales, metabolitos volátiles y metabolitos difusibles en dos cepas de *Rhizoctonia solani* (509 (GA 2-1) y 618 (GA 4)). Las pruebas de antagonismo se realizaron a la temperatura y pH óptimo de crecimiento del patógeno. Las cepas ThF 2-1, ThF 2-18, ThF 3-3, ThF 4-15 y la cepa ThF 5-8, presentaron los mejores porcentajes de inhibición. También se evaluó la capacidad biocontroladora de las cepas antes indicadas, bajo condiciones de invernadero en plántulas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola susceptibles. En la prueba de inocuidad se evaluó altura, peso fresco y seco de las plántulas. Todas las cepas resultaron inocuas. Para evaluar la capacidad biocontroladora, las cepas se aplicaron en forma de pellets de alginato de sodio (1,7 g pellet/ L suelo) al suelo en macetas, previamente inoculado con el fitopatógeno en suelo estéril y se compararon con un tratamiento testigo (sólo *Rhizoctonia solani*) y con un tratamiento a base del fungicida pencycuron. Se evaluó peso fresco y seco de las plantas, cancrrosis, desarrollo radical y mortalidad. La cepa mejorada ThF 4-15 fue el mejor agente de biocontrol en el cultivar de tomate Góndola, cuando se evaluó el nivel de cancrrosis comparado con sus genotipos silvestres. En cuanto al desarrollo radical de las plantas los tratamientos que incluyeron a las cepas mejoradas, no tuvieron diferencias. También se estudió la viabilidad y sobrevivencia de las cepas bioantagonistas formulados como pellets en dos suelos (Antumapu y La Palma) a tres temperaturas de almacenaje (22°C, 5°C y temperatura ambiental de laboratorio (18,6-25°C)) determinándose su capacidad antagónica sobre el fitopatógeno a los 30, 60 y 90 días, observándose que las cepas biocontroladoras se mantuvieron viables en los suelos Antumapu y La Palma, al menos hasta los 90 días a las temperaturas estudiadas. Se determinó también que ellos conservan su capacidad antagónica.

Palabras Clave: Fusión de protoplastos, Control biológico, Bromuro de metilo

ABSTRACT

This work had the aim to determine the capacity of the improved biocontrol agents of *Trichoderma* spp. obtained after treatment with protoplast fusion and application of N-methyl-N-Nitrosoguanidine from parental strains previously characterized and selected by its good capacity biocontroller. Dual culture direct antagonism, interaction of volatile and diffusible metabolite against *Rhizoctonia solani* 509 and 618 were tested in vitro. Those tests were done at optimums temperature and pH for pathogen growth. The ThF 2-1, ThF 2-18, ThF 3-3, ThF 4-15 and ThF 5-8 strains presented a better control.

The best bioantagonists were tested for their effectivity under glasshouse conditions in tomato plants cvs. 92.95 and Gondola, both susceptible to *Rhizoctonia solani*. The innocuity test were evaluated height, fresh and dry weight from plants. All strains result innocuous. Effectivity control of canker provoked by pathogen was also evaluated, applying *Trichoderma* strains as alginate sodium pellets (1,7 g / L soil) to soil previously phytopathogen inoculated and compared with witness treatment (only *R. solani*) and with fungicide treatment. The parameters were fresh and dry weight of plants, canker, development roots and mortality. The improved agent ThF 4-15 was the best agent of biocontrol on cultivar Góndola, about canker that the parental strains. For root development the treatments with mutants were not better between them. The viability of bioantagonistic strains in two soils at 3 storage temperatures and antagonic capacity against phytopathogen was also studied during 90 days. The number of CFU/ g soil and control against pathogen were evaluated. The biocontrol stocks were viable in both soils, at least 120 days from its inoculation at the studied temperatures and its characteristics of antagonism are conserved.

Key words: Protoplast fusion, Biological control, Methyl bromide

INTRODUCCIÓN

El tomate es la especie hortícola de mayor producción en el mundo. Según estadísticas de la FAO, en el período 2003-2006 se cultivaron 4,49 millones de ha y su producción promedio fue de 123,79 millones de toneladas métricas (Mific, 2007). En Chile, el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es uno de los más importantes por sus niveles de consumo, esto se traduce en altas superficies plantadas entre las Regiones I a X, ocupando una superficie aproximada de 16.500 ha, concentrándose el fuerte de la producción entre la V y VI Región (ODEPA, 2008).

Este cultivo, debido al monocultivo, es afectado por numerosos patógenos, tales como *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Phytophthora sp.*, *Rhizoctonia solani* (Kühn), que pueden causar caída de plántulas o “Damping-off”, daño en raíces, tallos y frutos (CORFO, 1990; Agrios, 1996; Montealegre 2005). *Rhizoctonia solani* también puede atacar frutos de tomate y pepino en contacto con suelo húmedo infectado. La incidencia de pudrición de frutos se ve favorecida con el monocultivo y alta densidad de plantación, condiciones muy utilizadas para la cosecha mecánica (Strashnov et al, 1985). Las pérdidas en rendimientos en el cultivo del tomate causado por esta enfermedad pueden llegar al 20% (Rudich, citado por Strashnov et al, 1985)

Rhizoctonia solani es uno de los hongos fitopatógenos más importantes del suelo. Este hongo fue descrito por Julius Kühn en 1858 sobre tubérculos de papa y se caracteriza por ser un patógeno muy destructivo, versátil y altamente variable, por lo cual el concepto de especie debe ser entendido en tal sentido. *Rhizoctonia solani* como especie presenta un amplio rango de hospedantes, ya que afecta las raíces, tallos tubérculos, cormos y otros órganos de las plantas que se desarrollan en el suelo (Agrios, 1996). Es un habitante común de la mayoría de los suelos e 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). También sobrevive en plantas perennes infectadas o en órganos de propagación, tales como tubérculos de papa e incluso también puede encontrarse en semillas. *Rhizoctonia solani* se disemina mediante el agua de lluvia ó de riego, suelo y a través de los órganos infectados o contaminados (Agrios, 1996).

Es una especie que presenta cepas más o menos emparentadas, dentro de la especie, estas se diferencian de acuerdo a sus grupos de anastomosis (fusión de hifas que entran en contacto) que pueden presentar. Los grupos de anastomosis se utilizan como criterio de diferenciación y clasificación entre las cepas. Dentro de los grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* presentes en Chile en el cultivo del tomate, se ha determinado la presencia de GA-4 y GA-2-1 (Montealegre *et al.*, 2003; Reyes, 2000).

El Bromuro de Metilo fue tradicionalmente usado en forma masiva en la agricultura, entre 70 y 80% del consumo mundial, como fumigante de suelos, antes del establecimiento de semillas o plantas. El restante porcentaje corresponde a tratamientos cuarentenarios, específicamente en la fumigación de frutas, de bodegas de granos y, en general, de mercaderías almacenadas, así como en la desinfección de bodegas de barcos, depósitos y molinos (González, 2006). El Bromuro de Metilo está confirmado como un producto

altamente dañino al ser una sustancia degradadora de la capa de ozono, por lo mismo, los países firmantes del Protocolo de Montreal acordaron la disminución de su producción en un 25 % para el año 2001, un 50 % para el año 2005, para así llegar a su eliminación total el año 2010 (Ristaino y Thomas citados por Reyes, 2000).

El uso de métodos alternativos a los agroquímicos que se usan normalmente para el control de enfermedades en Chile, ha ido adquiriendo importancia no sólo por los efectos al medio ambiente sino también por las exigencias de los consumidores tanto en Chile como en el extranjero (Montealegre, 2004).

La utilización de microorganismos que sean antagonistas de los fitopatógenos, requiere que estos sean efectivos, confiables, consistentes y económicos, para lo cual la obtención de bioantagonistas más eficaces puede ser incrementada a través de manipulación genética y/o mediante mutaciones inducidas. Estas modificaciones pueden no sólo incrementar la actividad de los biocontroladores; sino, aumentar su espectro de acción y persistencia en el medio ambiente.

En tomate, *Trichoderma spp.* promueve un mayor vigor de las raíces (Montealegre, 2001), aumento en el crecimiento ó desarrollo de las plantas (biofertilización), además de un aumento en los mecanismos de defensa (Benítez *et al.*, 2004)

Estudios han demostrado que *Trichoderma harzianum* Rifai ejerce un control efectivo en enfermedades presentes en plantas maduras, causadas por *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Elad *et al.*, 1981, 1982, citados por Strashnov *et al.*, 1985). Benítez *et al.* (2004) mencionan que se han obtenido excelentes resultados en el control integrado utilizando cepas de *Trichoderma virens* y Metalaxyl contra *Pythium ultimum* en el cultivo de algodón, cepas de *T. harzianum* y Captan contra *Verticillium dahliae* en papa, ó *T. virens* y Thiram controlando *Rhizoctonia solani* en tabaco.

Santander (2003) señala que estos biocontroladores naturales son capaces de ejercer un buen control sobre *Rhizoctonia solani*, en suelos que han sido sólo solarizados o se han aplicado en conjunto con la solarización. Además menciona el mejor desarrollo de la planta en cuanto a cantidad de raíces, altura de planta, calidad de frutos, peso de frutos en contraposición a plantas cultivadas en un suelo previamente bromurado.

Los mecanismos de biocontrol sugeridos para *Trichoderma* (entre otros bioantagonistas fúngicos) son antibiosis, lisis, competencia y micoparasitismo (Cook y Baker, 1983 citados por Papavizas, 1985). Además existe evidencia de que metabolitos producidos experimentalmente en materia orgánica, se producen naturalmente en los suelos y en suficientes cantidades que aseguren y expliquen un eficiente control biológico (Papavizas, 1985).

La habilidad de *Trichoderma* para degradar muchos sustratos, su versatilidad metabólica y su resistencia a inhibidores microbianos es determinante en su abundancia en muchos suelos y le proporcionan herramientas de competencia (Papavizas, 1985). En estudios

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

Es por ello que Polanco *et al.* (2004) han enfocado la producción de mutantes de *Trichoderma* a la obtención de cepas que aumenten la capacidad de secretar antibióticos y enzimas relacionados con su capacidad antagónica. Ogawa *et al.* (2000) señala que la fusión de protoplastos de aislados de *Trichoderma harzianum*, presentan características especiales en cuanto al aumento de la capacidad antagónica sobre fitopatógenos. Investigaciones indican que la fusión de protoplastos entre cepas de aislados silvestres de *Trichoderma* presentan un crecimiento más rápido y abundante esporulación que sus cepas parentales (Prabavathy *et al.*, 2006). Por otro lado, Hatvani *et al.* (2006) señalan que cepas mejoradas de *Trichoderma atroviridae*, a través de fusión, resultaron resistentes a tebuconazole y carbendazim.

Otra forma de mutagenesis existente actualmente, es el método químico, a través de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinio. Wiater *et al.* (2006) señalan que mutantes del aislado *Trichoderma harzianum* F-340 tuvieron una actividad enzimática casi 2 veces mayor que la cepa parental.

Desde esta perspectiva, la obtención de protoplastos de los aislados nativos chilenos ya seleccionados por su capacidad para expresar diferentes mecanismos de antagonismo o de tolerancia a fungicidas, permitiría obtener productos de fusión que muestren ambas características, constituyendo una alternativa adicional para la obtención de agentes biocontroladores.

Considerando los antecedentes expuestos, se planteó el objetivo de la presente memoria de título:

Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de cepas mejoradas de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre *Rhizoctonia solani* (Kühn), que potencialmente se pueden utilizar como biocontroladores.

Determinar la inocuidad y efectividad en 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 capacidad de sobrevivencia y conservación de eficacia antagónica *in vitro*, de las cepas de *Trichoderma harzianum* (Rifai) mantenidos en dos suelos a tres temperaturas diferentes de almacenaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

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.

En su realización, se utilizaron los equipos e infraestructura del laboratorio ya mencionado, cepas de *Rhizoctonia solani* (509 y 618) obtenidas del el cepario del laboratorio, los antagonistas utilizados corresponden a diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* mejoradas mediante fusión de protoplastos (Besoain *et al.*, 2004), y utilización del agente mutagénico N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinio a partir de *Trichoderma polysporum* 34 (Polanco, 2005), cuyos progenitores fueron previamente caracterizados y seleccionados por su capacidad para expresar mecanismos múltiples de antagonismo contra *Rhizoctonia solani* (Besoain *et al.*, 2001(Cuadro 1). Se utilizaron plántulas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola sin resistencia a *Rhizoctonia solani*, suelo del Campus Antumapu de la Universidad de Chile (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 mejoradas de *Trichoderma spp.* con sus cepas parentales utilizadas en los experimentos *in vitro*.

Cepas parentales	Cepas mejoradas	Tipo de mejoramiento realizado
Serie ThF2¹ (ThVxTh291)	ThF2-1;ThF2-10 ThF2-12; ThF2-18	Fusión de Protoplastos
Serie ThF3¹ (ThVxTh11)	ThF3-2;ThF3-3;ThF3-4; ThF3-6;ThF3-7	Fusión de Protoplastos
Serie ThF4¹ (ThVxTh12)	ThF4-13; ThF4-15	Fusión de Protoplastos
Serie ThF5¹ (Th11xTh12)	ThF5-8	Fusión de Protoplastos
Serie ThF6¹ (Th12xTh291)	ThF6-2	Fusión de Protoplastos
<i>T. polysporum</i> 34²	NG ³ 7; NG ³ -VII; NG ³ -IX	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinio

1/. Cepas proporcionadas por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 2/. Mutantes proporcionados por la Universidad Andrés Bello. 3/. Abreviación utilizada para referirse a N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidinio.

La memoria consideró dos experimentos, uno de los cuales se realizó *in vitro*, de manera de seleccionar las mejores cepas de acuerdo a los parámetros de antagonismo directo, interacción por producción de metabolitos difusibles y metabolitos volátiles. En base a estos resultados, las cepas que se destacaron fueron evaluadas en ensayos *in vivo*, en invernadero (prueba de inocuidad y efectividad) y evaluación de viabilidad en el suelo de las cepas seleccionadas almacenadas a diferentes temperaturas.

1. Evaluación *in vitro*

Para determinar el efecto de los antagonistas (biocontrol) *in vitro* (Cuadro 2), los antagonistas, y las cepas de *Rhizoctonia solani* 509 y 618 de los grupos de anastomosis 2-1 y 4, respectivamente, se hicieron crecer al pH y temperaturas óptimas (Madrid, 2002).

Los pH óptimos para cada cepa patógena (Madrid, 2002) se lograron agregando, al medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD), NaOH o HCl diluidos y midiendo permanentemente con un peachímetro (Hanna instruments HI 9321 Microprocessor), previo a autoclavar el medio de cultivo. La temperatura óptima para el crecimiento de las cepas de *R. solani*, se mantuvo colocando las placas en cámaras de cultivo a las temperaturas determinadas por Madrid (2002).

Cuadro 2. Temperaturas y pH óptimos de las cepas de *Rhizoctonia solani* utilizadas (Madrid, 2002).

Cepas	pH	T°
<i>Rhizoctonia solani</i> 509 GA 2-1	7,0	20 °C
<i>Rhizoctonia solani</i> 618 GA 4	6,5	22 °C

Los parámetros evaluados fueron el antagonismo directo, es decir, la inhibición de crecimiento que existe por el enfrentamiento de la cepa patógena frente al agente biocontrolador. También se evaluó la inhibición de crecimiento del patógeno por efecto de la producción de metabolitos volátiles del biocontrolador. Paralelamente se evaluó la inhibición de crecimiento del patógeno, que existió debido a la producción de metabolitos difusibles de las cepas biocontroladoras.

En las tres pruebas *in vitro*, los resultados obtenidos en porcentaje fueron transformados mediante la Transformación Angular de Bliss y luego se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y en el caso que se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) se llevó a cabo la prueba de rango múltiple de Tukey.

Caracterización de cepas mejoradas

Para la realización de los ensayos *in vitro*, que a continuación se presentan, las cepas de *Rhizoctonia solani*, las cepas mejoradas y las cepas parentales respectivas se hicieron crecer y se mantuvieron en placas de Petri con APD. Para la siembra de las placas se utilizó un disco de 5 mm de diámetro obtenido del margen de la colonia del microorganismo respectivo de 4 días de edad colocándolo en placas de Petri con APD. Luego, las placas en las cuales se realizaron las pruebas de inhibición de crecimiento, se incubaron a la temperatura y pH óptimos de cada cepa de *R. solani* (Cuadro 2).

Antagonismo *in vitro* a través de cultivos duales

Discos de APD de 5 mm de diámetro con el antagonista y con el patógeno, obtenidos con un sacabocados desde los márgenes de cultivos de 4 días de edad, se colocaron frente a frente y en forma equidistante del centro de la placa a 4 cm (Figura 1). Se realizaron cinco repeticiones para cada combinación patógeno / antagonista. El tratamiento testigo consistió en un disco de micelio del patógeno creciendo sobre el medio APD, también con cinco repeticiones. La evaluación se realizó cuando el crecimiento del testigo cubrió toda la placa, y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (I.C.R.) mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971a):

$$\text{ICR (\%)} = (R_1 - R_2) 100 / R_1$$

Donde R_1 es la distancia más lejana recorrida por el patógeno y R_2 es distancia recorrida por el patógeno hacia el antagonista.

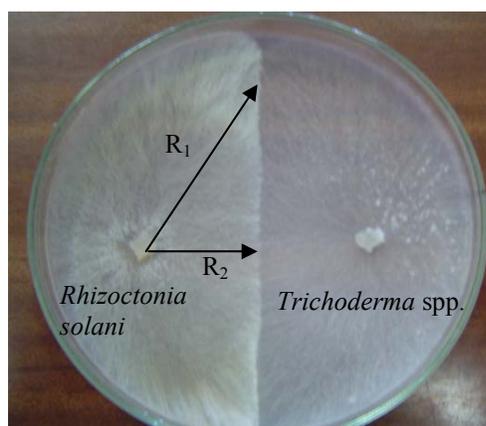


Figura 1. Interacción entre cultivos duales.

Producción de metabolitos volátiles

El efecto de metabolitos volátiles, se evaluó mediante el método de Dennis y Webster (1971b). En placas de Petri con medio APD, en su centro se colocó un disco de 5 mm de diámetro donde crecía el patógeno y en la otra, discos con el biocontrolador. Luego se unió cada placa del patógeno con una placa invertida donde se desarrollaría el biocontrolador, y se sellaron con parafilm en los bordes (Figura 2). Los tratamientos testigos consistieron en un disco de micelio de *R. solani* creciendo sobre el medio APD unida a una placa sólo con el medio de cultivo. La evaluación consistió en observar y medir el crecimiento radial del patógeno al momento que el testigo cubrió toda la placa de Petri.

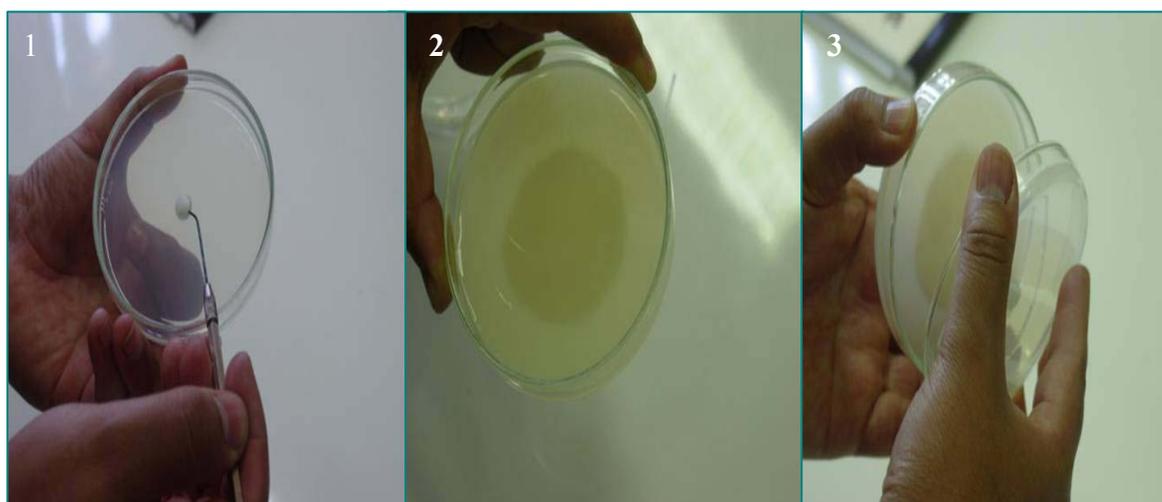


Figura 2. Inhibición de crecimiento por producción de metabolitos volátiles. 1. Siembra del disco de APD conteniendo al hongo. 2. Crecimiento del microorganismo en la placa. 3. Unión de placas conteniendo al bioantagonista en una y al patógeno en la otra.

Producción de metabolitos difusibles

En base al método de Dennis y Webster (1971b), las placas de Petri con medio de cultivo se tapizaron con papel celofán (sin film impermeabilizante y previamente esterilizado entre trozos de gasa en autoclave por una hora a 121°C).

En el centro de una placa de Petri con papel celofán se depositó un disco de cultivo de 5 mm de diámetro del hongo antagonista. Una vez que el antagonista creció lo suficiente, antes de llegar al borde del papel celofán, se retiró con una pinza el papel celofán más el antagonista incluido, cuidando que no hubiera ningún contacto entre el hongo y la superficie del agar y que no se encontrara esporulado y en su lugar se colocó un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo de la cepa *R. solani* respectiva (Figura 3). Los tratamientos testigos consistieron en un disco de micelio de la cepa del patógeno, creciendo sobre el medio APD que contenía papel celofán. La evaluación consistió en observar y medir el crecimiento radial del patógeno una vez que el testigo cubrió toda la superficie de la placa de Petri.

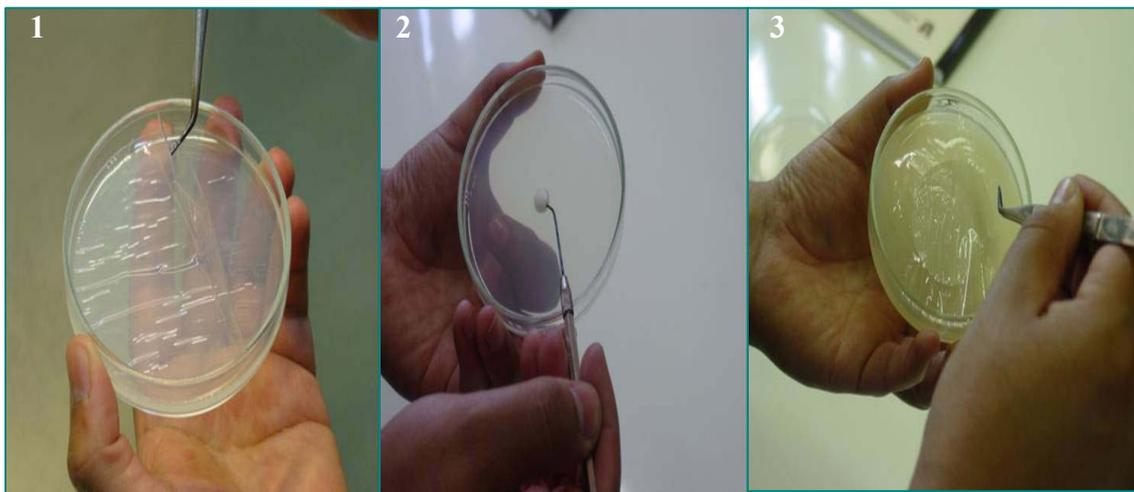


Figura 3. Inhibición de crecimiento por producción de metabolitos difusibles. 1. Colocación del papel celofán en la placa con APD. 2. Siembra del agente biocontrolador. 3. Retiro del papel celofán conteniendo al antagonista antes de que esporule y que las hifas entren en contacto con la superficie del agar, para luego sembrar el patógeno.

2. Bioensayos

Se seleccionaron las cepas de *Trichoderma spp.* que presentaron un mejor control in vitro de las cepas de *Rhizoctonia solani*, de acuerdo a los parámetros de antagonismo directo, metabolitos volátiles y metabolitos difusibles, con el fin de evaluar en condiciones semicontroladas de invernadero sus efectos sobre la cepa patógena *R. solani* 618.

Las cepas de *Trichoderma spp.* Mejoradas y seleccionadas se hicieron crecer en medios de cultivo líquidos e incubaron en cámara de cultivo a 22 °C, desde allí se obtuvo la biomasa para la fabricación de pellets (Santander, 2001), que representó la vía de formulación y aplicación.

Inocuidad en plantas de tomate

Tratamientos y Diseño experimental

Para evaluar la inocuidad de las cepas mejoradas y de sus progenitores, se establecieron dos ensayos independientes, uno en el cultivar de tomate 92.95 y el otro en el cultivar Góndola. Para ambos ensayos el diseño experimental consistió de un modelo completamente aleatorizado que incluyó 10 tratamientos (Cuadro 3) con 5 repeticiones. La unidad experimental fue 1 plántula de tomate dispuesta en un vaso plástico. Se consideró un tratamiento testigo que consistió en sumergir las raíces en agua destilada.

Cuadro 3. Tratamientos realizados en bioensayo de inocuidad en plántulas de tomate.

Tratamiento	Descripción
T ₀ (testigo)	Inmersión en agua destilada estéril
Th 12	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa Th 12
Th 11	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa Th 11
Th 291	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa Th 291
Th V	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa Th V
ThF2-1	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa ThF2-1
ThF2-18	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa ThF2-18
ThF3-3	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa ThF3-3
ThF4-15	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa ThF4-15
ThF5-8	Inmersión ¹ en suspensión de conidias cepa ThF5-8

1/. Inmersión de raíces en suspensiones de conidias (5×10^6 conidias/ml), durante 15 minutos, de las cepas de *Trichoderma spp.* estudiadas, en los dos cultivares de tomate.

Procedimiento

Para el establecimiento de los tratamientos se prepararon suspensiones de conidias de cada una de las cepas seleccionadas en agua destilada estéril a una concentración de 5×10^6 esporas / ml empleando la metodología de Besoain *et al.* (2004). Las raíces de las plántulas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola, al estado fenológico de 3 a 5 hojas verdaderas, se sumergieron en cada una de estas suspensiones durante 15 minutos (Cuadro 3), luego se transplantaron a vasos plásticos de 250 ml con sustrato estéril constituido de 1/3 de suelo Antumapu y 1/3 de arena (esterilizados con Bromuro de Metilo en dosis de $75,5 \text{ cc/m}^2$) y 1/3 de perlita (esterilizada en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos). De este modo, las plántulas se hicieron crecer bajo condiciones semicontroladas de invernadero (Figura 4).



Figura 4. Proceso de inoculación de las plántulas de tomate en suspensión de conidias. 1: Inmersión de raíces en suspensión de conidias, constante agitación. 2 y 3: transplante a sustrato estéril. 4: plántula de tomate dispuesta en vaso plástico y mantenida bajo condiciones semicontroladas de invernadero.

Evaluaciones

Se evaluó la altura (medida desde el cuello hasta el ápice de crecimiento más alto), peso fresco y peso seco de la parte aérea y peso fresco de raíces al mes de realizado el trasplante.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza con un 95% de confianza y cuando se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos se les realizó la prueba de comparación múltiple de Dunnett's para separar las medias.

Efectividad de cepas mejoradas de *Trichoderma spp.* en el control de *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate

Tratamientos y Diseño experimental

Se realizó un bioensayo con las cepas mejoradas de *Trichoderma spp.* seleccionadas y el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* 618 (GA 4) en forma independiente para los cultivares de tomate 92.95 y Góndola, con un diseño experimental completamente aleatorizado que incluyó 10 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Estos fueron comparados con un tratamiento testigo inoculado sólo con el fitopatógeno y con un tratamiento con fungicida, donde además de inocular al fitopatógeno al suelo, se le aplicó el fungicida pencycuron (Cuadro 5). La unidad experimental fue 1 plántula de tomate dispuesta en una maceta.

Cuadro 5. Tratamientos realizados en el bioensayo de efectividad.

Tratamiento	Descripción
T ₀ (testigo)	Plántula en suelo sólo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹
T ₁ (fungicida)	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pencycuron ²
Th 12	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ Th 12
Th 11	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ Th 11
Th 291	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ Th 291
Th V	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ Th V
ThF2-1	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ ThF2-1
ThF2-18	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ ThF2-18
ThF3-3	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ ThF3-3
ThF4-15	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ ThF4-15
ThF5-8	Plántula en suelo con <i>Rhizoctonia solani</i> 618 ¹ + pellets ³ ThF5-8

1/. Fitopatógeno inoculado al momento del transplante. 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 transplante como pellets de alginato de sodio.

Procedimiento

Elaboración de pellets de *Trichoderma spp.*

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), modificando el medio de cultivo en el cual se realiza la incubación de la biomasa del hongo (Robinson, 2005), además de la adición al medio de cultivo de 200 ppm del antibiótico Strepto Plus (Sulfato de Estreptomina, Clorhidrato de Oxitetraciclina) (AFIPA, 2006) para evitar posibles contaminaciones bacterianas (Figura 5).

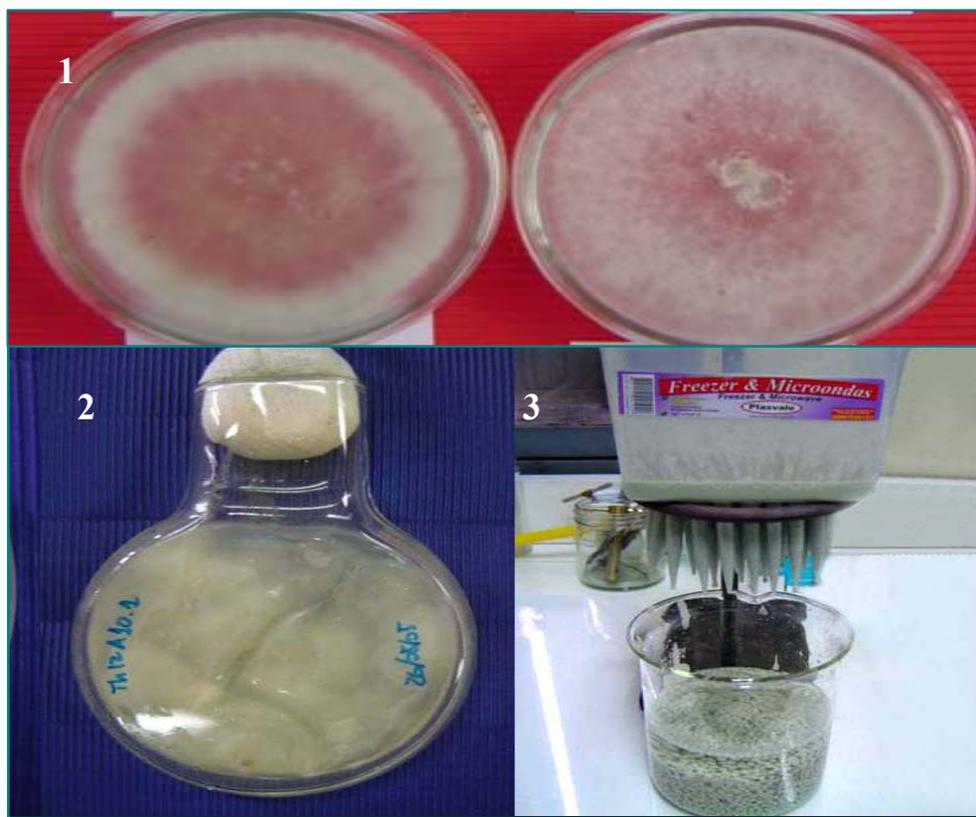


Figura 5. Proceso de pelletización de las cepas de *Trichoderma harzianum*. 1. Cultivo del hongo desarrollado en placa de Petri con APD. 2. Desarrollo del micelio del hongo en el medio de cultivo líquido específico. 3. Depósito de múltiples salidas de gotero desembocando en solución de CaCl_2 3% p/v para la formación de los pellets.

Una vez que los pellets estuvieron disponibles, se les determinó el número de unidades formadoras de colonia por gramo (N° UFC/ g pellets), siguiendo la metodología de siembra por extensión descrita por Madigan *et al.* (2003), en placas Petri con APD, y se incubaron a 22°C durante 72 horas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Unidades formadoras de colonia por gramo de pellets de cepas de *T. harzianum*.

Tipo de microorganismo	Fusión de protoplastos entre:	Cepa	UFC / g pellet
Cepa Parental	N.C	Th 12	375.000
Cepa Parental	N.C	Th 11	175.000
Cepa Parental	N.C	Th 291	366.667
Cepa Parental	N.C	Th V	225.000
Cepa mejorada	ThV x Th291	ThF2-1	866.667
Cepa mejorada	ThV x Th291	ThF2-18	766.667
Cepa mejorada	ThV x Th11	ThF3-3	666.668
Cepa mejorada	ThV x Th12	ThF4-15	275.000
Cepa mejorada	Th11 x Th12	ThF5-8	525.000

N.C.: No corresponde

Inoculación del suelo en macetas

Se utilizaron macetas de 2,3 L con suelo Antumapu esterilizado con Bromuro de Metilo (dosis de 75,5 cc/m²) y posteriormente inoculado con *Rhizoctonia solani* 618, se dispusieron plántulas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola. Para la inoculación del suelo, se utilizó la metodología empleada por Santander (2001), haciéndose crecer *Rhizoctonia solani* cepa 618 en semillas de avena, las que se esterilizaron autoclavando dos veces a 121°C durante 20 minutos dejando un intervalo de 24 horas entre cada esterilización, e incubadas en cámara de cultivo a 22°C durante siete días. Una vez que el micelio se desarrolló profusamente en estas semillas, se molieron y se procedió a inocular el suelo en una dosis de 21 g de *R. solani*/ maceta (Valderrama, 2007). Se utilizó 1,7 g pellet/L de cada cepa concentrando este inóculo en el volumen cercano al pan de raíces y tallo principal de las plántulas de tomate que se transplantaron al estado fenológico de tres a cinco hojas verdaderas. Luego se mantuvieron en invernadero hasta el estado fenológico de floración donde las temperaturas promedio de suelo fluctuaron entre los 16,3-22,6 °C (Figura 6).



Figura 6. Proceso de inoculación del suelo de las macetas. 1. Semillas de avena en matraz para ser esterilizadas. 2. Inóculo del fitopatógeno desarrollado en semillas de avena estériles. 3. Espacio dejado en suelo para inoculación. 4. Inoculación del fitopatógeno al suelo. 5. Inoculación de la cepa bioantagonista en forma de pellet. 6. Mezcla de los inóculos con el suelo del volumen cercano al pan de raíces y cuello de la plántula de tomate y posterior transplante.

Evaluaciones

En el estado fenológico de floración, se evaluó peso fresco total de las plantas, además del peso seco de las raíces.

También se evaluó mortalidad de plantas, considerando una planta muerta cuando el nivel de daño en el cuello fue muy alto y la planta ya no pudo continuar emitiendo hojas y sobrevivir. El nivel de cancrrosis en la zona del cuello se evaluó en base a escala propuesta por Valderrama (2007) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Escala de notas utilizada para determinar el nivel de cancrrosis en la zona del cuello de las plantas.

Escala	Rango de area afectada	Clasificación
0	0 %	planta sana
1	<5 %	enfermedad leve
2	5 %-30%	enfermedad moderada
3	30 %-60%	enfermedad importante
4	60 %-90%	enfermedad grave
5	>90 %	planta muerta

El desarrollo radical de las plantas, fue otro parámetro evaluado a través de la escala propuesta por Valderrama (2007) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Escala de notas utilizada para evaluar desarrollo radical de las plantas Valderrama, 2007).

Escala	Desarrollo radical
0	Nulo desarrollo (planta muerta)
1	Pobre desarrollo (planta debilitada)
2	Moderado desarrollo (planta estable)
3	Buen desarrollo (planta saludable)
4	Muy buen desarrollo (planta saludable)

Análisis estadístico

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 al 95% de confianza y cuando se detectaron diferencias significativas se les realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para analizar los parámetros de cancrrosis de la zona del cuello y desarrollo radical, los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por comparación de pares según prueba Mann-Whitney (95% de confianza).

Viabilidad en el suelo de cepas parentales y mejoradas

Tratamientos y Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar la viabilidad en el tiempo y la mantención de las características de antagonismo sobre *Rhizoctonia solani* de las cepas parentales y mejoradas seleccionadas se establecieron 10 tratamientos (Cuadro 8) los que se dispusieron en un diseño completamente al azar, con 5 repeticiones cada uno y con una unidad experimental de una placa de Petri por tratamiento.

Cuadro 8: Unidades formadoras de colonia inoculadas por tratamiento en frascos viales.

Tipo de microorganismo	Fusión de protoplastos entre:	Tratamiento	UFC/0,009 g pellet ¹
Cepa Parental	N.C. ²	Th 11	1.575
Cepa Parental	N.C.	Th 12	3.375
Cepa Parental	N.C.	Th 291	3.300
Cepa Parental	N.C.	Th V	2.025
Cepa Mejorada	ThV x Th291	ThF2-1	7.800
Cepa Mejorada	ThV x Th291	ThF2-18	6.900
Cepa Mejorada	ThV x Th11	ThF3-3	6.000
Cepa Mejorada	ThV x Th12	ThF4-15	2.475
Cepa Mejorada	Th11 x Th12	ThF5-8	4.725

1/. Unidades formadoras de colonia obtenidas del cálculo para 0,009 g de pellet según referencia del ensayo en macetas. 2/. N.C.: No corresponde

Procedimiento

Se inocularon frascos viales conteniendo 5 mL de suelo húmedo estéril (esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos) con 0,009 g de pellets de cada cepa de *Trichoderma* spp., equivalentes a la dosificación de pellet utilizada en el bioensayo anterior (Cuadro 8). Se emplearon dos tipos de suelo, suelo proveniente del Campus Antumapu y suelo de la Estación Experimental La Palma (Apéndices I y II). Los frascos con suelo estéril, se sometieron a tres temperaturas diferentes de almacenaje, temperatura de refrigeración (5 °C), óptima del fitopatógeno (22 °C) y temperatura ambiental de laboratorio (18,6-25 °C). Cada ensayo fue independiente entre sí, es decir, las temperaturas de almacenaje y los 2 suelos de distinta procedencia no tienen relación entre sí, al menos en este estudio. Estos se mantuvieron por 30, 60 y 90 días, luego se evaluaron.

Siguiendo el protocolo de reisolamiento de cepas de *Trichoderma* spp., utilizado por Williams *et al.* (2003), se reisolaron desde cada suelo inóculos de las cepas seleccionadas en tres oportunidades, y se les hicieron pruebas in vitro de antagonismo directo sobre *Rhizoctonia solani* cepa 618.

Desde el suelo de los frascos viales se recuperó 1 g de suelo y se prepararon diluciones seriadas en agua destilada estéril, reaislando así inóculos de las cepas a los 30, 60 y 90 días. Luego se realizó una siembra por extensión de las diluciones 10^{-4} y 10^{-6} en un medio de cultivo selectivo para *Trichoderma harzianum* (Williams *et al.*, 2003) dispuesto en placas de Petri, que permitió medir la viabilidad del hongo expresada en UFC/g de suelo recuperado en cada oportunidad. Con las colonias recuperadas y siguiendo la metodología empleada por Arias (2005), se realizaron pruebas de antagonismo directo in vitro en cultivos duales, sobre la cepa 618 de *Rhizoctonia solani* con el fin de evaluar la mantención de la capacidad antagonista en el tiempo de las distintas cepas de *Trichoderma* estudiadas.

Evaluaciones

La evaluación de la prueba de antagonismo directo 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 (1971a).

Análisis estadístico

Los resultados provenientes del número de UFC/g de suelo de los frascos viales, se sometieron a un análisis de varianza al 95% de confianza, y cuando se detectaron diferencias significativas se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Todos los resultados obtenidos en porcentaje fueron modificados mediante transformación angular de Bliss para luego someterse al análisis de varianza.

Normas de bioseguridad

El suelo, medios de cultivo, plantas y materiales utilizados en todos los bioensayos y que estuvieron en contacto con los microorganismos mejorados fueron esterilizados antes de su eliminación al medio ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron una serie de ensayos tendientes a demostrar las capacidades que exhiben los biocontroladores mejorados mediante mutaciones inducidas, en comparación con cepas parentales. El objetivo final fue seleccionar los mejores biocontroladores de acuerdo a los parámetros evaluados, tanto en laboratorio como en invernadero, como cepas mejoradas con altas capacidades antagonicas que controlan de mejor manera la enfermedad generada por el fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

1. Evaluación in vitro

Antagonismo in vitro a través de cultivos duales

Al analizar los porcentajes de inhibición del ensayo de antagonismo directo, entre las cepas de la serie ThF2 y los patógenos, se determinó que las cepas mejoradas ThF2-1 y ThF2-18 inhibieron en mayor proporción el micelio de *R. solani* 618 en comparación con la cepa parental Th291 de acuerdo al criterio de evaluación de inhibición del crecimiento miceliar (Cuadro 9). Por otra parte, estas mismas cepas fueron estadísticamente iguales a la cepa parental Th291 en la inhibición de *R. solani* 509, sin embargo, poseen un alto porcentaje de inhibición.

Cuadro 9. Antagonismo directo medido como el % de inhibición del crecimiento miceliar de la serie ThF2, obtenidas por fusión de protoplastos, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y	
	Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1)	Cepa 618 (GA 4)
	(%)	(%)
ThF2-1	89,79 a	60,19 a
ThF2-10	89,02 a	53,46 ab
ThF2-18	84,50 ab	54,68 a
<i>T. harzianum</i> 291 ¹	82,96 a	44,69 b
ThF2-12	53,77 bc	54,02 ab
<i>T. harzianum</i> V ¹	47,47 c	53,98 ab

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/.Cepa parental.

En la serie ThF3, se determinó que las cepas ThF3-2 y ThF3-3 fueron estadísticamente distintas con respecto a sus padres en el control de *R. solani* 509 (Cuadro 10) lo cual se reflejó en el alto porcentaje de inhibición que prácticamente fue el doble del observado en las cepas parentales. Sin embargo, en el control de la cepa 618, las cepas mejoradas fueron iguales estadísticamente a las cepas parentales, pero presentaron un porcentaje de inhibición sobre el 50%.

Cuadro 10. Antagonismo directo medido como el % de inhibición del crecimiento micelial de la serie ThF3, obtenidas por fusión de protoplastos, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1)	Cepa 618 (GA 4)
	(%)	(%)
ThF3-3	90,55 a	55,81 a
ThF3-2	86,61 a	51,42 a
ThF3-4	74,79 ab	49,16 a
ThF3-6	69,13 ab	50,43 a
ThF3-7	68,39 ab	52,58 a
<i>T. harzianum</i> V ¹	47,47 b	53,98 a
<i>T. harzianum</i> 11 ¹	47,41 b	55,09 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/.Cepa parental.

De acuerdo al parámetro de inhibición de crecimiento micelial, en la serie ThF4, la cepa mejorada ThF4-15 se destacó ya que presentó una mayor proporción de inhibición con respecto a sus cepas parentales sobre *R. solani* 509; sin embargo, se observó que no obtuvo diferencias significativas, pero sí resultó con un porcentaje de inhibición cercano al 50% sobre *R. solani* 618 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Antagonismo directo medido como el % de inhibición del crecimiento micelial de la serie ThF4, obtenidas por fusión de protoplastos, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1)	Cepa 618 (GA 4)
	(%)	(%)
ThF4-15	91,75 a	49,90 a
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	49,05 b	53,42 a
ThF4-13	48,98 b	30,62 b
<i>T. harzianum</i> V ¹	47,47 b	53,98 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental

En la serie ThF5, se observó que la cepa ThF5-8 tuvo diferencias significativas en relación a sus cepas parentales en el control del patógeno *R. solani* 509 con un alto porcentaje de inhibición por sobre el resto de los antagonistas (Cuadro 12). Por otra parte, la inhibición del crecimiento miceliar de la cepa 618 de *R. solani* resultó menor con respecto a las cepas parentales, sin embargo el porcentaje de inhibición resultó en un valor cercano al 50 %.

Cuadro 12. Antagonismo directo medido como el % de inhibición del crecimiento miceliar de la serie ThF5, obtenidas por fusión de protoplastos, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
ThF5-8	77,67 a	44,46 b
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	49,05 b	53,42 a
<i>T. harzianum</i> 11 ¹	47,41 b	55,09 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

Al observar los resultados en la serie ThF6, la cepa ThF6-2 presentó diferencias estadísticas con respecto a la cepa parental Th 12 (Cuadro 13), con un alto porcentaje de inhibición en el control de *R. solani* 509. En el caso del antagonismo frente a *R. solani* 618, ésta cepa presentó un porcentaje similar a sus padres en términos numéricos, es decir, cercano al 50 % de inhibición.

Cuadro 13. Antagonismo directo medido como el % de inhibición del crecimiento miceliar de la serie ThF6, obtenidas por fusión de protoplastos, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
ThF6-2	89,55 a	47,24 a
<i>T. harzianum</i> 291 ¹	82,96 a	44,69 a
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	49,05 b	53,42 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

En los resultados de los mutantes obtenidos por medio de N-nitrosoguanidinio a partir de la cepa *Trichoderma polysporum* 34, se pudo apreciar que las diferencias obtenidas reflejan que los mutantes estuvieron bajo el porcentaje de inhibición de la cepa parental en el control de *R. solani* 509. En el caso de la cepa 618 del patógeno no presentaron diferencias significativas respecto de la cepa parental (Cuadro 14).

Cuadro 14. Antagonismo directo medido como el % de inhibición del crecimiento miceliar de la serie NG, obtenidas por N-nitrosoguanidinio a partir de la cepa parental *Trichoderma polysporum* 34, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
<i>T. polysporum</i> 34 ¹	89,06 a	48,52 a
Tpol34 NG-VII	63,15 b	51,43 a
Tpol34 NG-7	58,64 b	53,23 a
Tpol34 NG-IX	54,08 b	51,79 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

Al efectuar un recuento de los resultados obtenidos mediante la prueba de antagonismo directo, en general, las cepas mejoradas presentaron una mejor inhibición de la cepa de *Rhizoctonia solani* 509 del grupo de anastomosis 2-1, que de la cepa 618 del grupo de anastomosis 4.

Los cepas mejoradas de *Trichoderma*, en general, ejercieron una mejor inhibición de las cepas de *Rhizoctonia solani* que sus cepas parentales ó con una de ellas. Incluso se pudo observar en algunas placas Petri un cambio de coloración del micelio en la zona de inhibición, observado también por Reyes (2000) y Arias (2005).

La finalidad de mejorar cepas silvestres de *Trichoderma* es que las mejoradas tengan un mayor efecto controlador sobre el patógeno (Rey *et al.*, 2000). En este trabajo, todas las cepas mejoradas tuvieron algún grado de inhibición sobre las cepas de *Rhizoctonia solani* evaluadas, lo que coincide con los reportes de Grondona *et al.* (1997). Los altos porcentajes de inhibición de crecimiento in vitro fueron observados por Kücük y Kivanc (2003), los cuales señalan que el aislado de *Trichoderma harzianum* cepa T19 ejerció una alta inhibición sobre *R. solani*.

Besoain *et al.* (2007) observaron un mayor crecimiento radial de las colonias en las cepas mejoradas, a través de fusión de protoplastos, que sus cepas parentales. Sivan y Harman (1991) observaron que la colonización de una cepa mejorada por fusión de protoplastos (*Trichoderma harzianum* 1295-22), entre los aislados T12 y T95, resultó ser más efectivo que sus cepas parentales, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el desarrollo de este ensayo.

La actividad y éxito de los antagonistas en esta prueba, es resultado de la competencia por nutrientes y espacio, o una modificación de la rizósfera como es la acidificación del medio, lo cual impide el desarrollo de algunos patógenos lo que se refleja en los resultados obtenidos in vitro (Benítez *et al.*, 2004; Howell, 2003; De Melo, 2000).

Producción de Metabolitos Volátiles

Los resultados de porcentajes de inhibición de crecimiento obtenidos mediante metabolitos volátiles fueron notoriamente menores, respecto de los valores de los porcentajes de inhibición obtenidos mediante antagonismo directo, en el control de ambas cepas de *Rhizoctonia solani*.

Entre las cepas de la serie ThF2, la cepa ThF2-12 presentó un porcentaje de inhibición que tuvo diferencias significativas con la cepa parental ThV en el control de la cepa *R. solani* 509 (Cuadro 15). Por el contrario, no presentó diferencias significativas con respecto a sus cepas parentales frente a la cepa *R. solani* 618. Sin embargo, los porcentajes de inhibición fueron bastante bajos como para destacarlos como candidatos a ser utilizados en el control de este patógeno, según este parámetro. Es importante mencionar que las cepas ThF2-1, ThF2-10 y ThF2-18 no ejercieron inhibición alguna en el desarrollo de *Rhizoctonia solani* 618

Cuadro 15. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos volátiles de las cepas mejoradas de la serie ThF2 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
ThF2-12	31,88 a	14,15 a
<i>T. harzianum</i> 291 ¹	28,75 a	13,17 a
ThF2-10	16,88 ab	0,00 b
ThF2-1	16,25 ab	0,00 b
ThF2-18	8,13 b	0,00 b
<i>T.harzianum</i> V ¹	6,25 b	7,32 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

En las observaciones realizadas en la serie ThF3 (Cuadro 16), no se presentaron diferencias significativas con las cepas parentales en el control de *R. solani* 509. En la inhibición de *R. solani* 618, ninguna de las cepas mejoradas superó el 2 % de inhibición, lo que es reflejo del, casi nulo, efecto de inhibición de crecimiento que existe desde el punto de vista de metabolitos volátiles.

Cuadro 16. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos volátiles de las cepas mejoradas de la serie ThF3 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1)	Cepa 618 (GA 4)
	(%)	(%)
ThF3-2	37,00 a	1,46 b
ThF3-6	30,24 a	0,00 b
ThF3-3	29,76 a	0,00 b
ThF3-7	27,81 a	0,00 b
<i>T.harzianum</i> V ¹	26,83 a	7,32 a
<i>T. harzianum</i> 11 ¹	26,34 a	1,95 b
ThF3-4	25,00 a	0,00 b

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

Las cepas mejoradas de la serie ThF4 no tuvieron mayores porcentajes de inhibición de crecimiento que las cepas parentales sobre la cepa *R. solani* 618 (Cuadro 17). Por el contrario, estas mismas cepas no presentaron diferencias con sus cepas parentales en la inhibición de crecimiento de *R. solani* 509, lo que se puede apreciar en los similares porcentajes de inhibición alcanzadas por ellas.

Cuadro 17. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos volátiles de las cepas mejoradas de la serie ThF4 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1)	Cepa 618 (GA 4)
	(%)	(%)
ThF4-15	28,78 a	0,00 b
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	27,80 a	8,78 a
<i>T. harzianum</i> V ¹	26,83 a	7,32 a
ThF4-13	23,90 a	2,44 b

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

En la serie ThF5 (Cuadro 18), la cepa ThF5-8 no presentó diferencias significativas con sus cepas parentales en el control de la cepa 509 de *Rhizoctonia solani*. La diferencia estadística en el control de *Rhizoctonia solani* 618 estuvo dada por la nula inhibición (0 %) de crecimiento que tuvo ésta cepa.

Cuadro 18. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos volátiles de las cepas mejoradas de la serie ThF5 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	27,80 a	8,78 a
ThF5-8	26,83 a	0,00 c
<i>T. harzianum</i> 11 ¹	26,34 a	1,95 b

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

En el caso de la serie ThF6 (Cuadro 19), la cepa ThF6-2 fue igual a uno de sus padres (Th12) en el control de la cepa 509, no obstante su porcentaje no superó el 44,39 % de la cepa parental Th291 que fue la que obtuvo el más alto porcentaje. En la inhibición de crecimiento de la cepa 618, la cepa mejorada presentó el menor porcentaje de inhibición.

Cuadro 19. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos volátiles de las cepas mejoradas de la serie ThF6 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
<i>T. harzianum</i> 291 ¹	44,39 a	13,17 a
ThF6-2	28,29 b	2,44 b
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	27,80 b	8,78 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

En tanto, ninguno de los mutantes producidos por medio químico (Cuadro 20) mostraron diferencias con *T. polysporum* 34 en el control de las cepas de *Rhizoctonia solani* 509 y 618, obteniendo porcentajes muy similares a las cepas parentales. Sin embargo ninguna cepa pudo sobresalir de las otras y el porcentaje de control no superó el 50 % en todos los tratamientos, incluso en el caso del control de la cepa *R. solani* 618 los resultados bordearon la nula inhibición.

Cuadro 20. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos volátiles de los mutantes de la serie NG, obtenidos por N-nitrosoguanidinio a partir de la cepa parental *Trichoderma polysporum* 34, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición ¹	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
Tpol34 NG-IX	53,55 a	5,85 a
<i>T. polysporum</i> 34 ²	50,73 a	16,59 a
Tpol34 NG-VII	48,78 a	6,83 a
Tpol34 NG-7	45,37 a	17,07 a

1/. Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 2/. Cepa parental.

En términos de producción de metabolitos volátiles, todas las cepas de *Trichoderma* presentaron alguna inhibición a través de esta vía (Raggi, 2001). El efecto de inhibición fue mayor en la cepa 509 (GA 2-1) de *R. solani* en comparación con los resultados obtenidos en la cepa 618 (GA 4).

Los porcentajes de inhibición obtenidos se hicieron notoriamente menores en relación a los obtenidos en la prueba de antagonismo directo en cultivos duales; sin embargo, Küçük y Kivanç (2003) obtuvieron resultados similares al estudiar el aislado de *T. harzianum* cepa T 19 que controló bien a la cepa de *Rhizoctonia solani* mediante metabolitos volátiles.

En el contexto del análisis y presentación de resultados, Hanson (2002) señala el mejoramiento de cepas a través de la fusión de protoplastos, demostrando diferencias significativas de los mutantes en relación a sus cepas parentales con respecto a la producción de metabolitos volátiles. Además de una mejor eficacia en el biocontrol de *R. solani* lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

Producción de Metabolitos Difusibles

Al observar los resultados obtenidos mediante la prueba de metabolitos difusibles, los porcentajes de inhibición demuestran un considerable control del patógeno, mostrando valores sobre el 50% de inhibición en la mayoría de las cepas mejoradas.

En las observaciones realizadas en la serie ThF2 contra *R. solani* 509 (Cuadro 21), las cepas ThF2-1, ThF2-12 y ThF2-18 presentaron diferencias con los padres como se puede observar en el alto porcentaje de inhibición exhibido. Coinciden las diferencias significativas que se observan en el control de la cepa patógena 618, las cuales corresponden al porcentaje de inhibición mayor con sólo uno de sus padres. Así, ThF2-1 y ThF2-18 son diferentes estadísticamente a la cepa parental *T. harzianum* 291, superándolo en la inhibición del patógeno.

Cuadro 21. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos difusibles de las cepas mejoradas de la serie ThF2 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
ThF2-12	89,60 a	77,38 b
ThF2-1	88,53 a	88,36 a
ThF2-18	82,62 a	87,29 a
<i>T. harzianum</i> 291 ¹	77,24 b	75,24 b
ThF2-10	65,38 c	75,11 b
<i>T. harzianum</i> V ¹	64,13 c	89,38 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

En la serie ThF3 (Cuadro 22), las diferencias significativas estuvieron dadas por casi todas las cepas mejoradas, excepto ThF3-7, la cual fue igual al padre *T. harzianum* 11, pero con un porcentaje de control cercano al 100%. En el caso de los resultados de inhibición de la cepa de *Rhizoctonia solani* 618, casi todos fueron iguales a las cepas parentales, y sólo la cepa ThF3-6 presentó diferencias significativas, obteniendo un porcentaje menor de inhibición cercano al 50% sobre la cepa patógena.

Cuadro 22. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos difusibles de las cepas mejoradas de la serie ThF3 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1)	Cepa 618 (GA 4)
	(%)	(%)
<i>T. harzianum</i> 11 ¹	98,48 a	89,82 a
ThF3-7	97,55 a	81,07 b
ThF3-2	88,40 b	85,60 ab
ThF3-4	78,93 b	88,27 ab
ThF3-3	78,84 b	91,73 a
ThF3-6	77,82 b	53,29 c
<i>T.harzianum</i> V ¹	64,13 c	89,38 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

Al observar los resultados de la serie ThF4, las diferencias significativas estuvieron dadas por una de las cepas mejoradas con respecto a una de sus cepas parentales. Así, la cepa ThF4-13 fue estadísticamente diferente a su parental ThV, sin embargo, fue igual estadísticamente a su cepa parental Th12 en el control de *R. solani* 509 y 618. Esta cepa fue la que obtuvo el más alto porcentaje de control en esta serie (Cuadro 23).

Cuadro 23. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos difusibles de las cepas mejoradas de la serie ThF4 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1)	Cepa 618 (GA 4)
	(%)	(%)
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	91,73 a	99,11 a
ThF4-13	91,64 a	97,07 a
ThF4-15	70,26 b	83,78 b
<i>T.harzianum</i> V ¹	64,13 b	89,38 b

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

Los resultados observados en la serie ThF5, demuestran que la cepa ThF5-8 tuvo diferencias significativas con la cepa parental Th12, pero fue igual estadísticamente a su otro padre Th11, en la inhibición de *R. solani* 509. Además presentó un porcentaje de 100% en la inhibición del patógeno. En la inhibición de la cepa 618, presentó un mayor porcentaje de inhibición sobre el patógeno que su cepa parental Th11, no así con la cepa Th12 la cual no superó en porcentaje inhibitorio a ésta cepa parental (Cuadro 24).

Cuadro 24. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos difusibles de las cepas mejoradas de la serie ThF5 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
ThF5-8	100,00 b	96,40 b
<i>T. harzianum</i> 11 ¹	98,48 b	89,82 c
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	91,73 a	99,11 a

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

La cepa ThF6-2 presentó diferencias con Th291 al observar una mayor inhibición en el control de *R. solani* 509, pero fue muy similar a la cepa Th12. En el control de *Rhizoctonia solani* 618, la cepa mejorada fue diferente a ambas cepas parentales con un valor promedio de inhibición del patógeno entre ambas (Cuadro 25).

Cuadro 25. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos difusibles de las cepas mejoradas de la serie ThF6 sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de Trichoderma	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 618 (GA 4) (%)
<i>T. harzianum</i> 12 ¹	91,73 a	99,11 a
ThF6-2	90,04 a	85,82 b
<i>T. harzianum</i> 291 ¹	77,24 b	75,24 c

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

En el caso de los mutantes obtenidos por método químico, no existieron diferencias significativas de los mutantes con respecto a su cepa parental en la inhibición de la cepa *Rhizoctonia solani* 509. Las cepas mutantes *T. polysporum* 34 NG-IX y NG-7 presentaron diferencias significativas con respecto a su cepa parental en la inhibición de *R. solani* 618 (Cuadro 26).

Cuadro 26. Porcentajes de inhibición producidos por metabolitos difusibles de los mutantes de la serie NG, obtenidos por N-nitrosoguanidinio a partir de la cepa parental *Trichoderma polysporum* 34, sobre *Rhizoctonia solani* 509 y 618.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Cepas de <i>Rhizoctonia solani</i> y Porcentaje de Inhibición	
	Cepa 509 (GA 2-1) (%)	Cepa 509 (GA 4) (%)
<i>T. polysporum</i> 34 ¹	95,02 a	62,84 b
Tpol34 NG-IX	90,44 a	86,53 a
Tpol34 NG-7	90,35 a	81,07 a
Tpol34 NG-VII	85,33 a	77,91 ab

Letras iguales en la columna significa que no existen diferencias significativas según la prueba de rango Múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/. Cepa parental.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de metabolitos difusibles, indican que la gran mayoría de las cepas lograron una inhibición superior al 80%, incluso una de ellas alcanzó el 100% de inhibición, siendo más efectivos que sus cepas parentales en la inhibición de los patógenos en estudio. Esto podría traducirse en un buen control de campo de los patógenos.

Benítez et al (2004) señalan que los metabolitos difusibles, son compuestos de bajo peso molecular que interactúan con antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* produciendo la muerte celular del patógeno (antibiosis). Rey et al. (2000), señalan que la combinación de las enzimas hidrolíticas y antibióticos producidos por *Trichoderma* resultan en un alto nivel de antagonismo comparado con la eficiencia que presentan por separado lo que se traduce en el alto porcentaje de inhibición que presentan algunas de las cepas en el control de los patógenos aquí estudiados.

Los metabolitos difusibles ejercen una buena inhibición de los patógenos, tal como lo menciona Howell (2003), el cual describe que el control de especies de *Pythium* por *Trichoderma harzianum* (T-12) y *Trichoderma koningii* (T-8), no fue debido al micoparasitismo ni a la competición si no a factores tóxicos producidos por los antagonistas que inhibieron el crecimiento de este patógeno. Este mismo autor señala que un mutante de *T.virens* deficiente en la síntesis de gliotoxinas y en micoparasitismo, aún así fue igual de eficiente que la cepa parental (G-6) en el control de *P. ultimum* y *R. solani*.

Este tipo de inhibición que supera el 80% de efectividad en la mayoría de las cepas estudiadas concuerda con resultados obtenidos por KücüK y Kivanc (2003), quienes describen una inhibición bastante superior, llegando incluso al 100 % por parte de aislados de *Trichoderma harzianum* sobre *R. solani*. Otra prueba que denota la producción de metabolitos difusibles por parte de los mutantes de *Trichoderma spp.* utilizados en este ensayo, fue la existencia de manchas amarillas en el agar al extraer el papel celofán, estas sustancias también fueron observadas por estos mismos autores.

2. Bioensayos

Con el fin de seleccionar las mejores cepas de acuerdo a efectividad y espectro de acción, se seleccionó a aquellas que resultaron tener los mayores porcentajes de inhibición ó que obtuvieron un comportamiento similar en la inhibición de las 2 cepas de *Rhizoctonia solani*, ya sea en la prueba de antagonismo directo, interacción de metabolitos difusibles o metabolitos volátiles.

De acuerdo a este análisis las mejores cepas obtenidas a través de la fusión de protoplastos: ThF2-1, ThF2-18, ThF3-3, ThF4-15 y ThF5-8, provenientes de las cepas de *T. harzianum* 11, 12, 291 y V.

Inocuidad en plantas de tomate

Inocuidad de cepas mejoradas en plantas de tomate cv. 92.95

Al evaluar el parámetro de altura de plantas, todas las cepas se comportaron iguales al tratamiento testigo excepto las cepas Th12 y ThF3-3 quienes presentaron alturas mayores que el tratamiento testigo (Figura 7).



Figura 7. Altura de plantas en ensayo de inocuidad de cepas de *T. harzianum* en plantas de tomate del cultivar 92.95.

Al evaluar el peso fresco de la parte aérea de las plántulas (Cuadro 27), la cepa parental Th12, las cepas mejoradas ThF2-18, ThF3-3 y ThF4-15 presentaron mayores pesos que el testigo, situación que no se repitió al analizar el peso seco de la parte aérea en donde todos los tratamientos se comportaron igual al testigo. Al analizar el peso fresco de raíces, las cepas ThF2-18, ThF3-3 y ThF4-15 registraron mayores pesos que el testigo (To).

Cuadro 27: Parámetros medidos para determinar la inocuidad de las cepas de *T. harzianum* en plántulas de tomate del cv. 92.95.

Cepa	Altura (cm)	Peso fresco parte aérea		Peso seco parte aérea		Peso fresco raíces		
		(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	
Th 12	14,96	b	2,64	b	0,27	a	1,24	A
ThF3-3	14,88	b	2,62	b	0,22	a	1,28	b
ThF2-1	14,28	a	2,22	a	0,16	a	1,14	A
Th V	14,14	a	2,28	a	0,18	a	1,24	A
Th 291	14,00	a	2,3	a	0,12	a	1,14	A
Th 11	13,8	a	2,3	a	0,18	a	1,1	A
ThF2-18	13,52	a	2,64	b	0,83	a	1,38	b
ThF4-15	13,06	a	2,62	b	0,26	a	1,26	b
To	12,88	a	2,02	a	0,05	a	0,90	A
ThF5-8	12,16	a	2,18	a	0,16	a	1,02	A

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

Inocuidad de cepas mejoradas en plantas de tomate cv. Góndola

Al observar el parámetro de altura de plantas en el cv. Góndola, todas las cepas se comportaron igual que el tratamiento testigo (Figura 8). Por otra parte, al evaluar el peso fresco de la parte aérea, las cepas parentales Th12 y ThV, y las mejoradas ThF2-18, ThF3-3, ThF4-15 fueron diferentes al tratamiento testigo registrando mayores pesos promedio. En cuanto al peso seco de la parte aérea, ninguno de las cepas mejoradas fue distinta al testigo, sólo Th12 fue diferente al tratamiento testigo.



Figura 8. Altura de plantas en ensayo de inocuidad de cepas de *T. harzianum* en plantas de tomate del cultivar Góndola.

Cuando se evaluó el peso fresco de las raíces todos los tratamientos, excepto ThF5-8, se comportaron diferentes del tratamiento testigo, presentando mayores pesos promedio que éste (Cuadro 28).

Cuadro 28: Inocuidad de cepas de *Trichoderma harzianum* en plántulas de tomate del cv. Góndola.

Cepa	Altura		Peso fresco parte aérea		Peso seco parte aérea		Peso fresco raíces	
	(cm)		(g)		(g)		(g)	
Th 12	14,52	a	3,26	b	0,37	b	1,70	b
Th 291	13,68	a	2,56	a	0,13	a	1,38	b
ThF4-15	13,64	a	2,94	b	0,21	a	1,46	b
ThF2-1	13,52	a	2,68	a	0,18	a	1,44	b
Th V	13,42	a	2,92	b	0,21	a	1,42	b
ThF5-8	13,34	a	2,7	a	0,17	a	1,16	a
ThF3-3	13,32	a	2,78	b	0,18	a	1,36	b
Th 11	12,76	a	2,58	a	0,20	a	1,36	b
ThF2-18	12,56	a	2,82	b	0,21	a	1,6	b
To	12,46	a	2,12	a	0,07	a	0,96	a

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

Las cepas de *Trichoderma harzianum* mejoradas, estudiadas en este ensayo presentaron algunas diferencias con el tratamiento testigo, en ambos cultivares de tomate; sin embargo, no se observó un efecto dañino, en términos de altura ó muerte de las plántulas (Cuadro 28).

Los resultados de inocuidad de los biocontroladores utilizados en esta investigación, es decir, no generar mortalidad en las plántulas de tomate concuerda con lo expuesto por Besoain *et al* (2007). También concuerdan con los resultados obtenidos por Riquelme *et al.* (2005) en donde cepas de *Trichoderma harzianum* presentaron mayores valores en términos de rendimiento aéreo y radical en plantas de *Fragaria chiloensis* (L.) sin generar muerte de las plantas.

Ozby *et al.* (2004) experimentaron con las cepas de *Trichoderma harzianum* T22 y T95 en semillas de tomate, las cuales demostraron un aumento en los parámetros de emergencia de la semilla, número de hojas verdaderas, peso fresco y seco de la parte aérea. Santander (2001) no encontró diferencias en el peso, tanto fresco como seco de las raíces, en bandejas sembradoras y también demostró el aumento del porcentaje de emergencia de plántulas de tomate.

Efectividad de cepas mejoradas de *Trichoderma spp.* en el control de *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate

Efectividad de cepas mejoradas en plantas cv. 92.95

Cuando se evaluó el nivel de canchrosis en la zona del cuello de las plantas, todas las cepas mostraron valores promedio iguales entre ellas. Por otra parte, al observar el desarrollo radical de las plantas, estas mismas cepas, tampoco tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, al igual que en el nivel de canchrosis (Figura 9).

Si se relaciona la cantidad de propágulos en los pellets aplicados por unidad de peso de los tratamientos con los diferentes bioantagonistas (UFC/g pellet) y el grado de control de la enfermedad producida por *Rhizoctonia solani* 618, no se establecen relaciones, ya que la cepa ThF 2-1 contaba al momento de la inoculación con aproximadamente el doble de UFC que las cepas parentales y ThF 5-8, obteniendo un mayor control. Esto no concuerda con los resultados observados por Valderrama (2007), quien menciona una relación inversa, en la que los mutantes Th 11A 80.1 y Th 12A 10.1 con aproximadamente la mitad de UFC/g pellet 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 este.

En cuanto a la mortalidad de las plantas, los tratamientos con cepas mejoradas tuvieron buenos efectos registrando nulos porcentajes de mortalidad. El tratamiento testigo (T_0) obtuvo un 100% de mortalidad de plantas, seguido por el testigo con fungicida (T_1) con un 80%, Th 291 y Th 12 con un 20%, y Th 11 junto a ThV con un 10 % (Figura 9).

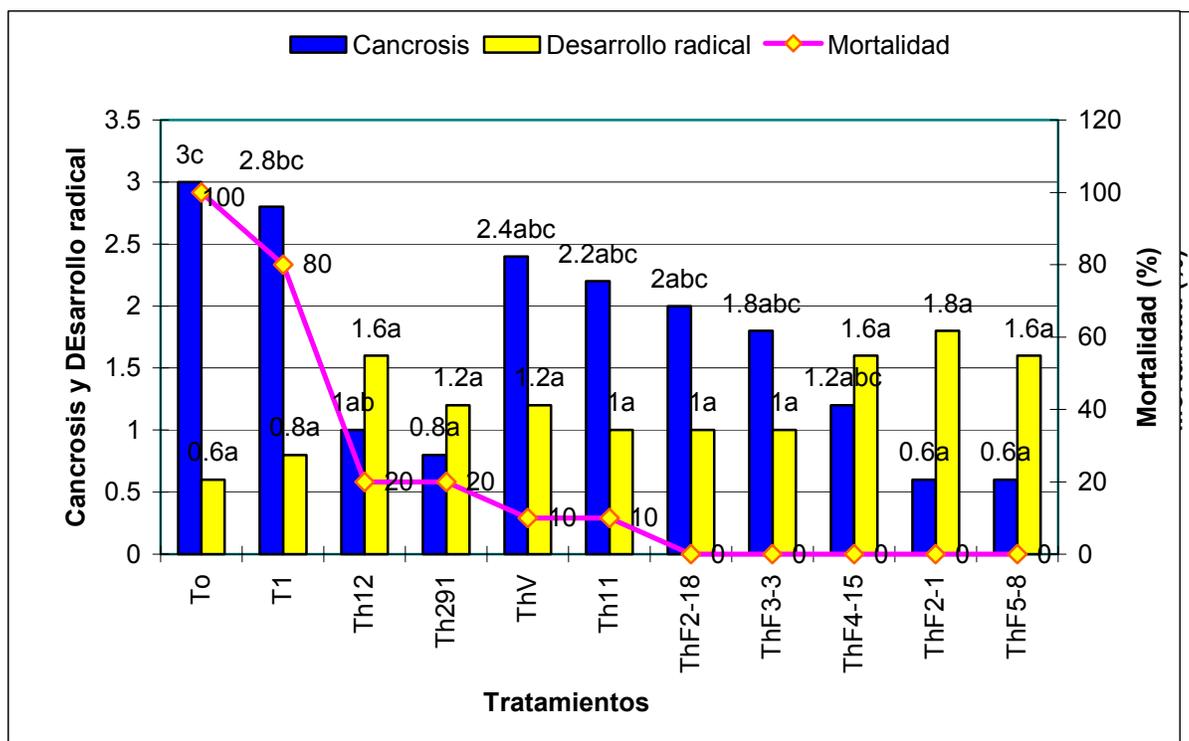


Figura 9. Cancrosis, desarrollo radical y mortalidad causada por *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate cv. 92.95. Letras iguales en las columnas del mismo color implica que no existen diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p \geq 0,05$).

Rendimiento en biomasa

Los resultados de obtenidos por los tratamientos no generaron diferencias estadísticas entre ellos a la hora de evaluar peso fresco de la biomasa desarrollada por las plantas, sólo se diferenciaron de los tratamientos testigos obteniendo, en promedio, mayores rendimientos (Cuadro 29).

Prabavathy *et al.* (2006) mediante la técnica de fusión de protoplastos a partir de la cepa PTh18 de *Trichoderma harzianum*, observaron aumento de la actividad antagonista contra *Rhizoctonia solani* con respecto a sus cepas parentales, lo que concuerda, en términos numéricos, con lo obtenido en el desarrollo de este ensayo en que el cultivo fue menos afectado.

Santander (2001) menciona que el mejor control lo obtuvo la cepa Th 650 en plantas de tomate de la variedad Cal Ace con *Rhizoctonia solani*. Cabe destacar que la carga de inóculo del patógeno fue tres veces menor (7 g de inóculo/maceta 2,3 L) que la utilizada en esta investigación, lo que sugeriría hasta qué carga de inóculo puede ser efectivo el control. En cuanto al peso seco aéreo no se registraron diferencias entre los tratamientos.

Cuadro 29: 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)	
ThF2-1	1,36	a	0,030	a	0,36	a b
ThF2-18	1,26	a	0,030	a	0,50	a
ThF5-8	1,22	a	0,026	a	0,18	a b
ThF3-3	1,10	a b	0,018	a	0,32	a b
Th 291	1,00	a b c	0,016	a	0,10	b
Th 12	0,98	a b c	0,012	a	0,38	a b
Th V	0,86	a b c	0,010	a	0,20	a b
ThF4-15	0,74	a b c	0,008	a	0,22	a b
Th 11	0,74	a b c	0,008	a	0,20	a b
To ¹	0,46	c	0,012	a	0,14	b
T ₁ ²	0,40	b c	0,006	a	0,14	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/. T₀ (Solo *R. solani* 618). 2/. T₁ (*R. solani* + Pencycuron (0,15 cc/maceta))

Efectividad de cepas mejoradas en plantas cv. Góndola

La Figura 10 muestra los resultados en donde se observó que para el parámetro de canchosis, sólo la cepa ThF4-15 presentó diferencias con las cepas Th11 y Th12, y los tratamientos testigos, con una menor nota, en promedio, en relación al daño producido por el patógeno. El resto de los tratamientos no presentaron diferencias entre ellos. En tanto para el parámetro de desarrollo radical no existieron diferencias entre los tratamientos.

Se corrobora nuevamente la relación entre la cantidad de propágulos por unidad de peso de los tratamientos bioantagonistas, en el que Th F4-15 presentó el menor número de UFC/g de pellet, y tuvo valores promedio mayores en el control sobre *Rhizoctonia solani* que las cepas Th12, Th11, el tratamiento testigo (To) y el tratamiento fungicida (T₁). No así la cepa ThF 2-1, la cual tenía la mayor cantidad de UFC/g pellet, fue muy similar al resto de los tratamientos tuvo la menor nota de control sobre el patógeno concordando esto último con lo referido por Valderrama (2007), que observó que la carga de inóculo es indirectamente proporcional al nivel de control ejercido sobre el patógeno. En cuanto al desarrollo radical del cultivar, no se registraron diferencias entre los tratamientos.

Las cepas biocontroladoras mejoradas y la cepa parental ThV no registraron porcentajes de mortalidad en ninguno de los tratamientos. Por otra parte, las cepas parentales Th291 y Th12, obtuvieron un 10%, mientras que la cepa Th11 presentó un 20%, de mortalidad.

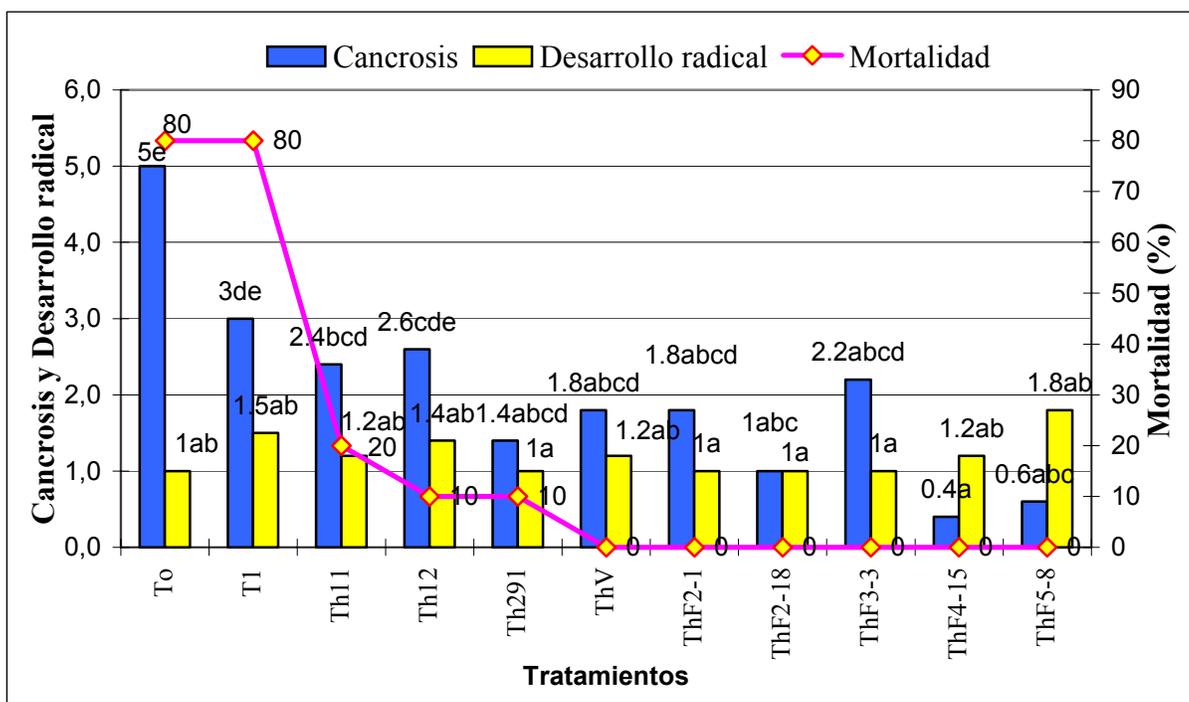


Figura 10. Cancrosis, desarrollo radical y mortalidad causada por *Rhizoctonia solani* en plantas de tomate cv. Góndola. Letras iguales en las columnas del mismo color implica que no existen diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p \geq 0,05$).

Rendimiento en biomasa

En el Cuadro 30, se presentan los resultados obtenidos en el cultivar Góndola en donde al evaluar el peso fresco de la parte aérea las cepas mejoradas fueron estadísticamente iguales entre ellas, incluso con ThV, Th291 y T₀. En cuanto al peso seco de la parte aérea, destaca la cepa ThF 2-18 la cual presentó un peso mayor a casi todo el resto de los tratamientos, exceptuando ThF 2-1, ThF 4-15 y T₀. Montealegre *et al.* (2005) observaron mayores rendimientos en los tratamientos en los cuales fueron aplicados los biocontroladores.

Cuadro 30: 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)	
ThF2-1	1,44	a	0,032	a b c	0,24	a b
ThF5-8	1,34	a	0,028	b c	0,56	a
ThF2-18	1,32	a	0,088	a	0,34	a b
Th V	1,26	a	0,030	b c	0,34	a b
ThF4-15	1,24	a	0,078	a b	0,34	a b
ThF3-3	1,20	a	0,016	c	0,20	b
Th 291	1,04	a b	0,012	c	0,44	a b
T ₀ ¹	1,00	a b	0,052	a b c	0,30	a b
Th 11	0,90	c	0,010	c	0,24	a b
Th 12	0,52	b c	0,000	c	0,24	a b
T ₁ ²	0,51	b c	0,022	b c	0,20	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/. T₀ (Solo *R. solani* 618). 2/. T₁ (*R. solani* + Pencycuron (0,15 cc/maceta)).

Viabilidad y capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma harzianum* en el suelo

Viabilidad de cepas mantenidas a 22°C

En el Cuadro 31 se presenta la viabilidad de las cepas de *Trichoderma harzianum* inoculadas en frascos viales con 5 ml de suelo Antumapu y La Palma, mantenidas a 22 °C, en donde las diferencias estuvieron dadas por el incremento de las UFC en el tiempo hasta los 90 días en que se realizó la última evaluación de UFC, tendencia que también fue observada por Valderrama (2007) durante el mismo período de tiempo. Cabe destacar la cepa ThF 2-1 que registró la mayor cantidad de UFC al término de esta investigación, en ambos suelos.

Cuadro 31: Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) recolectado desde frascos viales mantenidos a 22 °C.

Días	Cepas mejoradas					Cepas parentales				
	ThF2-1	ThF2-18	ThF3-3	ThF4-15	ThF5-8	Th 12	Th 11	Th 291	Th V	
Antumapu	30	13.460 C	11.080 C	9.940 C	12.060 C	15.740 C	9.200 C	4.740 B	9.100 C	8.260 C
	60	69.000 B	52.240 B	45.800 B	20.800 B	32.800 B	27.120 B	8.620 B	29.200 B	19.660 B
	90	321.800 A	274.000 A	307.000 A	230.400 A	223.200 A	144.200 A	90.200 A	130.900 A	220.200 A
La Palma	30	77.000 c	32.000 c	23.000 c	25.700 c	21.500 c	47.500 c	87.800 c	49020 c	30440 c
	60	320.800 b	237.000 b	108.500 b	73.000 b	92.900 b	528.000 b	372400 b	505600 b	590000 b
	90	1.225.000 a	795.000 a	862.000 a	540.000 a	636.000 a	908.000 a	734600 a	914000 a	832200 a

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

Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a 22°C

El Cuadro 32 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, exceptuando la cepa ThF 2-1 que registró un leve, pero significativo aumento al cabo de los 90 días.

Cuadro 32: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial obtenido por cultivo dual entre cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas en suelo a 22 °C y la cepa 618 de *Rhizoctonia solani*.

Días	Cepas mejoradas					Cepas parentales				
	ThF2-1	ThF2-18	ThF3-3	ThF4-15	ThF5-8	Th 12	Th 11	Th 291	Th V	
Antumapu	30	44,13 B	45,90 A	46,54 A	46,21 A	45,87 A	43,91 B	46,78 A	45,56 A	47,38 A
	60	43,86 B	46,44 A	47,52 A	44,38 A	46,36 A	43,41 B	47,02 A	45,82 A	48,47 A
	90	48,03 A	47,91 A	47,48 A	46,56 A	42,93 A	46,88 A	46,72 A	47,00 A	47,93 A
La Palma	30	43,03 b	45,77 a	47,10 a	45,66 a	46,62 a	43,60 c	46,96 a	45,87 ab	48,17 a
	60	43,97 ab	49,43 a	44,44 ab	44,10 a	47,05 a	45,36 b	44,98 b	47,35 a	46,95 a
	90	47,01 a	45,36 a	43,64 b	48,48 a	46,23 a	47,76 a	45,15 b	41,02 b	46,46 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 y para cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación múltiple de Tukey, $p \geq 0,05$.

Viabilidad de cepas mantenidas a 5°C

En el cuadro 33 se muestran los resultados de las cepas mantenidas a temperatura de refrigeración (5°C), en donde, para ambos suelos las cepas alcanzaron su máximo número de UFC al cabo de los 90 días que duró este ensayo. Küçük y Kivanç (2005) señalan que existe una mayor conservación de las cepas en el tiempo a una temperatura de refrigeración.

Cuadro 33: Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) recolectado desde frascos viales mantenidos a 5 °C.

Días	Cepas mejoradas					Cepas parentales				
	ThF2-1	ThF2-18	ThF3-3	ThF4-15	ThF5-8	Th 12	Th 11	Th 291	Th V	
Antumapu	30	14.180 C	9.100 C	10.080 C	11.340 C	15.020 C	8.540 C	4.100 B	9.340 C	8.960 C
	60	70.400 B	55.000 B	49.200 B	20.000 B	33.400 B	34.660 B	10.100 A	26.500 B	18.280 B
	90	334.000 A	293.600 A	280.200 A	230.000 A	231.100 A	316.600 A	93.140 A	142.200 A	192.400 A
La Palma	30	23.300 c	14.600 c	19.000 c	10.360 c	22.000 b	41.200 c	79.600 c	14.000 c	60.800 c
	60	102.000 b	89.000 b	43.000 b	17.000 b	37.000 b	122.000 b	364.000 b	42.400 b	214.000 b
	90	525.000 a	460.000 a	279.000 a	215.200 a	305.000 a	478.000 a	736.000 a	213.400 a	381.000 a

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

Capacidad antagónica de las cepas mantenidas a 5°C

En general, la capacidad antagónica de las cepas no presentó diferencias estadísticas en el tiempo. Se mantuvo el control en torno al 50%, en ambos tipos de suelos (Cuadro 34).

Cuadro 34: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial obtenido por cultivo dual entre cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas en suelo a 5 °C y la cepa 618 de *Rhizoctonia solani*.

Días	Cepas mejoradas					Cepas parentales				
	ThF2-1	ThF2-18	ThF3-3	ThF4-15	ThF5-8	Th 12	Th 11	Th 291	Th V	
Antumapu	30	48,45 A	42,03 AB	47,37 A	46,12 A	44,09 A	47,52 A	44,10 A	45,20 A	46,39 A
	60	46,85 A	41,56 B	47,76 A	47,01 A	45,77 A	48,10 A	43,66 A	45,37 A	46,86 A
	90	46,72 A	46,37 A	43,44 B	46,43 A	45,39 A	47,58 A	40,38 B	43,98 A	45,72 A
La Palma	30	47,97 a	45,86 A	46,67 b	44,53 a	46,55 a	46,32 b	44,51 ab	43,67 c	45,77 a
	60	48,16 a	48,22 A	46,48 b	42,93 a	47,00 a	47,93 a	41,31 a	47,49 a	46,88 a
	90	49,38 a	41,25 B	48,86 a	46,10 a	43,51 a	47,62 ab	43,09 b	45,33 b	47,59 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 y para cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación Múltiple de Tukey, $p \geq 0,05$.

Viabilidad de cepas mantenidas a temperatura ambiente

En el caso de las cepas mantenidas a temperatura ambiente las UFC, tanto para el suelo La Palma como para el suelo Antumapu, estuvieron dadas por un incremento de las unidades formadoras de colonia en el tiempo llegando a un máximo a los 90 días (Cuadro 35).

Cuadro 35: Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) recolectado desde frascos viales mantenidos a Temperatura ambiental de laboratorio.

Días	Cepas mejoradas					Cepas parentales				
	ThF2-1	ThF2-18	ThF3-3	ThF4-15	ThF5-8	Th 12	Th 11	Th 291	Th V	
Antumapu	30	13.060 C	11.000 C	10.500 C	13.560 B	16.700 C	8.820 C	5.360 B	10.740 C	10.060 C
	60	72.160 B	57.200 B	47.000 B	23.860 B	34.380 B	47.500 B	10.520 A	32.920 B	23.080 B
	90	333.200 A	285.200 A	335.000 A	256.600 A	248.600 A	136.100 A	74.120 A	144.400 A	254.600 A
La Palma	30	45.000 c	26.400 c	17.000 c	21.000 c	24.800 c	43.400 c	80.700 c	34.060 c	34.780 c
	60	289.000 b	212.000 b	69.900 b	54.000 b	62.000 b	73.360 b	321400 b	69.680 b	200.000 b
	90	915.000 a	780.000 a	450.000 a	378.000 a	633.000 a	313.200 a	413.800 a	304.000 a	346.600 a

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

Capacidad antagónica de cepas mantenidas a temperatura ambiente

A temperatura ambiente, en general, no se registraron diferencias en cuanto a la inhibición de crecimiento radial ejercido por los biocontroladores (Cuadro 36). La capacidad antagónica de las cepas registró valores cercanos al 50 % de control sobre *Rhizoctonia solani* 618.

Cuadro 36: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial obtenido por cultivo dual entre cepas de *Trichoderma harzianum* mantenidas en suelo a temperatura ambiental de laboratorio y la cepa 618 de *Rhizoctonia solani*.

Días	Cepas mejoradas					Cepas parentales				
	ThF2-1	ThF2-18	ThF3-3	ThF4-15	ThF5-8	Th 12	Th 11	Th 291	Th V	
Antumapu	30	44,58 A	46,15 A	47,52 A	44,81 A	46,96 A	44,33 B	46,50 A	46,33 A	47,37 A
	60	45,90 A	45,83 A	45,22 A	46,69 A	46,87 A	46,50 AB	46,61 A	47,07 A	47,74 A
	90	45,16 A	43,68 A	45,31 A	44,07 A	45,09 A	47,65 A	47,26 A	45,36 A	45,61 A
La Palma	30	48,22 a	46,92 ab	48,23 a	43,57 b	45,39 a	48,20 a	47,12 a	45,08 a	46,86 a
	60	46,30 b	45,96 b	44,76 b	46,11 ab	46,95 a	46,12 b	46,66 a	46,70 a	47,57 a
	90	49,05 a	47,76 a	43,82 b	47,27 a	46,89 a	48,47 a	47,58 a	45,67 a	46,81 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 y para cada suelo implica que no existen diferencias significativas según ANDEVA y posterior prueba de comparación Múltiple de Tukey, $p \geq 0,05$.

En todas las cepas se observó un incremento en el número de UFC/g de suelo independientemente de la temperatura de almacenaje a las cuales fueron sometidas.

En general, en todas las cepas evaluadas se observó un buen nivel de viabilidad en el suelo a las tres temperaturas estudiadas, recuperando colonias hasta por lo menos los 90 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 sólo recuperó colonias hasta la sexta semana. Además, Acuña (2001) señala un incremento en el tiempo de las UFC en cepas de *Trichoderma longibrachiatum* cepa Soto lo que concuerda con lo observado en esta prueba, al menos durante el período de tiempo estudiado. Valderrama (2007) observó la misma tendencia en el mismo período de tiempo, es decir, existió un aumento en la cantidad de UFC.

Es importante observar la disminución en los porcentajes de inhibición de crecimiento radial registrados en las cepas de *Trichoderma* spp, luego de mantenerlas por un período de tiempo en almacenamiento bajo las temperaturas estudiadas en este ensayo en comparación con los resultados obtenidos en la primera parte de este ensayo la que se realizó completamente in vitro. El caso más notorio estuvo dado por la cepa ThF 2-1, la cual bajó de un 60,19 % a un valor de 45,96 % en promedio para el suelo Antumapu. Para el suelo La Palma, el valor disminuyó a 47,01 %.

Análisis de los mejores biocontroladores

Al observar los resultados, tanto en el ensayo in vitro como en invernadero, se determinó que las cepas provenientes de fusión de protoplastos ThF 2-1, ThF4-15 y ThF 5-8, son cepas que tuvieron un mejor comportamiento en comparación con el resto de las cepas, incluyendo a las cepas parentales en el control de *Rhizoctonia solani*. Esto se refleja en mejores porcentajes de control, presentaron alturas y pesos de plantas mayores que el resto, y además de no provocar mortalidad en las plantas. Tampoco obtuvieron altas notas en cuanto al nivel de cancrisis observado, y el desarrollo radical no fue tan afectado.

CONCLUSIONES

Todas las cepas mejoradas de *Trichoderma spp.* ejercieron algún grado de control sobre el patógeno *Rhizoctonia solani* corroborando las características biocontroladoras que presentaban sus cepas parentales. El efecto fue mayor en la cepa 509 GA 2-1 que en la cepa 618 GA-4.

Los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento radial (ICR) en las pruebas in vitro, estuvieron dados por la producción de metabolitos difusibles en donde incluso se registró un 100 % de control.

Las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en la realización de esta investigación resultaron ser inocuas, es decir, no afectaron negativamente y/o no provocaron muerte de las plántulas de tomate de los cultivares 92.95 y Góndola.

La cepa mejorada, ThF 4-15 por fusión de protoplastos resultó ser una cepa promisoría que podría utilizarse en el control de *Rhizoctonia solani* cepa 618 en el cultivar Góndola lo cual se expresó en un menor nivel de canchros del cuello causada por *Rhizoctonia solani* comparada con la observada en los tratamientos en que se utilizaron los fenotipos silvestres. Incluso fue mejor que el tratamiento control con el fungicida pencycuron en cuanto al desarrollo radical observado en las plantas. En el cultivar 92.95, ninguna cepa mejorada resultó ser mejor entre ellas, ni tampoco se diferenciaron con sus tratamientos parentales. Ninguna de las cepas mejoradas provocó la muerte de las plántulas.

Las cepas de *Trichoderma harzianum* mantienen su viabilidad en los suelos Antumapu y La Palma (al menos en los 90 días que se evaluaron), y aumentan en el tiempo al ser almacenadas a las temperaturas estudiadas. Además, la capacidad antagónica se mantiene sobre la cepa *Rhizoctonia solani* 618.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, C. 2001. Evaluación de la capacidad de sobrevivencia en dos cepas nativas del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp, en el suelo. Memoria de pregrado para optar al Título de Ing. Agr., Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias. 45 p. Resumen en [DSpace Universidad de Talca: Item 1950/736](#)

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.

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. 20 p.

BENÍTEZ, T., RÍNCON, A. M., LIMÓN M. C., CODÓN, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260. Disponible en: <http://www.im.microbios.org/0704/0704249.pdf>

BESOAIN, X., GARCÍA, R., RAGGI, C., OYANEDEL, E., MONTEALEGRE, J. y PÉREZ, L. 2001. Biological control of *Phytophthora parasitica* in greenhouse tomatoes using *Trichoderma harzianum*. *IOBC / WPRS Bulletin* 24 (3): 103-107.

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.

BESOAIN, X.; PÉREZ, L. M.; ARAYA, A.; LEFEVER, LI.; SANGUINETTI, M.; MONTEALEGRE, J. 2007. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458.(4). Issue of October 15, 2007. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue4/full/16/16.pdf>

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 MELO, I. 2000. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. Scientia agricola 57(1). ISSN 0103-9016. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162000000100010

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

DENNIS, C. y WEBSTER, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 41-48.

GRONDONA, I., HERMOSA, R., TEJADA, M. GOMIS, M.D., MATEOS, P.F., BRIDGE, P.D., MONTE, E. and GARCIA-ACHA, I. 1997. Physiological and Biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology, August 1997. 63 (8): 3189-3198.

HANSON, L. 2002. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* y *T.virens*. Mycology Resource 106(3): 321-328.

HATVANI, L., MANCZINGER L., KREDICS L., SZEKERES A., ANTAL Z., VÁGVÖLGYI C. 2006. Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006. May; 89 (3-4):387-93.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease, 87 (1): 7.

KÜÇÜK, Ç., KIVANÇ, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turkish Journal of Biology. 27: 247-253.

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*) Mediante el uso de *Trichoderma* spp. Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Agronómicas. 83 p.

- 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.
- MINISTERIO DE FOMENTO, INDUSTRIA Y COMERCIO (MIFIC). 2007. Ficha del tomate. Managua, Nicaragua. 14.
- MONTEALEGRE, J.; REYES, R.; BESOAIN, X.; PEREZ, L. M.; HERRERA, R., 2003. Identificación de grupos de anastomosis de cepas de *Rhizoctonia solani* Kuhn aisladas de tomates en la quinta 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.
- MONTEALEGRE, J.; PEREZ, L.M.; BESOAIN, X. and HERRERA, R. 2004. Integrated control of soilborne and Root-Rot diseases in greenhouse tomatoes with solarization and biocontrol microorganisms in Chile. In: Proceedings of the International Seminar on Biological Control of Soilborne Plant Diseases. Buenos Aires, Argentina, p.128 - 139.
- ODEPA, 2008 (On line). VII Censo Nacional Agropecuario y Forestal. Disponible en: http://www.censoagropecuario.cl/generalidades/files/resultados_censo_agropecuario97.xls#'6,01!A1
- OGAWA, K.; YOSHIDA N.; GESNARA W.; OMUMASABA C.A.; CHAMUSWARNG CH., 2000. Hybridization and breeding of the benomyl resistant mutant, *Trichoderma harzianum* antagonized to phytopathogenic fungi by protoplast fusion. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2000. 64(4): 833-836.
- OZBAY, N; NEWMAN, S.E.;BROWN,W.M. 2004. The Effect of the *Trichoderma harzianum* Strains on the Growth of Tomato Seedlings. Acta Hort. 635, ISHS 2004.
- PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathology. 23: 23-54.
- PEREZ L.M. y MORALES M. P. 2003. Obtention of *Trichoderma harzianum* Th₆₅₀ mutants with antagonistic capacity against *Fusarium oxysporum*. En: Resúmenes XIII Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Marbella, Chile.

POLANCO R.; IPINZA F.; RÍOS J.; MONTEALEGRE J.; BESOAÍN X.; PÉREZ L. 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.

PRABAVATHY, V.R.; MATHIVANAN, N.; SAGADEVAN, E.; MURUGESAN, K. Y LALITHAKUMARI, D. 2006. Self-fusion of protoplasts enhances chitinase production and biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. Bioresource Technology. 2006 Dec; 97 (18):2330-4.

RAGGI, C. 2001. Control biológico de *Pyrenochaeta lycopersici* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero mediante el uso de aislados de *Trichoderma* spp. y solarización. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Disponible en: http://cybertesis.ucv.cl/tesis/production/pucv/2001/raggi_ca/html/index-frames.html

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: 31-36.

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.

RÍOS, J. C., POLANCO, R., PÉREZ, L. M. 2005. Evaluación de mutantes de *Trichoderma harzianum* para el control biológico de patógenos del tomate. Biological Resource. 38.2-3.

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.otalca.cl/handle/1950/1490>. 09/08/2006

ROBINSON, M. 2005. Determinación de las condiciones óptimas para la máxima esporulación del hongo *Trichoderma harzianum*. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Andrés Bello. 18 p.

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.

SIVAN, A. HARMAN, G. 1991. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. Journal Microbiology, 137(1):23-29.

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

STRASHNOV, Y., ELAD, Y., SIVAN, A. and CHET, I. 1985. Integrated control of *Rhizoctonia solani* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. Plant Pathol. 34: 146-151.

VALDERRAMA, L. 2007. Utilización de mutantes de *Trichoderma harzianum* (Rifai) para el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Memoria de Título Ing. Agr. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 43 p.

WIATER, A., SZCZODRAK J., PLESZCZYNSKA, M. 2006. Enhancement of mutanase production in *Trichoderma harzianum* by mutagenesis. Acta Biológica Húngara. 57(1):. 123-132.

WILLIAMS, J., CLARKSON, J.M., MILLS, P., and COOPER, R. 2003. A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. Applied and Environmental Microbiology. 69 (7): 4190–4191.

ZALDIVAR, M., VELASQUEZ, J.C.; CONTRERAS, I. and PEREZ L.M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electronic Journal of Biotechnology. 4(3). Disponible en: <http://www.ejb.org/content/vol4/issue3/full/7>.

APÉNDICES

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

Suelo	Tamaño y Diámetro de partículas			Clase de textura
	Hidrometro Bouyoucos			
	% Arena 2-0,05 mm	%Limo 0,05-0,002 mm	% Arcilla < 0,002 mm	
Antumapu	48,00	28,90	23,10	Franco
La Palma	71,50	15,80	12,70	Franco-Arenoso

Según análisis realizado por laboratorio de suelos, INIA La Platina.

Apéndice II: Análisis de fertilidad de 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
Antumapu	7,6	2,17	2,1	32	7	142
La Palma	6,6	1,71	1,7	18	82	156

Según análisis realizado por laboratorio de suelos, INIA La Platina.