

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

Memoria de Título

**CONTROL BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* (Kühn) MEDIANTE 2 CEPAS
MEJORADAS DE *Trichoderma harzianum* (Rifai) EN TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill.)**

SOLEDAD VICTORIA SÁNCHEZ TÉLLEZ

Santiago, Chile

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE

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

Memoria de Título

**CONTROL BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* (Kühn) MEDIANTE 2 CEPAS
MEJORADAS DE *Trichoderma harzianum* (Rifai) EN TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill.)**

**BIOLOGICAL CONTROL OF *Rhizoctonia solani* (Kühn) WITH 2 *Trichoderma
harzianum* (Rifai) IMPROVED STRAINS IN TOMATO**

SOLEDAD VICTORIA SÁNCHEZ TÉLLEZ

Santiago, Chile

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

**CONTROL BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* (Kühn) MEDIANTE 2 CEPAS
MEJORADAS DE *Trichoderma harzianum* (Rifai) EN TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill.)**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniera Agrónoma
Mención: Sanidad Vegetal

SOLEDAD VICTORIA SÁNCHEZ TÉLLEZ

Profesores Guías	Calificaciones
Sr. Jaime R. Montealegre A. Ingeniero Agrónomo	6,9
Sr. Rodrigo A. Herrera C. Ingeniero Agrónomo	7,0
Profesores evaluadores Sr. José Luis Henríquez S. Ingeniero Agrónomo, M. S., Ph. D.	6,8
Sr. Jaime A. Rodríguez M. Ingeniero Agrónomo	6,5

Santiago, Chile

2009

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco al Sr. Jaime Montealegre por su confianza y apoyo para llevar a cabo la presente investigación, así como por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal. Al Sr. Rodrigo Herrera por sus oportunos consejos y su excelente disposición. Al Sr. José Luis Henríquez por sus oportunas y constructivas críticas y su aporte como excelente profesional y docente.

A todas las personas que han trabajado y trabajan en el Laboratorio, especialmente a Javiera Barcos por su ayuda en terreno, su apoyo y amistad. A Felipe Bauzá por su ayuda y excelente disposición. A María Francisca Sepúlveda por su preocupación y apoyo. A la señora Lula y a Natalia Romero quienes me enseñaron el funcionamiento del Laboratorio y los procedimientos necesarios para realizar mi Memoria. A Fabián Ochoa y a Luis Valderrama quienes me guiaron y apoyaron en los ensayos, y también por entregarme su confianza y amistad. A la Sra. Ángela, la Sra. Marta Sepúlveda y Sra. Felicia, por su alegría y por brindar un inmejorable ambiente de trabajo.

Agradezco especialmente a mi padre por su interés y amor. A mi madre por su paciencia durante este largo proceso; por su amor y fuerza. A mi hermana por su cariño y preocupación. A Alex por su amor y apoyo incondicional.

A mis Padres

ÍNDICE

RESÚMEN.....	1
Palabras clave.....	1
ABSTRACT.....	2
Key words.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Efectividad en el control de <i>Rhizoctonia solani</i>	8
Tratamientos y diseño experimental.....	8
Preparación de pellets de <i>Trichoderma harzianum</i>	9
Montaje del ensayo.....	10
Evaluaciones.....	11
Evaluación de la población y de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp.....	13
Población.....	13
Capacidad antagónica.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
Efectividad en el control de <i>Rhizoctonia solani</i>	16
Rendimiento de Frutos.....	16
Peso fresco de plantas.....	17
Nivel de daño.....	18
Evaluación de la población y de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp.....	20
Población.....	20
Capacidad antagónica.....	23
CONCLUSIONES.....	26
LITERATURA CITADA.....	27

RESÚMEN

El control de *Rhizoctonia solani* y otros patógenos del suelo en el cultivo del tomate, se realiza fundamentalmente mediante fumigaciones con bromuro de metilo. En la búsqueda de alternativas de control amigables con el medio ambiente, se evaluó la efectividad de dos cepas mejoradas de *Trichoderma harzianum* sobre el biocontrol de *Rhizoctonia solani* en un cultivo comercial de tomates bajo invernadero. Las cepas utilizadas fueron: Th 12A 10.1, y Th F2-1, previamente seleccionadas como buenos biocontroladores del fitopatógeno. Ambas fueron aplicadas en forma de pellets de alginato de sodio (1,7 g / planta). Estas fueron comparadas con aplicaciones del biofungicida comercial Trichonativa (aplicado en dosis de 5 cc / L en pre-transplante y 1 L / Ha en post-transplante) y con una aplicación de bromuro de metilo (60 g / m², con 5 días de exposición). Los bioantagonistas fueron aplicados en 1 y 3 oportunidades. Se evaluó: rendimiento de frutos, peso fresco de plantas y nivel de daño causado por *R. solani*. Además se determinó la persistencia de la población y capacidad antagónica de los bioantagonistas en estudio. En rendimiento total y de frutos de calibre primera, destacan los resultados de la cepa Th F2-1 aplicada en tres oportunidades en relación al tratamiento con una aplicación de la misma cepa mejorada. Mientras que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos en el peso fresco de las plantas. En cuanto al nivel de daño, la cepa Th F2-1 aplicada en tres oportunidades se diferenció del tratamiento testigo, sin embargo, los bajos niveles de la enfermedad no permitieron una buena apreciación de las características antagónicas de las cepas restantes. *Trichoderma* spp. en los suelos inoculados, persistió durante 3 meses en los tratamientos con aplicaciones de las cepas mejoradas de *T. harzianum* en tres oportunidades, destacando la cepa Th F2-1. En relación a la mantención de la capacidad antagónica de las cepas, los aislados de los tratamientos con aplicaciones de las cepas Th F2-1 y Th 12A 10.1 mantuvieron su capacidad antagónica durante el ensayo, no así las cepas aisladas desde los tratamientos con el biofungicida comercial.

Palabras clave: Biocontrol, Bioantagonistas mejorados, Bromuro de Metilo.

ABSTRACT

The diseases caused by soilborne pathogens in tomato, such as *R. solani*, are usually controlled by soil fumigation. The aim of this research was to study the effectivity of the biological control of *R. solani* utilizing two *Trichoderma harzianum* improved strains (Th 12A 10.1 and Th F2-1) compared with Methyl Bromide and a commercial formulation of *Trichoderma* spp. in cropped under greenhouse in Chile. Fruit yield, fresh weight of plants and the canker level caused by *R. solani* were evaluated. The viability of improved strains of *T. harzianum* and their antagonistic activity on *Rhizoctonia solani* in tomatoes were also evaluated. For fruit yield, there were not differences between the treatments and the control, except the treatment with methyl bromide, which presented lower yield. In the parameter fresh weight of plants were not detected differences between treatments. For canker level the best treatment was the Th F2-1 strain applied in three times. The population viability of *T. harzianum* was of 3 months in the treatments with 3 applications of the improved strains. The treatments with Th F2-1 and Th 12A 10.1 applications kept theirs antagonistic effects on *R. solani* during the present research. The strains isolated of the treatments with applications of the commercial product, does not kept their antagonistic effects on *R. solani*.

Key words: Biological control, Methyl Bromide, Improved strains of *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia solani*.

INTRODUCCIÓN

El tomate es la especie hortícola de mayor producción en el mundo, llegando a 4,4 millones de hectáreas cultivadas. En Chile, según estimaciones de ODEPA (2007), en la temporada 2003/04 se cultivaron 5.282 hectáreas de tomates al aire libre para consumo en fresco, 1.066 hectáreas de tomates en invernadero y 10.400 hectáreas destinadas a la agroindustria. La disminución en las hectáreas cultivadas, debido a la contracción del mercado durante los últimos años, ha llevado a una intensificación del cultivo con el objetivo de lograr mayores rendimientos para no perder rentabilidad, lo que ha traído como consecuencia un incremento en una serie de enfermedades, especialmente cuando se realiza bajo invernaderos fríos (CORFO, 1990), disminuyendo los rendimientos y, a su vez, provocando una inestabilidad en los agroecosistemas, principalmente producto de un mal manejo de los problemas fitosanitarios (Flint y Roberts, 1988).

Dentro de los microorganismos que atacan al cultivo del tomate, los hongos constituyen uno de los principales grupos, tanto por la diversidad de especies como por las enfermedades y pérdidas que estas originan (Benítez *et al*, 1998; Papavizas, 1985; Rey *et al*, 2000). Algunos de ellos habitan en el suelo como las especies pertenecientes a los géneros *Pyrenochaeta*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* entre otros; produciendo daños a nivel de raíces, tallos y frutos (De Souza, 1992). Entre ellos destaca la especie *Rhizoctonia solani* (Kühn), patógeno que causa enfermedades en un amplio rango de hospederos de cultivos agrícolas, teniendo gran importancia en el cultivo del tomate (Sneh *et al*, 1991; Van den Boogert, 1999; Cúndom *et al*, 2001).

R. solani es una especie fitopatógena compuesta por cepas más o menos emparentadas, las que se diferencian de acuerdo a sus grupos de anastomosis y que se utilizan como criterio de clasificación. Dentro de los grupos de anastomosis de *R. solani* presentes en el cultivo del tomate en Chile, se ha determinado la presencia de GA-4 y GA-2-1 (Reyes, 2000; Montealegre *et al.*, 2003); siendo este microorganismo el principal agente causal del ahogamiento de plántulas, de la pudrición y de la canchrosis del tallo, tanto en plantas adultas como en proceso de crecimiento, provocando importantes pérdidas en el cultivo (Agrios, 2001).

R. solani, y en general los patógenos que afectan el sistema radical, son usualmente controladas mediante fumigación del suelo, previo al trasplante, con bromuro de metilo (Escobar *et al* (2000) citados por Santander, 2001). La utilización de este producto se encuentra altamente cuestionada por ser tóxico y riesgoso para los aplicadores, además de ser una sustancia degradadora de la capa de ozono. De acuerdo a lo planteado en el Protocolo de Montreal, su uso en los países desarrollados se llevó a cero el 1 de Enero de 2005, sin embargo se permite que los estados declaren usos críticos y soliciten cuotas de consumo para los casos en los que no se encuentren alternativas viables al fumigante. En tanto, para los países en vías de desarrollo, como sucede en el caso de Chile, su uso se ha

prohibido a partir del año 2010, disminuyendo progresivamente su utilización en un 25 % desde el año 2001 a un 50% para el año 2005 (Ristaino y Thomas, 1997; González y Carrasco, 2006).

Además de provocar un importante daño ambiental, el control químico emplea compuestos que, si bien se caracterizan por una elevada eficacia y una gran rapidez en el control, son tóxicos inespecíficos que eliminan junto con los organismos fitopatógenos otros organismos beneficiosos para el agroecosistema, disminuyendo la biodiversidad y dejando un importante vacío biológico en el suelo, aumentando el peligro de ataques de enfermedades catastróficas para el cultivo (Flint y Roberts, 1988). Estos inconvenientes se han potenciado en los últimos años debido al cambio en los sistemas de cultivo, como son los monocultivos y explotaciones intensivas (Rey *et al*, 2000).

Además del control mediante fumigación, existe la posibilidad de controlar a *R. solani* empleando fungicidas. Una importante limitante para esta estrategia, junto a lo variable de los resultados, lo constituye la adquisición de resistencia por parte de los microorganismos, tornándose crecientemente tolerantes o resistentes a los compuestos utilizados (Schnettler, 1993).

Sin dejar de lado el enfoque de productores y científicos, los métodos tradicionales de control que implican la utilización de sustancias perjudiciales para el medio ambiente han adquirido detractores entre los consumidores tanto en Chile como en el extranjero, los que exigen alimentos cuya producción se realice de manera sustentable e inocua para el agroecosistema (Montealegre, 2004).

En la actualidad se abre una importante ventana a la investigación de técnicas alternativas para el manejo de microorganismos fitopatógenos debido a la necesidad de sustituir o disminuir el uso de productos químicos en el control de enfermedades producidas por hongos del suelo. El control biológico se refiere a la utilización de agentes de control benéficos con el objetivo de disminuir las poblaciones de individuos perjudiciales a niveles no dañinos en los cultivos y es una herramienta eficaz en el control de plagas y enfermedades, desde un punto de vista de la calidad del manejo, el impacto en el medio, la compatibilidad con la fauna del lugar y el enriquecimiento de la biodiversidad local con organismos benéficos (Rengifo 2000).

En ese ámbito se han realizado numerosos estudios de invernadero y de laboratorio que prueban la capacidad bioantagonista de diversas especies de hongos, entre ellas *Trichoderma* spp. y bacterias como las del género *Bacillus* (Herrera, 2005). Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos, principalmente debido a su facilidad para ser aisladas y cultivadas y a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos (Papavizas *et al*, 1982; Papavizas *et al*, 1990; Agrios 2001; Ristaino y Thomas, 1997; Rey *et al* 2000).

Las propiedades antagonicas del género *Trichoderma* se basan en la acción de múltiples mecanismos. Según Chet *et al* (1997), los principales medios utilizados por estos microorganismos para desplazar al fitopatógeno son competencia directa por el espacio y nutrientes, producción de metabolitos antibióticos volátiles y difusibles, además de parasitismo directo. Otros autores agregan la capacidad del bioantagonista de modificar las condiciones del medio, además de promover el crecimiento y mecanismos de defensa de las plantas (Howell 2003, Benitez *et al* 2004). Según Fernández-Larrea (2001), el efecto principal se debe al hiperparasitismo, no obstante, la capacidad de algunas especies de producir metabolitos bioactivos incrementa su acción. Benitez *et al* (2004), indican al respecto que estos mecanismos directos e indirectos pueden actuar en forma conjunta y su importancia en el biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma* del fitopatógeno en cuestión, del cultivo y de las condiciones ambientales, como son la disponibilidad de nutrientes, pH y temperatura.

A pesar de las ventajas antagonicas que pueda tener el biocontrolador, diversos estudios han demostrado que aislados de cepas silvestres de *Trichoderma harzianum* (Rifai) si bien poseen un buen control de organismos fitopatógenos, este es menor al logrado por la fumigación con bromuro de metilo (Montealegre *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2002; Arias 2005).

Sin duda, un uso más extendido del control biológico requiere de la obtención de agentes de biocontrol más eficaces que los que existen actualmente. Con el fin de obtener cepas de *Trichoderma* que sean mejores agentes de biocontrol que las existentes, se han seguido varias estrategias encaminadas a aumentar su capacidad de control, entre ellas, la de degradación de la pared celular de los organismos que atacan (Rey *et al*, 2000).

La utilización de luz ultravioleta ha sido una herramienta orientada a inducir mutaciones en la especie *T. harzianum*, modificando su capacidad de secretar sustancias antibióticas, aumentando su efecto antagonico en relación a las cepas silvestres (Graeme-Cook y Faull, 1991). En el trabajo realizado por Arias (2005), se estudiaron diversas cepas mutadas por medio de luz ultravioleta. Dentro de ellas, Th 11A 160.1, Th 11A 80.1, Th 11A 160.1 y Th 12A 10.1 mostraron un importante grado de inhibición de las cepas 618 (GA 4) y 509 (GA 2-1) del fitopatógeno *R. solani* en relación a sus cepas padres (Arias *et al.*, 2005). En estudios posteriores realizados en macetas y bajo condiciones semicontroladas de invernadero, la cepa mutante Th 12A 10.1 presentó buenos resultados sobre el control de la cepa 618 de *R. solani* (Valderrama, 2007).

Además de la mutación a través de luz ultravioleta, se ha utilizado la técnica de fusión de protoplastos para conseguir cepas mejoradas del bioantagonista (Stasz *et al.*, 1998; Arias 2005). En trabajos desarrollados por Ogawa *et al* (2000) se indica que las cepas mejoradas obtenidas por la fusión de protoplastos de aislados de *Trichoderma harzianum*, presentan características especiales en cuanto al aumento de la capacidad antagonica sobre microorganismos fitopatógenos. Otras investigaciones señalan que la fusión de protoplastos entre cepas de aislados silvestres de *Trichoderma*, presentan un crecimiento más rápido y

una mayor esporulación que sus cepas parentales (Prabavathy *et al*, 2006). En estudios realizados por Ochoa (2008), se obtuvieron resultados que probaron la superioridad de ciertas cepas mejoradas por medio de fusión de protoplastos sobre sus progenitores, destacando la cepa ThF 2-1.

Basándose en los antecedentes presentados, el objetivo de esta investigación fue evaluar el control de *Rhizoctonia solani* mediante el uso de cepas mejoradas de *Trichoderma harzianum*, Th 12A 10.1 y ThF 2-1, en un cultivo comercial de tomates bajo condiciones de invernadero frío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo en un cultivo comercial de tomates, con el fin de evaluar la efectividad a nivel de campo de dos cepas de *T. harzianum* en el control de *R. solani*. Además se cuantificaron las poblaciones de *Trichoderma* spp. presentes en los distintos tratamientos a lo largo del cultivo, así como también la capacidad antagónica de los aislamientos realizados. Si bien, no se tiene la certeza de que estas cepas correspondan a los bioantagonistas aplicados, ya que no se utilizaron marcadores, los resultados dan una visión general acerca de las características antagónicas de los microorganismos del género *Trichoderma* presentes en los tratamientos.

El ensayo fue realizado en un invernadero frío ubicado en la localidad de Olmué, V Región. Para los ensayos *in vitro* se utilizó la infraestructura y equipos del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Se utilizaron las cepas mejoradas de *T. harzianum* Th 12A 10.1 y Th F2-1 (Cuadro 1); además, se utilizó el biofungicida Trichonativa (Cuadro 2); la cepa 618 de *R. solani* (Kühn) (GA 4) de patogenicidad comprobada obtenida del cepario del laboratorio y plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) del cultivar Fortaleza. Las cepas mejoradas de *T. harzianum* que se utilizaron fueron previamente seleccionadas *in vitro* y bajo condiciones semicontroladas de invernadero, como buenos controladores del fitopatógeno (Arias *et al*, 2005; Valderrama 2007; Ochoa 2008).

Cuadro 1. Antecedentes de las cepas utilizadas en el ensayo¹.

Cepas	Cepas parentales	Agente de mejoramiento
Th 12A 10.1	Th 12	Luz ultravioleta A (320 nm).
Th F2-1	ThV x Th 291	Fusión de protoplastos.

1/: Las letras (A o F) indican el agente mutagénico, mientras que la numeración que sigue a la letra A, en el caso de Th 12A 10.1 corresponde al tiempo de exposición a luz ultravioleta, para Th F2-1 corresponde a la serie. El número que sigue después de la puntuación o guión, según el caso, corresponde al número de repetición.

Cuadro 2. Especificaciones del biofungicida Trichonativa (SC) utilizado en el ensayo.

Composición	Cantidad
<i>Trichoderma</i> spp.	3,71 % p/p
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule	$3,3 \times 10^8$ conidias/ml
<i>Trichoderma virens</i> cepa Sherwood	$3,3 \times 10^8$ conidias/ml
<i>Trichoderma parceanamosum</i> cepa Trailes	$3,3 \times 10^8$ conidias/ml
Ácido láctico	0,11 % p/p
Inertes c.s.p.	96,18 % p/p

Fuente: Bio-Insumos Nativa Ltda. 2006.

Efectividad en el control de *Rhizoctonia solani*

Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos realizados se indican en el Cuadro 3 y consistieron en la aplicación de dos cepas mejoradas de *T. harzianum* las que fueron comparadas con aplicaciones del biofungicida Trichonativa y una aplicación de bromuro de metilo (CH₃Br) como control comercial. El tratamiento testigo recibió una aplicación de pellets de alginato de sodio sin biocontrolador.

El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar. Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones y la unidad experimental estuvo compuesta por diez plantas de tomate.

Se realizó un análisis de varianza y para separar las medias se efectuó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Cuando los datos no tuvieron una distribución normal se realizó un análisis según la prueba no paramétrica de Friedman, y para determinar las diferencias entre tratamientos se utilizó el valor crítico tabulado correspondiente.

Cuadro 3. Tratamientos efectuados.

Tratamientos	Descripción
Th 12A 10.1 ¹	Plantas con aplicaciones de pellets de la cepa mejorada Th 12A 10.1 en pre-transplante.
Th F2-1 ¹	Plantas con aplicaciones de pellets de la cepa mejorada ThF2-1 en pre-transplante.
Trichonativa ¹	Plantas con aplicaciones del biofungicida Trichonativa en pre-transplante.
Th 12A 10.1 ³	Plantas con aplicaciones de pellets de la cepa mejorada Th 12A 10.1 en tres oportunidades.
Th F2-1 ³	Plantas con aplicaciones de pellets de la cepa mejorada ThF2-1 en tres oportunidades.
Trichonativa ³	Plantas con aplicaciones del biofungicida Trichonativa en tres oportunidades.
Bromurado	Control con una aplicación de CH ₃ Br en pre-transplante.
Testigo	Control con aplicaciones de pellets inertes en pre-transplante

¹/: Se refiere a los tratamientos aplicados en pre-transplante. ³/: Se refiere a los tratamientos que fueron aplicados en pre-transplante, 15 días después del transplante y una semana antes del desbrote.

Preparación de pellets de *Trichoderma harzianum*

Para la obtención de la biomasa de las cepas de *T. harzianum* que fue utilizada en la fabricación de los pellets (Besoain *et al*, 2004), se cultivó micelio de las cepas en placas de Petri con medio agar-papa-dextrosa (APD) por un período mínimo de cinco días a 23 °C en cámara de cultivo. Se elaboró un medio de cultivo líquido para *Trichoderma* sp. (Figura 1.A y 1.B) a partir de: 500 mL de jugo de papa, 10 mL de jugo concentrado de maíz diluido en 250 mL de agua destilada, 25 g de glucosa y 250 mL de agua destilada, mezcla que se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y a una presión de 1 Kg/cm². Luego, con la ayuda de un asa, se extrajeron 10 discos de 8 mm de diámetro con el micelio del hongo cultivado para introducirlos en el medio de cultivo líquido (Figura 1 A). Las placas con el medio líquido fueron incubadas por al menos siete días a 30 °C en cámara de cultivo. La biomasa del hongo desarrollada en este período (Figura 1 B), fue cosechada mediante colador y se utilizó para la fabricación de los pellets.

Para la fabricación de los pellets se procedió según la metodología utilizada por Valderrama (2007), la mezcla obtenida se pasó por un depósito de múltiples salidas de gotero y se dejaron caer gotas sobre una solución de CaCl₂ 3% p/v formándose los pellets, los que se retiraron de la solución y se secaron en horno a 30 °C por 15 horas aproximadamente (Figura 1.C y 1.D)

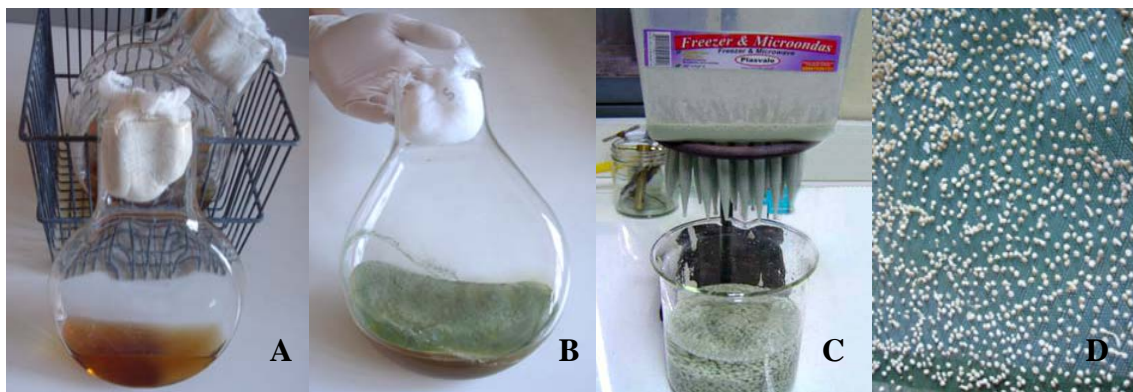


Figura 1. A. Medio líquido para *Trichoderma* spp. B. Micelio y esporas de *Trichoderma* sp. cultivado en medio líquido. C. Fabricación de los pellets. D. Secado de los pellets.

Finalmente, acorde con la metodología utilizada por Santander (2001) y descrita por Madigan *et al* (2004), se determinó el número de unidades formadoras de colonia por gramo de pellets (N° UFC/ g pellets) para lo cual se realizó una dilución seriada y siembra por extensión en placas de Petri con APD incubadas a 22 °C durante 72 horas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de unidades formadoras de colonia por gramo de pellets.

Cepa pelletizada	Nº UFC/ g pellets
Th12A10.1	500.000
ThF2-1	700.000

Montaje del ensayo

El montaje del ensayo se realizó el 25 de mayo de 2006, eligiéndose un predio donde se realiza monocultivo de tomates en invernaderos con antecedentes de ataques de *Rhizoctonia solani* en años anteriores (Figura 2).



Figura 2. Lugar del montaje del ensayo en las distintas etapas del cultivo.

Los pellets de los biocontroladores fueron aplicados en mezcla con un volumen de suelo correspondiente a 1 L en el lugar del hoyo de plantación en las aplicaciones pre-transplante (Figura 3) y alrededor del tallo de la planta en las aplicaciones posteriores, en una dosis de 1,7 gramos de pellets / planta. En cuanto al producto comercial, se aplicó vía riego en una dosis de 5 cc / L para la aplicación pre-transplante y de 1 L / Ha para las aplicaciones restantes (Figura 4). El bromuro de metilo fue aplicado en una dosis de 60 g / m² con 5 días de exposición y 10 de ventilación (dosis determinada por el productor). El trasplante fue realizado el 2 de junio de 2006.

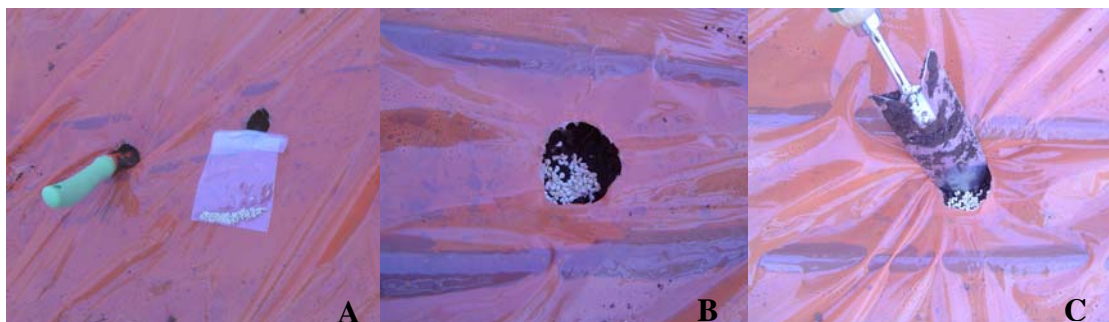


Figura 3. Proceso de aplicación de pellets de los biocontroladores pre-transplante A. dosificación; B inoculación de suelo; C homogenización de los pellets con el suelo.



Figura 4. Aplicaciones post-transplante de los pellets y de Trichonativa. A Plantas inoculadas; B crecimiento del Trichoderma en el suelo; C crecimiento de plantas inoculadas.

Previo al montaje del ensayo se efectuó un análisis químico (Cuadro 5) y físico del suelo donde se realizó el ensayo (Cuadro 6), además se determinó el inóculo natural de *Trichoderma spp.* (Williams *et al*, 2003), correspondiendo a 2.500 UFC/ g suelo.

Cuadro 5. Resultados del análisis químico del suelo.

pH	C.E.¹ (dS / m)	M.O.² (%)	Nitrógeno (mg / Kg)	Fósforo (mg / Kg)	Potasio (mg / Kg)
7,1	4,1	3,7	32	200	580

1/: Conductividad eléctrica de la solución suelo. 2/: Contenido de materia orgánica del suelo.

Cuadro 6. Resultados del análisis físico del suelo.

Tamaño y diámetro de partículas (mm) Método hidrómetro-Bouyoucos			Clase de Textura	Densidad Real g / cc
% Arena 2 – 0,05 mm	% Limo 0,05 – 0,002 mm	% Arcilla < 0,002 mm		
42,70	35,80	21,50	Franco	N/A

Evaluaciones

Rendimiento de frutos

Se evaluó el rendimiento en kilogramos de frutos producidos por planta hasta el tercer racimo (3 de Octubre hasta el 14 de Noviembre de 2006), para lo cual se cosechó semanalmente utilizando el índice de cosecha recomendado por el productor. Los frutos fueron separados por calibre según criterio del productor (Cuadro 7) y luego fueron pesados.

Cuadro 7. Categoría de los frutos dependiendo de su calibre, según criterio del productor.

Diámetro (mm)	Categoría
> 67	primera
67 – 57	segunda
< 57	tercera

Peso fresco de las plantas

Se evaluó el peso fresco de las plantas al momento del levantamiento del cultivo (2 de enero de 2007), se pesaron las plantas de cada unidad experimental para luego determinar el peso promedio por planta, tanto de la parte aérea como de las raíces.

Nivel de daño

Se evaluó el nivel de daño de *R. solani* al momento del levantamiento del cultivo (2 de Enero de 2007), midiendo el daño de acuerdo al porcentaje del cuello de la planta afectado. Para lo cual se utilizó la escala propuesta por Valderrama (2007) modificada, la que se detalla en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Escala de daño en base a porcentaje afectado del área de la zona del cuello de la planta.

Categoría	Área afectada (%)	Estado
0	0%	Planta sana
1	<5%	Planta con enfermedad leve
2	5%-30%	Planta con enfermedad moderada
3	30%-60%	Planta con enfermedad importante
4	60%-90%	Planta con enfermedad grave

En la Figura 5 se puede apreciar la escala visual de daño detallada anteriormente en el Cuadro 8.



Figura 5. Escala de evaluación utilizada para determinar cancrisis de cuello.

Evaluación de la población y de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp.

Población

Con el fin de registrar las poblaciones de *Trichoderma* spp. en el transcurso del ensayo, se tomaron muestras de suelo de las parcelas tratadas con los biocontroladores en estudio (Cuadro 9).

Cuadro 9. Número de muestra y tratamiento.

Muestra	Tratamiento muestreado
1	Th 12A 10.1 ¹
2	Th F2-1 ¹
3	Trichonativa ¹
4	Th 12A 10.1 ³
5	Th F2-1 ³
6	Trichonativa ³

¹/: Se refiere a los tratamientos aplicados en pre-transplante. ³/: Se refiere a los tratamientos que fueron aplicados en pre-transplante, 15 días después del transplante y una semana antes del desbrote.

Para realizar la cuantificación se formaron muestras compuestas a partir de submuestras obtenidas de cada parcela, para lo cual se utilizó un sacabocados de 8 mm de diámetro que se introdujo en el sector cercano al cuello de las plantas, a 10 cm de profundidad, en el pan de raíces, como se presenta en la Figura 6.



Figura 6. Toma de muestra de suelo con un sacabocados en el sector cercano al cuello de la planta.

Las muestras de suelo fueron tomadas en cuatro oportunidades: un mes después del transplante (3 de julio de 2006); en el momento de la cuaja del segundo racimo frutal, tres meses después del transplante (5 de Septiembre de 2006); cosecha del tercer racimo, cinco meses después del transplante (6 de Noviembre de 2006) y una vez realizado el levantamiento del cultivo, siete meses después del transplante (2 de enero de 2007).

Una vez en laboratorio, se tomó 1 g de cada muestra para efectuar una dilución seriada según el procedimiento de determinación de unidades formadoras de colonia mediante la metodología de siembra por extensión descrita por Madigan *et al* (2004) en placas de Petri con medio de cultivo Coorky Root (Grove and Campbell, 1987), si bien este medio es utilizado para realizar aislamientos de *Pyrenocheta licoperisci* se ha comprobado que además actúa como medio semiselectivo para *Trichoderma* spp. Las placas fueron incubadas a 22 °C durante 72 horas, luego se procedió al conteo de las colonias de *Trichoderma* para determinar las UFC del bioantagonista por g de suelo.

Los datos se analizaron para cada muestra considerando como tratamientos las distintas fechas de toma de muestras (1, 3, 5 y 7 meses después del trasplante), comparando los resultados de UFC de *Trichoderma* spp. / g de suelo a lo largo del cultivo.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, se realizaron 4 repeticiones y la unidad experimental correspondió a una placa de Petri. Se realizó un análisis de varianza y para separar las medias se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Capacidad antagónica

Una vez determinada la cantidad de unidades formadoras de colonia de *Trichoderma* spp. por gramo de suelo en los distintos tratamientos y luego de realizados los aislamientos en cultivos puros, se efectuaron pruebas de antagonismo directo según la metodología descrita por Arias (2005), entre las cepas obtenidas desde los aislamientos realizados 1, 3, 5 y 7 meses después del trasplante y la cepa 618 de *R. solani*. Se comparó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de cada uno de los aislados con la cepa mejorada original, obtenidas desde el cepario del Laboratorio de Microbiología en el caso de las cepas Th 12A 10.1 y Th F2-1, y de un aislamiento directo desde el producto en el caso de las cepas aisladas desde muestras con aplicaciones de Trichonativa.

La evaluación de los ensayos de antagonismo directo se realizó cuando las cepas utilizadas para los tratamientos testigos cubrieron la totalidad de la placa con su crecimiento, en ese momento se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (ICR) mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971) como se muestra en la Figura 7.

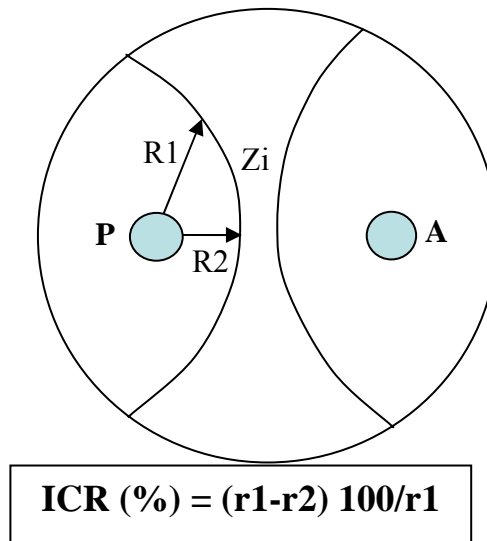


Figura 7. Determinación de antagonismo directo a través de cultivos duales. P: patógeno, A: antagonista y Zi: Zona de inhibición. Donde R1 corresponde a la distancia más lejana recorrida por el patógeno y R2 corresponde a la distancia recorrida por el patógeno hacia el bioantagonista.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, se realizaron 5 repeticiones por tratamientos y la unidad experimental fue una placa de Petri. Los porcentajes obtenidos fueron sometidos a la transformación angular de Bliss para luego realizar un análisis de varianza, para separar las medias se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectividad en el control de *Rhizoctonia solani*

Rendimiento de Frutos

En cuanto al rendimiento de frutos de primera, no se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos con aplicaciones de bioantagonistas y el testigo. El tratamiento bromurado presentó el menor rendimiento. Mientras los rendimientos de frutos de segunda y tercera categoría fueron similares para todos los tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Rendimiento, promedio por planta para cada uno de los tratamientos

Tratamiento	Calibre		
	Primera	Segunda	Tercera
	(g / planta)		
Th F2-1 ³	1715 a	317 a	26 a
Trichonativa ³	1700 a	317 a	26 a
Trichonativa ¹	1645 a b	224 a	8 a
Testigo	1595 a b	274 a	14 a
Th 12A 10.1 ³	1584 a b	256 a	8 a
ThF2-1 ¹	1548 a b	213 a	14 a
Th12A10.1 ¹	1437 b	252 a	20 a
Bromurado	1252 c	178 a	12 a

Letras iguales en las columnas indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos según el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. ¹: Se refiere a los tratamientos aplicados en pre-transplante. ³: Se refiere a los tratamientos que fueron aplicados en pre-transplante, 15 días después del transplante y una semana antes del desbrote.

Resultados afines se obtuvieron en un ensayo realizado bajo condiciones productivas de tomate, en el cual se evaluó el control ejercido por distintas cepas de *Trichoderma* y *Paenibacillus lentimorbus* sobre *Pyrenochaeta lycopersici* (Fernandois, 2003), en el cual los tratamientos presentaron resultados similares en cuanto al rendimiento de frutos incluido el bromurado a diferencia del presente ensayo. En el caso del ensayo realizado por Fernandois (2003), los resultados se atribuyeron a las condiciones ambientales a las que estuvieron sometidas las plantas. En este sentido Windham *et al* (1986), señalan que *Trichoderma* podría incrementar los rendimientos por producción de algún factor de crecimiento, pero debido a que en sus ensayos no obtuvieron pruebas suficientes al respecto, atribuyeron el incremento en el rendimiento al control que ejerce el microorganismo sobre los patógenos que habitan el suelo.

Estudios posteriores indican que especies de *Trichoderma* tendrían una acción estimulante sobre las defensas de las plantas. Es así como en un ensayo realizado por Yedidia *et al* (1999), al inocular semillas de pepino con esporas de *T. harzianum* las plantas expresaron respuestas de defensa tanto en las raíces, como en las hojas. En otro estudio realizado por Howell *et al* (2000), donde se trataron semillas de algodón con esporas de *Trichoderma* spp., una vez emergidas las plantas tratadas presentaron en sus raíces altas concentraciones de moléculas relacionadas con la inhibición de *R. solani*. Sin embargo, si se consideran los resultados presentados, los tratamientos con aplicaciones de *Trichoderma* spp. no se diferenciaron del testigo, lo que indicaría que no existen pruebas que permitan concluir que existió un aumento en el rendimiento de frutos en las plantas sometidas a aplicaciones del bioantagonista, ya sea por control directo del fitopatógeno o por la inducción de mecanismos de defensa.

Peso fresco de plantas

El peso fresco de plantas tanto de la parte aérea como del sistema radical fue similar en todos los tratamientos (Cuadro 11), lo que corroboraría los resultados obtenidos por Valderrama (2007) en un ensayo de efectividad del control de *R. solani* por mutantes de *T. harzianum* en plantas de tomate del cultivar Góndola, en condiciones semicontroladas de invernadero con inóculo artificial del fitopatógeno. Donde la similitud de los pesos de la parte aérea y raíces entre los tratamientos se atribuyó a cierto grado de tolerancia del cultivar al patógeno, afirmación que no podría descartarse en el presente ensayo ya que no se tienen antecedentes de algún tipo de resistencia por parte del cultivar Fortaleza.

Cuadro 11. Peso fresco total de las plantas.

Tratamiento	Peso total		Peso raíces	
	(g / planta)			
Trichonativa ¹	1508,9	a	95,4	a
Th F2-1 ³	1463,4	a	91,6	a
Trichonativa ³	1441,4	a	90,1	a
ThF2-1 ¹	1366,9	a	87,4	a
Testigo	1307,2	a	85,8	a
Bromurado	1302,8	a	85,4	a
Th 12A 10.1 ¹	1227,2	a	71,4	a
Th 12A 10.1 ³	1172,4	a	69,5	a

Letras iguales en las columnas indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos según el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. ^{1/}: Se refiere a los tratamientos aplicados en pre-transplante. ^{3/}: Se refiere a los tratamientos que fueron aplicados en pre-transplante, 15 días después del transplante y una semana antes del desbrote.

Fernandois (2003) en un ensayo orientado a evaluar la eficiencia en el control de *Pyrenochaeta lycopersici* mediante distintas cepas de *Trichoderma* spp. y *Paenibacillus lentimorbus* en tomate producido bajo invernadero, obtuvo resultados similares en relación al peso fresco de las plantas, donde no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con aplicaciones de los bioantagonistas y el testigo lo que en este caso se explicaría por el efecto de la temperatura y luminosidad sobre el desarrollo vegetativo de las plantas, argumentando que estas variables tienen un efecto sobre los niveles endógenos de giberelinas y citoquininas lo que tendería a enmascarar las diferencias existentes entre el testigo y los tratamientos restantes.

Por otra parte, se puede deducir que al no existir diferencias entre los tratamientos, la aplicación de los distintos bioantagonistas no tuvo un efecto estimulante en cuanto al desarrollo vegetativo de las plantas, a diferencia de lo descrito por González *et al* (2004) en un ensayo en el que se evaluó el control de *Fusarium solani* en tomate mediante el uso de cepas de *Trichoderma* spp., donde se obtuvo un mayor peso seco de las plantas tratadas con el bioantagonista, atribuyéndose a un efecto estimulante sobre el desarrollo vegetativo de los individuos.

El efecto estimulante de *T. harzianum* sobre el desarrollo de las plantas se debe, según algunos autores, básicamente a la producción de fitohormonas y vitaminas, además de la conversión de minerales de formas no utilizables a otras utilizables por la plantas y al aumento en la absorción y traslocación de nutrientes (Baker, 1989; Kleifeld y Chet, 1992, citados por Cruz y Cisterna 1998).

En el caso del presente ensayo, la similitud entre el peso fresco de las plantas de los distintos tratamientos, se explicaría probablemente porque el nivel de enfermedad presentado en el ensayo fue de leve a moderado (Cuadro 8), no afectando el normal desarrollo de las plantas (Figura 8).

Nivel de daño

En base a los resultados, se puede señalar que el daño producido por *R. solani* fue de carácter secundario; no obstante, durante el desarrollo del ensayo se observaron lesiones en la base del tallo de las plantas, producto del ataque del fitopatógeno detectándose un nivel de enfermedad de leve a moderada (Figura 8). Cabe destacar que no existió mortalidad de plantas.

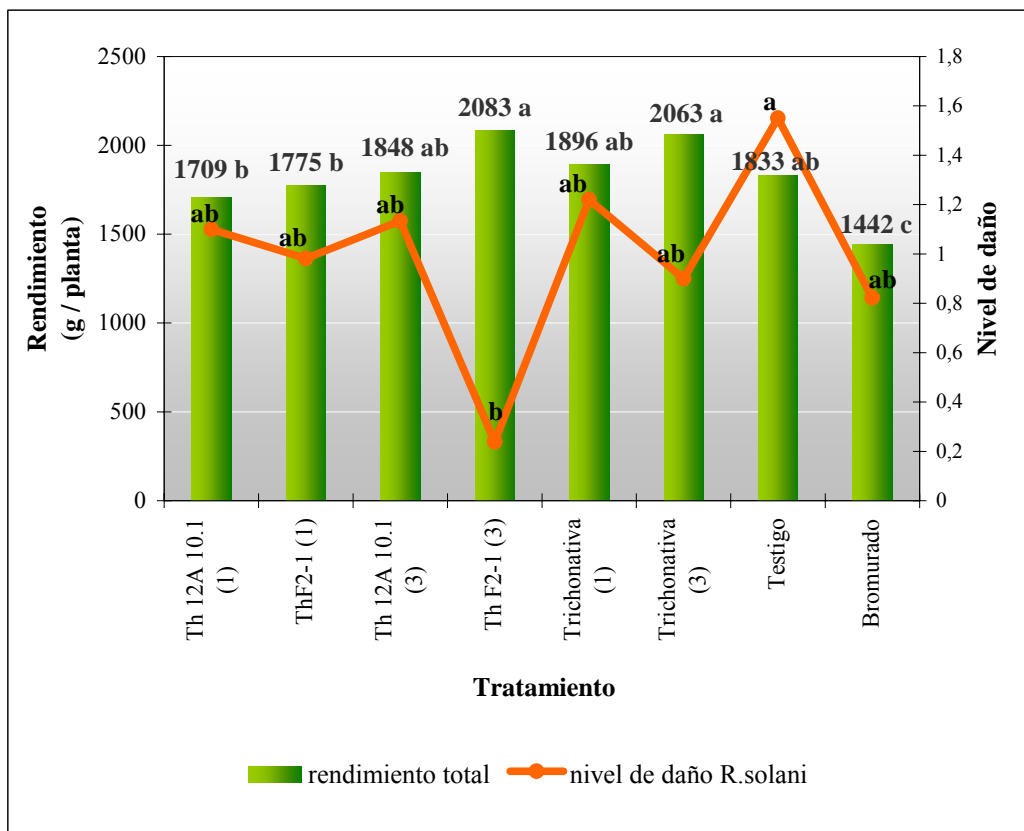


Figura 8. Rendimiento total y nivel de daño causado por *Rhizoctonia solani* presentado por las plantas. Letras iguales en las columnas indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de comparación múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$.

Como se puede apreciar en la Figura 8, el tratamiento con aplicaciones de la cepa Th F2-1 en tres oportunidades (Th F2-1³) fue el único que se diferenció significativamente del tratamiento testigo, ejerciendo un control sobre el fitopatógeno. Los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas lo que se explicaría por el bajo nivel de inóculo natural de *R. solani*. En este sentido es importante considerar que las interacciones existentes entre los microorganismos y su entorno dependen de múltiples variables, muchas de las cuales pueden favorecer o impedir un control biológico efectivo (McSpadden Gardener and Fravel, 2002).

Al observar la Figura 8 relacionando el nivel de daño provocado por el fitopatógeno en estudio y el rendimiento total del cultivo, destaca el tratamiento Th F2-1³, ya que el alto rendimiento obtenido posiblemente se asociaría al bajo nivel de daño presentado por las plantas, siendo el tratamiento con 3 aplicaciones de esta cepa obtenida por fusión de protoplastos el que presentó los mejores resultados en relación a ambos parámetros. En este sentido se podría hacer referencia a lo planteado por Howell (2003), quien destaca que las cepas obtenidas por fusión de protoplastos serían mejores biocontroladores que cepas

obtenidas por medio de otros tipos de agentes mutágenos, basándose en que no todos los mecanismos de biocontrol necesariamente se encuentran en un mismo microorganismo, de este modo, al realizar hibridaciones de distintas cepas de *Trichoderma* se conjugarían las características benéficas potenciando las cualidades del microorganismo resultante.

En los tratamientos con aplicaciones de la cepa Th 12A 10.1, *Trichonativa* y bromuro de metilo (Th 12A 10.1¹, Th 12A 10.1³, *Trichonativa*¹, *Trichonativa*³ y bromurado) no existió una relación clara entre ambas variables. Al observar la situación del tratamiento bromurado, destaca que si bien se detectó un bajo nivel de daño fue el que presentó el menor rendimiento de frutos, lo anterior podría explicarse debido a una aplicación deficiente del fumigante, lo que se corroboró según los antecedentes del productor y a lo observado en terreno. Además es sabido que la fumigación con bromuro de metilo elimina los microorganismos perjudiciales tanto como los benéficos creando un vacío biológico, lo que resulta perjudicial para el desarrollo del cultivo (Fuentes, 1996).

Evaluación de la población y de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp.

Población

En las muestras de suelo tomadas de las parcelas con aplicaciones de los distintos tratamientos no se detectó la presencia de *Trichoderma* a los 5 y 7 meses después del trasplante, razón por la cual sólo se consideraron las muestras tomadas hasta los 3 meses (90 días) luego del trasplante para realizar el análisis de los datos.

Como se puede apreciar en el Cuadro 12, en la parcela tratada con una aplicación pre-trasplante de la cepa Th 12A 10.1 (Th 12A 10.1¹) transcurridos 3 meses no se aisló *Trichoderma* spp. Cuando se efectuaron aplicaciones de la misma cepa en tres oportunidades (Th 12A 10.1³) las poblaciones de *Trichoderma* aumentaron a los 30 días ya que la parcela recibió nuevas aplicaciones, sin embargo tampoco se obtuvieron aislamientos de *Trichoderma* a los 90 días después del trasplante.

Cuadro 12. Población de *Trichoderma* spp. (UFC 10^6 / g de suelo) considerando el inóculo inicial y luego de 30 y 90 días después del trasplante.

Días después del trasplante	Tratamientos aplicados en pre-trasplante			Tratamientos aplicados en tres oportunidades		
	Th 12A 10.1 ¹	Th F2-1 ¹	Trichonativa ¹	Th 12A 10.1 ³	Th F2-1 ³	Trichonativa ³
0 ²	3,5 b	7,2 b	1x10 ² a	3,5 b	7,2 b	1x10 ² a
30	60 a	61 a	0 b	460 a	2,2 x10 ³ a	60 b
90	0 c	55 a	0 b	0 c	1,6 x10 ³ a	6 c

Letras iguales en las columnas indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos según el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/: se refiere a los tratamientos aplicados en pre-trasplante. 2/. Corresponde a la cantidad de inóculo inicial. 3/: Se refiere a los tratamientos que fueron aplicados en pre-trasplante, 15 días después del -trasplante y una semana antes del desbrote.

Los resultados presentados en relación a la sobrevivencia de la cepa Th 12A 10.1 en campo se contraponen a los obtenidos por Valderrama (2007), en un ensayo de persistencia de cepas padres y mutantes de *T. harzianum* en suelo estéril conservadas en frascos viales a 22°C, donde la población del mutante Th 12A 10.1 persistió hasta los 180 días después de la inoculación.

Los mejores tratamientos en cuanto a sobrevivencia de la población fueron en los que se aplicó la cepa Th F2-1, manteniendo su población hasta los 90 días después del trasplante incluso cuando la cepa se aplicó en una oportunidad. Ochoa (2008), en un ensayo de viabilidad de cepas mejoradas de *Trichoderma* spp. entre ellas la cepa Th F2-1, obtuvo como resultado que las cepas mantenidas a temperaturas de 22°C en suelo estéril incrementaron las unidades formadoras de colonia hasta los 120 días destacando entre ellas la Th F2-1, mostrando un mayor incremento en las UFC al término de la investigación.

Si bien la persistencia de la población en los ensayos realizados por Valderrama (2007) y Ochoa (2008) fue mayor que en el presente ensayo, se debe considerar que el suelo utilizado en los ensayos anteriores corresponde a un suelo estéril, mientras que el suelo del invernadero donde se realizó este ensayo se encuentra en sus condiciones naturales por lo que la interacción entre los agentes bióticos del suelo puede haber dado como resultado una menor persistencia de las cepas, además se deben considerar las condiciones propias de la rizosfera como por ejemplo el pH, el suelo sobre el que se montó el ensayo es de pH 7,1, mientras que el pH óptimo para el crecimiento y producción de biomasa de la cepa Th 12 A10.1 es cercano a 5,5, lo que podría afectar su sobrevivencia.

En el caso de Trichonativa aplicado en 1 oportunidad, 30 días después del trasplante no se detectó presencia de *Trichoderma* spp., mientras que al seguir las recomendaciones del fabricante (aplicando en tres oportunidades, Trichonativa³) las poblaciones de *Trichoderma* persistieron en el suelo hasta 90 días después del trasplante. Lo anterior se contrapone a

estudios realizados por Donoso (2007) donde al evaluar la efectividad de *Trichoderma* sobre la incidencia de *Phytophthora capsici* en plantas de tomate se detectaron poblaciones del bioantagonista en el suelo hasta 5 meses después de su aplicación.

El hecho de que la formulación líquida posea una menor persistencia en relación a los pellets, concuerda con lo planteado por Lewis y Papavizas (1985), donde al evaluar la efectividad de diferentes cepas de *T. harzianum*, *T. harmatum* y *Gliocladium virens*, la supresividad sobre cepas de *R. solani* fue mayor en preparaciones en base al micelio del microorganismo acompañadas de nutrientes base, que en preparaciones de suspensiones conidiales. Lo que puede ser atribuido a la utilización de los nutrientes por parte del bioantagonista, contribuyendo a un buen establecimiento del microorganismo en el suelo y potenciando de este modo sus capacidades antagónicas.

Sivan *et al* (1987) corroboraron lo anterior, al evaluar la efectividad de aplicaciones de suspensiones conidiales de *Trichoderma* más salvado de trigo sobre el control de *Fusarium* spp., señalando que la adición de salvado de trigo contribuyó en gran medida al establecimiento satisfactorio del antagonista en el suelo.

Otro autor señala al respecto que la utilización de pellets de alginato de sodio facilita y mejora la primera fase de colonización de la rizósfera. Estos pellets presentan una relativa uniformidad de tamaño y permiten una adecuada conservación de la viabilidad de los antagonistas (Chet, 1987).

En relación a lo anterior en la Figura 9 se puede apreciar el crecimiento y abundante esporulación de una de las cepas mejoradas de *Trichoderma*, aplicada en forma de pellets de alginato de sodio.



Figura 9. Crecimiento micelial y esporulación de la cepa Th F2-1 aplicada en forma de pellets.

Capacidad antagónica

Los resultados de las pruebas de antagonismo directo realizadas a partir de aislados obtenidos desde los tratamientos que recibieron aplicaciones de *Trichoderma* spp., se presentan en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* spp. (%ICR) aisladas desde los distintos tratamientos, luego de 30 y 90 días después del trasplante.

Días después del trasplante	Tratamientos aplicados en pre-trasplante			Tratamientos aplicados en tres oportunidades ³		
	Th 12 ^a 10.1 ¹	Th F2-1 ¹	Trichonativa ¹	Th 12 ^a 10.1 ³	Th F2-1 ³	Trichonativa ³
0 ²	51,0 a	43,0 a	56,9	51,0 a	42,9 a	56,9 a
30	43,0 a	43,0 a	s.a ⁴	51,0 a	40,1 a	40,7 b
90	s.a ⁴	30,0 a	s.a ⁴	s.a ⁴	31,1 a	31,3 b

Letras iguales en las columnas indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos según el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey, $p \leq 0,05$. 1/: se refiere a los tratamientos aplicados en pre-trasplante. 2/: cepas originales utilizadas para las aplicaciones de los bioantagonistas. 3/: Se refiere a los tratamientos que fueron aplicados en pre-trasplante, 15 días después del trasplante y una semana antes del desbrote. 4/: no se aisló *Trichoderma* spp.

En cuanto a la mantención de la capacidad antagónica de los bioantagonistas, los aislados de *Trichoderma* desde los suelos tratados con aplicaciones de la cepa Th F2-1 (Th F2-1¹ y Th F2-1³) al ser comparados con la cepa Th F2-1 obtenida del laboratorio, mantuvieron el % de Inhibición de Crecimiento Radial (ICR) de los aislamientos realizados hasta los 90 días después del trasplante.

Los tratamientos con aplicaciones de la cepa Th 12A 10.1 (Th 12A 10.1¹ y Th 12A10.1³) mantuvieron sus características antagónicas hasta los 30 días después del trasplante, fecha en que se logró realizar el último aislamiento.

Lo anterior confirmaría los resultados obtenidos por Valderrama (2007) donde se evaluó la capacidad antagónica de cepas mutantes de *T. harzianum*, entre ellas la cepa Th 12A 10.1, reaisladas desde suelo estéril mantenido a 22°C., en dicho estudio los microorganismos mutantes mantuvieron su capacidad antagónica hasta por 180 días.

Por otra parte, el tratamiento con aplicaciones de Trichonativa en tres oportunidades (Trichonativa³) mostró una disminución en la capacidad antagónica de las cepas aisladas en relación a un aislado obtenido directamente desde el producto comercial envasado, luego de 30 días de efectuado el trasplante.

En las Figuras 10, 11 y 12 se muestran las pruebas de antagonismo en cultivos duales realizadas entre las cepas Th 12A 10.1, Th F2-1, una cepa obtenida directamente desde el

biofungicida *Trichonativa* y el fitopatógeno *R. solani*, así como las pruebas realizadas entre los aislados obtenidos desde los distintos tratamientos y el fitopatógeno. Donde se puede observar claramente la inhibición del patógeno causada por los bioantagonistas.

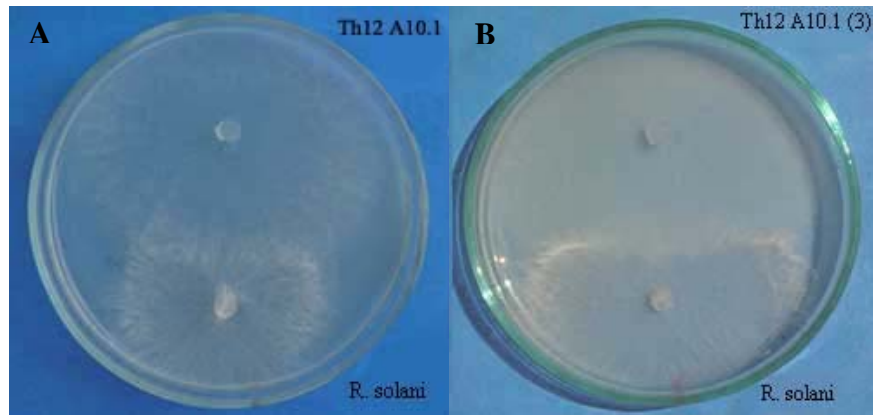


Figura 10. Pruebas de antagonismo directo entre *R. solani* 618 y la cepa Th 12A 10.1 obtenida desde laboratorio (A) y una cepa de *Trichoderma* spp. aislada desde el tratamiento Th12 A10.1³ (B).

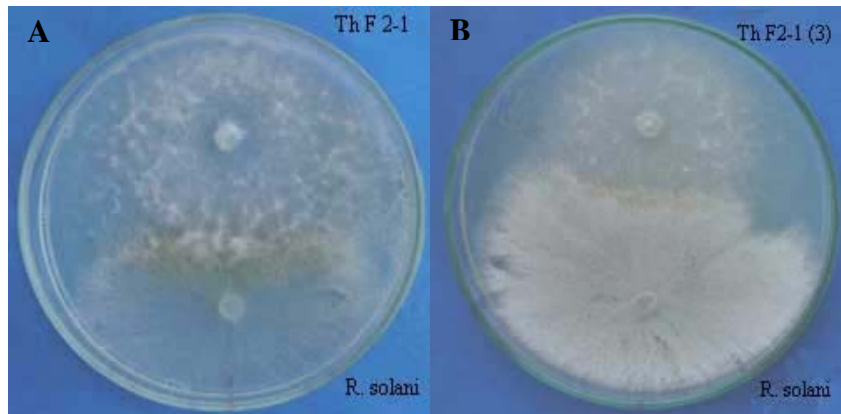


Figura 11. Pruebas de antagonismo directo entre *R. solani* 618 y la cepa Th F 2-1 obtenida desde laboratorio (A) y una cepa de *Trichoderma* spp. aislada desde el tratamiento ThF 2-1³ (B).

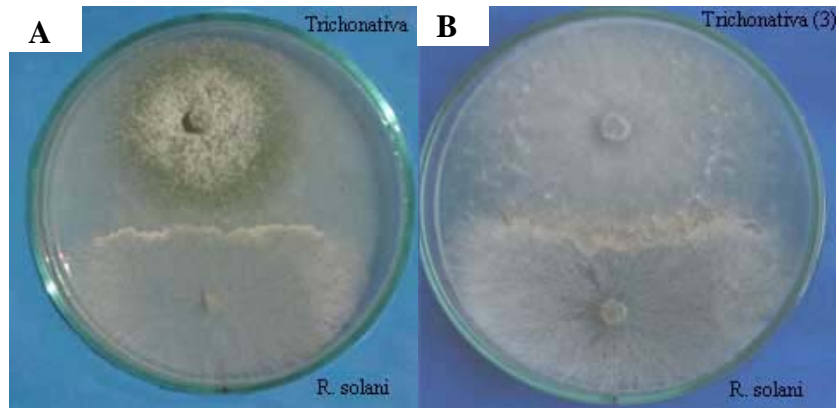


Figura 12. Pruebas de antagonismo directo entre *R. solani* 618 y una aislada del producto comercial Trichonativa (A) y una cepa de *Trichoderma* spp. Aislada desde el tratamiento Trichonativa³ (B).

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la investigación realizada se concluye lo siguiente:

El bajo nivel de inóculo natural de la enfermedad no permitió una adecuada apreciación del control ejercido por las cepas mejoradas de *Trichoderma* spp. en estudio sobre *R. solani*. Sin embargo, la cepa Th F2-1 ejerció cierto grado de control del fitopatógeno al ser aplicada en tres oportunidades, ya que las plantas presentaron un menor nivel de daño al en comparación con el tratamiento testigo. En algunos parámetros como el rendimiento total y de frutos de calibre de primera destacan los bajos rendimientos obtenidos por el tratamiento bromurado.

En cuanto al comportamiento de la población de *Trichoderma* spp. en los distintos tratamientos durante el ensayo, se obtuvieron mejores resultados al aplicar tanto las cepas mejoradas como el producto comercial en tres oportunidades, manteniéndose poblaciones del microorganismo hasta por 3 meses. Destacando los resultados obtenidos por el tratamiento con una aplicación en pretransplante de la cepa Th F2-1, manteniendo la población de *Trichoderma* spp. por un período de 90 días.

Las pruebas de antagonismo directo en cultivos duales realizadas a partir de aislados efectuados desde los distintos tratamientos con aplicaciones de bioantagonistas mejorados mostraron mejores resultados en relación al producto comercial, ya que las cepas aisladas desde parcelas que recibieron aplicaciones de las cepas Th 12A 10.1 y Th F2-1 mantuvieron su capacidad antagónica en el tiempo, a diferencia de lo sucedido con los aislamientos realizados desde las parcelas tratadas con Trichonativa, las que presentaron disminuciones de su capacidad antagónica.

LITERATURA CITADA

AGRIOS, G. 2001. Fitopatología. (2ª edición) 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. Proyecto de memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 20 p.

ARIAS, M., R. HERRERA, X. BENSOAIN, L. M. PEREZ y J. MONTEALGRE, 2005. Eficacia *in vitro* de mutantes de *Trichoderma* spp. en el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) y *Phytophthora nicotianae* (Breda de Hann) aislados de tomate. XV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad de Tarapacá, Chile, 15-17 de Noviembre.

BENITEZ, T.; DELGADO-JARANA, J.; RINCÓN, A.; REY, M. y LIMON, M. 1998. Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (ed.) Recent Research Developments in Microbiology. Trivandrum, India, Research Signpost 2: 129-150.

BENITEZ, T.; RINCÓN, A.; LIMON, M y CODON, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7 (4): 249 – 260.

BESOAIN, X.; LL. LEFEVER; A. ARAYA; J. MONTEALEGRE y L. M. PEREZ. 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.

CHET, I. 1987. *Trichoderma*, application, mode of action and potencial as biocontrol agent of soil-borne pathogenic fungi. In: Chet, innovative approaches to plant disease control. New York, Wiley. 137 – 160.

CHET, I., J. IBAR, I. HADAR. 1997. Fungal antagonist and mycoparasites. In: Wicklow dt & Soderstrom B. (eds.) The Mycota IV: Enviromental and Microbial Relationships, New York, Springer Verlag, 165-192.

CORFO, 1990. Enfermedades del tomate en invernadero frío. Valparaíso, Chile. 53 p.

CRUZ, M. y CISTERNA, V. 1998. Control integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento, efecto de hongos antagonicos sobre el crecimiento de las plantas. Agricultura Técnica 58: 81 – 91.

CUNDOM, M., S. MAZZA, S. GUTIERREZ, M. MAZZANTINI DE CASTAÑÓN. 2001. Evaluación de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* in vitro e invernáculo. Cátedra de fitopatología – Facultad de Ciencias Agrarias – UNNE. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/5-Agrarias/A-051.pdf>

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

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

DONOSO, E., 2007. Uso de cepas nativas de microorganismos para el control de enfermedades en hortalizas y flores. Trabajo expuesto en el curso: Manejo de Enfermedades y Nemátodos en Cultivos Hortícolas y Flores de Interés Económico para Chile. 4 y de Julio de 2007. Santiago, Chile.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas* 62: 96-100.

FERNANDOIS, C. 2003. Control biológico en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), cultivado bajo invernadero frío en suelo naturalmente infectado con *Pyrenochaeta lycopersici*. Memoria de Título Ing. Agr. Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Ciencias Agronómicas. 71 p.

FLINT, M. and ROBERTS, P. 1988. Using crop diversity to manage pest problems: some California examples. *American Journal of Alternative Agriculture* 3: 164 - 167.

FUENTES, P. 1996. Uso de la solarización en el control de *Pyrenochaeta lycopersici* y nemátodos asociados en tomate cultivado bajo invernadero frío en Olmué. V Región. Memoria de título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 100 p.

GONZÁLEZ, R.; MONTEALEGRE, J. y HERRERA, R. 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenobacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agrícola* 31 (1): 21-28.

GONZÁLEZ, S. y CARRASCO, J. 2006. Protocolo de Montreal, pasos para eliminar el bromuro de metilo en Chile. *Tierra Adentro* 68: 46 – 49.

GRAEME-COOK, K.A. and J.L. FAULL. 1991 Effect of ultraviolet-induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered antibiotic production on selected pathogens *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* 37:659-664.

GROVE, C and CAMPBELL, R. 1987. Host range and survival in soil of *Pyrenochaeta lycopersici*. Plant Disease 71: 806-809.

HERRERA, R. 2005. Control biológico de *R. solani*, *F. oxysporum f. sp lycopersici* y *Fusarium solani* en tomate bajo condiciones de invernaderos. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Disponible en:
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/cinecias_agronomicas/montealegre_j/14.html
 Leído 25 de Febrero 2006.

HOWELL, C.; HANSON, L.; STIPANOVIC, R y PUCKHABER, L. S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology 90:248 - 252.

HOWELL, C. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. Plant disease 87 (1): 4 – 10.

LEWIS, J. and PAPAIVIZAS, G.C. 1985. Characteristics of pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. Plant Pathology 34: 571 – 577.

MCSPADDEN GARDENER, B. and FRAVEL, D. 2002. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. Disponible en. Plant Health Progress:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. y PARKER, J. 2004. Brock Biología de los Microorganismos. Décima Edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 1096 p.

MONTEALEGRE, J., M. L. PEREZ, R. HERRERA, C. SANTANDER, J. VELÁSQUEZ, P. SILVA y X. Besoain. 2002. Control of root rot fungi in tomatoes with *Trichoderma harzianum*, *Bacillus lentimorbus* and solarization under glass house and field condition in Chile. Proceeding 7^o Meeting W.C Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. Kusadasi, Turkey. 22-26 May 2002.

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.

OCHOA, F. 2008. Efecto *in vitro* y en invernadero de cepas mejoradas de *Trichoderma* spp. En el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn). Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 49 p.

ODEPA. 2007. Mercado del tomate para el consume en fresco. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl> 17/10/2008.

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. 64(4): 833-836.

PAPAVIZAS, G.C. 1985 *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potencial for biocontrol. Annu Rev Phytopathol 23: 23-54.

PAPAVIZAS, G. C., J. LEWIS, TH. ABD- EL OMITÍ. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology 72: 126-132

PAPAVIZAS, G.C., D. ROBERTS, K. KIM. 1990. Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. Can J. Microbiology 36: 484-489.

PEREZ, L.M.; BESOAIN, X.; REYES, M.; PARDO, G. y MONTEALEGRE, J. 2002. The expresión off extracellular fungal cell wall hydrollytic enzymes in different *Trichoderma harzinum* isolates correlates with their ability to control *Pyrenochaeta lycopersici*. Biological Reserch 35: 401- 410.

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. 97 (18):2330-4.

RENGIFO, V. E. 2000. Efecto de distintas densidades de inoculación de *Cryptolaemus monstruzieri* sobre la producción y calidad de su descendencia. Taller de titulación, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile. 47p.

REY, M.; J. DELGADO-JARANA; RINCÓN, A.; LIMON, C. and BENITEZ, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología 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.

- RISTAINO, J. and THOMAS, W. 1997. Agriculture, methyl bromide and the ozone hole can we fill the gaps? *Plant Disease* 81 (9): 964-977.
- SANTANDER, 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.
- SCHNETTLER, V. 1993. Efecto de bacterias antagonistas en la incidencia de *R. solani* Kühn AG 3 agente causal de la sarna negra del cultivo de la papa (*solanum tuberosum* L). Memoria Licenciado en Agronomía, Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 152 p.
- SIVAN, A.; UCKO, O y CHET, I. 1987. Biological control of *Fusarium* crown root of tomato. *Plant Disease* 74: 889 – 894.
- SNEH, B.; BURPEE, L. and OGOSHI, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 133 p.
- STASZ, T.E.; HARMAN, G.E. y WEEDEN, N.F. 1998. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* 80: 141-150.
- VALDERRAMA, C. 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. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 36 p.
- VAN DEN BOOGERT, P.H. 1999. Mycoparasitism and biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologica* 25: 107-110.
- WILLIAMS J.; CLARKSON, J.M.; MILLS, P.R. y COOPER, R.M. 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 4190 - 4191.
- WINDHAM, M.; ELAD, Y. and BAKER, R. 1986. A mechanism to increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518 – 521.
- YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; y CHET, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.