

**PRODUCCION DE *Trichoderma* sp. Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO EN  
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)**



**MONICA PAOLA CHAVEZ GARCIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL – MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y  
VETERINARIA**

**Bogotá, D.C**

**2006**

**PRODUCCION DE *Trichoderma* sp. Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO EN  
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)**



**MONICA PAOLA CHAVEZ GARCIA**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de**

**Microbióloga Industrial – Microbióloga Agrícola y Veterinaria**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL – MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y  
VETERINARIA**

**Bogotá, D.C  
2006**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**PRODUCCION DE *Trichoderma* sp. Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO EN  
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)**

**MONICA PAOLA CHAVEZ GARCIA**

**APROBADO**

---

**MARIA MERCEDES MARTINEZ  
DIRECTORA**

---

**BALKYS QUEVEDO  
CODIRECTORA**

---

**MARCELA MERCADO  
ASESORA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL – MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y  
VETERINARIA**

**Bogotá, D.C  
2006**

**PRODUCCION DE *Trichoderma* sp. Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO EN  
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)**

**MONICA PAOLA CHAVEZ GARCIA**

**APROBADO**

---

**AURA MARINA PEDROZA  
JURADO**

---

**JOSE SALVADOR MONTAÑA  
JURADO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL – MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y  
VETERINARIA**

**Bogotá, D.C  
2006**

**PRODUCCION DE *Trichoderma* sp. Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO EN  
CULTIVO DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)**

**MONICA PAOLA CHAVEZ GARCIA**

**APROBADO**

---

**ANGELA UMAÑA MPhil  
DECANA ACADEMICA**

---

**DAVID GOMEZ  
DIRECTOR DE CARRERA DE  
MICROBIOLOGIAS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL – MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y  
VETERINARIA**

**Bogotá, D.C  
2006**

A Dios por su guía  
a mis padres y hermanos por su apoyo y colaboración  
a mi familia, a Jairo y a mis amigos por creer en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Maria Mercedes, por su apoyo, comprensión y confianza, por darme la oportunidad de realizar esta investigación, y por ser más que la directora de este estudio.

A Balkys, por sus conocimientos, paciencia y consejos y por el apoyo que siempre me brindó.

A Marcela por su colaboración durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Cristian Fog, al Dr. Mauricio Supelano y al personal de Cultivos del Norte, por permitir la realización de este estudio y por el soporte brindado.

Al Laboratorio de Biotecnología por la colaboración durante la realización de esta investigación.

A mi familia, a mis amigos y a Jairo, por que siempre estuvieron ahí apoyándome, y por que siempre han creído en mi.



## RESUMEN

El hongo *Trichoderma* sp., es uno de los inoculantes biológicos más empleados en los últimos años ya que posee buenas cualidades como antagonista de hongos patógenos del suelo, actuando como hiperparásitos competitivos, así mismo debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo. Del mismo modo este hongo deuteromycete ha demostrado poseer otras propiedades además del antagonismo, ya que se ha indicado que es capaz de inducir un mayor crecimiento en plantas tratadas, así como respuestas de defensa sistémicas, lo que hace de este, un inoculante recomendable gracias a su amplio rango de acción.

En este estudio se evaluó la capacidad antagónica de dos cepas de *Trichoderma* sp., en el control *in vitro* de los hongos patógenos de plantas *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp., y *Fusarium* sp. Con el fin de obtener la mayor producción de conidios de este hongo, se realizó la evaluación de las condiciones de cultivo apropiadas para tal fin, para ello, se evaluó el tipo de proceso fermentativo, medio de cultivo y condiciones de temperatura y exposición de luz, concluyendo que la mayor producción de conidios de este hongo se reporta en un cultivo en matriz de fermentación sólida con medio de cultivo arroz – agua destilada, temperatura de 25°C con exposición permanente de luz durante ocho días, recuperando un total de  $45 \times 10^{18}$  conidios/ml.

Del mismo modo, se realizó la evaluación *in vivo* de este inoculante en un cultivo de crisantemo ubicado en el municipio de Tocancipá, Cundinamarca. Los resultados obtenidos indicaron que el empleo de este hongo antagonista, además de tener un efecto preventivo y protector contra hongos fitopatógenos, es una alternativa viable para el tratamiento de cultivos ornamentales, ya que incrementó el crecimiento de las plantas, así como su peso.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCION	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1 Bioinoculantes	3
1.2 <i>Trichoderma</i> sp.	4
1.2.1 Morfología	6
1.2.2 Ecología del microorganismo	7
1.2.3 Factores que influyen en el crecimiento	8
1.2.4 Mecanismos de antagonismo	11
1.3 Producción de <i>Trichoderma</i> sp.	14
1.3.1 Sustratos	14
1.3.2 Proceso Fermentativo	16
1.4 Control de Calidad para Formulaciones Biológicas	22
1.5 Crisantemo ( <i>Dendranthema grandiflora</i> )	24
1.5.1 Fertilización	25
1.5.2 Enfermedades causadas por patógenos del suelo en Crisantemo	26
2. JUSTIFICACION	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo General	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4. METODOLOGIA	36
4.1 Muestreo	36
4.2. Etapa de Laboratorio	36
4.2.1 Aislamiento de <i>Trichoderma</i> sp.	36
4.2.2 Obtención de hongos fitopatógenos ( <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ) y del hongo antagonista <i>Trichoderma</i> sp.	37
4.2.3 Selección de la cepa con mayor capacidad antagónica	37
4.2.4 Preparación preinoculo de <i>Trichoderma</i> sp.	38

4.2.5 Producción de <i>Trichoderma</i> sp.	39
4.2.5.1 Fermentación sólida de <i>Trichoderma</i> sp.	39
4.2.5.2 Fermentación líquida de <i>Trichoderma</i> sp.	40
4.2.6 Selección del mejor sustrato de producción para <i>Trichoderma</i> sp.	41
4.2.7 Evaluación de las condiciones de cultivo para la producción de <i>Trichoderma</i> sp.	42
4.2.8 Control de calidad del inoculante biológico	43
4.3 Etapa Pruebas en Campo	44
4.3.1 Ensayos de enraizamiento en crisantemo ( <i>Dendranthema grandiflora</i> ).	44
4.3.1.1 Evaluaciones de variables agronómicas	46
4.3.2 Ensayos en camas desde siembra hasta floración (12 semanas)	46
4.4 Análisis Estadístico	48
4.4.1 Pruebas de antagonismo <i>in Vitro</i>	48
4.4.2 Evaluación y selección del proceso de producción de <i>Trichoderma</i> sp.	49
4.4.3 Evaluación y selección del sustrato para la producción de <i>Trichoderma</i> sp.	51
4.4.4 Evaluación y selección de las condiciones de cultivo para la producción de <i>Trichoderma</i> sp.	52
4.4.5 Ensayo de enraizamiento en crisantemo	53
4.4.6 Ensayos en camas desde siembra hasta floración	54
4.4.7 Comparación de longitud foliar en tratamientos con aplicación y sin aplicación de hormona de enraizamiento	55
5. RESULTADOS Y DISCUSION	57
5.1 Aislamiento de <i>Trichoderma</i> sp.	57
5.2 Pruebas de Antagonismo <i>Trichoderma</i> vs Hongos fitopatógenos	59
5.3 Preparación preinoculo de <i>Trichoderma</i> sp.	63
5.4 Evaluación del mejor proceso de producción de <i>Trichoderma</i> sp.	64
5.5 Selección del sustrato de producción para <i>Trichoderma</i> sp.	70
5.6 Evaluación de las condiciones de cultivo para la producción de <i>Trichoderma</i> sp.	74
5.7 Ensayos de enraizamiento en crisantemo ( <i>Dendranthema grandiflora</i> )	79
5.8 Evaluación ensayos en camas de siembra hasta floración	84
6. CONCLUSIONES	95
7. RECOMENDACIONES	97

**8. BIBLIOGRAFIA**

99

ANEXOS

113

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Características macroscópicas de <i>Trichoderma</i> sp.	6
<b>Figura 2.</b> Características microscópicas de <i>Trichoderma</i> sp.	7
<b>Figura 3.</b> <i>Dendranthema grandiflora</i> variedad Yoko Ono spray	25
<b>Figura 4.</b> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	29
<b>Figura 5.</b> <i>Rhizoctonia</i> sp.	30
<b>Figura 6.</b> <i>Fusarium</i> sp.	32
<b>Figura 7.</b> Plano de muestreo de suelo	36
<b>Figura 8.</b> Distribución de tratamientos en bloque 12 nave 4	48
<b>Figura 9.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. nativa en agar PDA	57
<b>Figura 10.</b> Microscopia de <i>Trichoderma</i> sp.	58
<b>Figura 11.</b> Análisis Estadístico Pruebas de Antagonismo cepas de <i>Trichoderma</i> sp. vs. <i>Fusarium</i> sp.	61
<b>Figura 12.</b> Análisis Estadístico Pruebas de Antagonismo cepas de <i>Trichoderma</i> sp. vs. <i>Rhizoctonia</i> sp.	61
<b>Figura 13.</b> Análisis Estadístico Pruebas de Antagonismo cepas de <i>Trichoderma</i> sp. vs. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	62
<b>Figura 14 A.</b> Análisis Estadístico Concentración de Esporas Fermentación líquida vs. Fermentación sólida	68
<b>Figura 14 B.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 18 horas Fermentación líquida vs. Fermentación sólida	68
<b>Figura 15 A.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 24 horas Fermentación líquida vs. Fermentación sólida	68
<b>Figura 15 B.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Pureza Fermentación líquida vs. Fermentación sólida	69
<b>Figura 16.</b> Análisis Estadístico Concentración de Esporas en Evaluación de Medios de Cultivo	71

<b>Figura 17.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 18 horas en Evaluación de Medios de Cultivo	72
<b>Figura 18.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 24 horas en Evaluación de Medios de Cultivo	72
<b>Figura 19.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Pureza en Evaluación de Medios de Cultivo	72
<b>Figura 20.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. en medio de cultivo arroz y Agua destilada	73
<b>Figura 21.</b> Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. con exposición constante de Luz a 25°C	76
<b>Figura 22.</b> Análisis Estadístico Concentración de Esporas en Evaluación de Condiciones de cultivo	77
<b>Figura 23.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 18 horas en Evaluación de Condiciones de cultivo	78
<b>Figura 24.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 24 horas en Evaluación de Condiciones de Cultivo	78
<b>Figura 25.</b> Análisis Estadístico Porcentaje de Pureza en Evaluación de Condiciones de Cultivo	78
<b>Figura 26.</b> Distribución de los tratamientos en banco de enraizamiento	80
<b>Figura 27.</b> Plántulas enraizadas	81
<b>Figura 28. A y B.</b> Transplante de plántulas enraizadas a camas de Siembra <b>C.</b> Establecimiento de tratamientos en camas de siembra	85
<b>Figura 29.</b> Longitud Foliar Tratamiento 4 (Fertirriego + Compost (1x) + Microagro + <i>Trichoderma</i> sp.)	87
<b>Figura 30.</b> Raíces provenientes del tratamiento T4	88
<b>Figura 31.</b> Ramos de Crisantemo Variedad Yoko Ono	89

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Comparación entre fermentación líquida y Fermentación sólida	21
<b>Tabla 2.</b> Principales enfermedades causadas por patógenos del suelo en Crisantemo	26
<b>Tabla 3.</b> Información nutricional del sustrato	39
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos para evaluación de condiciones de luz y temperatura	42
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos evaluados en banco de enraizamiento	45
<b>Tabla 6.</b> Distribución de tratamientos en banco de enraizamiento	46
<b>Tabla 7.</b> Tratamientos evaluados en camas de producción	47
<b>Tabla 8.</b> Parámetros evaluados durante la fermentación líquida en reactor	66
<b>Tabla 9.</b> Parámetros evaluados en la selección de proceso de producción	67
<b>Tabla 10.</b> Resultados evaluación de sustratos para producción	71
<b>Tabla 11.</b> Parámetros evaluados en la selección de las condiciones de cultivo para la producción de <i>Trichoderma</i> sp.	75
<b>Tabla 12.</b> Resumen estadística de tratamientos para la evaluación de las condiciones de producción de <i>Trichoderma</i> sp.	79
<b>Tabla 13.</b> Resumen Estadística de Variables Agronómicas durante el enraizamiento	82
<b>Tabla 14.</b> Resumen Estadística de Variables Agronómicas en camas de Producción, Tratamientos con Aplicación de hormona de enraizamiento	85
<b>Tabla 15.</b> Resumen Estadística Longitud foliar en tratamientos sin hormona de enraizamiento	86
<b>Tabla 16.</b> Resumen Análisis Estadístico Variable en Producción	89

## INTRODUCCION

El empleo de inoculantes biológicos definidos como preparados que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas en los sistemas productivos, es una alternativa viable para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad.

El hongo *Trichoderma* sp. es un habitante natural del suelo y puede desempeñarse como saprófito o como parásito de otros hongos. Es ampliamente conocido por su conducta antagonista y utilizado para biocontrol, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislado y cultivado, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no ataca plantas. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno están fundamentalmente asociados a competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos.

Además de lo anterior, *Trichoderma* sp. tiene diversas ventajas como agente de control biológico, por su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y diversidad de sustratos utilizables; de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos.

Para su producción han sido propuestos diversos métodos de fermentación según si se requieren conidios o micelio., estableciéndose que la fermentación sólida es el método más promisorio, ya que permite un rápido crecimiento del microorganismo, reflejado en una alta concentración de conidios por gramo de sustrato en un relativo corto periodo de tiempo. La fermentación líquida facilita la obtención de una alta concentración del microorganismo pero representado en micelio y clamidosporas estructuras no aptas para sobrevivir a condiciones adversas y en consecuencia débiles para el establecimiento en nuevos hábitats.



Las técnicas y productividad de los fermentados sólidos, representan una alternativa viable para producción tanto industrial como artesanal de este inoculante biológico; ya que el resultado es de alta calidad y consecuentemente el efecto del mismo en campo, donde los resultados son apreciables. Así, al aplicar este hongo a las semillas, sustrato en vivero, plantas en vivero, recién transplantadas o plantas establecidas, este coloniza las raíces formando una capa protectora sobre ellas por medio de diversos mecanismos.

De este modo el objetivo de esta investigación fue evaluar los procesos de fermentación sólida y fermentación líquida para la obtención de inóculos de *Trichoderma* sp., evaluando en cada proceso la concentración y germinación de esporas así como la pureza del producto; para ser aplicados bajo condiciones controladas de invernadero como una alternativa promisoría de protección de cultivos desde sus etapas de enraizamiento.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Bioinoculantes

Los inoculantes biológicos pueden definirse como preparados que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas benéficas, eficientes fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo, potencializadoras de diversos nutrientes, biocontroladoras o productoras de sustancias activas, que se utilizan para aplicar a las semillas o al suelo con el objetivo de incrementar el número de estos microorganismos y acelerar los procesos microbianos, así mismo son empleados con el fin de promover el crecimiento vegetal o favorecer el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera (ICA, 2004). De esta manera se aumentan las cantidades de nutrientes, que pueden ser asimilados por las plantas o se hacen más rápidos los procesos fisiológicos que influyen sobre la absorción de nutrientes y por tanto en el rendimiento de los cultivos (Tengerdy & Szakács, 1998).

La utilización de inoculantes biológicos ha tenido una amplia difusión en los últimos años, también se ha difundido su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos y en distintas situaciones y la factibilidad de una agricultura orgánica. Se clasifican según su uso en biofertilizantes, biocontroladores, aceleradores de compostaje y biorremediadores; siendo algunas especies de *Trichoderma* sp. empleadas dentro de los bioinoculantes como biocontrolador, biofertilizante y acelerador de compostaje.

En Colombia, el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) por medio de la resolución N. 00375 del 27 de Febrero de 2004 dicta las disposiciones sobre registro y control de los bioinsumos y extractos vegetales de uso agrícola en Colombia; por medio de esta resolución el ICA define inoculante biológico como “Producto elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que al aplicarse al suelo o a las semillas, promueven el crecimiento vegetal o favorecen el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera”.

De esta manera esta normatividad define las pautas de registro y al mismo tiempo complementa la resolución de ICA N. 1062 del 25 de abril de 1996 por la cual se establece el método de aplicación comercial de bioinsumos, contribuyendo a fortalecer y mejorar las condiciones de producción, comercialización y utilización, elevando los niveles de calidad, eficacia y seguridad

Algunos de los productos comercializados actualmente en Colombia y registrados en el ICA, incluyen marcas comerciales como Tricho – D de Orius biotecnología; BIODERMA, Trichoderma AC, entre otros, cuyo principio activo en la mayoría de los casos es el hongo *Trichoderma harzianum*.

### **1.2 *Trichoderma* sp.**

El género *Trichoderma* fue introducido por Persoon hace casi 200 años y consiste de hongos anamórficos aislados principalmente del suelo y de materia orgánica en descomposición (Grondona y col, 1997). Este género pertenece al grupo de hongos Deuteromicetes u hongos imperfectos, al orden Hifales (Moniliales) y se caracteriza por presentar conidióforos hialinos, muchas veces blanquecinos, no verticilados, fiálides simples o en grupos, conidias hialinas, unicelulares ovoides que yacen en pequeños racimos terminales, se les reconoce fácilmente por su rápido crecimiento y el color verde de las conidias. En su estado vegetativo presentan un micelio o septos simples. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Son anaerobios facultativos y se reproducen asexualmente por conidios. Las hifas que llevan las esporas o conidiófonos son ramificadas (Alexopoulos y col, 1996; Atlas & Bartha, 1992; Harman y col, 2004; Rodríguez & Verónica, 2002).

Las especies de este género (en su mayoría micoparasíticas), son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades producidas por hongos debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en varios sustratos, ataca una amplia variedad de hongos fitopatógenos responsables de la mayoría de enfermedades en cultivos, pero sobretodo porque no ataca plantas superiores (De la Cruz y col, 1995; Ezziyani y col, 2004; Howell, 2003; Rey y col, 2000; Vázquez – Garcidueñas y col, 1998).

Las especies de *Trichoderma* han sido investigadas como agentes de control biológico por más de 70 años, pero solo recientemente se han comercializado; esto es resultado del cambio en la actitud del público hacia el uso de compuestos químicos en los cultivos (Hermosa y col, 2000).

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo. Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos, que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa (Ezziyani y col, 2004; Margolles – Clark y col, 1996; Harman y col, 2004).

Han sido considerados buenos agentes de control biológico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos en invernadero y en campo. Sin embargo la eficacia de estos hongos en suelos naturales puede estar limitada por la fungistasis del suelo, competencia por otros microorganismos del suelo, una pobre colonización de las raíces de la planta, o condiciones ambientales desfavorables (Bae & Knudsen, 2000).

El género *Trichoderma* comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente. Presenta micelio septado, conidias generalmente ovaladas, conidióforo hialino no verticilado, fiálides singulares o en grupos, conidias unicelulares coloreadas, de rápido crecimiento en medios artificiales (Barnett & Hunter, 1972; Hermosa y col, 2000).

Hongo superior

**Sub – División:** Deuteromycotina

**Clase:** Hyphomycetes

**Orden:** Hifales (Moniliales)

**Género:** *Trichoderma* (Agrios, 2004)

### 1.2.1 Morfología

- **Características macroscópicas**

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas - verdes, amarillo – verdosas; las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos (Arango y col, 1988; Barnett & Hunter, 1972).

El revés de las colonias es usualmente no coloreado, amarillo, ámbar o amarillo-verde, y muchas especies producen grandes cantidades de clamidosporas en cultivos sumergido (Howell, 2003).



**Figura 1. Características macroscópicas de *Trichoderma* sp.**  
Fuente: The Goraline Kaminski Medical Mycology Library

- **Características microscópicas**

Los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, no verticilados, los cuales pueden ser solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos, hinchadas en la región central pero delgadas hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Las conidias son unicelulares subglobosas u oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Arango y col, 1988; Barnett & Hunter, 1972).



**Figura 2. Características microscópicas de *Trichoderma* sp.**  
Fuente: The Goralaine Kaminski Medical Mycology Library

### 1.2.2 Ecología del microorganismo

El micelio y las esporas de resistencia de varios hongos fitopatógenos del suelo son invadidos y parasitados o bien lisados por otros hongos, que por regla general no son fitopatógenos. Entre los hongos micoparásitos más comunes se destaca *Trichoderma* sp., principalmente *Trichoderma harzianum*, que ha demostrado parasitismo sobre el micelio de *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotinia* sp., inhibe el crecimiento de muchos otros hongos, como *Pythium* sp., *Fusarium* sp. y *Fomes* sp., y reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de esos patógenos (Agris, 2004; Kredics y col, 2003).

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por hongos (Grondona y col, 1997; Zago y col. 2001; Stefanova y col. 1999). Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Domsch y col, 1980). Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos le confiere a este hongo la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica.

Aparte de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* sp. ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar

una fuente nutricional adicional. Varios autores reportan algunos mecanismos, con los cuales *Trichoderma* sp. actúa como biocontrolador y como colonizador de las raíces, como son: micoparasitismo, antibiosis, competición por nutrientes y espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés por parte de la planta al ayudar al desarrollo del sistema radicular, mejorar la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y generando resistencia inducida. Es importante resaltar que de estos, los primeros cuatro mecanismos mencionados tienen acción directa sobre el hongo fitopatógeno, los otros son indirectos, ya que su acción es impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta (Grondona y col, 1997; Altomare y col, 1999; Carsolio y col, 1999; Kullnig y col 2000).

Es por esto que *Trichoderma* sp. presenta diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, además de esto produce una gran cantidad de enzimas inducibles en presencia de hongos fitopatógenos. De las enzimas extracelulares producidas por *Trichoderma harzianum*, tres diferentes enzimas con actividad quitinolítica se han purificado y parcialmente caracterizado (Margolles – Clark y col, 1996; Garisto & Harman, 2001): N – acetil glucosamidasa, quitobiosidasa y endoquitinasa. Así mismo varios autores han descrito la producción de  $\beta$  – 1,3 – glucanasa, quitinasas y proteinasas, cuya actividad se ve incrementada notoriamente cuando el hongo se cultiva en un medio de residuos orgánicos con quitina (Vázquez – Garcidueñas y col, 1998).

De este modo, este hongo puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita la producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitats donde los hongos causan enfermedad le permiten ser un eficiente agente de control.

### **1.2.3 Factores que influyen en el crecimiento**

- **Temperatura**

La temperatura es un factor importante para determinar la cantidad y la tasa de crecimiento de estos organismos (Moore – Landecker, 1996). Varios estudios han evaluado el efecto de la temperatura en la germinación de las esporas y el

crecimiento del tubo germinal, crecimiento del micelio, habilidades competitivas y producción de metabolitos volátiles y no volátiles en las especies de *Trichoderma*, estableciendo que la temperatura óptima de crecimiento difiere entre las diferentes especies (Kredics y col, 2003); sin embargo al igual que la gran mayoría de hongos, estos se desarrollan en rangos de temperatura mesofílicos entre 10° y 40°C, pero en la mayoría de los casos, la temperatura óptima se encuentra entre 15 y 30°C (Nampoothiri y col, 2004).

De este modo, el efecto de la temperatura sobre las especies de *Trichoderma* sp., en el desarrollo de procesos biológicos es tal que esta puede generar denaturación de proteínas, inhibición de enzimas, promoción o supresión de la producción de un metabolito particular, viabilidad y muerte celular (Nampoothiri y col, 2004).

- **Disponibilidad de agua**

Una de las limitaciones más importantes del uso de *Trichoderma* como biofungicida es su bajo nivel de tolerancia osmótica (0.5 M o menos). Las condiciones de agua afectan las actividades de este hongo, en especial la germinación de la espora y el crecimiento del tubo germinal, así como el crecimiento del micelio, y tiene un efecto crítico en la interacción con otros hongos y la producción de enzimas (Kredics y col, 2003; Moore – Landecker, 1996).

Así, este hongo del suelo, crece mejor en humedades moderadas que en altas, lo cual es debido a que la aireación del suelo (y por ende el suministro de oxígeno) es limitada cuando el contenido de humedad es alto (Moore - Landecker, 1996).

En la fermentación sólida un nivel de humedad mayor que el óptimo causa una disminución en la porosidad, alteración en la estructura de las partículas, menor transferencia de oxígeno e incrementa la formación de micelio aéreo. Los hongos prefieren una humedad suficiente para su supervivencia de tal manera que esta no interfiera con su metabolismo. Del mismo modo un nivel de humedad menor que el óptimo lleva a una mayor tensión de agua y reduce la solubilidad de los nutrientes del sustrato sólido (Nampoothiri y col, 2004). Aunque el contenido de humedad es



un factor crítico durante este proceso el nivel óptimo de la misma depende del microorganismo y de la matriz sólida empleada, sin embargo, el contenido de agua en el sustrato por lo general oscila entre el 30 y el 75% (Pérez – Guerra y col, 2003).

- **pH**

El pH juega un papel importante en la regulación de la producción de enzimas extracelulares. La mayoría de cepas de *Trichoderma* tienen la habilidad de crecer en un amplio rango de pH de 2 a 6 con un óptimo de 4; y se ha reportado que la producción óptima de biomasa ocurre en un rango de pH entre 4.6 y 6.8 (Kredics y col, 2003).

- **Aireación**

Dos componentes del aire son esenciales para los hongos: el oxígeno y el dióxido de carbono. Las especies de *Trichoderma*, como anaerobios facultativos, tienen la habilidad para crecer en hábitats como suelos profundos donde el oxígeno es relativamente insuficiente (Moore - Landecker, 1996).

Sin embargo en los cultivos de estos organismos es necesario tener en cuenta que altas concentraciones de dióxido de carbono resultado de la respiración celular se pueden acumular en ambientes cerrados y de esta forma inhibir el crecimiento de este microorganismo, los hongos usualmente son inhibidos en concentraciones de dióxido de carbono mayores de 10 a 15% (Moore - Landecker, 1996).

- **Condiciones de Luz**

El crecimiento de la mayoría de hongos aparentemente no es afectado por la luz. El efecto más visible es la inhibición en una exposición de luz fuerte. La luz también puede afectar la formación de estructuras reproductivas o puede controlar la orientación de los movimientos fototrópicos de estas estructuras (Moore – Landecker, 1996).

En algunos casos la luz puede afectar la esporulación de algunos hongos pudiendo ser inductora o inhibitoria en la formación de estructuras reproductivas y esporas. Los efectos de la luz en la reproducción de los hongos son muy complejos, ya que especies cercanas o diferentes aislamientos de la misma especie pueden diferir en su respuesta a la luz (Moore – Landecker, 1996).

La mayoría de especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, esporulando rápidamente sobre sustratos naturales o artificiales, en patrones anulares concéntricos en respuesta a la alternancia diaria de luz y oscuridad, con producción de conidios durante el período luminoso. La máxima actividad fotoinductiva se encuentra entre los 380nm y 440nm rango visible, no ocurriendo esporulación bajo los 245nm (Danielson, 1989).

#### **1.2.4 Mecanismos de antagonismo**

Varios modos de acción han sido propuestos para explicar la supresión de patógenos de plantas por *Trichoderma*; estos modos de acción incluyen producción de antibióticos, competencia por nutrientes, producción de enzimas degradadoras de la pared celular, estimulación de mecanismos de defensa en la planta y una combinación de estas posibilidades (Vázquez-Garcidueñas, 1998).

Los mecanismos empleados por estos organismos para un efectivo control de las enfermedades de las plantas son muchos y muy complejos, y su uso varía con la clase de agente de biocontrol, patógeno y planta hospedera involucrados en la interacción. Estos mecanismos también se ven afectados por el tipo de suelo, temperatura, pH, y humedad de la planta y el ambiente del suelo, y por otros miembros de la microflora (Howell, 2003).

- **Micoparasitismo**

El micoparasitismo es esencialmente una interacción hospedero-parásito. La interacción comienza con el reconocimiento del hospedero o de moléculas liberadas por este, por acción enzimática del micoparásito. Tales señales pueden ser

generadas por los diferentes polímeros componentes de la pared de distintas estructuras de hongos patógenos o, productos de degradación de la pared celular que son liberados durante el contacto o el acercamiento del hospedero (Mukherjee y col, 2004).

En este proceso, inicialmente el micoparásito crece directamente hacia su hospedero y usualmente se enrolla alrededor de este, o se une por la formación de estructuras similares a ganchos y apresorios. Seguido de esta interacción el micoparásito algunas veces penetra el micelio del hospedero, aparentemente por la degradación de su pared celular. Finalmente se asume que este utiliza el contenido intracelular del hospedero (Carsolio y col, 1999; De la Cruz y col, 1995; Harman y col, 2004). Para que el micoparasitismo ocurra en el suelo, las hifas del antagonista deben crecer hacia el contacto con los propágulos (esclerocios o hifas del fitopatógeno) y parasitarlos (Knudsen y col, 1991).

Durante este proceso una de las etapas claves consiste en la degradación de la pared celular de los fitopatógenos mediada por la acción de las enzimas hidrolíticas producidas por el antagonista (Rey y col, 2000); dentro de estas enzimas hidrolíticas se encuentran glucanasas y quitinasas responsables de la degradación de la quitina y  $\beta$  - glucanos (Howell, 2003).

De este modo se puede decir que el micoparasitismo realizado por *Trichoderma* sp., el cual fue demostrado por Weindling en 1932 y 1934 (Grondona y col, 1997), es un proceso complejo que incluye una serie de eventos sucesivos. La primera señal de interacción detectable muestra un crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma* sp. en respuesta a algún estímulo en la hifa del hospedero o hacia un gradiente de químicos producidos por el mismo. Cuando el micoparásito hace contacto físico con su huésped, sus hifas se enrollan alrededor de este o se le adhieren por medio de estructuras especializadas. Como un paso posterior a estas interacciones el micoparásito penetra al micelio huésped, degradando aparentemente de manera parcial su pared celular (Whipps, 2001; Ait – Lahsen y col 2001).

- **Competencia**

La competencia en la rizósfera es importante debido a que un agente de biocontrol no puede competir por espacio y nutrientes si es incapaz de crecer en la rizósfera. Las especies de *Trichoderma* bien sean adicionadas al suelo o aplicadas como tratamiento de semillas, crecen simultáneamente con el desarrollo del sistema radicular de la planta tratada.

Aunque la competencia en la rizósfera puede no ser el mecanismo principal de este control biológico, contribuye en sinergia con los otros mecanismos para lograr un control eficaz (Howell, 2003).

- **Producción de Enzimas**

Investigaciones recientes en los posibles mecanismos involucrados en el control biológico realizado por las especies de *Trichoderma* han llevado a varias explicaciones alternas para un biocontrol exitoso. Una de ellas es la producción de enzimas tales como quitinasas y/o glucanasas producidas por este hongo y que pueden ser responsables de la disminución de los hongos patógenos. Estas enzimas son hidrolíticas y degradan los polisacáridos que otorgan rigidez y estructura a la pared celular de hongos (quitina y  $\beta$  glucanos) destruyendo la integridad de los mismos; así mismo se ha establecido que estos hongos pueden producir proteasas que afectan las enzimas de los patógenos perturbando su capacidad de atacar las células de las plantas (Howell, 2003).

Las quitinasas y glucanasas son enzimas hidrolíticas responsables de la degradación de la quitina y juegan un papel clave en el biocontrol (De la Cruz y col, 1995; Mach y col, 1999; Nampoothiri y col, 2004). Sin embargo otras enzimas degradadoras de la pared celular, incluyendo aquellas que hidrolizan polímeros menores pueden estar involucradas en la degradación completa y efectiva del micelio o las conidias de los hongos fitopatógenos (Ait-Lahsen y col, 2001; De la Cruz y col, 1995).

- **Inducción de respuesta de defensa en plantas**

Otro mecanismo que se ha propuesto para explicar el biocontrol realizado por *Trichoderma* es la inducción de resistencia en la planta hospedera (Howell, 2003); y aunque ha sido objeto de poco estudio, en 1997, Bigirimana y col, reportaron que el tratamiento de suelo con *Trichoderma harzianum* hacia que las hojas de frijol fueran resistentes a las enfermedades causadas por los patógenos fúngicos *B. cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum* (Harman y col, 2004).

La capacidad de inducir resistencia en un rango de enfermedades las cuales son causadas por varias clases de patógenos (incluyendo hongos, bacterias y virus) en una amplia variedad de plantas parece ser una característica de este género, de hecho se ha evidenciado la existencia de resistencia sistémica debido a que el control de la enfermedad ocurre en un sitio distante de la ubicación de *Trichoderma*. Sin embargo con las cepas competentes creciendo continuamente con la planta, puede presentarse resistencia sistémica a largo plazo (Harman y col, 2004).

Actualmente se conocen tres clases de compuestos que son producidos por las cepas de *Trichoderma* y que inducen resistencia en la planta. Estos son (I) proteínas con funciones enzimáticas, (II) homólogos de proteínas codificadas para avirulencia *Avr* y (III) oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular. Estos compuestos inducen la producción de etileno en la planta, también funcionan como productores específicos que son capaces de inducir respuestas hipersensibles y otras reacciones de defensa (Harman y col, 2004).

### **1.3 Producción de *Trichoderma* sp.**

#### **1.3.1 Sustratos**

Los sustratos empleados para la producción de microorganismos, en lo posible deben contener todos los elementos necesarios para una adecuada síntesis del material celular y para la producción de metabolitos, cuando son requeridos.

- **Arroz**

El arroz es el cereal más rico en almidón, en torno al 70%. Su contenido en proteína es bajo (7,3%) pero es rico en lisina (4,1%). Su contenido en cenizas es muy escaso y su aporte en macrominerales prácticamente despreciable. Asimismo, su contenido en vitaminas es muy bajo.

El arroz original es rico en aceite que a su vez es rico en vitamina E. Este aceite tiene un alto contenido en ácido linoléico por lo que se enrancia muy fácilmente. De aquí que la fracción grasa del arroz se elimine y que el grano comercial contenga cantidades mínimas de grasa (<0,6%). El contenido en energía del grano de arroz es elevado, debido a su alto contenido en almidón y a la ausencia de factores antinutricionales (FENDA, 2003).

La estructura química del almidón es relativamente sencilla comparada con otros sustratos. Esencialmente el almidón está compuesto de dos polímeros relacionados en diferentes proporciones: amilosa (16 – 30%) y amilopectina (68-85%). La amilosa es un polímero de glucosa unido por enlaces  $\alpha$ - 1,4, principalmente en cadenas lineales. La amilopectina es un polímero de glucosa altamente ramificado incluyendo también enlaces  $\alpha$ - 1,6 en los puntos de ramificación (Raimbault, 1998).

De esta manera *Trichoderma* sp. hidroliza el polímero del almidón mediante enzimas como glucoamilasas,  $\alpha$  – amilasas,  $\beta$  – amilasas, pululanasa y isoamilasas (Raimbault, 1998), obteniendo moléculas libres de glucosa, las cuales son fáciles de asimilar, permitiendo el crecimiento micelial y la producción de conidios, al mismo tiempo se producen ácidos orgánicos producto del desarrollo del microorganismo los cuales influyen en la disminución gradual del pH (Otalora y col, 2001). Del mismo modo se ha reportado la producción de enzimas celulolíticas por *Trichoderma* sp., haciéndolo capaz de crecer en sustratos poco nutritivos como mezcla de paja con trigo, sustrato asimilado fácilmente gracias a la producción de estas enzimas (Chahal, 1985).

- **Melaza**

La melaza es un líquido denso y negrozco constituido por el residuo que permanece en las cubas después de la extracción de la mayor parte de los azúcares de caña por cristalización y centrifugación. Las melazas son concentrados de hidratos de carbono. Los azúcares representan del orden del 80% de su contenido en materia seca. Como consecuencia, son muy palatables y su contenido energético es apreciable. Este sub producto de la industria azucarera posee un alto contenido de sacarosa (32%), oligosacaridos (rafinosa) y ácidos orgánicos (málico, oxálico, láctico, acotínico y cítrico) (FENDA, 2003).

La melaza de caña tiene un contenido en proteína bruta cercano al 4%. La fracción nitrogenada es totalmente soluble, estando constituida en un 50% por aminoácidos (principalmente aspártico y glutámico) y en un 50% por nitrógeno no proteico. La proporción de aminoácidos esenciales es muy baja.

Las melazas presentan altos contenidos en cenizas. La de caña es rica en calcio, cloro y magnesio así como en potasio (1,5-4%). Sin embargo, el nivel de fósforo es reducido (FENDA, 2003).

### **1.3.2 Proceso Fermentativo**

Fermentación es el término utilizado para describir cualquier proceso para la obtención de un producto por medio del cultivo de un microorganismo. El producto puede ser la célula en si, referida como producción de biomasa o un metabolito del microorganismo.

En este sentido, una fermentación puede ser vista como un sistema de tres fases, implicando líquido, sólido, reacciones de gas sólidas y de gas líquidas:

- La fase líquida contiene sustancias nutritivas disueltas, sustratos disueltos y metabolitos.

- La fase sólida consiste en células individuales, pellets, sustratos insolubles o productos metabólicos precipitados.
- La fase gaseosa proporciona un depósito para el suministro de oxígeno y para el retiro de CO<sub>2</sub>. (Pumphrey & Julien, 1996).

La producción de biomasa constituye con frecuencia el objetivo de numerosas fermentaciones; cuando se desea obtener esa producción es necesario hacerlo en las condiciones en las que el rendimiento energético sea el mejor, es decir, en las que haya una oxidación completa del sustrato por el oxígeno del aire y en las que toda la energía potencial del sustrato sea liberada y utilizada para la síntesis (Arnaud y col, 1985).

### **Fermentación por lotes (cultivo en batch)**

Un microorganismo sólo crecerá en un medio de cultivo si contiene todos los nutrientes necesarios en una forma disponible y si son adecuados el resto de los factores ambientales. El método de cultivo más simple es el cultivo discontinuo en el que el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan subproductos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento (Trevan y col, 1990).

Este sistema se puede considerar cerrado; en el tiempo cero la solución nutritiva estéril es inoculada en el fermentador y se inicia el proceso de incubación. En el curso de la fermentación nada es añadido, excepto oxígeno (en el caso de microorganismos aeróbicos), un agente antiespumante y un regulador de pH (Pumphrey & Julien, 1996).

Después de la inoculación de la solución estéril de nutrientes con los microorganismos y su cultivo se observan tres fases: El crecimiento no comienza inmediatamente después de la inoculación del medio de cultivo; el período previo al crecimiento activo se denomina fase de latencia que puede considerarse como un periodo de adaptación. Es evidente que en los procesos comerciales es conveniente



reducir la fase de latencia tanto como sea posible, no solo para evitar la pérdida de tiempo sino también porque se consumen nutrientes para mantener el cultivo viable en dicho periodo previo al crecimiento. El tiempo de la fase de latencia puede reducirse usando un inóculo relativamente grande (3-10%) de un cultivo en fase exponencial que haya sido preparado en el mismo medio que el utilizado para la fermentación (Trevan y col, 1990).

También se observa una fase logarítmica en la cual las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento. En ese momento el crecimiento de la biomasa puede ser descrito cuantitativamente. En este proceso la tasa de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato mientras haya un exceso del mismo (Pumphrey & Julien, 1996).

La fase estacionaria, se presenta cuando comienza a disminuir el crecimiento, debido a que el sustrato ha sido metabolizado o a la formación de sustancias tóxicas para el microorganismo. La biomasa aumenta solo gradualmente o permanece constante durante esta fase estacionaria, aunque la composición de las células puede cambiar. Debido a la lisis, son liberados nuevos sustratos que pueden servir como fuente de energía.

- **Fermentación líquida**

En la fermentación líquida el sustrato es suspendido o solubilizado como partículas finas en un gran volumen de agua. En la mayoría de fermentaciones líquidas, la concentración del sustrato se encuentra en un rango de 0.5 a 6%; esta concentración depende de la densidad del sustrato y de los problemas reológicos que pueda causar (Chahal, 1985).

- **Fermentación sólida**

La fermentación sólida puede ser definida como el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en materiales sólidos húmedos en la ausencia de agua libre. La habilidad de los microorganismos para crecer en un sustrato sólido es una

función de sus requerimientos en cuanto a la actividad de agua, su capacidad de adherencia y penetración en el sustrato y su habilidad para asimilar mezclas de diferentes polisacáridos, debido a la naturaleza usualmente compleja de los mismos (Pérez – Guerra, y col, 2003).

Los sustratos que tradicionalmente han sido utilizados para este procedimiento incluyen una variedad de productos agrícolas como arroz, trigo, granos, soya y maíz entre otros (Pérez-Guerra y col, 2003). Así la fermentación sólida es un proceso en el cual un sustrato insoluble es fermentado con suficiente humedad pero sin agua libre (Chahal, 1985). Este tipo de fermentación involucra interacciones de la biomasa microbiana con un sustrato sólido humedecido, en este el microorganismo puede crecer entre los fragmentos del sustrato, por ejemplo dentro de la matriz o sobre la superficie del sustrato. La biomasa microbiana dentro de la matriz consume el sustrato y secreta metabolitos y enzimas (Padmasari, 2005).

Dicho proceso ha sido usado ampliamente para la obtención de diversos productos. Recientemente ha aumentado el interés en este tipo de fermentación debido a que pueden obtenerse mayores concentraciones de producto (Pérez-Guerra y col, 2003). Así mismo, este procedimiento provee una tecnología apropiada para el manejo de residuos agroindustriales siendo una tecnología eficaz para el desarrollo de varios bioprocesos y productos incluyendo la producción de enzimas industriales a gran escala (Nampoothiri y col, 2004).

Los microorganismos involucrados en la fermentación sólida, en su mayoría hongos filamentosos, sintetizan enzimas que degradan sustancias poliméricas en compuestos fácilmente asimilables. Estos mismos microorganismos tienen la habilidad de convertir los compuestos degradados en enzimas y otro tipo de productos de utilidad.

Los hongos filamentosos se caracterizan por ser organismos modulares, los cuales crecen por la interacción de módulos usualmente para producir un patrón de ramificación. La hifa tubular que emerge de la espora se elonga en la punta y al mismo tiempo que crece la hifa, se van formando nuevas ramificaciones; por estas y

otras propiedades fisiológicas, enzimológicas y bioquímicas, los hongos filamentosos son los que se encuentran mejor adaptados para la fermentación sólida. El modo de crecimiento hifal le otorga a estos organismos el poder de penetrar en el sustrato sólido. Esto también le otorga una mayor ventaja sobre los organismos unicelulares durante la colonización del sustrato y el empleo de los nutrientes disponibles (Pérez – Guerra y col, 2003).

Adicionalmente su habilidad para crecer a una baja actividad de agua y condiciones de alta presión osmótica (alta concentración de nutrientes) hace de los hongos organismos eficientes y competitivos para la bioconversión de sustratos sólidos (Pérez-Guerra y col, 2003).

De este modo, los hongos filamentosos penetran la matriz del sustrato en la fermentación sólida. Esto puede generar un alto grado de conversión del sustrato y aunque la estrecha relación entre el micelio y el sustrato sólido compensa parcialmente la falta de mezcla, en algunos casos no permite una recuperación completa de la biomasa lo que dificulta la estimación de los índices de crecimiento y productividad (Padmasari, 2005).

La eficiencia y productividad de la fermentación sólida son afectados por varios factores. La característica más importante es el contenido de humedad del medio, lo cual diferencia este proceso de los cultivos líquidos. El agua es esencial para el crecimiento microbiano (Doelle y col, 1992). Dentro de los factores ambientales que afectan el crecimiento microbiano en la fermentación sólida se encuentran:

-Actividad de agua y contenido de humedad del sustrato: El contenido de humedad es un factor crítico en el proceso de fermentación sólida debido a que esta variable tiene influencia sobre el crecimiento, biosíntesis y secreción de diferentes metabolitos. Un bajo contenido de humedad causa reducción en la solubilidad de los nutrientes del sustrato, y alta tensión de agua. Por otro lado un alto nivel de humedad puede causar una reducción en la producción de enzimas. Generalmente el contenido de agua del sustrato oscila entre 30% y 75% (Pérez-Guerra y col, 2003). La actividad de agua de los sustratos sólidos

puede estar significativamente por debajo de 0.99, especialmente en las fermentaciones sólidas donde el agua libre permanece casi ausente. Esto tiende a favorecer a los hongos filamentosos, los cuales en su mayoría crecen bien con actividades de agua entre 0.93 y 0.98 (Doelle y col, 1992).

-Temperatura: El incremento en la temperatura en la fermentación sólida es una consecuencia de la actividad metabólica cuando el calor removido no es suficiente (Doelle y col, 1992). Este afecta de forma directa la germinación de esporas, así como el crecimiento. El nivel de temperatura alcanzado es una función del tipo de microorganismo, la porosidad, el diámetro de las partículas y la profundidad del sustrato (Pérez-Guerra y col, 2003).

-pH: La medida y control de esta variable en la fermentación sólida es difícil. Sin embargo los sustratos empleados en este proceso usualmente tiene un efecto buffer debido a su compleja composición química (Pérez-Guerra y col, 2003).

En la tabla 1 se observan las principales diferencias entre el proceso de fermentación sólida y fermentación líquida.

**Tabla 1. Comparación entre fermentación líquida y fermentación sólida**

<b>FACTOR</b>	<b>Fermentación líquida</b>	<b>Fermentación sólida</b>
<b>Sustrato</b>	Solubles (azúcares) y poliméricos	Polímeros insolubles:
<b>Sub sustratos</b>		Almidón, celulosa, pectina, lignina
<b>Condiciones asépticas</b>	Esterilización por calor y control de asepsia	Tratamiento con vapor, condiciones no estériles
<b>Agua</b>	Altos volúmenes de consumo de agua y de efluentes descartados	Limitado consumo de agua, bajo AW, no efluentes
<b>Calor Metabólico</b>	Fácil control de temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor. Fácil aireación y amplia superficie de intercambio aire / sustrato
<b>Aireación</b>	Requiere altos niveles de aireación	
<b>Control de pH</b>	Fácil control de pH	Sustratos sólidos con capacidad buffer
<b>Agitación mecánica</b>	Buena homogenización	Se prefieren condiciones

		estáticas
<b>Escalamiento</b>	Disponibilidad de equipos industriales	Se requiere nuevo diseño de equipos
<b>Inoculación</b>	Fácil inoculación, proceso continuo	Inoculación con esporas, fermentación batch
<b>Contaminación</b>	Riesgo de contaminación bacteriana	Riesgo de contaminación
<b>Consideraciones energéticas</b>	Alto consumo de energía	Bajo consumo de energía
<b>Volumen del equipo</b>	Altos volúmenes y tecnología de alto costo	Bajos volúmenes y bajo costo de equipos
<b>Efluentes y contaminación</b>	Altos volúmenes de efluentes contaminantes	No hay efluentes, menor contaminación.

Fuente: Riambault, 1998.

#### 1.4 Control de Calidad para Formulaciones Biológicas

En Colombia se expidió una reglamentación sobre la elaboración de productos comerciales de hongos, y sobre los requisitos para obtener las licencias de producción y venta, reglamentación que esta basada en una detallada información sobre el control de calidad de estos productos (Vélez y col, 1997).

Para la realización de las pruebas, previamente es necesaria la reactivación del hongo a evaluar. Las pruebas que deben ser realizadas para cada formulación de carácter comercial son:

##### Pruebas Microbiológicas

- **Concentración de esporas:** Se realiza una cuantificación de las esporas del hongo para determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso o volumen existente.
- **Germinación de esporas:** Esta prueba establece la viabilidad del hongo en combinación con el estimado del número de esporas, se puede calcular la cantidad de esporas viables de cada formulación por unidad de peso o volumen.
- **Prueba de pureza:** Esta prueba tiene como fin establecer la proporción del agente biológico en la formulación e identificar los microorganismos

contaminantes, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los hongos (Monzón, 2001; Vélez y Col, 1997).

#### Prueba de patogenicidad

Esta prueba es fundamental en el análisis de calidad de la formulación, ya que determina si el hongo realmente cumple la función para la cual esta diseñado. Sin embargo no asegura que bajo condiciones de campo su eficacia va a ser igual a la registrada en el laboratorio (Monzón, 2001; Vélez y Col, 1997).

#### Pruebas físico – químicas

- pH: Mediante esta prueba se determina la acidez o la alcalinidad de una formulación.
- Porcentaje de humedad
- Humectabilidad: Determina el tiempo que tarda un polvo mojable en humedecerse completamente.
- Suspensibilidad: Determina la concentración de esporas del producto en suspensión después de un tiempo de preparada la mezcla, con el fin de asegurar la homogeneidad de la concentración del producto durante la aspersión.
- Taponamiento de boquillas: El objetivo de esta prueba es evaluar si las formulaciones comerciales originan taponamiento de las boquillas en los equipos de aspersión (Monzón, 2001; Vélez y Col, 1997).

### 1.5 Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)

El crisantemo es una planta ornamental cultivada en todo el mundo y comercialmente valiosa debido a sus numerosos híbridos, bastante apreciados por la inflorescencia, diversidad de colores, formas y durabilidad. El mejoramiento y la selección de crisantemos han sido realizados no solo con relación a la forma y color, sino también a su adecuado cultivo, resistencia al frío – calor y resistencia postcosecha (Modesto & Fenille, 2004). El crisantemo de invernadero es una planta herbácea perenne con inflorescencias, miembros de la familia Asteraceae. El desarrollo vegetativo del crisantemo ocurre bajo condiciones de día largo, mientras que la formación del botón ocurre bajo condiciones de día corto (Kuklina, 2003).

Taxonómicamente, el crisantemo se clasificó originalmente en el género *Chrysanthemum* (del latín *Crysanthemum* y este del griego *Chrysanthemon*, de *Chrysos*, oro y de *antheion*, flor); sin embargo, recientemente la especie *Chrysanthemum grandiflora* Ramat. se transfirió al género *Dendranthema*, por lo que su nombre científico correcto es *Dendranthema grandiflora* (Ramat.) perteneciente a la familia Asteraceae (Camargo y col, 2000).

El crisantemo presenta tallos herbáceos y hojas alternas que pueden ser dentadas o con márgenes de distintas formas. Sus flores que son muy apreciadas por su elegancia y la variedad de sus colores, se presentan arregladas en inflorescencias llamadas botones (Figura 3), los cuales pueden ser solitarios o reunidos en corimbos. Se puede reproducir por semilla, por esqueje o por división de la planta. Existe una amplia gama de variedades catalogadas; por ejemplo, se pueden distinguir las de jardín y las variedades comerciales para flor cortada; según la forma de cultivo, hay variedades al aire libre, de invernadero y de cultivo en maceta. De acuerdo con el tamaño de los botones, destacan los crisantemos “pompones”, de flor pequeña, compacta, y los chinos de flores más grandes (Camargo y col, 2000).

La propagación se realiza por esquejes terminales que se obtienen de plantas madre seleccionadas por su conformación a la progenie, capacidad de cosecha y

vigor mantenidas bajo condiciones de día largo para inhibir la formación de botones finales. Los esquejes terminales de 8-10 cm de longitud pueden colocarse directamente en el medio para enraizamiento.

Los extremos basales de esquejes y estaquillas son rociados en ácido indolbutírico (AIB) para intensificar el desarrollo de raíces. El enraizamiento normalmente se lleva a cabo en invernadero y, preferiblemente, en canastas de propagación. El sustrato debe ser poroso; se pretende fomentar el desarrollo de raíces cortas, gruesas, con el medio de crecimiento adherido cuando se levantan (Linares, 2005).



**Figura 3. *Dendranthema grandiflora* variedad Yoko Ono spray**

**Fuente: Autor**

La temperatura del invernadero debe situarse entre 15 y 18°C. y la del medio de enraizamiento a 18-21°C.

El trasplante puede llevarse a cabo a los 10-20 días, dependiendo de la variedad y de la temporada. Para garantizar que las plantas estén turgentes y tengan una reserva antes de arraigar, se aplica un riego con fertilizantes complejos en vísperas a la plantación (Linares, 2005).

### **1.5.1 Fertilización**

Los crisantemos son muy exigentes en nutrientes, especialmente, en nitrógeno y potasio. Durante los dos primeros meses de crecimiento es muy importante mantener niveles altos de nitrógeno para obtener flores y plantas de calidad, ya que si durante este período se produce una deficiencia moderada de este nutriente, no



se logrará recuperar la calidad de la flor que se haya perdido, incluso con aplicaciones posteriores de nitrógeno.

Antes de la desinfección del suelo, suelen incorporarse ciertos fertilizantes de baja solubilidad: urea-formaldehído, superfosfato simple, cal dolomítica, sulfato de potasio, etc. Inmediatamente después de la plantación de los esquejes, deben regarse con un fertilizante líquido que contenga unos 200 ppm tanto de nitrógeno como de potasio y dicho fertilizante líquido será aplicado en cada riego. También pueden aportarse abonos de cobertura tales como el nitrato potásico, nitrato cálcico, etc. Entre los microelementos hay que cuidar especialmente la adición de hierro.

### 1.5.2 Enfermedades causadas por patógenos del suelo en Crisantemo

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos generalmente se denominan con base en los síntomas provocados y, menos frecuentemente, los nombres aplicados dependen de la apariencia de las estructuras vegetativas y reproductoras de los hongos que se encuentran desarrollándose sobre las plantas (Camargo y col, 2000).

Las enfermedades inducidas por hongos del suelo en Crisantemo (Tabla 2.), se pueden agrupar de acuerdo al sitio de la planta donde ocasionan el daño. De esta manera, se clasifican como: patógenos vasculares, patógenos que causan pudrición de raíz y cuello en la planta y patógenos causantes del damping off.

**Tabla 2. Principales enfermedades causadas por patógenos del suelo en crisantemo**

ENFERMEDAD	PATOGENO	PRINCIPALES SINTOMAS
<b>Marchitamiento vascular</b>	- <i>Verticillium alboatrum</i> - <i>Verticillium dahliae</i>	Amarillamiento marginal de las hojas inferiores avanzando hacia el centro de la lámina foliar hasta causar la muerte. Clorosis venal Enanismo de las plantas
	- <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>chrysanthemi</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>tracheiphilum</i>	Se manifiesta sobre follaje más joven y luego avanza hacia la parte basal Síntomas de difícil diagnóstico

<b>Pudrición del tallo</b>	- <i>Fusarium solani</i>	Ennegrecimiento y necrosis del sitio afectado Coloración roja a café del tejido vascular Ramas laterales deshidratadas
	- <i>Rhizoctonia</i> sp.	Las raíces afectadas sufren rápido decaimiento y pueden desarrollar lesiones de color rojo-café Ulceración en el tejido de la corteza de la base del tallo.
	- <i>Sclerotinia</i> sp.	Marchitez y amarillamiento de las hojas inferiores o muerte descendente Lesión café claro sobre el tallo que eventualmente se cubre con micelio blanco originando los esclerocios.
<b>Damping off</b>	- <i>Rhizoctonia solani</i>	Afectan plantas en primeros estadios de desarrollo Raíces se tornan negras y débiles Disminución del crecimiento de la planta Síntomas confundibles con deficiencia de nutrientes

Fuente: Agrios, 2004; Asocolflores, 1995.

Sin embargo, los síntomas causados son de difícil diagnóstico por la variabilidad de expresión en cada cultivariedad y porque son fácilmente confundibles con los ocasionados con otros hongos y con daños causados por deficiencias nutricionales o exceso de agua.

De este modo algunos de los principales hongos que atacan el cultivo del crisantemo incluyen a *Sclerotinia sclerotiorum*, parásito de plantas, cuya distribución en las zonas templadas es mundial y los huéspedes más importantes son habichuela, papa, lechuga, cultivos ornamentales, girasol, y algunos vegetales (Domsch y col, 1980; Tu, 1997).

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary es un fitopatógeno ampliamente distribuido que afecta diferentes cultivos de importancia económica (Rabbendran y col, 1998), incluyendo más de 408 especies de plantas, y aunque hay una amplia revisión bibliográfica sobre la biología y la ecología de *S. sclerotiorum*, información sobre la biología de la población de este microorganismo todavía se encuentra en estudio (Cubeta y col, 1997).

*Sclerotinia sclerotiorum*, causa marchitamiento y muerte de plantas o esclerotiniosis, una de las enfermedades principales por los daños que ocasiona, frecuencia y amplia distribución. Este hongo coloniza los tejidos del huésped, produciendo una lesión café pálida a gris – café; esta degradación severa del tejido resulta en una pudrición suave. *Sclerotinia sclerotiorum* puede atacar a su huésped a través del suelo, pero también produce frecuentemente esporas que pueden ser transportadas a partes aéreas de la planta (Agrios, 2004; Tu, 1997; Zago Ethur y col, 2001).

Este hongo produce un micelio algodonoso, blanco y denso sobre la superficie del huésped y sobre superficies de suelo adyacentes; así mismo produce esclerocios que le permiten al hongo sobrevivir durante muchos años en el suelo (Laemmlen, 2000).

El esclerocio, que es un agregado negro de micelio, se forma tanto en la parte interna como externa de las plantas infectadas. El esclerocio varía en tamaño y puede ser esférico, aplanado o con diferentes formas indefinidas (Figura 4.). Usualmente miden alrededor de 3-10mm de longitud por 3 – 7mm de ancho, con una cobertura negra y usualmente el interior presenta una coloración blanca (Pernezny & Purdy, 2000). El esclerocio se forma sobre la superficie de ciertas partes de las plantas así como en el interior de los tallos. Estos esclerocios sobreviven por muchos años en el suelo y germinan bajo condiciones de humedad, produciendo pequeñas estructuras fructíferas llamadas apotecio. El apotecio produce y expulsa ascosporas que infectan más tejidos (Kim y col, 1999; Rollins & Dickman, 1998).

#### Ubicación Taxonómica

Hongo superior

**Sub – División:** Ascomycotina

**Clase:** Discomycetes

**Orden:** Helotiales

**Género:** *Sclerotinia* (Agrios, 2004)



**Figura 4. *Sclerotinia sclerotiorum***  
**Fuente: Deacon, 2005.**

En los últimos años se ha reportado que más de 30 especies de hongos, bacterias, insectos y otros organismos parasitan a *Sclerotinia* o inhiben su crecimiento. Se han obtenido resultados alentadores en el control biológico de las enfermedades que produce este hongo en algunos cultivos al incorporar en suelos infestados hongos micoparasíticos que tienen la capacidad de destruir los esclerocios presentes en el suelo o inhibir su nueva formación, por lo que disminuyen en forma considerable la población de *Sclerotinia* (Agrios, 2004; Rabeendran y col, 1998). Es importante resaltar que el control biológico contra este fitopatógeno debe implementarse en el estado de esclerocio, durante el cual el patógeno tiene poca movilidad o durante el estado germinativo, durante el cual el patógeno es más vulnerable al ataque (Tu, 1997).

Otro de los hongos fitopatógenos que ataca al cultivo de crisantemo es *Rhizoctonia* sp., un hongo del suelo que por lo general causa enfermedades en una amplia gama de hospederos, afectando tanto partes aéreas como subterráneas. Usualmente se le conoce como hongo estéril debido a que durante muchos años se pensó que era incapaz de producir algún tipo de espora, ya fuera sexual o asexual. Actualmente se sabe que *Rhizoctonia solani* produce basidiosporas que hacen que esta especie sea un basidiomiceto al que se le denominó *Thanatephorus cucumeris* (Agrios, 2004). Este hongo produce cuerpos fructíferos asexuales y carece de esporas; poseen esclerocios café o negro, de formas variantes, frecuentemente pequeños (Barnett & Hunter, 1972).

Los síntomas más comunes de las enfermedades por *Rhizoctonia*, principalmente por *R. solani*, en la mayoría de las plantas son el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de la raíz, así como la pudrición y la canchrosis del tallo de las plantas adultas y en proceso de crecimiento.

En PDA, el color de las colonias es pardo, oscuro y presenta un desarrollo profuso. Al microscopio se observa un micelio septado, ramificado (Figura 5) y algunas veces, se aprecian cordones miceliales generadores de esclerocios, los cuales son de forma aplanada y redondeada (Camargo y col, 2000).

#### Ubicación taxonómica

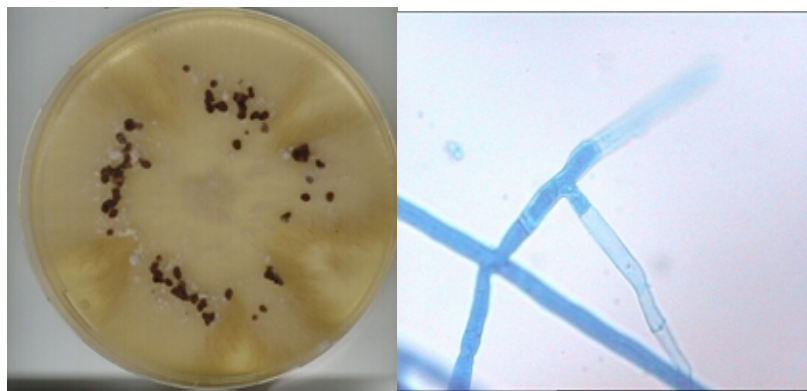
Hongo superior

**Sub – División:** Deuteromycotina

**Clase:** Agonomycetes

**Orden:** Agonomycetales (Myceliales)

**Género:** *Rhizoctonia* (Agrios, 2004).



**Figura 5. *Rhizoctonia* sp.**

**Fuente: The British Society for Plant Pathology, 2006**

Debido a los efectos que causa este hongo en diferentes tipos de cultivo se han realizado grandes esfuerzos para encontrar métodos de control alternativos más eficientes para combatir las enfermedades ocasionadas por este hongo; de esta forma se ha reportado que *Rhizoctonia* sp. es parasitado por varios microorganismos, especialmente hongos del género *Trichoderma* (Kullnig y col, 2000). En algunas ocasiones este hongo también sufre la llamada decadencia que

se produce por dos o tres RNAs infecciosos de doble banda, los cuales por medio de la anastomosis del hongo se transportan de los individuos hipovirulentos infectados a los individuos sanos virulentos y reducen tanto su capacidad para producir infección como su capacidad para sobrevivir (Agrios, 2004).

Un tercer hongo fitopatógeno que ataca al cultivo de crisantemo es *Fusarium* sp., el cual es un organismo saprófito y, una vez que se introduce en un terreno de cultivo, se establece ahí por tiempo indefinido, aunque su número poblacional varía en forma considerable, dependiendo de la susceptibilidad y tiempo de cultivo de la planta hospedante en el campo. Los marchitamientos causados por *Fusarium* se ven favorecidos ampliamente por las condiciones ambientales y del suelo de los invernaderos (Agrios, 2004).

Las colonias de estos hongos son de rápido crecimiento en PDA, con coloraciones blancas, crema, amarilla, café, rosada, rojiza o violeta (Figura 6.). Poseen micelio aéreo algodonoso, usualmente abundante en aislamientos frescos, pero algunas veces reducido o ausente en cepas altamente esporuladas (Samson & Hoekstra, 2000).

Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios o masas limosas (pionotos). Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie (Figura 6.). Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre son producidos ambos tipos de esporas. Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos sólo constan de una célula conidiógena, en otros están ramificados, a veces en verticilos. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Barnett & Hunter, 1972; Carrillo, 2003).

Al microscopio se observan conidióforos alargados en forma de botella con verticilos a intervalos regulares, septados, individuales o agrupados en esporodoquios, formando microconidios elípticos hialinos y clamidosporas (Camargo y col, 2000).

*Fusarium* sp. produce marchitamiento vascular principalmente en flores y hortalizas anuales. Dentro de las plantas ornamentales que se ven afectadas por este hongo fitopatógeno se encuentran: crisantemo, clavel, orquídeas, gladiolos entre otros. La mayoría de los hongos de este género que producen marchitamientos vasculares pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum*. Diferentes plantas hospedantes son atacadas por formas especiales o razas del hongo. Así, el hongo que ataca al crisantemo se denomina, *Fusarium oxysporum*. f. *chrysanthemi* (Agrios, 2004).

#### Ubicación Taxonómica

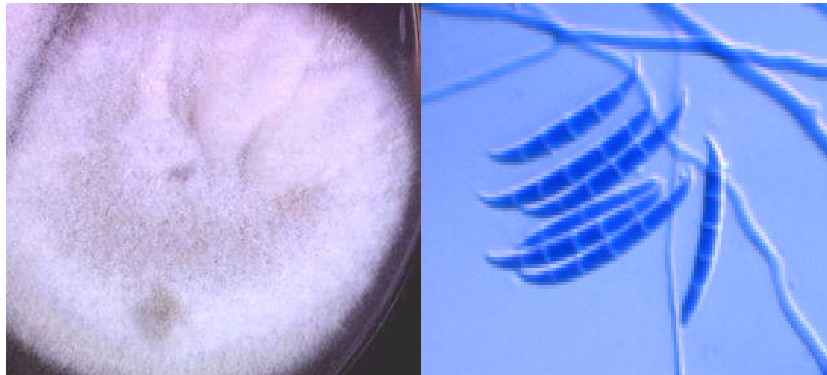
Hongo superior

**Sub – División:** Deuteromycotina

**Clase:** Hyphomycetes

**Orden:** Hifales (Moniliales)

**Género:** *Fusarium* (Agrios, 2004).



**Figura 6. *Fusarium* sp.  
Fuente: Deacon, 2006**

Al igual que con otros hongos fitopatógenos, se han estudiado diferentes posibilidades para el control de las enfermedades causadas por *Fusarium* sp., obteniendo resultados positivos al inocular previamente las plantas susceptibles con hongos antagónicos como *Trichoderma*; sin embargo la alta incidencia y patogenicidad de este hongo hacen que los resultados en campo no sean tan promisorios como los resultados *in vitro* (Agrios, 2004).

## 2. JUSTIFICACION

La implementación de buenas prácticas agrícolas responde a la conciencia generada en los últimos años frente al deterioro ambiental, llevando a los productores a asumir posiciones más amigables con el medio ambiente, reconvirtiendo sus procesos de producción e integrando a su misión la protección de los recursos naturales (Asocolflores, 2002). Esto ha llevado a una reducción en el empleo de sustancias tóxicas, las cuales progresivamente han sido reemplazadas por metodologías de control con el fin de prevenir efectos a corto y a mediano plazo.

La introducción de productos biológicos en sistemas agrícolas como cultivos de flores se presenta como una alternativa promisoría en la que las variables de evaluación de calidad como estabilidad y concentración del compuesto activo del producto llevan a evaluar los sistemas de producción del bioinoculante con especial atención en la concentración del producto, viabilidad y pureza del mismo.

Así, la demanda de producción del hongo *Trichoderma* sp. como inoculante biológico genera la oportunidad de realizar esta investigación, donde se plantea tanto la evaluación de diferentes métodos de producción de este hongo, como el establecimiento de un medio de cultivo de fácil acceso bajo condiciones apropiadas, que en conjunto permitan obtener la mayor producción de conidios del hongo *Trichoderma* sp. garantizando un mayor cubrimiento en área de cultivo.

De igual forma se hace necesaria la evaluación del agente biológico en cultivo de crisantemo, donde se pretendió investigar el efecto del mismo a lo largo del proceso de producción del cultivo desde el enraizamiento de las plántulas hasta el corte de la flor.

El cultivo de crisantemo que sirvió de locación para los ensayos en campo emplea sistemas biológicos asociados a la producción con compost con adición de bacterias



como inoculantes biológicos o acondicionadores de suelo y lombricomposteo en el sistema de enraizamiento; por esta razón se pretendió complementar el manejo de enfermedades en ornamentales con la aplicación de un biofertilizante con base en *Trichoderma* sp., cuya producción incluye la evaluación de un medio de cultivo que permita una producción óptima de biomasa y de esta forma motivar el desarrollo del manejo integral de suelos, que a futuro constituya un sistema ecológicamente sostenible.

Es por esto, que con la realización de este estudio se espera evaluar las condiciones óptimas de cultivo para *Trichoderma* sp. y generar una propuesta que permita realizar dicho proceso en cultivos ornamentales, aportando una alternativa de control más amigable con el ambiente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar dos métodos de fermentación sólida y líquida para la producción de *Trichoderma* sp., y evaluar su efecto en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* sp. aisladas y del cepario de biotecnología frente a los hongos *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium* sp.
- Comparar procesos de fermentación sólida y líquida para la producción de *Trichoderma* sp. teniendo en cuenta densidad poblacional (concentración de esporas), pureza y germinación de esporas.
- Evaluar *in vivo* en etapa de enraizamiento y campo en un cultivo de crisantemo, el efecto del bioinoculante.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 MUESTREO

El muestreo fue llevado a cabo en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* variedad Yoko Ono spray) en Tocancipá, Cundinamarca. Fueron tomados 100 g de suelo a profundidad de 5 – 10 cm cada 1/7 de la distancia total de cada una de las camas. Las submuestras de cada cama fueron homogenizadas y a partir de cada una de ellas se realizaron una serie de procedimientos de laboratorio. Cada muestra de suelo fue recogida en bolsas de papel kraft debidamente rotuladas. El plano (Fig. 7) muestra la ubicación de los muestreos que fueron llevados a cabo por cama; cada punto indica un sitio de muestreo.

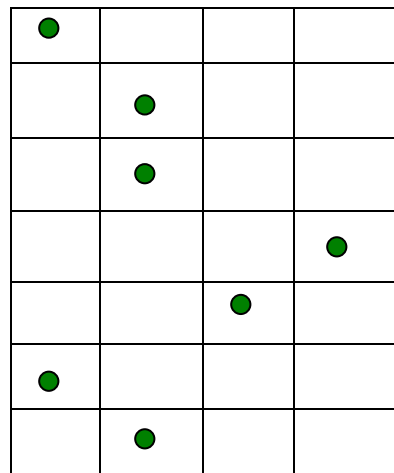


Figura 7. Plano de muestreo de suelo

### 4.2 ETAPA DE LABORATORIO

#### 4.2.1 Aislamiento de *Trichoderma* sp.

Con el fin de aislar una cepa de *Trichoderma* sp., a partir de las muestras de suelo, se empleó la técnica de diluciones, por cada muestra de suelo se tomaron 10 g que

fueron diluidos en 90 ml de solución salina al 0.85%, luego se realizaron diluciones seriadas base 10, hasta  $10^{-9}$ , de las tres últimas diluciones se tomaron 0.1 ml que fueron sembrados en cajas de petri con medio de cultivo agar papa – dextrosa (Anexo 1.) (PDA) (Knudsen y col, 1991; Mach y col, 1999; Mukherjee y col, 2004; Nampoothiri y col, 2004); las cajas fueron incubadas a 25°C durante 7 días y se realizó el conteo de UFC/g (Hermosa y col, 2000; Yedidia y col, 1999). Una vez realizado el recuento de UFC/g se efectuó la identificación de *Trichoderma* sp. por medio de sus características macroscópicas y microscópicas.

Una vez identificada la cepa nativa, se aisló en cajas de petri con medio de cultivo agar papa – dextrosa PDA, incubando a 25°C. durante 8 días.

#### **4.2.2 Obtención de hongos fitopatógenos (*Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotinia sclerotiorum*) y del hongo antagonista *Trichoderma* sp.**

Las cepas de hongos fitopatógenos fueron obtenidas del cepario del Laboratorio del Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

Adicionalmente se evaluó una cepa de *Trichoderma* sp., obtenida del Cepario de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana.

#### **4.2.3 Selección de la cepa con mayor capacidad antagónica**

Se realizaron pruebas de antagonismo de las dos cepas a evaluar (*Trichoderma* nativa y *Trichoderma* proveniente del cepario de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana) contra los fitopatógenos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Sclerotinia sclerotiorum*, para determinar la capacidad antagónica de cada una de ellas y seleccionar la cepa para la realización de las pruebas en campo.

Para ello, trozos de agar cortados de cultivos de 4 – 6 días de crecimiento de cada hongo fitopatógeno fueron colocados a 1 cm del borde de cajas de petri con medio de cultivo PDA.

En el caso del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* este fue incubado durante 3 días a 25°C previo a la siembra de *Trichoderma* sp. a 1 cm del borde opuesto de la caja de petri donde los patógenos blanco estaban creciendo. En el caso de *Rhizoctonia* sp., y *Fusarium* sp. se realizó el mismo procedimiento pero con solo un día de crecimiento previo a la siembra de *Trichoderma* sp.. Este procedimiento fue realizado con las dos cepas de antagonistas para definir cual presentaba una mayor actividad antagónica. Los parámetros de crecimiento de los cultivos duales fueron evaluados después de siete días (Hermosa y col 2000; Valencia & Arbeláez, 1999).

Cada uno de los tratamientos fue seguido con un control alterno con cada hongo y un disco de agar estéril, para verificar ausencia de contaminación en la prueba. Los resultados se procesaron con la fórmula (1) (Delgado & Arbeláez, 1990).

$$M1 = ((Mb - Ma)/Mb) \times 100. (1)$$

Donde:

- M1 = Inhibición del crecimiento micelial.
- Ma = Crecimiento micelial influenciado.
- Mb = Crecimiento micelial libre (Delgado & Arbeláez, 1990).

#### **4.2.4 Preparación preinóculo de *Trichoderma* sp.**

Se obtuvieron cajas de petri con abundante crecimiento de *Trichoderma* sp. y fueron removidos los conidios por medio de la aplicación de una solución de tween al 0.5%; con la solución resultante se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 10<sup>-9</sup> y con las ultimas tres diluciones se llevó a cabo el recuento de conidios en la cámara de Neubauer, procedimiento que fue realizado seis veces (Vélez y col, 1997).

La concentración conocida de conidios fue inoculada en 200 ml de caldo arroz al 3% p/v el cual se incubó durante tres días a 25°C, 100 rpm y 1/5 de aireación (Otalora y col, 2001).

Una vez cumplido el tiempo de incubación se realizó un nuevo recuento en la cámara de Neubauer.

#### 4.2.5 Producción de *Trichoderma* sp.

Para la selección del mejor proceso se realizó tanto fermentación sólida como líquida, para las cuales se empleó el mismo sustrato (Arroz), con la misma concentración de inóculo.

##### 4.2.5.1 Fermentación sólida de *Trichoderma* sp.

El procedimiento de la matriz de fermentación fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana y se estableció en bolsas de polipropileno de alta densidad con capacidad para 1 o 2 kg; para la matriz se utilizaron 200 g de arroz por bolsa; el arroz empleado fue de la marca comercial arroz Supremo Tradicional, cuya ficha técnica se presenta en la tabla 3.

**Tabla 3. Información nutricional del sustrato**

Calorías por porción	
Calorías 130	Calorías desde la grasa 6
% Valor Diario	
<b>Grasa saturada</b>	0,0%
<b>Colesterol</b> 0 mg	0,0%
<b>Sodio</b> 0 mg	0,0%
<b>Carbohidrato Total</b> 28,6 g	9,50%
Fibra dietaria 0,3 g	1,20%
Azúcares 0 g	0,00%
<b>Proteína</b> 2.4 g	
Vitamina B1	Vitamina B2
Fósforo 37 mg	Hierro 0,2 mg
Potasio 29 mg	Calcio 3 mg

**Fuente: Unión de Arroceros S.A., 2006**

Se depositaron 200 g de arroz en cada bolsa con 137.7 ml de agua destilada, las matrices fueron llevadas a esterilizar en autoclave durante 7 minutos a 121°C y posteriormente se siguieron los lineamientos propuestos por Angarita (2005), Chahal (1985), Monzón (2001) y Torres y col. (2002).

Transcurridos los 8 días de incubación la matriz de arroz fue homogenizada y se tomaron 10 g de cada bolsa que fueron diluidos en 90 ml de una solución de tween 80 al 0.5% para realizar la remoción de conidios. Con la solución obtenida se realizaron diluciones seriadas base 10 hasta  $10^{-10}$  y se realizó nuevamente el recuento de conidios en la cámara de Neubauer.

El procedimiento de la matriz de fermentación fue llevado a cabo con cinco repeticiones manteniendo las mismas condiciones de cultivo; del mismo modo se llevaron a cabo los recuentos en la cámara de Neubauer en cada una de las muestras con seis repeticiones en cada una de ellas.

#### **4.2.5.2 Fermentación líquida de *Trichoderma* sp.**

- Fermentación líquida en Reactor

Esta fermentación fue llevada a cabo con tres repeticiones en un reactor con capacidad de 2 litros, donde no se empleó la agitación por medio de la turbina, pero si se utilizó la aireación (1 vvm).

Para esta fermentación fue utilizado el medio arroz al 3% p/v en 500 ml de agua destilada (Otalora y col, 2001). Una vez preparado el medio este fue llevado a esterilizar en autoclave durante siete minutos a 121°C (Monzón, 2001), y posteriormente inoculado con 10% v/v de la suspensión preparada con anterioridad, e incubado a 25°C durante 8 días.

Luego de los 8 días de incubación, se realizó la recuperación de los conidios, lavando con solución de tween 80 al 0.5%, lo que permitió una total remoción de los conidios del medio de cultivo (Otalora y col, 2001; Vélez y col 1997).

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base 10 con la solución de conidios y fue efectuado el recuento de los mismos en la cámara de Neubauer, realizando seis repeticiones del recuento por cada muestra evaluada, así como la

evaluación de la germinación de esporas y la pureza del producto (Vélez y col, 1997).

- Fermentación líquida en agitación

Esta fermentación fue llevada a cabo con cinco repeticiones en un shaker termostático donde se empleó una agitación de 100 rpm y una temperatura constante de 25 +/-2 °C (Pérez y col, 2000).

Para esta fermentación fueron utilizados cinco erlenmeyers de 500 ml con medio arroz al 3% p/v (Otalora y col, 2001), una vez preparado el medio, este fue llevado a esterilizar en autoclave durante 7 minutos a 121 °C (Angarita, A. 2005; Monzón, 2001).

El procedimiento realizado una vez preparado el medio fue el mismo empleado en la fermentación líquida en reactor.

#### **4.2.6 Selección del mejor sustrato de producción para *Trichoderma* sp.**

Una vez seleccionado el mejor proceso de fermentación, se procedió a evaluar varios medios de cultivo que permitieran incrementar la producción de este hongo biocontrolador.

Los medios evaluados fueron:

- Arroz y agua destilada.
- Arroz y melaza al 3%.
- Arroz y melaza al 10% (Pérez y col, 2000).

Las condiciones de fermentación fueron 25 °C durante 8 días (Altomare y col, 1999; Torres y col, 2002).



#### 4.2.7 Evaluación de las condiciones de cultivo para la producción de *Trichoderma* sp.

Luego de la evaluación del proceso y del medio de cultivo para la producción del hongo biocontrolador *Trichoderma* sp., se procedió a la evaluación de temperatura y exposición de luz como condiciones de cultivo apropiadas para una mejor producción de biomasa, teniendo como base de producción, la fermentación sólida.

Igualmente a partir de reportes de diferentes autores, se evaluaron temperaturas de 20°C, 25°C (Altomare y col, 1999; Ezziyani y col, 2004; Grondona y col, 1997; Hermosa y col, 2000; Torres y col, 2002; Williams y col, 2003) y 30°C (Nampoothiri y col, 2004; Stefanova, 1999); para ello, se siguieron los mismos protocolos empleados durante el proceso de fermentación seleccionado.

Para evaluar períodos de exposición de luz se utilizaron periodos alternos de 24 horas luz – 24 horas oscuridad, durante ocho días; completa oscuridad durante ocho días y luz permanente durante ocho días (Moore – Landecker, 1996).

La evaluación de estas condiciones fue llevada a cabo de acuerdo a los tratamientos presentados en la tabla 4., durante la selección de las condiciones de cultivo se realizaron tres repeticiones en cada evaluación; finalizado cada procedimiento fueron llevadas a cabo las diluciones en base 10 para el recuento de conidios en cámara de Neubauer con seis replicas en cada una de las muestras así como la evaluación de la germinación de esporas y la pureza del producto (Monzón, 2001; Vélez y col, 1997).

**Tabla 4. Tratamientos para evaluación de condiciones de luz y temperatura**

TRATAMIENTO	COMPOSICION	
	CONDICIONES DE LUZ	TEMPERATURA
<b>T1</b>	Luz constante durante ocho días	30°C
<b>T2</b>	Oscuridad constante durante ocho días	30°C
<b>T3</b>	Periodos alternos de 24 h luz y 24 h oscuridad	30°C
<b>T4</b>	Luz constante durante ocho días	25°C

<b>T5</b>	Oscuridad constante durante ocho días	25°C
<b>T6</b>	Periodos alternos de 24 h luz y 24 h oscuridad	25°C
<b>T7</b>	Luz constante durante ocho días	20°C
<b>T8</b>	Oscuridad constante durante ocho días	20°C
<b>T9</b>	Periodos alternos de 24 h luz y 24 h oscuridad	20°C

#### **4.2.8 Control de calidad del inoculante biológico**

##### **Pruebas microbiológicas**

- Concentración de esporas.

Este procedimiento permitió determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso o volumen existentes en la formulación. De cada unidad de producto de ocho días de desarrollo, fueron removidas las esporas pesando 10 g del producto homogenizado y diluyéndolo en una solución de agua con tween 80 al 0.5%. La suspensión obtenida fue la dilución  $10^{-1}$  de la cual se tomó 1 ml que fue depositado en un tubo con 9 ml de solución salina, procedimiento que fue repetido hasta obtener una dilución apropiada para la realización del recuento de esporas por mililitro de suspensión.

El recuento fue llevado a cabo en cámara de Neubauer, sumando el total de esporas presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. Este procedimiento se realizó por triplicado, para obtener un total de seis lecturas. (Monzón, 2001; Vélez y col, 1997).

- Germinación de esporas.

Esta prueba permitió establecer la viabilidad del hongo. Este procedimiento fue realizado con la solución preparada para determinar la concentración de esporas. Se preparó agar agua y en el fondo de cada caja de petri se definieron cinco puntos, correspondientes a los puntos en los cuales se depositaron las alícuotas que contenían las esporas. De la dilución preparada anteriormente se tomaron 5 ul que se depositaron en los cinco puntos establecidos (este proceso fue llevado a cabo por triplicado para obtener un total de 15 muestras en cada dilución); las cajas de

petri se incubaron a 25+/- 2°C durante 18 y 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó una gota de azul de lactofenol a cada alícuota para detener la germinación y ayudar a teñir las esporas del hongo.

Posteriormente se cortaron los cinco discos de agar donde fueron depositadas las alícuotas, estos se colocaron sobre una lámina y fueron cubiertos con una laminilla. Estas láminas fueron observadas en 40x contando un mínimo de 100 esporas registrando germinadas y no germinadas por alícuota. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de germinación (Monzón, 2001; Vélez y col, 1997).

- Prueba de pureza.

En esta prueba se estableció la proporción de *Trichoderma* sp. en la formulación con respecto a los posibles contaminantes. Se tomaron nuevamente las diluciones preparadas en la prueba de concentración de esporas, y se sembraron alícuotas de 0.1 ml en cajas de petri con agar PDA; las cajas inoculadas fueron incubadas a 25+/- 2°C; diariamente y durante siete días se cuantificó el número de UFC de cada microorganismo (*Trichoderma* vs. microorganismos contaminantes). Al final de las lecturas se calculó el porcentaje de pureza (Vélez y col, 1997; ICA, 2004) (2):

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\# \text{ UFC } \textit{Trichoderma} \text{ sp.}}{\# \text{ UFC Totales}} \times 100 \text{ (2)}$$

Esta prueba fue realizada con cinco repeticiones por dilución.

### **4.3 ETAPA PRUEBAS EN CAMPO**

#### **4.3.1 Ensayos de enraizamiento en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)**

Se emplearon esquejes de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Yoko Ono aportados por Cultivos del Norte, ubicado en el Municipio de Tocancipá, Cundinamarca. Inicialmente se realizó una predesinfestación y desinfestación del tejido por medio del lavado con agua y detergente. Posteriormente fue realizada la

siembra para enraizamiento en canastas previamente desinfectadas (según metodología del cultivo) y se establecieron los tratamientos (Tabla 5.).

El sustrato empleado en las canastas de enraizamiento fue cascarilla de arroz quemada previamente desinfectada con una solución de 40g de cloro granulado en 250 litros de agua.

El compost empleado en algunos de los tratamientos fue producido en Cultivos del Norte con residuos de cosecha.

**Tabla 5. Tratamientos evaluados en banco de enraizamiento**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>REPETICIONES (CANASTAS)</b>	<b>UNIDADES EXPERIMENTALES/ CANASTA</b>
<b>Control negativo = Agua</b>	36	140
<b>T1 = Compost 70/30</b>	27	140
<b>T2 = Microagro</b>	10	140
<b>T3 = Compost + Microagro</b>	10	140
<b>T4 = <i>Trichoderma</i> sp.</b>	18	140
<b>T5 = <i>Trichoderma</i> sp. + Compost</b>	10	140
<b>T6 = <i>Trichoderma</i> sp. + Microagro</b>	10	140
<b>T7 = <i>Trichoderma</i> sp. + Microagro + Compost</b>	10	140

El proceso fue llevado a cabo en la cama 10 del banco de enraizamiento con la distribución presentada en la tabla 6, empleando 140 plántulas en cada canasta de enraizamiento, para un total de 18340 plántulas en el estudio

**Tabla 6. Distribución de tratamientos en banco de enraizamiento**

<b>T7</b>	10 canastas
<b>T6</b>	10 canastas
<b>T5</b>	10 canastas
<b>T4</b>	18 canastas
<b>T3</b>	10 canastas
<b>T2</b>	10 canastas
<b>T1</b>	27 canastas
<b>C-</b>	36 canastas

#### **4.3.1.1 Evaluación de variables agronómicas**

Finalizado el proceso de enraizamiento fueron realizadas mediciones de las siguientes variables:

- Peso fresco foliar (g).
- Peso fresco radicular (g).
- Longitud foliar (cm).
- Longitud radicular (cm).
- Peso seco foliar (g).

Del mismo modo se realizaron mediciones de:

- Presencia de fitopatógenos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.) empleando la metodología descrita en el numeral 4.2.1 para el aislamiento de *Trichoderma* sp. en muestras de suelo.
- Presencia de *Trichoderma* sp.: Se evaluó en suelo siguiendo la metodología descrita en el punto 4.2.1.

#### **4.3.2 Ensayos en camas desde siembra hasta floración (12 semanas)**

Los ensayos fueron realizados en las instalaciones de Cultivos del Norte, ubicado en el Municipio de Tocancipá, Cundinamarca. Estos se realizaron completamente al azar con los tratamientos presentados en la tabla 7.

**Tabla 7. Tratamientos evaluados en camas de producción**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>COMPOSICION</b>
<b>C-</b>	Fertirriego + compost (1x al suelo)+ microagro ( C-).
<b>T1</b>	Fertirriego + compost(1x y desde enraizamiento) + microagro (T1).
<b>T3</b>	Fertirriego + compost (2x al suelo) + microagro (C-).
<b>T4</b>	Fertirriego + compost (1x)+ microagro + <i>Trichoderma</i> (1x) (plántulas procedentes de C-).
<b>T5</b>	Fertirriego + compost (1x)+ microagro + <i>Trichoderma</i> (1x) (plántulas procedentes de T1).
<b>T6</b>	Fertirriego + compost (1x)+ microagro + <i>Trichoderma</i> (1x) (plántulas procedentes de T4).
<b>T7</b>	Fertirriego + compost (1x)+ microagro + <i>Trichoderma</i> (2x) (plántulas procedentes de C-).
<b>T8</b>	Fertirriego + compost (1x)+ microagro + <i>Trichoderma</i> (2x) (plántulas procedentes de T1).
<b>T9</b>	Fertirriego + compost (1x)+ microagro + <i>Trichoderma</i> (2x) (plántulas procedentes de T4).

Las pruebas de campo fueron llevadas a cabo en el bloque 12, nave 4 en las camas pares; la cama 8 se empleo para el testigo y en la cama 6 se ubicaron las plántulas que durante el enraizamiento no tuvieron aplicación de ácido indol butírico, de acuerdo distribución presentada en la figura 8, por repetición fueron empleadas 352 plántulas, dando un total de 1050 plántulas por tratamiento.

En este ensayo se realizaron mediciones de:

- Producción (número de ramos / tratamiento) Diferenciando ramos para comercio nacional y exportación.
- Altura (cm).
- Peso fresco de los ramos (g).
- Peso fresco radicular (g).
- Peso seco radicular (g).

- Presencia de fitopatógenos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.) empleando la metodología descrita anteriormente para el aislamiento de *Trichoderma* sp. en el numeral 4.2.1.
- Presencia de *Trichoderma* sp.: Solamente se evaluó en suelo siguiendo la metodología descrita en el punto 4.2.1.

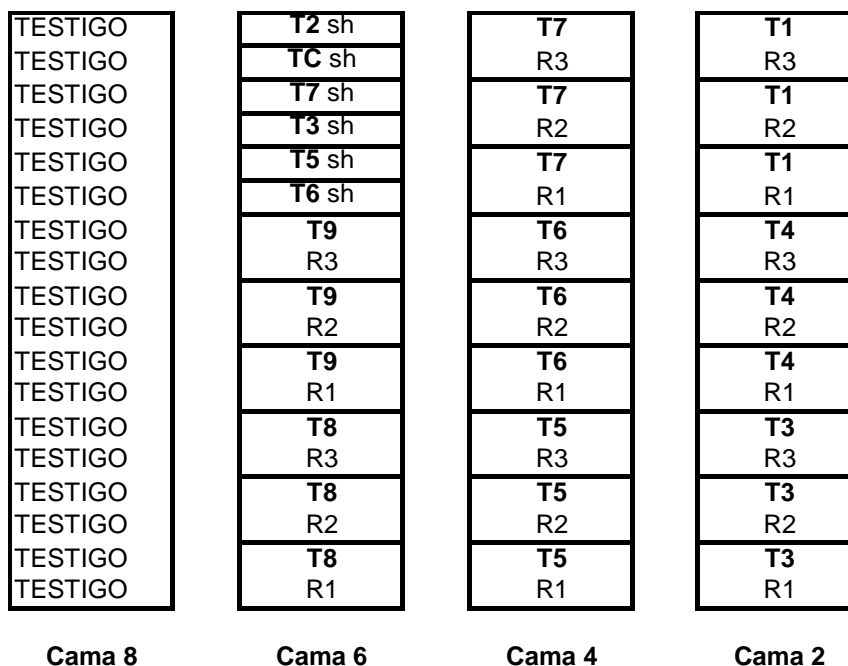


Figura 8. Distribución de tratamientos en bloque 12 nave 4

#### 4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

##### 4.4.1 Pruebas de antagonismo *in vitro*

Los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* sp. (*Trichoderma* nativa y *Trichoderma* cepario Biotecnología) contra los hongos fitopatógenos (*Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Sclerotinia sclerotiorum*), fueron analizados mediante una prueba de hipótesis (T test para dos muestras) a un nivel de confianza del 95%, lo que permitió estimar la diferencia entre las medias de los porcentajes de antagonismo. Las hipótesis empleadas en estas pruebas fueron:

**Ho:**  $\mu_A - \mu_B = 0$

**Hi:**  $\mu_A - \mu_B < 0$

**Ho:** La media de los porcentajes de antagonismo presentado por la cepa A (*Trichoderma* nativa) es igual a la media de los porcentajes de antagonismo presentado por la cepa B (*Trichoderma* cepario).

**Hi:** La media de los porcentajes de antagonismo presentado por la cepa A (*Trichoderma* nativa) es menor que la media de los porcentajes de antagonismo presentados por la cepa B (*Trichoderma* cepario).

#### **4.4.2 Evaluación y selección del proceso de producción de *Trichoderma* sp.**

La selección del proceso de producción incluyó los siguientes parámetros: (I) densidad poblacional (concentración de esporas), (II) germinación de esporas a 18 y 24 h, y (III) porcentaje de pureza. Cada uno de estos parámetros fue analizado estadísticamente de manera individual.

##### Densidad poblacional

Debido a que los resultados de esta prueba no presentaron una distribución normal, se realizó un Test Wilcoxon Rank que permitió estimar la diferencia entre las medianas obtenidas. Las hipótesis empleadas fueron:

**Ho:**  $M_I - M_s = 0$

**Hi:**  $M_I - M_s < 0$

**Ho:** La mediana de la concentración de esporas medida en unidades logarítmicas obtenido en la fermentación líquida (l) es igual a la mediana de la concentración de esporas medida en unidades logarítmicas obtenido en la fermentación sólida (s).

**Hi:** La mediana de la concentración de esporas medida en unidades logarítmicas obtenido en la fermentación líquida (l) es menor que la mediana de la concentración de esporas medida en unidades logarítmicas obtenido en la fermentación sólida (s).



### Germinación de esporas a las 18 horas

Los resultados obtenidos en las pruebas de germinación a 18 horas, fueron analizados mediante una prueba de hipótesis (T test para dos muestras) a un nivel de confianza del 95%, lo que permitió estimar la diferencia entre las medias de los porcentajes de germinación. Las hipótesis empleadas en estas pruebas fueron:

**Ho:**  $\mu_l - \mu_s = 0$

**Hi:**  $\mu_l - \mu_s < 0$

**Ho:** La media de los porcentajes de germinación a las 18 horas obtenido en la fermentación líquida (l) es igual a la media de los porcentajes de germinación a las 18 horas obtenido en la fermentación sólida (s).

**Hi:** La media de los porcentajes de germinación a las 18 horas obtenido en la fermentación líquida (l) es menor que la media de los porcentajes de germinación a las 18 horas obtenido en la fermentación sólida (s).

### Germinación de esporas a las 24 horas

Los resultados obtenidos en las pruebas de germinación a 24 horas, fueron analizados mediante una prueba de hipótesis (T test para dos muestras) a un nivel de confianza del 95%, lo que permitió estimar la diferencia entre las medias de los porcentajes de germinación. Las hipótesis empleadas en estas pruebas fueron:

**Ho:**  $\mu_l - \mu_s = 0$

**Hi:**  $\mu_l - \mu_s < 0$

**Ho:** La media de los porcentajes de germinación a las 24 horas obtenido en la fermentación líquida (l) es igual a la media de los porcentajes de germinación a las 24 horas obtenido en la fermentación sólida (s).

**Hi:** La media de los porcentajes de germinación a las 24 horas obtenido en la fermentación líquida (l) es menor que la media de los porcentajes de germinación a las 24 horas obtenido en la fermentación sólida (s).

### Pureza

Debido a que los resultados de esta prueba no presentaron una distribución normal, se realizó un Test Wilcoxon Rank que permitió estimar la diferencia entre las medianas obtenidas. Las hipótesis empleadas fueron:

**Ho:**  $M_l - M_s = 0$

**Hi:**  $M_l - M_s < 0$

**Ho:** La mediana del porcentaje de pureza obtenido en la fermentación líquida (l) es igual a la mediana del porcentaje de pureza obtenido en la fermentación sólida (s).

**Hi:** La mediana del porcentaje de pureza obtenido en la fermentación líquida (l) es menor que la mediana del porcentaje de pureza obtenido en la fermentación sólida (s).

#### **4.4.3 Evaluación y selección del sustrato para la producción de *Trichoderma* sp.**

Debido a que los resultados obtenidos en las pruebas de densidad poblacional y pureza no presentaron una distribución normal se utilizó para el análisis estadístico una prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el análisis unilateral de varianzas por rangos. Las hipótesis empleadas para la evaluación de este parámetro fueron:

**Ho:** Las distribuciones en todos los sustratos son iguales.

**Hi:** Al menos uno de los sustratos tiene una distribución diferente.

Para establecer el grado de diferencia entre la distribución de los sustratos se empleó una prueba de comparación Kruskal Wallis.

Por el contrario, los resultados obtenidos en las pruebas de germinación a 18 y 24 horas presentaron una distribución normal y fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianzas (ANOVA). Las hipótesis empleadas para la evaluación de los tres parámetros fueron:

**Ho:** Todas las medias (de los medios; arroz y agua destilada, arroz y melaza al 3% y arroz y melaza al 10%) son iguales.

**Hi:** Al menos una media (de los medios: arroz y agua destilada, arroz y melaza al 3% y arroz y melaza al 10%) es diferente.

Para establecer el grado de diferencia entre las medias se empleó una prueba Bonferroni.

#### **4.4.4 Evaluación y selección de las condiciones de cultivo para la producción de *Trichoderma* sp.**

La selección de las condiciones de producción incluyó los siguientes parámetros (I) densidad poblacional (concentración de esporas), (II) germinación de esporas a 18 y 24 horas, y (III) pureza. Cada uno de estos parámetros fue analizado estadísticamente de manera individual.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en las variables densidad poblacional, germinación de esporas a 18 horas y 24 horas, se empleó un análisis de varianzas (ANOVA) en cada una de los tratamientos evaluados. Las hipótesis empleadas para la evaluación de estos parámetros fueron:

**Ho:** Todas las medias son iguales.

**Hi:** Al menos una media es diferente.

Para establecer el grado de diferencia entre las medias se empleó una prueba Bonferroni.

En el análisis de la variable de porcentaje de pureza, debido a que los datos no presentaron una distribución normal, se empleó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el análisis unilateral de varianzas por rangos. Las hipótesis empleadas para la evaluación de este parámetro fueron:

**Ho:** Las distribuciones en todos los tratamientos son iguales.

**Hi:** Al menos uno de los tratamientos tiene una distribución diferente.

Para establecer el grado de diferencia entre la distribución de los tratamientos se empleó una prueba de comparación Kuscal Wallis.

#### **4.4.5 Ensayo de enraizamiento en crisantemo**

El análisis estadístico de las variables evaluadas en este ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: En las variables de peso fresco foliar, peso seco foliar y peso fresco radicular, debido a que los resultados obtenidos no siguieron una distribución normal, se utilizó para el análisis estadístico una prueba no paramétrica Kruscal Wallis para el análisis unilateral de varianzas por rangos. Las hipótesis empleadas para la evaluación de este parámetro fueron:

**Ho:** Las distribuciones de las poblaciones en todos los tratamientos son iguales.

**Hi:** Al menos una de las poblaciones tiene una distribución diferente.

Para establecer el grado de diferencia entre las distribuciones de las poblaciones se empleó una prueba de comparación Kuscal Wallis.

Para el análisis de los resultados de las variables longitud foliar y longitud radicular, se realizó un análisis de varianzas (ANOVA). Las hipótesis empleadas para el análisis de cada una de las variables fueron:

**Ho:** Todas las medias son iguales

**Hi:** Al menos una media es diferente

Para establecer el grado de diferencia entre las medias se empleó una prueba Bonferroni.

#### 4.4.6 Ensayos en camas desde siembra hasta floración

- **Evaluaciones en tratamientos con aplicación de hormona de enraizamiento**

El análisis estadístico de las variables evaluadas en este ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: Los datos obtenidos en la variable número de ramos de exportación fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianzas (ANOVA) Las hipótesis empleadas para la evaluación de este parámetro fueron:

**H<sub>0</sub>:** Todas las medias son iguales

**H<sub>1</sub>:** Al menos una media es diferente

Para establecer el grado de diferencia entre las medias se empleó una prueba Bonferroni

Debido a que los resultados obtenidos en las variables longitud foliar (altura), peso fresco y seco radicular, peso fresco foliar (peso de ramos) y numero de ramos nacional, no siguen una distribución normal, se utilizó para el análisis estadístico una prueba no paramétrica Kruscal Wallis para el análisis unilateral de varianzas por rangos. Las hipótesis empleadas para la evaluación de este parámetro fueron:

**H<sub>0</sub>:** Las distribuciones de las poblaciones en todos los tratamientos son iguales.

**H<sub>1</sub>:** Al menos una de las poblaciones tiene una distribución diferente.

Para establecer el grado de diferencia entre las distribuciones de las poblaciones se empleó una prueba de comparación Kuscal Wallis.

- **Evaluación de longitud foliar en tratamientos sin aplicación de hormona de enraizamiento**

El análisis estadístico de esta variable en los tratamientos sin aplicación de hormona de enraizamiento fue llevado a cabo por medio de un análisis de varianzas (ANOVA) Las hipótesis empleadas para la evaluación de este parámetro fueron:

**Ho:** Todas las medias son iguales

**Hi:** Al menos una media es diferente

Para establecer el grado de diferencia entre las medias se empleó una prueba Bonferroni

#### **4.4.7 Comparación de longitud foliar en tratamientos con aplicación y sin aplicación de hormona de enraizamiento**

Los resultados obtenidos en los tratamientos control, T3, T4, T5 y T6 con y sin aplicación de hormona enraizamiento, fueron analizados mediante una prueba de hipótesis (T test para dos muestras) a un nivel de confianza del 95%, lo que permitió estimar la diferencia entre las medias de las longitudes foliares. Las hipótesis empleadas en estas pruebas fueron:

**Ho:**  $\mu_A - \mu_B = 0$

**Hi:**  $\mu_A - \mu_B < 0$

**Ho:** La media de las longitudes foliares presentado por los tratamientos A (Tratamientos sin hormona) es igual a la media de las longitudes foliares presentado por los tratamientos B (Tratamientos con hormona).

**Hi:** La media de las longitudes foliares presentado por los tratamientos A (Tratamientos sin hormona) es menor a la media de las longitudes foliares presentado por los tratamientos B (Tratamientos con hormona).

Por el contrario, los resultados obtenidos en los tratamientos T1 y T7 con y sin aplicación de hormona, no presentaron una distribución normal, por lo que se realizó un Test Wilcoxon Rank que permitió estimar la diferencia entre las medianas obtenidas. Las hipótesis empleadas fueron:

**Ho:**  $MA - MB = 0$

**Hi:**  $MA - MB < 0$

**Ho:** La mediana de las longitudes foliares presentado por los tratamientos A (Tratamientos sin hormona) es igual a la mediana de las longitudes foliares presentado por los tratamientos B (Tratamientos con hormona).

**Hi:** La mediana de las longitudes foliares presentado por los tratamientos A (Tratamientos sin hormona) es menor a la mediana de las longitudes foliares presentado por los tratamientos B (Tratamientos con hormona).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Aislamiento de *Trichoderma* sp.

Las siete muestras de suelo tomadas del cultivo de flores presentaron una abundante población de hongos con recuentos promedio de  $23 \times 10^{10}$  ufc/g de suelo, estos aislamientos presentaron diferentes morfologías no identificadas, entre ellos algunas correspondieron a *Trichoderma* sp. Una vez realizado el aislamiento de estas cepas en agar PDA, se procedió a la recuperación de una cepa que por sus características macroscópicas y microscópicas perteneciera al género de interés.

De esta manera y con pases sucesivos se logró la purificación de una cepa de *Trichoderma* nativa del cultivo (Figura 9.) a partir de cinco cepas encontradas, cuyas características macroscópicas en agar PDA a 25°C de incubación, incluían colonias algodonosas de rápido crecimiento concéntrico en un lapso de cinco a seis días con una coloración amarillo – verdosa, con un revés amarillo (Arango y col, 1988; Barnett & Hunter ,1972).



Figura 9. Crecimiento de *Trichoderma* sp. nativa en agar PDA  
Fuente: Autor



Esta cepa durante el análisis microscópico realizado por medio de una coloración con azul de lactofenol, presentó hifas hialinas tabicadas y de micelio ramificado, fiálides en forma de botella, hialinas, conidios ovoides, hialinos (Figura10.) (Barnett & Hunter, 1972). Estas características macroscópicas y microscópicas permiten una identificación relativamente fácil de *Trichoderma* como género, pero el concepto de especie es difícil de interpretar y hay diferentes confusiones en cuanto a la aplicación de diferentes nombres. Las divergencias de criterio hacen difícil buscar y sobre todo caracterizar nuevos agentes de biocontrol dentro de las especies y reidentificarlas (Küçük & Kivanç, 2003), razón por la cual, la cepa de *Trichoderma* sp. nativa del cultivo de crisantemo fue identificada hasta género.



**Figura 10. Microscopia de *Trichoderma* sp.**  
**Fuente: Systematic Botany and Mycology Laboratory, 2006**

En cuanto a la frecuencia de aislamientos de *Trichoderma* sp., varios reportes coinciden en que este hongo se encuentra ampliamente distribuido y se encuentra naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, y que su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Harman y col, 2004).

En muestras de suelos provenientes de cultivos de flores Márquez y col. (2001), reportan una presencia representativa de *Trichoderma* sp.; las muestras de suelo presentaron una diversa población de hongos y bacterias con capacidad antagónica lo que puede indicar que esos microorganismos producen sustancias antifúngicas

que degradan la pared de los hongos disminuyendo su población, de esta manera se obtuvieron recuentos promedio de  $25 \times 10^3$  ufc/ml del hongo *Trichoderma* sp.

Estudios realizados en Caldas, Colombia, indican que este agente de control biológico es de fácil aislamiento en suelos con cultivos o con presencia de síntomas de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Villegas & Castaño, 1999), reafirmando una vez más que *Trichoderma* sp. es un microorganismo que ha sido ampliamente estudiado por su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo rápido, además de sus capacidades antagónicas.

## **5.2 Pruebas de Antagonismo *Trichoderma* sp. vs. Hongos fitopatógenos**

Las pruebas de antagonismo *in vitro* llevadas a cabo con las dos cepas de *Trichoderma* sp. en agar PDA con una incubación de siete días a 25°C, presentaron un antagonismo evidente en la prueba de enfrentamiento dual contra los hongos fitopatógenos evaluados (*Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Sclerotinia sclerotiorum*).

Esta actividad antagónica ha sido reportada en varios estudios, los cuales exponen los diferentes mecanismos empleados por el agente biocontrolador *Trichoderma* sp., para la disminución o eliminación de la población de hongos fitopatógenos. Dentro de los mecanismos empleados por *Trichoderma* sp., para el control de hongos fitopatógenos se encuentran el micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y/o espacio, entre otros (Kulling y col, 2000; Carsolio y col, 1999; Ait – Lahsen y col, 2001; Valencia & Arbeláez, 1999; Delgado & Arbeláez, 1990; Rabeendran y col, 1998).

Los eventos que llevan al micoparasitismo son complejos y comienzan cuando las cepas de *Trichoderma* detectan a otros hongos y crecen trópicamente hacia estos; diferentes cepas pueden seguir distintos patrones de inducción, pero el hongo aparentemente siempre produce bajos niveles de una exoquitinasa extracelular. La difusión de esta enzima cataliza la liberación de oligómeros de la pared celular del hongo blanco, y esto induce la expresión de endoquitinasas fungitóxicas. Una vez el hongo hace contacto con el patógeno, *Trichoderma* sp., se enrolla y forma

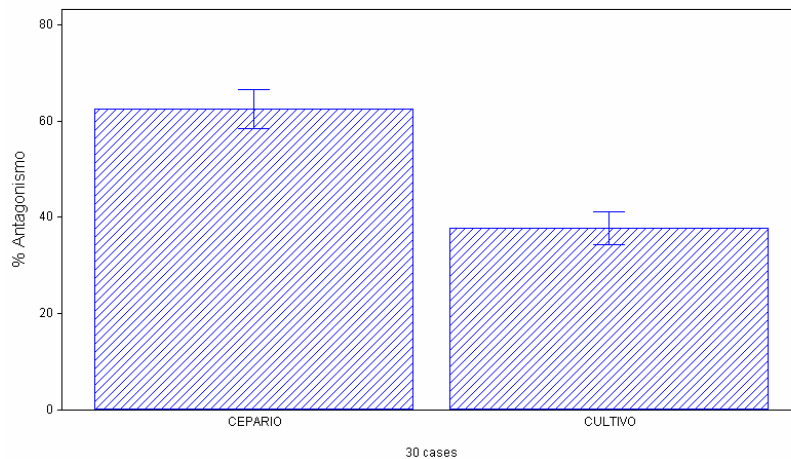
apresorios en la superficie del hospedero, produciendo varias enzimas fungitóxicas degradadoras de la pared celular. La combinación de estas actividades resulta en el parasitismo del hongo blanco y la disolución de la pared celular (Harman y col, 2004; Howell, 2003; Lorito, 1996). Este proceso se ha evidenciado varias veces en el antagonismo contra los hongos *Rhizoctonia solani*, varias especies del género *Fusarium*, *Sclerotium rolfsii*, entre otros (Howell, 2003).

Otro mecanismo propuesto para el antagonismo de *Trichoderma* sp., es la antibiosis, la cual ha sido demostrada en varios estudios; en 1983, Howell y Stipanovic, aislaron y describieron un nuevo antibiótico, gliovirina, de *Gliocladium* (*Trichoderma*) *virens* que demostró ser altamente inhibitoria para *Pythium ultimum* y algunas especies de *Phytophthora*, así como para algunas bacterias. En cuanto a la competencia por nutrientes y por espacio, *Trichoderma* sp., posee la habilidad de crecer rápidamente en la rizósfera, bien sea aplicado al suelo o como tratamiento en plántulas o semillas, creciendo a la par con el desarrollo del sistema radicular de las plantas, lo cual le otorga una ventaja competitiva sobre la mayoría de hongos fitopatógenos (Howell, 2003).

Dentro de las investigaciones más recientes en cuanto a los posibles mecanismos involucrados en el control biológico realizado por *Trichoderma* sp., se ha propuesto que la producción de enzimas tales como quitinasas y/o glucanasas están involucradas en la supresión de los patógenos de plantas. Estas enzimas actúan degradando los polisacáridos, la quitina y los glucanos, los cuales son responsables de la rigidez de la pared celular de los hongos; esta producción de enzimas ha sido evaluada contra los hongos *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani*, *P. ultimum*, entre otros (Ait – Lahsen, H. y col, 2001; Howell, 2003; Kullning y col, 2000).

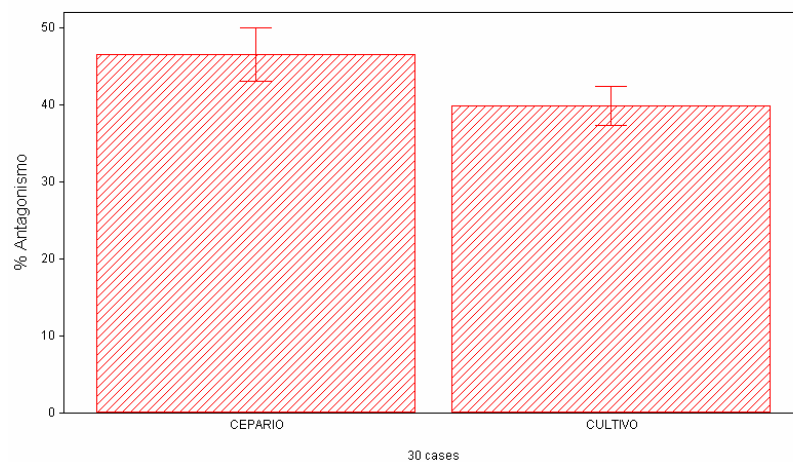
De esta forma en las pruebas de antagonismo realizadas frente a los tres hongos fitopatógenos, se observó que la cepa proveniente del cepario de Biotecnología, cuyas características macro y microscópicas incluyeron colonias algodonosas de crecimiento rápido (cuatro a cinco días en agar PDA), con una fuerte coloración verde oscura, revés amarillo, micelio septado, conidias unicelulares ovaladas en masas en los ápices de las fiálides (Barnett & Hunter, 1972), presentó una mayor

acción antagónica y una elevada actividad colonizadora. Cuantitativamente se obtuvo un 24.8, 6.7, y 22.4% más de antagonismo que la cepa nativa de Cultivos del Norte, contra los hongos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Sclerotinia sclerotiorum*, debido probablemente a una mayor y más rápida esporulación en el medio PDA. En las figuras 11, 12 y 13 se observan los resultados obtenidos durante esta evaluación.



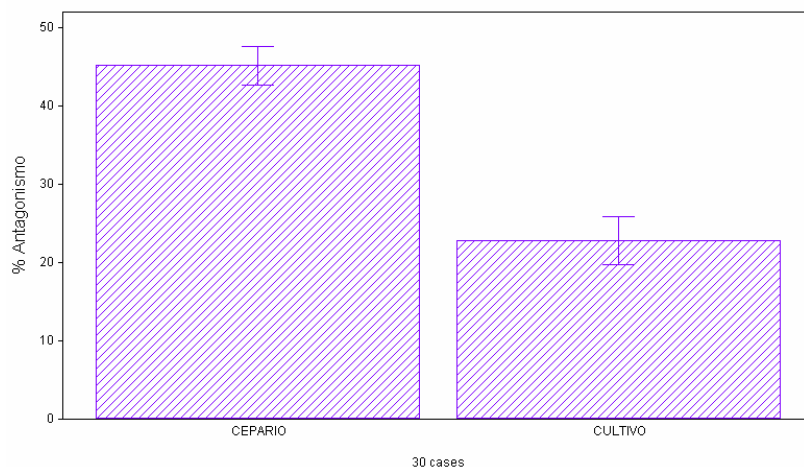
**p = 0.00001**

**Figura 11. Análisis Estadístico Pruebas de Antagonismo cepas de *Trichoderma* sp. vs. *Fusarium* sp.**



**p= 0.00001**

**Figura 12. Análisis Estadístico Pruebas de Antagonismo cepas de *Trichoderma* sp. vs. *Rhizoctonia* sp.**



**p=0.00001**

**Figura 13. Análisis Estadístico Pruebas de Antagonismo cepas de *Trichoderma* sp. vs. *Sclerotinia sclerotiorum***

En el estudio realizado por Ezziyyani y col. (2004), *Trichoderma harzianum* demostró un claro efecto antagónico contra *Phytophthora capsici* en cultivos duales realizados *in vitro*, aumentando su actividad antifúngica mediante la secreción de la enzima hidrolítica  $\beta - 1,3 -$  glucanasa, y posiblemente algunas otras, sobrecreciendo y reduciendo totalmente la colonia del patógeno; sin embargo en este estudio la intensidad de la inhibición del patógeno varió según el medio de cultivo, observándose una mayor inhibición en medio PDA. Se demostró que el sustrato afecta las propiedades antagónicas.

En el análisis estadístico realizado con una prueba T para dos muestras, se encontraron diferencias significativas en relación a las medias de los porcentajes de antagonismo presentados por las dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a los hongos fitopatógenos ( $p = 0.00001$ ), encontrándose que en todos los casos la mayor actividad antagónica la presenta la cepa de *Trichoderma* sp., proveniente del cepario de Biotecnología.

A pesar de que el efecto antagónico presentado por la cepa de *Trichoderma* sp., proveniente del cepario, fue evidenciado de manera cualitativa y cuantitativa, el enfrentamiento dual como técnica de evaluación, dificulta establecer los

mecanismos propuestos para el antagonismo de *Trichoderma* sp., ya que solo se evidencia la inhibición del crecimiento del patógeno.

De este modo la cepa seleccionada para las pruebas de producción del inoculante biológico y las pruebas en campo fue la cepa de *Trichoderma* sp. proveniente del cepario de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana, ya que esta presentó los mas altos porcentajes de actividad antagónica contra los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotinia sclerotiorum*.

### **5.3 Preparación preinóculo de *Trichoderma* sp.**

Después de ocho días de incubación a 25°C en cajas de petri con agar PDA de la cepa de *Trichoderma* sp. seleccionada previamente, se observó un crecimiento abundante concéntrico con un cubrimiento total del medio de cultivo en cuatro a cinco días, y alta esporulación, lo que favoreció la posterior preparación del preinóculo.

De este modo, se tomaron estas cajas de petri para la remoción de conidios con solución de tween 80 al 0.5% y el recuento en cámara de Neubauer (Ezziyyani, M. y col, 2004; Monzón, 2001), obteniendo un recuento de  $32 \times 10^5$  conidios/ml.

Conocida la concentración de conidios presente se procedió a la inoculación del caldo arroz al 3%, y se incubó a 25°C 100 rpm y 1/5 de aireación (Otalora y col, 2001). Finalizado el tiempo de incubación se realizó el recuento de conidios en cámara de Neubauer, el recuento obtenido en el preinóculo fue  $14 \times 10^8$  conidios/ml.

Esta concentración se aproxima a las reportadas por Sánchez y col. (2001), quienes produjeron en caldo avena al 6% un preinoculo con promedio de  $1 \times 10^7$  conidios/ml y Otalora y col. (2001), quienes produjeron en medio de polvo de arroz puro una concentración de  $1.9 \times 10^8$  conidios/ml, mientras que en otros estudios Pérez y col. (2000), reportan concentraciones de  $9.5 \times 10^9$  conidios/ml.

#### **5.4 Evaluación del mejor proceso de producción de *Trichoderma* sp.**

Con el fin de evaluar la producción de conidios por *Trichoderma* sp, se hizo seguimiento a los procesos de fermentación sólida en matrices de polipropileno con medio arroz y agua destilada y fermentación líquida en erlermeyer en shaker termostataado y en reactor con medio arroz al 3% (Otalora y col, 2001), para así establecer las mejores condiciones para la producción de este hongo.

Durante los ocho días de cultivo a una temperatura constante de 25°C, se observaron diferencias en el crecimiento de este microorganismo en los tres procedimientos evaluados. En la fermentación sólida se evidenció un crecimiento abundante del hongo así como una rápida colonización del sustrato en seis días, relacionado con una coloración verde oscura refiriendo un alto número de conidios como se observa en la tabla 9, y un aroma dulzón característico, similar a coco (Harman y col, 2004). En el proceso de fermentación líquida en agitación, la apariencia inicial del sustrato solo presentó algunos cambios poco aparentes en la coloración del medio de cultivo y finalmente en la fermentación líquida en reactor la apariencia inicial del medio de cultivo se mantuvo en el tiempo, sin presentar alguna característica significativa de crecimiento del *Trichoderma* sp.

Durante la realización de la primera réplica de la fermentación líquida en reactor, fue evidente que este procedimiento no presenta las características adecuadas para la producción de organismos miceliales, ya que la agitación proporcionada (50 rpm) en este equipo si bien genera una mezcla eficiente, puede causar rompimiento de las estructuras del hongo impidiendo un correcto crecimiento y reproducción del mismo (Pérez y col, 2000). Por lo anterior no se empleó la agitación mecánica sino la aireación para generar la mezcla y permitir el intercambio de gases (Blanco y col, 1999). Sin embargo debido al flujo de aireación (1 vvm) y a la reología del sustrato utilizado, no fue posible generar una mezcla homogénea del inóculo con el sustrato, lo que se evidenció en los resultados obtenidos (Tabla 8.) donde, a pesar de encontrarse un recuento aceptable hay un bajo porcentaje de germinación y pureza del producto. Durante la realización de la segunda y tercera réplica de este procedimiento, el proceso realizado no fue reproducible, ya que no se obtuvo

crecimiento alguno del hongo de interés y por el contrario se evidenció una alta carga contaminante. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Pérez y col. (2000) donde se empleó el medio avena al 6% p/v con 1vvm de aireación con recuentos de  $4.1 \times 10^{11}$  conidios/l.

En trabajos anteriores realizados por Otalora y col. (2001), donde se empleó el medio caldo arroz al 3%, fue posible producir  $3 \times 10^{10}$  conidios/ml a las 60 horas de fermentación, resultados que pueden ser relacionados con los obtenidos en esta investigación donde se obtuvo un recuento de conidios de  $33 \times 10^{15}$  conidios/ml después de ocho días de fermentación a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sin embargo, sería necesaria la realización de una evaluación bajo los mismos parámetros de tiempo, para hacer comparables los datos obtenidos en los dos estudios.

No obstante, y a pesar de tener un recuento de conidios superior al obtenido en otros estudios, tanto el porcentaje de germinación como el porcentaje de pureza, no cumplen los requisitos para el control de calidad establecidos por CENICAFE (Vélez y col, 1997) donde se considera que una formulación debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Este parámetro se define en razón a que una vez el producto sea aplicado en campo se requiere asegurar un efecto rápido sobre la población blanco y un corto periodo de exposición a condiciones medioambientales; así mismo, estas formulaciones deben tener un porcentaje de pureza superior al 90% para garantizar que el producto aplicado contenga el microorganismo de interés. Monzón (2001), indica que un producto de buena calidad debe tener una germinación cercana al 100% a las 24 horas de incubación, ya que en la medida en que un producto pierde viabilidad, se reduce la capacidad de establecerse en campo reduciendo así su efectividad sobre los organismos blanco.

Así, en este caso, se obtienen mejores resultados en biomasa fúngica en la fermentación en reactores de lecho fijo los cuales se recomiendan cuando los agentes de fermentación son hongos filamentosos, debido a que estos organismos son capaces de colonizar el medio sólido y utilizar el oxígeno y el vapor de agua



suministrado por el aire húmedo con el que se alimenta el lecho. Estos reactores por lo general son cilíndricos y el medio sólido (lecho fijo) es retenido en el reactor por un soporte estático, donde el flujo de aire es forzado a través del lecho asegurando el suministro de oxígeno y la remoción de calor (Cavalcanti y col, 2005). Debido a los resultados obtenidos con el proceso de fermentación líquida en reactor en cuanto a germinación de las esporas y pureza del producto final (Tabla 8.), además de la dificultad en la reproducción del procedimiento, no se continuó con la fermentación en reactor.

**Tabla 8. Parámetros evaluados durante la fermentación líquida en reactor**

	<b>FERMENTACION LIQUIDA REACTOR</b>
<b>Concentración de esporas (conidios/ml)</b>	33 X 10 <sup>15</sup>
<b>% Germinación 18 horas</b>	46.8
<b>% Germinación 24 horas</b>	52.4
<b>% Pureza</b>	44.2
<b>Concentración de esporas (conidios/g arroz)</b>	11 X 10 <sup>16</sup>

La producción para el hongo biocontrolador *Trichoderma* sp., fue llevada a cabo con los resultados obtenidos en la fermentación sólida y fermentación líquida en agitación, y los resultados obtenidos durante estos dos procedimientos (Tabla 9.), fueron analizados estadísticamente empleando las pruebas Wilcoxon Rank (resultados no normales) y Prueba T para dos muestras (resultados normales) arrojando diferencias significativas en cuanto a la concentración de esporas, la germinación a las 18 horas y el porcentaje de pureza, mientras que en el porcentaje de germinación a las 24 horas, no existen diferencias significativas en los dos procesos de producción evaluados.

Las diferencias obtenidas en cuanto a la concentración de conidios en la fermentación sólida y la fermentación líquida en agitación (40 x 10<sup>16</sup> y 37 x 10<sup>15</sup> conidios/ml respectivamente) confirman lo propuesto por Padmasari (2005) y Pérez – Guerra y col. (2003), quienes recomiendan el proceso de fermentación sólida para la obtención de biomasa fúngica, debido a su relativa alta tolerancia a bajas

actividades de agua, su alto potencial para excretar enzimas hidrolíticas y a su morfología.

**Tabla 9. Parámetros evaluados en la selección de proceso de producción \***

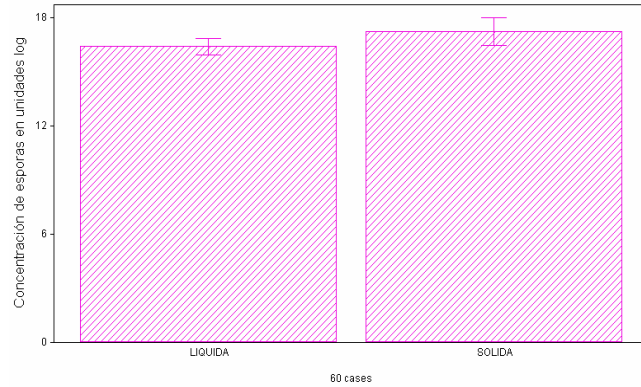
	<b>FERMENTACIÓN SÓLIDA</b>	<b>FERMENTACIÓN LÍQUIDA (AGITACION)</b>
<b>Concentración de esporas (conidios/ml)</b>	40 x 10 <sup>16</sup>	37 x 10 <sup>15</sup>
<b>% Germinación 18 horas</b>	90.4	85.2
<b>% Germinación 24 horas</b>	92	91.2
<b>% Pureza</b>	92.3	76.8
<b>Concentración de esporas (conidios/g arroz)</b>	52 x 10 <sup>15</sup>	24 x 10 <sup>16</sup>

\*datos correspondientes a cinco repeticiones

Los hongos filamentosos son caracterizados como organismos que crecen por la repetida interacción de módulos para alcanzar un patrón de ramificación. La hifa tubular que emerge de la espора, se elonga en la punta y al mismo tiempo que se elonga la hifa se forman nuevas ramificaciones. Las ramificaciones continúan bifurcándose para formar una red porosa tridimensional de hifas, lo que se conoce como micelio. Estas características morfológicas, únicas de los hongos filamentosos son apropiadas para colonizar y penetrar el sustrato sólido en la búsqueda de nutrientes (Padmasari, 2005).

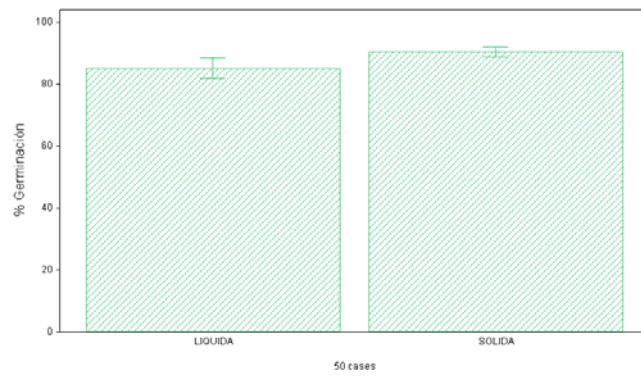
Así, durante el proceso de fermentación sólida, gracias a la realización de las matrices en bolsas de polipropileno, fue posible realizar una mezcla exitosa del sustrato con el microorganismo, facilitando una mayor conversión del arroz. La mezcla de la biomasa con el sustrato es considerada uno de los puntos de control importantes ya que en comparación con la fermentación líquida en donde la biomasa microbiana, así como el sustrato, están distribuidos de manera homogénea en una fase líquida, durante la fermentación sólida se involucran interacciones heterogéneas de la biomasa microbiana con un sustrato sólido húmedo (Padmasari, 2005). Por esta razón, la posibilidad de realizar mezcla en este proceso favorece el contacto de la biomasa microbiana con la totalidad del sustrato, lo que se ve reflejado en la recuperación de 40 x 10<sup>16</sup> conidios/ml en el proceso de fermentación sólida. En las figuras 14a a 15b se observan los análisis estadísticos de los datos de

los parámetros de calidad obtenidos durante la fermentación líquida en agitación y la fermentación sólida.



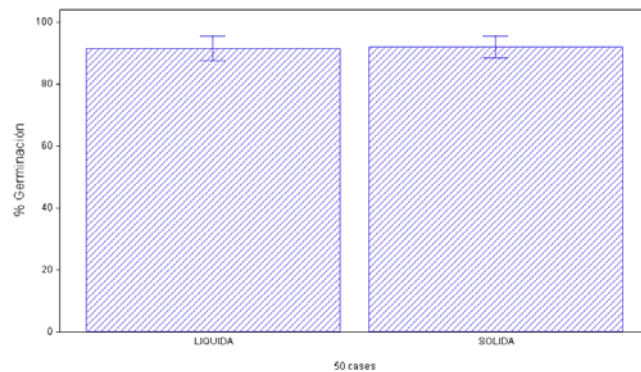
**p= 0.00001**

**Figura 14 A. Análisis Estadístico Concentración de Esporas Fermentación líquida vs. Fermentación sólida**



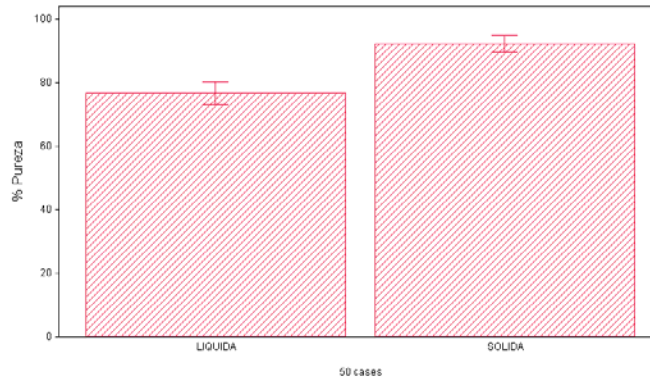
**p= 0.0010**

**Figura 14 B. Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 18 horas Fermentación líquida vs. Fermentación sólida**



**p= 0.2830**

**Figura 15 A. Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 24 horas Fermentación líquida vs. Fermentación sólida.**



**p= 0.00001**

**Figura 15 B. Análisis Estadístico Porcentaje de Pureza Fermentación Líquida vs. Fermentación sólida**

Del mismo modo los resultados obtenidos durante la fermentación líquida con una agitación de 100rpm a una temperatura constante de 25°C empleando el caldo arroz al 3% indican que este procedimiento, a pesar de producir una cantidad de biomasa representativa ( $37 \times 10^{15}$  conidios/ml), presenta inconvenientes que lo hacen poco interesante para la producción industrial. Algunas casas productoras de formulaciones (Controladores biológicos, Chile) cuya base es el hongo *Trichoderma* sp., optan por el proceso de fermentación sólida, cuyo producto final son esporas con paredes más gruesas asegurando una mayor persistencia del hongo en condiciones adversas y poseen propiedades hidrofóbicas por la acumulación de proteínas en la pared, lo que asegura una mayor adherencia a la superficie de las plantas y otros hongos (Controladores biológicos, 2006). Por el contrario en el proceso de fermentación líquida el resultado final es micelio y clamidosporas cuya pared es más delgada, y no poseen los compuestos que confieren hidrofobicidad por dilución en el medio en el cual están creciendo (Howell, 2003).

Por otro lado, vale la pena mencionar que aunque los dos procesos no presentan diferencias significativas en cuanto a la germinación a las 24 horas, a las 18 horas si se evidencian diferencias; pues el producto obtenido durante la fermentación sólida germinará en un menor periodo de tiempo, disminuyendo la duración de la exposición del hongo a condiciones ambientales adversas así como el tiempo de establecimiento en campo (Vélez y col, 1997).

Otra de las ventajas que presentó la fermentación sólida, fue la posibilidad de aplicación del producto en campo sin necesidad de la remoción previa de conidios, ya que esta presentación del inoculante puede ser mezclado en agua con agitación mecánica para la remoción de los conidios y aplicado una vez decante el sustrato no consumido, o filtrado, o aplicado directamente al suelo, debido a que esta matriz es un material orgánico que puede ser fácilmente transformado en campo (Torres y col, 2002).

Así mismo, el producto obtenido en las fermentaciones líquidas requiere del lavado con algún tipo de sustancia que permita la remoción de conidios, ya que por las características del medio este puede generar taponamiento de boquillas si no hay una correcta decantación del sustrato no consumido, sin embargo, debido a que la base del medio sigue siendo un material orgánico, este puede ser aplicado directamente al suelo (Torres y col, 2002).

Así se puede decir que existen diferentes formulaciones de hongos antagonistas y su uso depende del modo de acción. Para uso comercial el material seco es el preferido por la importancia del peso y la manipulación de los productos durante la comercialización. Las hifas son poco resistentes al secado, por lo cual se trabaja en las formulaciones de las formas reproductoras (conidios y clamidosporas) como polvos humectables, polvo seco, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo. Las conidias son más resistentes que las clamidosporas y se producen en mayor cantidad por diferentes medios (Monzón, 2001).

### **5.5 Selección del sustrato de producción para *Trichoderma* sp.**

Durante el análisis estadístico de los resultados obtenidos durante la evaluación de los medios arroz – agua destilada, arroz – melaza al 3% y arroz – melaza al 10%, realizado por medio de las pruebas Kruskal – Wallis (resultados no normales) y ANOVA (resultados normales), se presentaron diferencias significativas entre los tres medios de cultivo en los cuatro parámetros evaluados, evidenciándose que el medio de arroz y agua destilada representa una mejor opción para la producción de este hongo. En la tabla 10 y figuras 16 a 19, se presentan los resultados obtenidos

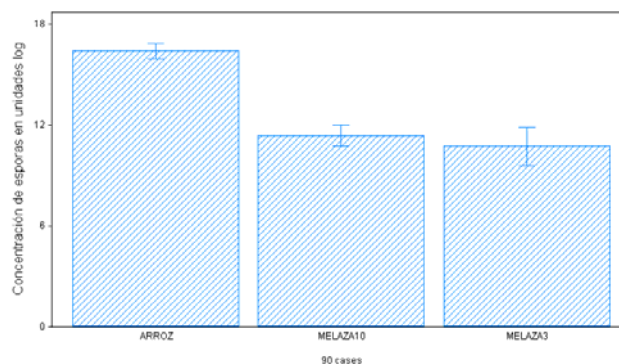
con este medio, que cumplen con los requisitos establecidos por Vélez y col. (1997) y por Monzón (2001) para el control de calidad de formulaciones de hongos; donde una formulación comercial debe tener una germinación superior a 85% en un tiempo de incubación de 24 horas y un porcentaje de pureza superior del 90%.

Dentro de los sustratos empleados con más frecuencia para la producción de *Trichoderma* sp. se encuentra el arroz, y como reportan Otalora y col. (2001) el crecimiento en este sustrato es bastante bueno, ya que presenta recuentos hasta de  $3 \times 10^{10}$  conidios/ml en un periodo de 60 horas de fermentación, su disponibilidad en el mercado es amplia y de bajo costo, lo que beneficia los intereses de producción industrial, que se evidencia por la rapidez de crecimiento y la significativa producción de conidios comparado con el medio avena 6% p/v empleado por Pérez y col., (2000) en donde se produjo un recuento de  $1.2 \times 10^{14}$  conidios/ml a las 96 horas de cultivo.

**Tabla 10. Resultados evaluación de sustratos para producción \***

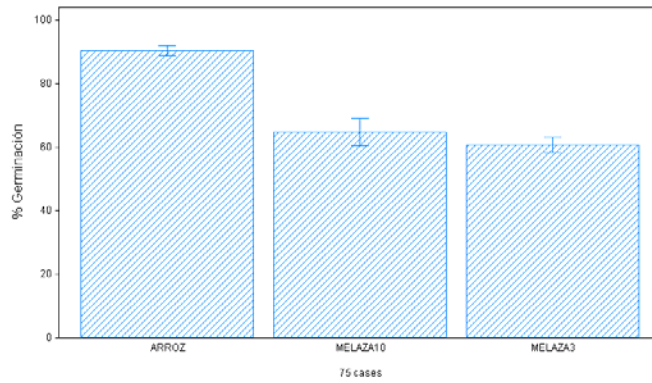
	Arroz – Agua destilada	Arroz – Melaza 3%	Arroz – Melaza 10%
<b>Concentración de esporas (conidios/ml)</b>	$40 \times 10^{16}$	$23 \times 10^{10}$	$50 \times 10^{10}$
<b>% Germinación 18 horas</b>	90.4	60.76	64.8
<b>% Germinación 24 horas</b>	92	61.24	65.1
<b>% Pureza</b>	92.3	42.2	38.5

\*Datos correspondientes a cinco repeticiones



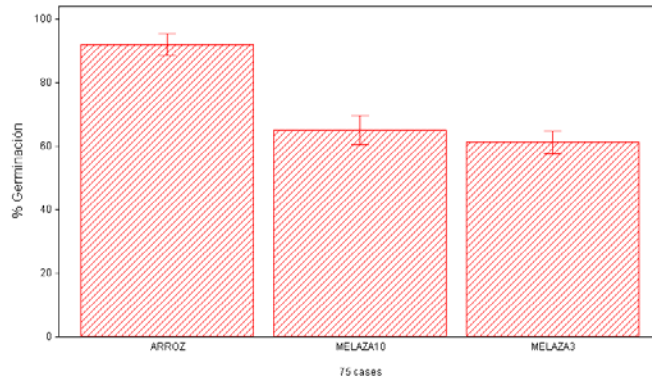
**p= 0.0001**

**Figura 16. Análisis Estadístico Concentración de Esporas en evaluación de Medios de cultivo**



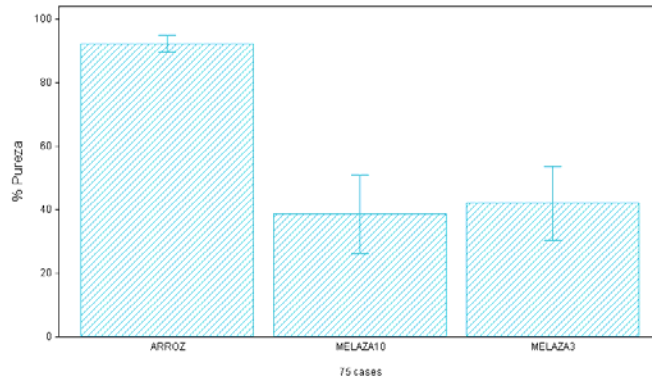
**p= 0.00001**

**Figura 17. Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 18 horas en evaluación de Medios de cultivo**



**p= 0.00001**

**Figura 18. Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 24 horas en evaluación de Medios de cultivo**



**p= 0.00001**

**Figura 19. Análisis Estadístico Porcentaje de Pureza en evaluación de Medios de cultivo**

En el medio de cultivo con arroz y agua destilada *Trichoderma* sp., creció de manera abundante y uniforme sobre la superficie del sustrato conforme se realizaba el proceso de mezcla manual diariamente (Figura 20); inicialmente se evidenció la formación de micelio de color blanco y posteriormente se observó un cambio gradual en la coloración a verde oscuro debido a la esporulación del hongo. Una vez finalizado el tiempo de incubación (ocho días a 25°C) se realizó el recuento de conidios mediante la técnica de recuento en cámara de Neubauer (Monzón, 2001; Vélez y col, 1997), obteniéndose  $40 \times 10^{16}$  conidios/ml, una producción de conidios abundante que pudo deberse a que el arroz es un sustrato rico en carbono representado en almidón, aproximadamente 70% (FENDA, 2003), proteínas y todos los elementos traza (Mg, Zn y Cu) que requiere *Trichoderma* sp., para su crecimiento, aportando los elementos más importantes para el desarrollo de este microorganismo (Moore – Landecker, 1996).



**Figura 20. Crecimiento de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo arroz y agua destilada**  
**Fuente: Autor**

Por otro lado, es importante resaltar que durante la realización de la evaluación de los medios de producción, donde se adicionó melaza, independientemente de la concentración, se presentaron inconvenientes en cuanto a contaminación a pesar de que los tres medios evaluados fueron esterilizados previo a la inoculación del microorganismo y se empleó en los tres el mismo inóculo. Estos resultados contradicen lo propuesto por Pérez y col. (2000), donde se empleó la melaza en las concentraciones de 3% y 10% obteniendo resultados satisfactorios en cuanto a producción de conidios del hongo biocontrolador *Trichoderma* sp.



Debido a que la melaza es un subproducto de la industria azucarera, rico en nutrientes que incluyen azúcares tales como sacarosa, rafinosa, algunos ácidos orgánicos, proteínas elementos como calcio, cloro magnesio, potasio y fósforo entre otros (FENDA, 2003), posee un mayor riesgo de contaminación microbiana, ya que fueron observados microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos (bacilos) y algunos esporulados; microorganismos que no son eliminados con el proceso de esterilización utilizado en este estudio (7 minutos a 121°C) y que requieren procedimientos más rigurosos.

A raíz de la alta carga microbiana que posee la melaza de caña y a la facilidad de contaminación de la misma, el proceso requerido para una óptima esterilización incluye la preparación de una solución melaza al 10%, la cual es centrifugada tres veces a 800 rpm durante diez minutos; después de cada proceso de centrifugación se descarta el pellet, una vez realizadas las centrifugaciones, se realiza una esterilización en autoclave durante veinte minutos a 18 libras de presión y finalmente para obtener un producto estéril se adiciona cloramfenicol al 0.3% (Fajardo y col., estudio en ejecución). De esta forma, y considerando que con cualquier método y medio de cultivo de producción, el objetivo final es garantizar pureza del producto, no se consideró pertinente la implementación de este procedimiento de esterilización de la melaza y por tanto este fue uno de los motivos por los cuales el empleo de la melaza fue descartado como posible medio de cultivo para la producción de *Trichoderma* sp.

Así mismo, y como se mencionó anteriormente, existen diferencias estadísticamente significativas, que descartan los medios melaza al 3 y 10%, siendo así el medio arroz y agua destilada el más apropiado para la producción de *Trichoderma* sp.

## **5.6 Evaluación de las condiciones de cultivo para la producción de *Trichoderma* sp.**

Para la evaluación de las condiciones de temperatura y exposición de luz se establecieron nueve tratamientos donde se combinaron las temperaturas 20, 25 y 30°C con períodos constantes de exposición de luz y oscuridad y períodos alternos

de 24 horas luz 24 horas oscuridad. Los resultados de las evaluaciones se observan en la tabla 11.

**Tabla 11. Parámetros evaluados en la selección de las condiciones de cultivo para la producción de *Trichoderma* sp. \***

TRATAMIENTOS		Conidios/ml	% Germinación 18 horas	% Germinación 24 horas	% Pureza
Luz	30°C	11 x 10 <sup>11</sup>	59.9	66.5	60.2
	25°C	45 x 10 <sup>18</sup>	88	96	92.1
	20°C	29 x 10 <sup>15</sup>	82.4	92.2	91
Oscuridad	30°C	32 x 10 <sup>11</sup>	62.6	77.6	78.2
	25°C	13 x 10 <sup>16</sup>	87.6	93.6	92.7
	20°C	46 x 10 <sup>12</sup>	70.4	81.9	90.9
Periodos Alternos	30°C	15 x 10 <sup>11</sup>	65.8	69.9	78.4
	25°C	13 x 10 <sup>18</sup>	80.1	93.1	92.5
	20°C	22 x 10 <sup>13</sup>	73.4	85.9	91.7

\*Datos correspondientes a tres repeticiones

En los tratamientos donde la temperatura empleada fue 30°C fue evidente la contaminación bacteriana, debido a la apariencia descompuesta del arroz en algunos sectores de la matriz, lo cual se refleja en los porcentajes de pureza del producto. Igualmente se presentó mayor crecimiento micelial y poca esporulación del microorganismo, aunque esta temperatura ha sido propuesta como óptima por autores como Nampoothiri y col, (2004) y Stefanova, (1999). Por otra parte en los tratamientos donde la temperatura fue de 20°C, el crecimiento de *Trichoderma* sp., fue razonable (29 x 10<sup>15</sup>, 46 x 10<sup>12</sup> y 22 x 10<sup>13</sup> conidios/ml), teniendo en cuenta que en los reportes consultados ningún autor refiere esta temperatura como apta para un óptimo crecimiento de este hongo filamentoso.

Finalmente, durante la evaluación a 25°C se observó una alta esporulación (13 x 10<sup>16</sup> conidios/ml – 45 x 10<sup>18</sup> conidios/ml); al final de los ocho días de cultivo, las matrices de fermentación presentaron una coloración verde oscura homogénea (Figura 21.) y un característico aroma frutal o dulzón. Los resultados obtenidos en

los parámetros de calidad presentados en la tabla 11 son consistentes con las observaciones realizadas durante la realización de las matrices.

De otro lado la evaluación de la exposición de luz también tuvo un efecto significativo sobre todo en el tratamiento a 25°C donde se obtuvo un recuento de  $45 \times 10^{18}$  conidios/ml; tal como reporta Moore – Landecker (1996), la luz afecta la esporulación de muchos hongos pudiendo ser inhibitoria o estimulando la producción de esporas, y al igual que lo propuesto por este autor, la luz posee un especial efecto estimulante en la producción de esporas en algunas especies de *Trichoderma* sp., ya que la exposición permanente a la luz genera una distribución constante y uniforme de esporas en el medio, mientras que la oscuridad si bien no afecta de manera negativa el crecimiento de este hongo, no estimula el proceso de esporulación y por el contrario lo inhibe.



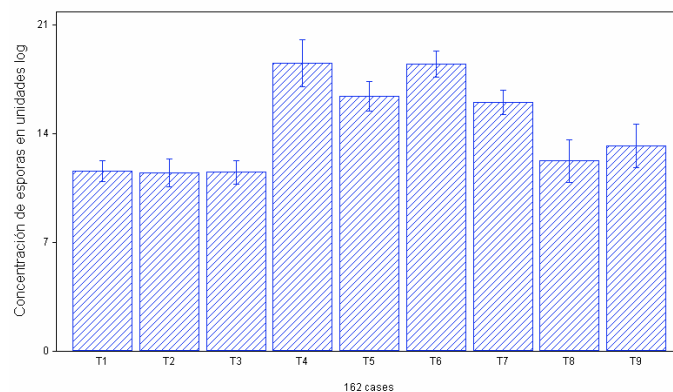
**Figura 21. Crecimiento de *Trichoderma* sp. con exposición constante de luz a 25°C**  
Fuente: Autor

En este estudio los tratamientos con luz constante presentaron mayor número de conidios/ml a 20 y 25°C ( $29 \times 10^{15}$  y  $45 \times 10^{18}$  conidios/ml respectivamente), seguidos de los tratamientos con periodos alternos de 24 horas luz – 24 horas oscuridad a 20°C y 25°C ( $46 \times 10^{12}$  y  $13 \times 10^{16}$  conidios/ml respectivamente) donde también se apreció una buena esporulación del hongo producto de los períodos de exposición a la luz, y finalmente los tratamientos con un menor número de conidios/ml fueron los tratamientos sin exposición a la luz, donde si bien hubo

crecimiento abundante del hongo en su mayoría este estuvo representado por micelio aunque también hubo producción de conidios en estos tratamientos.

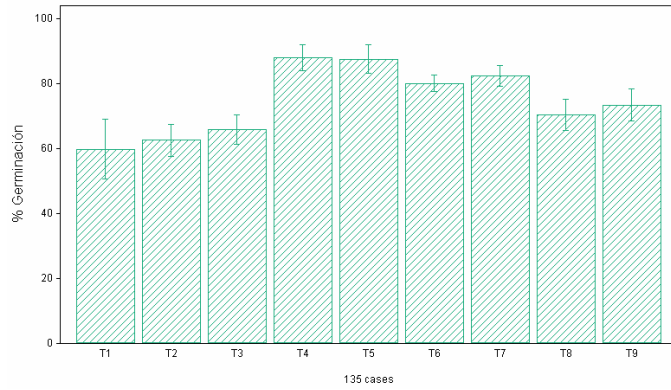
De esta forma y con los resultados obtenidos, se observa que la condición que más influye en el crecimiento de *Trichoderma* sp., es la temperatura, ya que en los tratamientos a 30°C independientemente de la exposición a luz, no se evidenciaron los mismos efectos positivos en cuanto a la esporulación obtenidos en las temperaturas 20 y 25°C.

En el análisis estadístico de estos resultados (Figuras 22 a 25) realizado por medio de las pruebas Kruskal – Wallis (resultados no normales) y ANOVA (resultados normales), se observan las diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en los parámetros de calidad, siendo el tratamiento de luz constante a 25°C, el que proporciona las condiciones más apropiadas para el cultivo de *Trichoderma* sp. El recuento de conidios estuvo en  $45 \times 10^{18}$  conidios/ml, con una germinación de 96%, y una pureza de 92.1%, obedeciendo los parámetros para control de calidad establecidos por Monzón (2001) y Vélez y col. (1997). Como se observa en la tabla 12, los tratamientos que presentan las condiciones más apropiadas para la producción del hongo biocontrolador *Trichoderma* sp., son T4 y T5, que consistieron de una exposición permanente de luz a 25°C y de períodos alternos de 24 horas luz – 24 horas oscuridad a 25°C respectivamente.



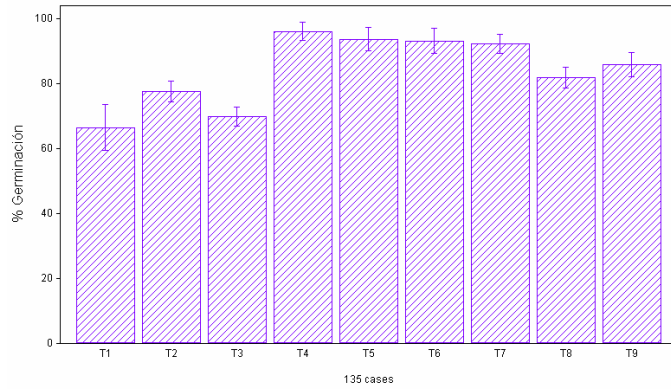
**p= 0.0019**

**Figura 22. Análisis Estadístico Concentración de Esporas en evaluación de Condiciones de cultivo**



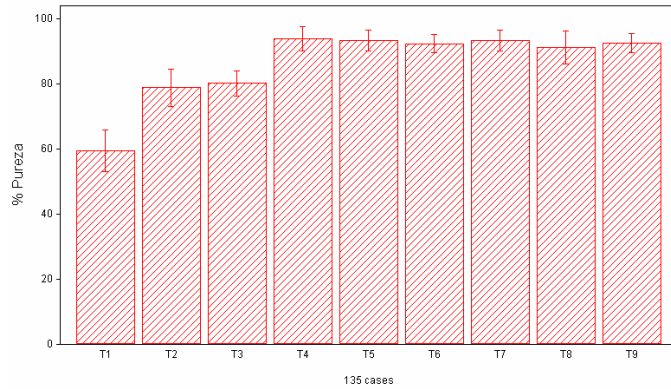
**p= 0.0002**

**Figura 23. Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 18 horas en evaluación de condiciones de cultivo**



**p= 0.0033**

**Figura 24. Análisis Estadístico Porcentaje de Germinación a 24 horas en evaluación de condiciones de cultivo**



**p= 0.00001**

**Figura 25. Análisis Estadístico Porcentaje de Pureza en evaluación de condiciones de cultivo**

Así, las condiciones apropiadas para obtener un adecuado recuento de conidios durante el cultivo de *Trichoderma* sp., es un cultivo de ocho días con exposición permanente o alterna de luz a una temperatura constante de incubación de 25°C, condiciones similares a las propuestas por Torres y col. (2002), donde en un cultivo en matriz sólida de arroz con exposición permanente a la luz y a una temperatura de 22°C, se obtuvo un recuento de conidios de  $9.6 \times 10^{11}$  conidios/g de medios esporulado.

**Tabla 12. Resumen estadística de tratamientos para la evaluación de las condiciones de producción de *Trichoderma* sp.**

	TRATAMIENTO	GRUPOS HOMOGENEOS
Conidios/ml	T4	A
	T6	A
% Germinación 18 horas	T4	A
	T5	A
% Germinación 24 horas	T4	A
	T5	A
% Pureza	T5	A
	T6	A

**T4: Luz constante a 25°C, T5: Oscuridad constante a 25°C, T6: Periodos alternos de 24 horas luz 24 horas oscuridad a 25°C**

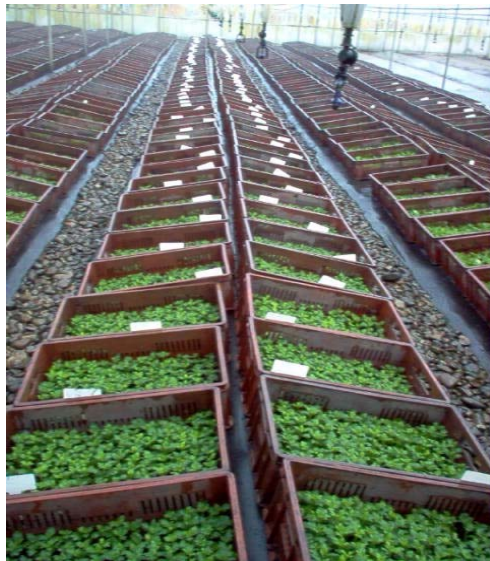
### 5.7 Ensayos de enraizamiento en crisantemo (*Dendranthema graniflora*)

Finalizado el ensayo realizado en las camas de enraizamiento, se realizaron evaluaciones de las variables peso fresco foliar (g), peso fresco radicular (g), longitud foliar (cm), longitud radicular (cm) y peso seco foliar, para esto se tomaron 50 plántulas de cada tratamiento teniendo en cuenta la distribución de los mismos (Figura 26), del mismo modo se evaluó la presencia de los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., y *Rhizoctonia* sp., así como del bioinoculante *Trichoderma* sp. en diez muestras de suelo.

La evaluación de estas variables se realizó con el fin de establecer si los tratamientos propuestos tenían algún efecto significativo durante el período de enraizamiento, que aunque se realiza en doce días, es definitivo para el desarrollo

total de la planta, ya que en este se pretende obtener plántulas con raíces cortas pero gruesas que incrementen el vigor de la planta (Linares, 2005). En la figura 27 se observa el aspecto final de las plántulas una vez realizado el proceso de enraizamiento.

En los cultivos de flores durante la propagación, se busca la obtención de un genotipo a gran escala, siendo este procedimiento muy útil, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la capacidad de totipotencia que tienen las células vegetales es decir la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así durante el proceso de enraizamiento se produce la formación de raíces adventicias asegurando una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz (Olmos y col, 2004).



**Figura 26. Distribución de los tratamientos en banco de enraizamiento**

Varios factores que afectan el enraizamiento han sido discutidos ampliamente, y la utilización de reguladores de crecimiento no evita la necesidad de otras prácticas recomendadas de propagación, como son la selección de buenos materiales para plántulas, la utilización de un buen método de enraizamiento, el mantenimiento de una humedad adecuada y la elección de condiciones apropiadas de luz, ventilación,

temperatura y humedad, todos los cuales son requisitos previos para la iniciación de las raíces sea óptima (Weaver, 1990).



**Figura 27. Plántulas enraizadas**

Según Cuquel y col. (1992), antes de la siembra, los esquejes son tratados con reguladores de crecimiento (AIB) para aumentar el porcentaje, velocidad, calidad y uniformidad del enraizamiento, consiguiendo bajo estas condiciones un enraizamiento satisfactorio de esquejes de crisantemo en ocho días; sin embargo, en este estudio el proceso de enraizamiento tomo doce días para obtener raíces cortas y fibrosas, aptas para el trasplante a camas de producción.

No obstante, en ocasiones el prendimiento se incrementa mediante el pretratamiento de las plántulas con sustancias de crecimiento. La mayoría de las plantas herbáceas incluyendo crisantemos, responden bien al tratamiento mediante reguladores de crecimiento. En ocasiones se producen efectos tóxicos iniciales como son la inclinación de los tallos y los daños causados a las raíces y se pierden muy pocas plántulas (Weaver, 1990). De esta forma y durante la evaluación de las plántulas en el banco de enraizamiento bajo las condiciones del ensayo, si bien hubo pérdida de algunas plántulas relacionada con posibles bacteriosis, estas no fueron representativas y pudieron ser causadas por la temperatura y la alta humedad del banco, pero no se observaron efectos negativos relacionados con la aplicación de la hormona de enraizamiento.



De acuerdo a los resultados obtenidos durante la evaluación de las variables en el proceso de enraizamiento y al análisis estadístico de los mismos llevado a cabo por medio de las pruebas Kruskal – Wallis (resultados no normales) y ANOVA (resultados normales) observado en la tabla 13, es claro que el tratamiento con un mayor efecto sobre las plántulas durante el proceso de enraizamiento es el T4 (*Trichoderma* sp.), seguido de T6 (*Trichoderma* sp. y caldo microbiano Microagro).

El tratamiento T4 obtuvo los resultados más altos en las variables peso fresco foliar y peso fresco radicular, así como una homogeneidad con otros tratamientos en las variables longitud foliar y peso seco foliar. Estos resultados pueden deberse a las propiedades de algunas especies del género *Trichoderma* sp., para inducir respuestas de defensa en la planta hospedera (Harman y col, 2004), así como a la producción de sustancias similares a hormonas de crecimiento como giberelinas (Márquez y col, 2001).

**Tabla 13. Resumen Estadística de Variables Agronómicas durante el Enraizamiento\***

TRATAMIENTO	VARIABLE AGRONOMICA									
	Peso Seco Foliar		Peso Fresco Radicular		Longitud Foliar		Longitud Radicular		Peso Fresco Foliar	
	RM	GH	RM	GH	M	GH	M	GH	RM	GH
<b>CONTROL</b>	148,4	C	221,6	AB	11,524	C	4,804	BCD	148,4	B
<b>T1</b>	196,7	ABC	179,6	ABC	12,104	ABC	4,86	BC	193,8	AB
<b>T2</b>	174,9	BC	201,1	ABC	11,912	BC	5,49	A	176,6	AB
<b>T3</b>	179,5	ABC	144	C	11,304	C	4,208	E	189,3	AB
<b>T4</b>	229,6	AB	248,8	A	12,732	AB	4,71	BCDE	245,6	A
<b>T5</b>	208,9	ABC	169,7	BC	11,86	BC	4,266	DE	202,4	AB
<b>T6</b>	217,9	ABC	244,5	A	12,958	A	4,948	AB	206,1	AB
<b>T7</b>	248,2	A	194,7	ABC	12,612	AB	4,348	CDE	241,8	A
<b>p</b>	0,00001		0,00001		0,232		0,3505		0,0002	

**Alfa= 0.05, RM= Rango de Mediana, M= Media, GH= Grupos Homogéneos**

**\* Datos Correspondientes a 400 unidades experimentales**

Las giberelinas pueden definirse como compuestos que estimulan la división o la prolongación celular o ambas cosas, estimulando el crecimiento en los internodios más jóvenes y frecuentemente incrementando la longitud de los internodios individuales, mientras el número de internodios permanece sin cambios, el efecto es aún más evidente en la elongación de los brotes de muchas especies, así, se ha

reportado que en cultivos de crisantemo la aplicación de 10ug de giberelinas al punto de crecimiento induce la floración y el crecimiento rápido (Weaver, 1990).

Aunque no se conoce la cantidad de giberelinas producidas por este hongo, es evidente el efecto de dicha sustancia en el cultivo de crisantemo durante el proceso de enraizamiento.

En cuanto al tratamiento T6, este presentó resultados positivos en la variable longitud foliar, y presentó homogeneidad con los resultados obtenidos en T4 en la variable peso fresco raíz y con T2 en la variable longitud radicular. Este resultado puede asociarse a la facultad de algunos de estos caldos microbianos de aportar flora bacteriana responsable de la solubilización de algunos nutrientes del suelo que se encuentran en formas no disponibles o no asimilables para las plantas (FUNDASES, 2006). De esta forma, se ha reportado que el caldo microbiano Microagro, posee diversos microorganismos, entre estos *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, *Aeromonas hydrophyla*, y *Lactobacillus* sp. entre otros (López y col, 2006), caracterizándose *Burkholderia cepacia* por ser una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal, capaz de fijar nitrógeno (Holmes y col, 1998; Richardson y col, 20002).

Por otro lado, es probable que los tratamientos donde se aplicó compost, no presenten resultados superiores, debido al corto tiempo que lleva el proceso de enraizamiento.

Durante el análisis de las diez muestras de suelo, fue evidente la presencia de *Trichoderma* sp. (en promedio en la dilución  $10^{-8}$ ), más no de los fitopatógenos; debido a que en esta investigación no se realizaron aplicaciones de estos hongos a los tratamientos evaluados. Este efecto no puede ser atribuido en su totalidad a la acción de *Trichoderma* sp., a pesar de que en este estudio la cepa empleada demostró un efecto *in vitro* significativo, y varios autores han reportado sus propiedades antagónicas (Carsolio y col, 1999; De la Cruz y col, 1995; Harman y col, 2004, Rey y col, 2000 Whipps, 2001). El sustrato empleado durante el enraizamiento (cascarilla de arroz quemada) fue previamente desinfectado con una

solución de 49 g de cloro granulado en 250 litros de agua y la empresa no tiene reportes de la presencia de estos hongos patógenos de plantas.

### **5.8 Evaluación ensayos en cama de siembra hasta floración**

Una vez finalizó el proceso de enraizamiento, las plántulas fueron sembradas en las camas de cultivo (Figura 28.A y 28.B) de acuerdo a los tratamientos establecidos. Todos los tratamientos a excepción de T1, T4, T8 y T9 tuvieron una siembra adicional en la cual las plántulas empleadas no recibieron hormona de enraizamiento (ácido indol butírico).

Los tratamientos establecidos (Figura 28. C.) fueron ubicados en el bloque 12 nave 4 en las camas pares. La evaluación de los tratamientos incluyó las variables altura, peso fresco de los ramos, peso fresco radicular, peso seco radicular, número de ramos producidos tanto nacionales como de exportación, del mismo modo de evaluó la presencia de los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., y *Rhizoctonia* sp., así como del bioinoculante *Trichoderma* sp.

En la tabla 14., se observan los resultados estadísticos obtenidos durante la medición de la variable altura en los tratamientos con aplicación de hormona de enraizamiento, la cual tuvo cinco mediciones durante el proceso, lo que permitió observar de manera gradual el comportamiento de las plantas en los diferentes tratamientos.

El análisis estadístico realizado por medio de una prueba Kruscal – Wallis a los resultados obtenidos en la evaluación de la variable longitud foliar en los tratamientos con aplicación de hormona de enraizamiento, muestra tres grupos homogéneos, indicando que los tratamiento T4 y T5 ambos consistentes en fertirriego, compost, microagro y *Trichoderma* sp., generan plantas con una longitud foliar sobresaliente con respecto a los demás tratamientos.



Figura 28. A y B. Transplante de plántulas enraizadas a camas de siembra.  
 C. Establecimiento de tratamientos en camas de siembra  
 Fuente: Autor

Tabla 14. Resumen Estadística Variables Agronómicas en camas de producción,  
 Tratamientos con Aplicación de Hormona de Enraizamiento\*

TRATAMIENTO	VARIABLE AGRONOMICA					
	Longitud Foliar		Peso Fresco Radicular		Peso Seco Radicular	
	RM	GH	RM	GH	RM	GH
<b>CONTROL</b>	224,7	B	260,4	ABC	252,1	AB
<b>T1</b>	181,6	B	189,6	C	196,4	B
<b>T3</b>	47,1	C	93	D	171,3	B
<b>T4</b>	368,6	A	317	A	290,3	A
<b>T5</b>	353,4	A	296,9	AB	285,3	A
<b>T6</b>	243,9	B	227,5	BC	224	AB
<b>T7</b>	240,5	B	206,9	C	191	B
<b>T8</b>	185,8	B	235,4	ABC	230	AB
<b>T9</b>	184	B	202,9	C	189	B
<b>p</b>	0,00001		0,00001		0,00001	

Alfa = 0.05, RM= Rango de Mediana, GH= Grupos Homogéneos  
 \* Datos correspondientes a 450 unidades experimentales

Una situación similar se presentó durante el análisis estadístico de la variable longitud foliar en los tratamientos sin aplicación de hormona de enraizamiento, realizado por medio de una prueba ANOVA, donde como se aprecia en la tabla 15, T4 aparece como el tratamiento con una mayor altura foliar (Figura 29.), con diferencias significativas con los otros tratamientos, aunque igualmente es evidente el efecto de la hormona de enraizamiento durante el proceso de producción de las plantas, ya que los tratamientos donde se evaluó el efecto de la ausencia de hormona de enraizamiento presentaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos con aplicación de ácido indol butírico en todas las evaluaciones.

Durante el enraizamiento, el regulador de crecimiento empleado fue la auxina AIB que tiene una actividad débil y los sistemas de enzimas destructores de auxinas, la destruyen en forma relativamente lenta. Un producto químico persistente resulta muy eficaz como estimulante de las raíces. Debido a que el AIB se desplaza muy poco, se retiene cerca del sitio de aplicación. Los reguladores del crecimiento que se desplazan con facilidad pueden causar defectos indeseables de crecimiento en la planta propagada.

**Tabla 15. Resumen estadística Longitud foliar en tratamientos sin hormona de enraizamiento\***

TRATAMIENTO	VARIABLE AGRONOMICA	
	Longitud Foliar	
	M	GH
<b>CONTROL</b>	88,006	ABC
<b>T1</b>	88,216	ABC
<b>T3</b>	89,324	ABC
<b>T4</b>	89,778	A
<b>T5</b>	89,464	AB
<b>T6</b>	87,382	C
<b>T7</b>	87,626	BC
<b>p</b>	0,0961	

**Alfa= 0.05, M= Media, GH= Grupos Homogéneos**

**\* Datos correspondientes a 350 unidades experimentales**

Estos compuestos pueden modificar tanto el tipo de raíces como el número en que se produzcan. El AIB produce un sistema de raíces fuertes y fibrosas, mientras que

los ácidos fenoxiacéticos a menudo producen un sistema de raíces atrofiado y matoso compuesto de raíces dobladas y gruesas (Weaver, 1990). Es posible que el ácido indol butírico, debido a las propiedades que posee, y a la retención del mismo cerca al sitio de aplicación, tenga un efecto a largo plazo involucrado en la elongación de la planta, aunque autores como Arteca (1995) y Weaver (1990), solo mencionan los efectos producidos durante la formación de raíces adventicias.



**Figura 29. Longitud Foliar Tratamiento 4 (Fertirriego + Compost (1x) + Microagro + *Trichoderma* sp.)**

En la tabla 14, se observan los resultados del análisis estadístico de la evaluación de las variables peso fresco y peso seco de la raíz, llevadas a cabo por medio de las pruebas Kruskal – Wallis (resultados no normales) y ANOVA (resultados normales) realizadas únicamente en los tratamientos con aplicación de hormona de enraizamiento, donde se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos, indicando que en las dos variables los tratamientos que generaron una mayor ganancia en peso en la zona radicular de las plantas, fueron los tratamiento T4 y T5, los cuales consistieron en la aplicación de fertirriego, compost, microagro y *Trichoderma* sp.

En la figura 30, se observan raíces pertenecientes al tratamiento T4, las cuales presentaron una estructura bastante ramificada, apta para la toma de nutrientes por parte de la planta. Las plantas requieren elementos esenciales inorgánicos, la mayoría de los cuales se obtienen a partir del suelo: C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl. Estos elementos son absorbidos por las raíces de la planta,

razón por la cual el desarrollo de las mismas es de vital importancia en el desarrollo de esta (Gil, 1995).



**Figura 30. Raíces provenientes del tratamiento T4**

En cuanto a los resultados del análisis estadístico de la variable peso de ramos llevado a cabo por medio de la prueba Kruskal – Wallis, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual puede atribuirse a que la medición de dicha variable, fue realizada finalizando el proceso de corte, es decir con el ultimo pico de producción de flores de las camas de cultivo, no obstante y aunque solo se obtuvo un grupo homogéneo, dentro de este, los mayores valores se presentan en los tratamientos T4, T6 y T5, como se observa en la tabla 16.

Durante la evaluación estadística de la producción de ramos tanto para comercio nacional como para exportación, desarrollada por medio de la pruebas Kruskal – Wallis (resultados no normales) y ANOVA (resultados normales), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 16.). Sin embargo, en la evaluación de ramos de exportación, los tratamientos con los mayores valores fueron T4 y T5; mientras que en la evaluación de la producción de ramos para comercio nacional, los tratamientos con un mayor número de ramos de esta categoría fueron el control negativo y T5, es decir el tratamiento T4, generó un mayor numero de ramos de calidad exportación, disminuyendo el numero de ramos destinados al comercio nacional. El aspecto final de los ramos se observa en la figura 31.

**Tabla 16. Resumen Análisis Estadístico Variables en Producción**

TRATAMIENTO	VARIABLE					
	Peso Ramos		Ramos Nacional		Ramos Exportación	
	RM	GH	RM	GH	M	GH
CONTROL	24	A	20,6	A	21,75	A
T1	22,8	A	15,5	A	24,5	A
T3	24,3	A	19,9	A	23,25	A
T4	31	A	19,6	A	29,75	A
T5	25,3	A	20,4	A	34,5	A
T6	25,4	A	15,5	A	18	A
T7	24,7	A	15,5	A	25,25	A
T8	18,9	A	20,1	A	27,25	A
T9	10,6	A	19,4	A	26,25	A
p	0,5323		0,921		0,6871	

**Alfa= 0.05, RM= Rango de Mediana, M= Media, GH= Grupos Homogéneos**

Una vez analizadas cada una de las variables de manera individual, se hace evidente que el tratamiento T4 consistente en la aplicación de fertiriego, compost, microagro y *Trichoderma* sp., presenta los mejores resultados en la mayoría de variables.



**Figura 31. Ramos de Crisantemo Variedad Yoko Ono**

Los resultados obtenidos en cuanto a longitud foliar son consistentes con los resultados obtenidos por Valencia y Arbeláez(1999), quienes reportan que el empleo de antagonistas como *Trichoderma* sp., estimula el crecimiento y desarrollo de las plantas de crisantemo en comparación con tratamientos testigo. Del mismo modo se reporta un adelanto de quince días en la floración de las plantas en comparación con las plantas testigo, los cuales puede deberse a la producción de sustancias estimuladoras de crecimiento por parte de los antagonistas, mostrando buenas



posibilidades para el uso de estos aislamientos en cultivos ornamentales. Igualmente, Ezziyani y col. (2004) reportan que en plántulas de pimiento tratadas con *Trichoderma harzianum*, el peso seco y la longitud de las plantas fue superior a las no tratadas lo que significa una mayor absorción de nutrientes, parcialmente atribuido al empleo de este inoculante ya que también puede depender de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera, la especie de planta, tipo de sustrato y prácticas culturales empleadas durante el cultivo.

El tratamiento de los sustratos de las plantas con *Trichoderma* resulta en incremento del crecimiento de las plantas; el biocontrol de patógenos de la rizósfera, mejora en la toma de nutrientes, liberación de nutrientes del suelo y la materia orgánica y el incremento en la producción de hormonas de las plantas, pueden explicar parcialmente la respuesta de incremento del crecimiento mediada por *Trichoderma* sp. Sin embargo, otros mecanismos, como la penetración de *Trichoderma harzianum* en la epidermis y la corteza externa, estimulan el sistema de defensa en las plantas llevando a la producción de compuestos bioquímicos y estructurales (Yedidia y col, 1999).

Altomare y col. (1999), sugieren que uno de los mecanismos empleados por *Trichoderma harzianum* para inducir un incremento en el crecimiento de las plantas, es por medio de la solubilización de algunos compuestos. Este hongo es capaz de crecer junto con la raíz durante su elongación, colonizando todo el sistema radicular y beneficiando al cultivo de por vida (Howell, 2003); de este modo, el fósforo que *Trichoderma* solubiliza rápidamente y almacena en la biomasa, es liberado en una forma disponible cerca de las raíces después de la lisis del micelio. Igualmente se ha reportado que los hongos *Pythium* sp. y *Rhizoctonia* sp. son incapaces de solubilizar fosfatos, lo que le otorga una ventaja competitiva a *Trichoderma* sp. en la supresión de estos patógenos de plantas (Altomare y col, 1999).

Muchos micronutrientes son requeridos para la formación del polifenol y otros aspectos del metabolismo fenólico, y por ende son cruciales para el desarrollo de habilidades de defensa de las plantas (Gil, 1995). Dentro de estos micronutrientes, se ha reportado que el manganeso es uno de los más importantes en el desarrollo

de resistencia de las plantas en las enfermedades de origen fúngico tanto en la raíz como en las zonas foliares (Altomare, 1999). El manganeso es requerido para la realización de varias funciones fisiológicas de las plantas, tales como fotosíntesis, metabolismo del nitrógeno, y síntesis de compuestos aromáticos como precursores de algunos aminoácidos, hormonas (auxinas), y fenoles (Gil, 1995). Altomare y col. (1999), indican que el hongo *Trichoderma harzianum* tiene la habilidad de solubilizar  $MnO_2$  de su componente en la fase sólida, al menos en estudios *in vitro*.

Del mismo modo se ha propuesto que algunos metabolitos o constituyentes de *Trichoderma harzianum* como péptidos, proteínas y quitina pueden estar involucrados en la quelación de Fe, los cuales a diferencia de los sideróforos producidos por algunas bacterias involucradas en el control biológico, no requieren deficiencia de Fe en el medio, otra de las ventajas que posee este hongo durante el antagonismo contra hongos patógenos de plantas. Así mismo, se ha reportado que *Trichoderma harzianum* produce metabolitos difusibles capaces de reducir Fe(III) y Cu (II), es decir, este microorganismo, posee habilidades que le permiten ser un eficiente biocontrolador, y del mismo modo le permiten favorecer a las plantas tratadas por medio de la solubilización de nutrientes (Altomare y col, 1999).

Por otro lado, las investigaciones realizadas por Harman y col. (2004), reportan el estudio de la resistencia sistémica e inducida por especies de *Trichoderma* sp., especialmente *Trichoderma harzianum*, resistencia que en muchos casos ha sido relacionada con el antagonismo ejercido por medio del microparasitismo, pero que después de la evaluación del sitio de control y la ubicación del *Trichoderma* sp., se ha concluido que el efecto se debe a resistencia inducida en las plantas, en algunos casos debido a la habilidad de estas cepas de inducir terpenoides fitoalexinas que son compuestos de defensa. Del mismo modo, se ha propuesto que algunas de las moléculas bioactivas que son liberadas por la acción de las enzimas degradadoras secretadas por *Trichoderma* sp., funcionan como inductores de los genes de la cascada de antagonismo en *Trichoderma* y algunas también funcionan como inductores de los mecanismos de defensa en las plantas. Otro de los mecanismos planteados para la resistencia sistémica inducida, ha sido la capacidad de colonización de las raíces por las cepas de *Trichoderma*, ya que se ha observado la

formación de características morfológicas similares a las observadas durante el micoparasitismo, ya que la hifa invade la epidermis de la raíz, penetración que usualmente se limita a la primera o segunda capa de células.

La síntesis de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) es uno de los mecanismos de defensa más comunes activado por las plantas después de la infección con agentes inductores. El estudio realizado por Yedidia y col. (1999) indica que después de la aplicación de *Trichoderma* sp. a las semillas de pepino, se observa un incremento en la producción de las proteínas PR, del mismo modo se observa un incremento en la actividad quitinasa y peroxidasa tanto en las raíces como en las hojas de las plantas tratadas 48 horas después de la inoculación.

Tanto en investigaciones académicas como en la práctica, *Trichoderma harzianum* ha demostrado incrementar el desarrollo radicular en varias especies de plantas, lo que conlleva a un incremento en la tolerancia a la sequía y probablemente a una mayor resistencia en suelos compactos. Estos incrementos en el desarrollo radicular están frecuentemente asociados con incremento en producción y biomasa. (Harman y col, 2004). Aunque algunos estudios reportados por Harman y col, indican que el incremento en el crecimiento y en la producción de las plantas tratadas con *Trichoderma* sp., es más evidente bajo condiciones de estrés, que en condiciones óptimas en invernaderos donde no se observa dicho incremento, durante la realización de esta investigación, los efectos de la aplicación de *Trichoderma* sp., fueron visibles, aún cuando en los invernaderos donde se realizó este estudio fueron proporcionadas las condiciones adecuadas de temperatura, humedad y nutrición para el desarrollo apropiado de estas plantas.

No obstante, y a pesar de conocer los efectos positivos generados por las cepas de *Trichoderma* sp., los fenómenos en la rizósfera son complejos y las diferencias obtenidas entre los tratamientos evaluados son difíciles de atribuir a un solo factor. Existe la probabilidad de que los exudados de las raíces de las plantas de crisantemo varíen según el sustrato donde crecen y esto tenga un efecto sobre la fisiología de los microorganismos asociados a la rizósfera, así como en las rizobacterias promotoras de crecimiento, presentes en el caldo microbiano

Microagro, y como consecuencia altere la producción de algunas sustancias o la capacidad de estos microorganismos para solubilizar algunos nutrientes para las plantas (Atlas & Bartha, 1992; Ezziyyani y col, 2004; Sylvia y col, 1998). Del mismo modo la composición de las comunidades microbianas en el sustrato empleado para el crecimiento de las plantas de crisantemo, pudo haber afectado la intensidad de la fungistasis que pudo generar supresión de la germinación y crecimiento de algunos hongos, entre estos hongos fitopatógenos (De Boer, y col, 2003).

De este modo, la aplicación de *Trichoderma* sp., combinada con el inoculante Microagro, tuvo un mayor efecto en las variables evaluadas en este estudio, lo que puede atribuirse a las propiedades de los dos compuestos; teniendo en cuenta los efectos benéficos generados por *Trichoderma* sp. previamente mencionados, y a que los microorganismos presentes en el caldo Microagro pudieron contribuir de manera significativa en la obtención de los resultados.

Así, *Burkholderia cepacia* es un bacilo Gram negativo que puede ser usado como un agente de control biológico debido a que produce múltiples antibióticos contra hongos patógenos de plantas. Esta bacteria tiene la habilidad de metabolizar diferentes hidrocarburos encontrados en pesticidas y herbicidas comerciales, descontaminando el ambiente de estas toxinas; y también ha sido considerado como rizobacteria promotora de crecimiento (Holmes y col, 1998; Marolda y col, 1999). Igualmente ha sido determinada su afinidad por la asociación a la rizósfera de plantas (Ramette, 2005), y su capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos, incrementando el crecimiento vegetal (Richardson y col, 2002), factores que explicarían los resultados obtenidos durante la producción del cultivo de crisantemo.

Por otro lado, los microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* si bien no han sido ampliamente reportados como microorganismos con potencial biofertilizante (López y col, 2006), pueden participar activamente dentro del inoculante por medio de la producción de sustancias antibacteriales tipo bacteriocinas (nistatina, ácidos orgánicos) y sustancias antifúngicas (ácido-3-

fenilacético), afectando a diferentes tipos de microorganismo patógenos del suelo (Lowe y Arendt, 2004; Ström, 2005).

## 6. CONCLUSIONES

- A partir de los aislamientos de cepas de *Trichoderma* sp., realizados en muestras de suelo, no fue posible obtener ninguna con características biocontroladoras sobre hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. mientras la cepa, proveniente del cepario de biotecnología presentó porcentajes de antagonismo *in vitro* de 45.1, 46.5 y 62.5%.
- El proceso de fermentación sólida en matrices de polipropileno, resultó ser el método más apropiado para la producción de conidios del hongo *Trichoderma* sp., obteniendo  $40 \times 10^{16}$  conidios/ml después de ocho días de fermentación, con un porcentaje de germinación del 92% a las 24 horas y un porcentaje de pureza de 92.3%.
- El medio arroz – agua destilada presenta varias ventajas frente a los medios melaza al 3 y 10%, en cuanto a la concentración de conidios, porcentaje de germinación y pureza, además de no requerir tratamientos térmicos intensos para la esterilización, lo que facilita su producción en cultivos de ornamentales.
- Se estandarizaron las condiciones luz constante y temperatura 25°C durante ocho días, para el cultivo de *Trichoderma* sp., en fermentación sólida con medio arroz – agua destilada, obteniendo una producción de  $45 \times 10^{18}$  conidios/ml.
- Con relación a los resultados obtenidos en las pruebas de enraizamiento en crisantemo, el mayor peso fresco foliar (2.6 g) y radicular (0.8 g) se obtuvo en los tratamientos donde fue inoculado el hongo *Trichoderma* sp., la mayor longitud foliar (13 cm.) se obtuvo en el tratamiento donde fueron inoculados *Trichoderma* sp. y el caldo microbiano microagro, mientras que la mayor

longitud radicular (5.5 cm) y el mayor peso seco foliar (0.2 g), se obtuvieron en los tratamientos donde fue inoculado microagro, y donde fue inoculado *Trichoderma* sp., microagro y compost respectivamente.

- En las pruebas realizadas en producción, los tratamientos con mayor longitud foliar, peso fresco y seco radicular, peso de ramos y mayor número de ramos de exportación, fueron aquellos donde se inoculó *Trichoderma* sp. y el caldo microbiano microagro.

## 7. RECOMENDACIONES

- Realizar el procedimiento propuesto para la esterilización de la melaza y evaluar su efecto en la producción de conidios de *Trichoderma* sp. en matriz de fermentación sólida a una concentración del 3%.
- Desarrollar la identificación hasta especie de la cepa de *Trichoderma*, para profundizar en los aspectos relacionados con el control biológico de patógenos de plantas así como su efecto en las plantas de crisantemo.
- Evaluar el crecimiento de *Trichoderma* sp., en el medio arroz – agua destilada por medio de una curva de crecimiento del microorganismo, para determinar el período de tiempo requerido para la obtención de la mayor cantidad de biomasa fúngica.
- Efectuar pruebas *in vivo* con inoculación de patógenos en suelo en plantas de crisantemo para evaluar y comparar el efecto antagónico de la cepa de *Trichoderma* sp.
- Realizar pruebas de antagonismo entre el hongo *Trichoderma* sp., con los microorganismos presentes en el caldo microbiano Microagro, para identificar las posibles interacciones (antagónicas o sinérgicas) presentes entre *Trichoderma* sp., y los diferentes microorganismos presentes en el caldo microbiano.



- Verificar la producción de compuestos estimuladores de crecimiento vegetal por parte de la cepa de *Trichoderma* sp. como giberelinas y ácido indolacético.
- Caracterizar molecular y metabólicamente esta cepa de *Trichoderma* sp., y evaluar otros posibles efectos benéficos en la agroindustria.

## 8. BIBLIOGRAFIA

**AGRIOS, G.** 2004. Fitopatología. Editorial Limusa. Noriega Editores 838 pp.

**AIT – LAHSEN, H., SOLER, A., REY, M., DE LA CRUZ, J., MONTE, E. and LLOBELL, A.** 2001. An Antifungal Exo -  $\alpha$  -1-3-Glucanase (AGN13.1) from the Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, N. 12, p. 5833 – 5839.

**ALEXOPOULOS, C., MIMS, C. and BLACKWELL, M.** 1996. Introductory Mycology. 4<sup>th</sup> Edition. John Wiley & Sons. New York. 869 pp.

**ALTOMARE, C. NORVELL, W.A. BJÖRKMAN, T. and HARMAN, G.E.** 1999. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum*. Rifai1295-22. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65. No, 7. p. 2926-2933.

**ANGARITA, A.** 2005. Guías de Laboratorio Control Biológico. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota, Colombia.

**ARANGO, M., ORDOÑEZ, N., CASTAÑEDA, E., y RESTREPO, A.** 1988. Manual hongos contaminantes del laboratorio. Instituto Nacional de Salud. Corporación para Investigaciones Biológicas. 127 pp.

**ARNAUD, A., BERNARD, M., BERSET, C., BOCQUET, J., BOUIX, M., ROSNAY, J., DUBUIS, T., GALZY, P., GOURSAUD, J., GUIRAUD, J., KUBIAK, C., LARRIEU, J., LEVEAU, J., POURQUIE, J., RICHARD, H., SCRIBAN, R y VANDECASTEELE, J.** 1985. Biotecnología. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. 669 pp.

**ARTECA, R.** 1995. Plant Growth substances. Principles and applications. Ed. Chapman & Hall. New York. pp. 332.

**ASOCOLFLORES.** 1995. Segundo Simposio Nacional del Crisantemo: Plagas y Enfermedades. Chrysanthemum Breeders Association n.v. Rionegro – Antioquia, Colombia. 114 pp.

**ASOCOLFLORES,** 2002. Guía ambiental para la floricultura. Ministerio del Medio Ambiente. Colombia. 122p.

**ATLAS, R.M. & BARTHA, R.** 1992. Microbial Ecology, Fundamentals and applications. Third edition. Ed. Benjamín/Cummings. Redwood City, USA. p. 69-73, 77-83, 463-466.

**BAE, Y. & KNUDSEN, G.** 2000. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with  $\beta$  - glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66 No 2 p. 810 – 815.

**BALL, V.** 1998. Ball RedBook. 16<sup>th</sup> Edition. Ball Publishing. 802 pp.

**BARNETT, H. & HUNTER, B.** 1972. Illustrated Genera of imperfect fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. 241 pp.

**BIGIRIMANA, J.** 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. Med. Fac Landbouww. Gent. Vol 62 p. 1001 – 1007.

**CAMARGO, S., GARCIA, V. y MUCIÑO, R.** 2000. ¿Qué es la fitopatología? Hongos fitopatógenos del crisantemo [*Dendranthema morifolium* (Ramat) Tzvelev], un estudio de caso. Contactos. Vol. 37. p.9 - 22.

**CARRILLO, L.** 2003. Los hongos de los Alimentos y Forrajes. Curso de postgrado el doctorado regional de ciencia y tecnología de alimentos. Universidad Nacional de Salta Argentina p. 70 – 78.

**CARSOLIO, C., BENHAMOU, N., HARAN, S., CORTES, C., GUTIÉRREZ A., CHET, I. and HERRERA – ESTRELLA, A.** 1999. Role of *Trichoderma harzianum* Endochitinase gene, *ech42*, in Mycoparasitism. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65, No. 3. p. 929 – 935.

**CAVALCANTI, E., LIMOEIRO, M., GUIMARAES, D., REIS, L. and LIPPEL, G.** 2005. Lipase production by solid – state fermentation in fixed – bed bioreactors. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol 48. p. 78 – 84.

**CHAHAL, D.** 1985. Solid- state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 49 No 1 p. 205 – 210.

**CONTROLADORES BIOLÓGICOS LTDA.** 2006. Características de *Trichoderma* en fermentación sólida. Chile. <http://www.controladoresbiologicos.cl>

**CUBETA, M., CODY, B., KOHLI, Y. and KOHN, L.,** 1997. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in Eastern North Carolina. Phytopathology. Vol. 87, N. 10: 1000 – 1004.

**CUQUEL, F., GRANJA, N., MINAMI, K.** 1992. Avaliação do enraizamento de estacas de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* L.) CV. White reagan 606 tratadas com ácido indolbutírico (IBA). Scientia Agrícola, Piracicaba. Vol 49. N. 1 p. 15 – 22.

**DANIELSON, R.** 1989. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma harzianum*. Soil. Biol. Biochem. Vol 5. p. 495 – 504.

**DE BOER, W., VERHEGGEN, P., KLEIN, P., KOWALCHUK, G. and VAN VEEN, J.** 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 69. N. 2. p. 835 - 844

**DE LA CRUZ, J., PINTOR – TORO, J., BENITEZ, T. and LLOBELL, A.** 1995. Purification and characterization of an Endo -  $\beta$ - 1,6 – Glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of Bacteriology*. Vol. 177. No 7. p. 1864 – 1871.

**DEACON, J.** 2006. *Fungal Biology*. Fourth Edition. Blackwell Publishing. 369 p.

**DELGADO DE KALLMAN, L. y ARBELAEZ TORRES, G.** 1990. Control de *Sclerotinia sclerotiorum* en (Lib.) de Bary en crisantemo y habichuela con diferentes aislamientos de *Trichoderma* y con funguicidas. *Agronomía Colombiana*. Vol. 7: 33-39.

**DOELLE, H., MITCHELL, D. and ROLZ, C.** 1992. *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science. Great Britain. 466 pp.

**DOMSCH, K., GAMS, W. and TRAUTE – HEIDE, A.** 1980. *Compendium of Soil fungi*. Vol. 1. Academic Press. London, U.K. 430 pp.

**EZZIYYANI, M., PEREZ, C., AHMED, A., REQUENA, M. and CANDELA, M.** 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. Vol. 26 p. 35 – 45.

**FAJARDO, E., SARMIENTO, S., QUEVEDO, B.** Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Streptomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fé de Bogotá. Investigación en desarrollo.

**FENDA.** 2003. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 423 pp.

**FUNDASES.** 2006. Efecto de la bacteria *Azotobacter* sp., sobre el desarrollo vegetativo y el rendimiento en la producción de flor en plantas de clavel (*Dianthus* sp.) y pompón (*Dendranthema grandiflora*). Biofertilizantes como alternativa nutricional en ornamentales. Fundación de Asesorías para el Sector Rural.

**GARISTO, B & HARMAN, G.** 2001. Interaction of Ammonium, Glucose, and chitin regulates the Expression of Cell Wall – Degrading Enzymes in *Trichoderma atroviride* Strain P1. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No 12, p. 5643 – 5647.

**GIL, F.** 1995. Elementos de fisiología vegetal. Relaciones hídricas. Nutrición mineral. Transporte. Metabolismo. Ediciones Mundi Prensa. España. pp. 1147

**GRONDONA, I., HERMOSA, R., TEJADA, M., GOMIS, M., MATEOS, P., BRIDGE, P., 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. Vol. 63, No 8. p. 3189 – 3198.

**HARMAN, G., HOWELL, C., VITERBO, A., CHET, I. and LORITO, M.** 2004. *Trichoderma* species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Vol. 2. p. 43 – 56.

**HERMOSA, M., GRONDONA, E., ITURRIAGA, E., DIAZ – MINGUEZ, J., CASTRO, C., MONTE, E. and GARCIA – ACHA, I.** 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66, No 5, p. 1890 – 1898.

**HOLMES, A., GOVAN, J., GOLDSTEIN, R.** 1998. Agricultural Use of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: A Threat to Human Health?. Emerging Infectious Diseases. Vol 4. No 1.

**HOWELL, C.** 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant disease. Vol 87 No 1 p. 4 – 10.

**HOWELL, C. & STIPANOVIC, R.** 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Canadian Journal of Microbiology Vol 29. p. 321 – 324.

**INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA).** 2004. Resolución N. 00375. Disposiciones sobre Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia. Colombia

**KIM, H., SNELLER, C and DIERS, B.** 1999. Evaluation of Soybean Cultivars for Resistance to Sclerotinia Stem Rot in Field Environments. Crop Science, Vol. 39, p. 64 – 68.

**KNUDSEN, G., ESCHEN, D., DANDURAND, L. and WANG, Z.** 1991. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 57 No 10 p. 2864 – 2867.

**KREDICS, L., ANTAL, Z., MANCZINGER, L., SZEKERES, A., KEVEI, F. and NAGY, E.** 2003. Influence of Environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology. Vol 41 No 1 p. 37 – 42.

**KUÇUK, Ç. & KIVANÇ, M.** 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turk, Journal of Biology. Vol. 27. p. 247 – 253.

**KUKLINA, E.** 2003. Flower Development of greenhouse Chrysanthemum. Acta Biologica Cracoviensia. Vol. 45 No 1 p. 173 – 176.

**KULLNIG, C., MACH, R., LORITO, M., and KUBICEK, C.** 2000. Enzyme Diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* Is a Prerequisite for Triggering of *Trichoderma ech42* Gene Expression before Mycoparasitic Contact. Applied and Environmental Microbiology. Vol 66, Npo 5, p. 2232 – 2234.

**LAEMMLEN, F.** 2000. *Sclerotinia* Diseases. University of California. Agriculture and Natural Resources. Agricultural and Natural Resources. University of California, USA.

**LINARES, H.** 2005. El cultivo del Crisantemo. Curso Teórico Práctico. Programa de Jóvenes emprendedores rurales. 31 pp.

**LOPEZ, M., PEREZ, V., MARTINEZ, M., QUEVEDO, B.** 2005. Evaluación de un medio de cultivo no comercial para la producción de un bioinoculante empleado en un cultivo de flores. Trabajo de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fé de Bogotá.

**LOWE, P. and ARENDT, K.** 2004. The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing with Their Relationships to Antifungal Activity, Mycotoxins and Gushing: A Review. J. Inst. Brew. 110(3). 163–180.

**LU, Z., TOMBOLINI, R., WOO, S., ZEILINGER, S., LORITO, M. and JANSSON, J.** 2004. In vivo study of *Trichoderma* – Pathogen – plant Interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. Applied and Environmental Microbiology. Vol 70, N 5. p. 3073 – 3081.

**MACH, R., PETERBAUER, C., PAYER, K., JAKSITS, S., WOO, S., ZEILINGER, S., KULLNIG, C., LORITO, M and KUBICEK, C.** 1999. Expression of two mayor chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different



regulatory signals. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 65, N. 5, p. 1858 – 1863.

**MARGOLLES - CLARK, W., HARMAN, G. and PENTTILA, M.** 1996. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 No 6 p. 2152 – 2155.

**MARGOLLES - CLARK, E., HAYES, C., HARMAN, G. and PENTTILA, M.** 1996. Improved Production of *Trichoderma harzianum* Endochitinase by Expression in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 62, N. 6, p. 2145 – 2151.

**MARQUEZ, M., FRANCO, M., MARTINEZ, M. y PEDROZA, A.** 2001. Aislamiento de *Trichoderma* sp., y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus cariophyllus*) y evaluación de su capacidad antagonica sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Trabajo de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fé de Bogotá.

**MAROLDA, C., HAURODER, B., JOHN, M., MICHEL, R., VALVANO, M.** 1999. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology*. Vol 145. pp. 1509 – 1517.

**MODESTO, J. & FENILLE, R.** 2004. Controle químico da mosca branca (*Hemisia argentifoli* Hemiptera: Aleyrodidae) em crisantemo (*Dendranthema morifolium*). *Arq. Inst. Biol.*, Vol. 71 N. 4 , p. 499 – 502.

**MONZON, A.** 2001. Producción, Uso de Hongos Entomopatógenos, Control de Calidad. Capacitación Productos Fitosanitarios No Sintéticos. Proyecto NOQ-CATIE/GTZ.

**MOORE – LANDECKER, E.** 1996. *Fundamentals of the fungi*. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 574 pp.

**MUKHERJEE, P., LATHA, J., HADAR, R. and HORWITZ, B.** 2004. Role of two G-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70 No 1 p. 542 – 549.

**NAMPOOTHIRI, K., BAIJU, T., SANDHYA, C., SABU, A., SZAKACS, G. and PANDEY, A.** 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. Process Biochemistry. Vol. 39 p. 1583 – 1590.

**OLMOS, S., LUCIANI, G., GALDEANO, G.** 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Micropropagación. En Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología. P. 161 – 172.

**OTAHOLA – GOMEZ, V., ARAY, M., and ANTOIMA, Y.** 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. Revista Científica UDO Agrícola. Vol. 1, N. 1, p. 56 – 63.

**OTALORA, A., MARTINEZ, M. y PEDROZA, A.** 2001. Evaluación de medios de cultivo alternos para la producción de *Trichoderma harzianum*. Trabajo de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fé de Bogotá.

**PADMASARI, Y.** 2005. Fungal Mats in Solid – State Fermentation. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

**PEREZ, A., NASSER, L. and MACHADO, J.** 2002. Use of semi – selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. Fitopatologia Brasileira 27 (2).

**PEREZ, L., RAMIREZ, C, MARTINEZ, M y ALGECIRA, N.** 2000. Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de

*Trichoderma harzianum*. Trabajo de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fé de Bogotá. 153 pp.

**PEREZ-GUERRA, N., TORRADO-AGRASAR, A., LOPEZ-MACIAS, C. and PASTRANA, L.** 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. Vol.2 No.3 p. 343-350.

**PERNEZNY, K. & PURDY, L.,** 2000. Sclerotinia diseases of vegetable and field crops in Florida. Plant Pathology Fact Sheet. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, USA.

**PIZANO, M.** 2001. Floricultura y medio ambiente. Producción de flores sin Bromuro de metilo. División de Tecnología, Industria y Economía del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA DTIE).

**PUMPHREY, B. & JULIEN, C.** 1996. An Introduction to Fermentation.

**RABEENDRAN, N., JONES, E. and STEWART, A.** 1998. Isolation and *in vitro* screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Protection 102-106.

**RAIMBAULT, M.** 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology. Vol 1. N.3 p. 1 – 15.

**RAMETTE, A., LIPUMA, J. and THIEDJE, J.** 2005. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacea* Complex in the Environment. Applied and environmental microbiology. Vol. 71, No. 3.pp 1193-1201.

**REY, M., DELGADO – JARANA, J., RINCON, A., LIMON, C. and BENITEZ, T.** 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de micología. Vol.17 p. s31 – s36.

**RICHARDSON, J.; STEAD, D.; ELPHINSTONE, J. and COUTTS, R.** 2002. Diversity of *Burkholderia* isolates from woodland rhizosphere environments. *Journal of applied microbiology*. 93: 616-630.

**RODRIGUEZ, L. & VERONICA, J.** 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofiticos contra *Rhizoctonia solani* patógeno causante del “damping off” en plantas de tomate. Trabajo de Grado. Microbiología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.

**ROLLINS, J. & DICKMAN, M.** 1998. Increase in Endogenous and Exogenous Cyclic AMP Levels Inhibits Sclerotial Development in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol, 64, No 7, p. 2539 – 2544.

**ROLLINS, J. & DICKMAN, M.** 2000. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 67, No 1, p. 75 – 81.

**ROUSSOS, S.** 1987. Croissance du *Trichoderma harizianum* par fermentation en milieu solide-. *Physiologie, sporulation et production du cellelases*. Edition du I'ORSTOM p. 68 – 113.

**SAMSON, R. & HOEKSTRA, E.** 2000. Introduction to food and airborne fungi. Centraalbureau voor schimmelcultures. Sixth Edition. Utrecht, The Netherlands.

**SANCHEZ, P., SANDON, A., MARTINEZ, M., FRANCO, M. y PEDROZA, A.** 2001. Evaluación de cepas antagonistas de actinomycetos y de *Trichoderma* sp aisladas a partir de suelos de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fe de Bogota. 95 pp.

**STEFANOVA, M., LEIVA, A., LARRINAGA, L. y CORONADO, M.** 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). Vol. 16: 509 – 516.

**STRÖM, K.** 2005. Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria.Characterization and Application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. Tesis de doctorado. Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas. Estocolmo, Suecia. Pp.8-13.

**SYLVIA, D., FUHRMANN, J., HARTEL, P. and ZUBERER, D.** 1998.Principles and applications of soil microbiology. Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA. p. 259-264, 297, 370, 378, 404-406, 428-429.

**TENGERDY, R. & SZAKÁCS, G.** 1998. Perspectives in agrobiotechnology. Journal of Biotechnology. p. 91-99.

**TORRES, C., VILLAMIZAR, L. y FRANCO, M.** 2002. Desarrollo y caracterización microbiológica y física de preformulados en polvo a base del hongo *Trichoderma koningii* para el control de fitopatógenos. Trabajo de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa fé de Bogotá.

**TREVAN, M., BOFFEY, S., GOULDING, K. y STANBURY, P.** 1990. Biotecnología: Principios Biológicos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 284 pp.

**TU, C.** 1997. An Integrated Control of White Mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of Beans, with emphasis on Recent Advances in Biological Control. Botanical Bulletin of Academia Sinica, Vol. 38, p. 73 – 76.

**VALENCIA, J. & ARBELAEZ, G.** 1999. Control biológico de la pudrición basal del tallo en crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum* con algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. Agronomía Colombiana. Vol. 16 (1-3): 1-4

**VAZQUEZ – GARCIDUEÑAS, S., LEAL – MORALES, C. and HERRERA – ESTRELLA, A.** 1998. Analysis of the  $\beta$ -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64 N. 4, p. 1442 – 1446

**VELEZ, A., POSADA, F., MARIN, M., GONZALEZ, G., OSORIO, V. y BUSTILLO, P.** 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico CENICAFE. N. 17: 1-34.Colombia.

**VILLEGAS, B. & CASTAÑO, J.** 1999. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schröeter, causante de la pudrición de la corona y raíz del manzano (*Malus domestica* Borkh) en Caldas. Fitorpatología. N. 32

**WEAVER, R.** 1990. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas. México. 622 pp.

**WHIPPS, J.** 2001. Microbial Interactions and Biocontrol in the Rhizosphere. Journal of Experimental Botany. Vol. 52. Root Special Issue. p. 487 – 511.

**WILLIAMS, J., CLARKSON, J. M, MILLS, P. and COOPER, R.M.** 2003. A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69. No.7. p. 4190-4191.

**YEDIDIA, I., BENHAMOU, N. and CHET, I.,** 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65 No. 3. p. 1061 – 1070.

**ZAGO ETHUR, L., ZAGO CEMBRANEL, C and FERREIRA DA SILVA, A.** 2001. Seleção de *Trichoderma* spp. Visando ao Controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. Ciência Rural, Vol. 31, No 5, p. 885 – 887.

**ZVALETA – MEJIA, E.**1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. TERRA, Vol.17, No 3, p. 201 – 205.

## ANEXOS

### ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO

#### A. AGAR PDA (Agar papa dextrosa)

##### Fórmula

Extracto de papa	4g/l
Glucosa	20g/l
Agar	1.5g/l
pH final 5.6 +/-0.2 (Oxoid, 1995)	

#### B. CALDO ARROZ AL 3% p/v

##### Fórmula

Harina de arroz	30g/l
pH final 5.5 +/- 0.2	

#### C. AGAR AGUA

##### Fórmula

Agar - agar	15g/l
-------------	-------



**PRODUCCION DE *Trichoderma* sp. Y  
EVALUACION DE SU EFECTO EN CULTIVO  
DE CRISANTEMO (*Dendranthema  
grandiflora*)**



**MONICA PAOLA CHAVEZ GARCIA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial**

**para optar al titulo de**

**MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL – MICROBIÓLOGA AGRÍCOLA  
Y VETERINARIA**

# INTRODUCCION

BPA's      Conciencia frente a deterioro ambiental

↓ Sustancias tóxicas      ↑ Metodologías de control

**INOCULANTES BIOLÓGICOS**



Desarrollo Agrícola Sostenible

Producción a bajo costo

Conservación del suelo

## *Trichoderma sp.*

- Saprofito o parásito de hongos
- Facilidad de aislamiento y cultivo
- Tolerancia a condiciones ambientales extremas



- Evaluación de condiciones de cultivo
- Evaluación de efecto en campo

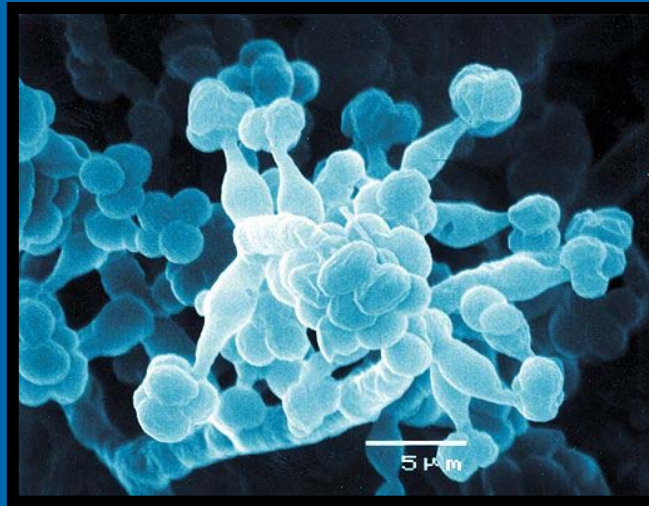


Alternativa para la producción de *Trichoderma sp.* para floricultores

# MARCO TEORICO

## INOCULANTES BIOLÓGICOS

“Preparados que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas benéficas, que se utilizan para aplicar a las semillas o al suelo con el fin de acelerar los procesos microbianos, promover el crecimiento vegetal o favorecer el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera (ICA, 2004, Tengerdy & Szakács, 1998).



***Trichoderma* sp.**

Hongo superior

**Sub – División:** Deuteromycotina

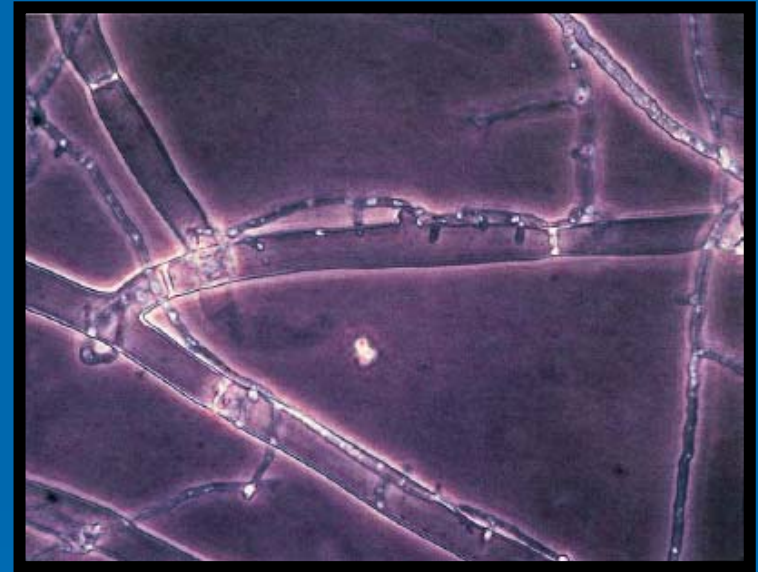
**Clase:** Hyphomycetes

**Orden:** Hifales (Moniliales)

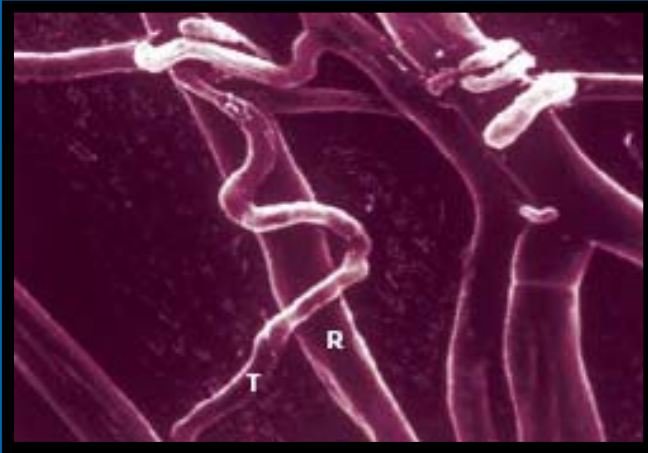
**Género:** *Trichoderma* (Agris, 2004)

# AGENTE BIOCONTROLADOR

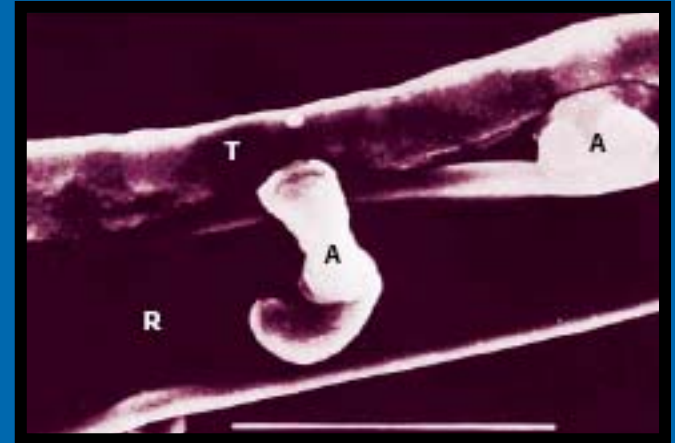
- Micoparasitismo
- Antibiosis
- Competición por nutrientes y espacio
- Desactivación de enzimas de patógenos



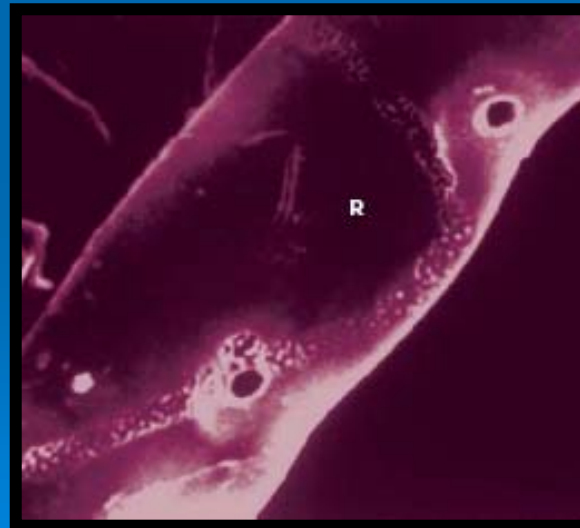
Penetración y formación de haustorios dentro de la hifa de *Rhizoctonia* sp., por la hifa de *Trichoderma* sp.



Contacto de antagonista con patógeno – Enrollamiento



Formación de apresorios sobre la superficie del huésped

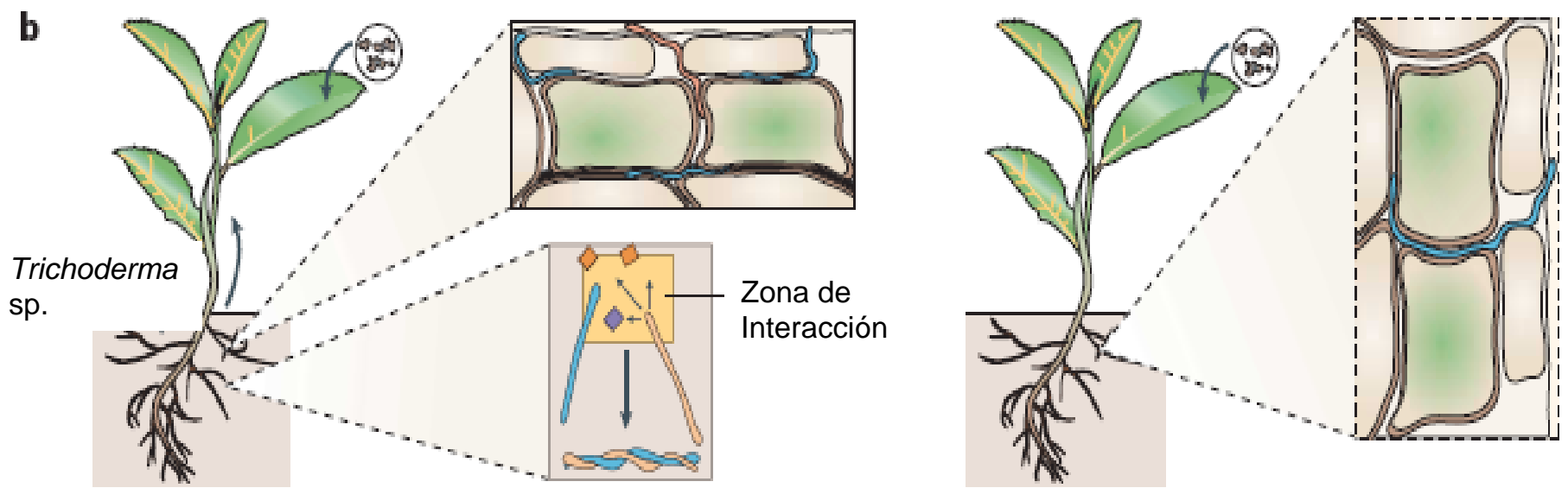
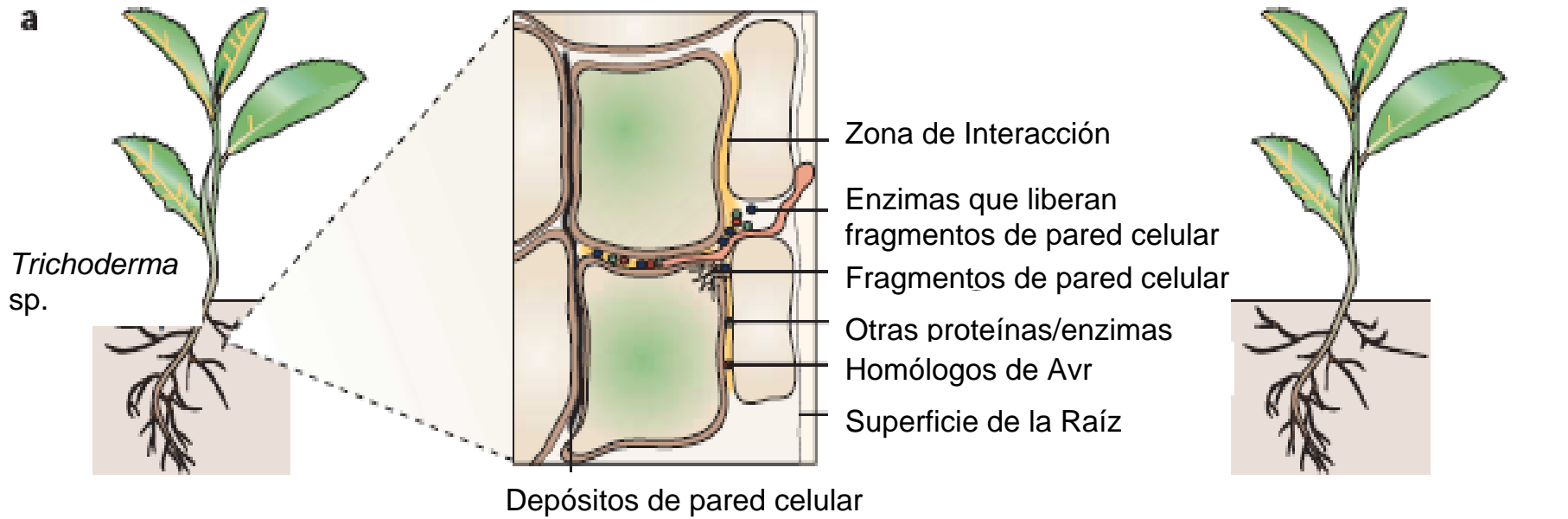


Hifas de *Rhizoctonia* sp. después de la remoción de las hifas de *Trichoderma* sp.

# AGENTE BENEFICO PARA EL CRECIMIENTO VEGETAL

- Tolerancia al estrés (sistema radicular)
- Solubilización – Absorción de nutrientes inorgánicos
- Resistencia Inducida
  - Proteínas con funciones enzimáticas
  - Homólogos de proteínas codificadas para avirulencia  
*Avr*
  - Oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular





# FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE *Trichoderma* sp.

- Temperatura
- Disponibilidad de agua
- pH
- Aireación
- Condiciones de luz

# PRODUCCION DE *Trichoderma* sp.



Fermentación de *Trichoderma viride* para la producción de celulasas a partir de bagazo de caña

Arroz  
Avena  
Cebada  
Melaza  
Bagazo de caña



Fermentación de *Trichoderma harzianum* para la producción de biomasa (conidios) en matriz de arroz

# CONTROL DE CALIDAD PARA FORMULACIONES BIOLÓGICAS

## Pruebas Físico – Químicas

- pH
- Taponamiento de boquillas
- Suspensibilidad

## Pruebas Microbiológicas

- Concentración de esporas
- Porcentaje de Germinación
- Porcentaje de Pureza

## Prueba de Patogenicidad (Vélez y col, 1997)

# CRISANTEMO

(*Dendranthema grandiflora*)



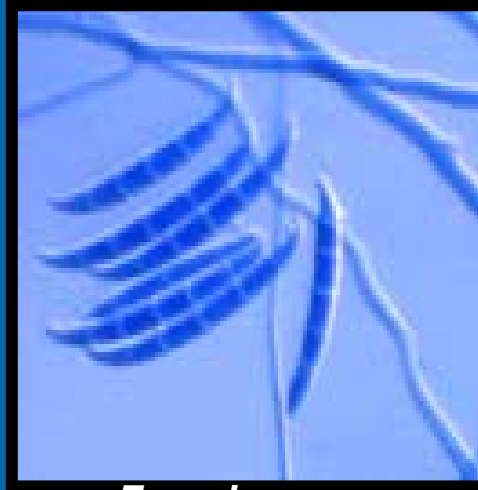
- Familia Asteraceae
- Planta herbácea perenne con inflorescencias
- Propagación por esquejes terminales

# PATOGENOS DEL SUELO EN CRISANTEMO



*Sclerotinia sclerotiorum*

Deacon, 2005



*Fusarium* sp.

Deacon, 2005



*Rhizoctonia* sp.

The British Society for Plant Patology, 2006

## Damping off - Pudrición del Tallo - Marchitamiento vascular

**TRICHO-D** ( $10 \times 10^7$  conidios/g)

Banco: 15g en 80l (drench)

Camas: 15 – 20g en 80l (drench)

**BIODERMA** ( $1 \times 10^7$  conidios/g)

Banco: 1g/cama de 36m<sup>2</sup>

Camas: 1.5g/cama de 36m<sup>2</sup>

0.5g / 80l

# OBJETIVO GENERAL

Comparar dos métodos de fermentación sólida y líquida para la producción de *Trichoderma* sp., y evaluar su efecto en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)

# OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* sp. aisladas y del cepario de biotecnología frente a los hongos *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium* sp.
- Comparar procesos de fermentación sólida y líquida para la producción de *Trichoderma* sp. teniendo en cuenta densidad poblacional (concentración de esporas), pureza y germinación de esporas.
- Evaluar *in vivo* en etapa de enraizamiento y campo en un cultivo de crisantemo, el efecto del bioinoculante.



# METODOLOGIA



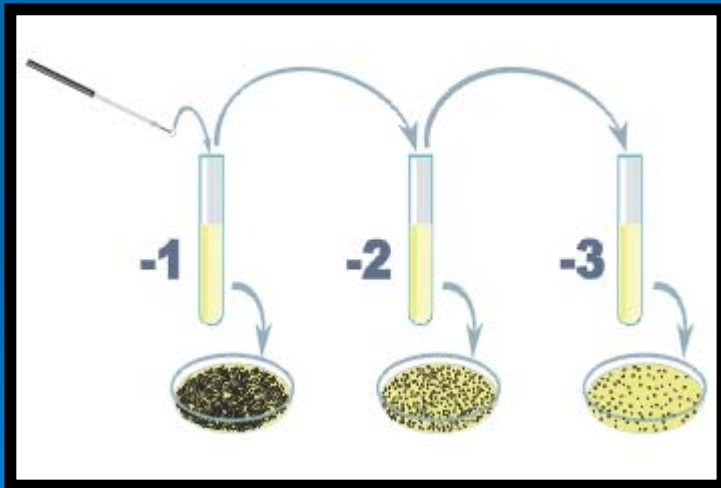
# AISLAMIENTO DE *Trichoderma* sp.

Muestreo de suelo



100g

5 – 10 cm



PDA

25°C por 7 Días



# PRUEBAS DE ANTAGONISMO

## Enfrentamiento dual



*Sclerotinia sclerotiorum*

Deacon, 2005



*Rhizoctonia* sp

The British Society for Plant Patology, 2006



*Fusarium* sp.

Deacon, 2005



*Trichoderma* sp.

The Goralaine Kaminski Medical Mycology Library

$$M1 = ((M_b - M_a) / M_b) \times 100.$$

(Delgado & Arbeláez, 1990).

# FERMENTACIONES

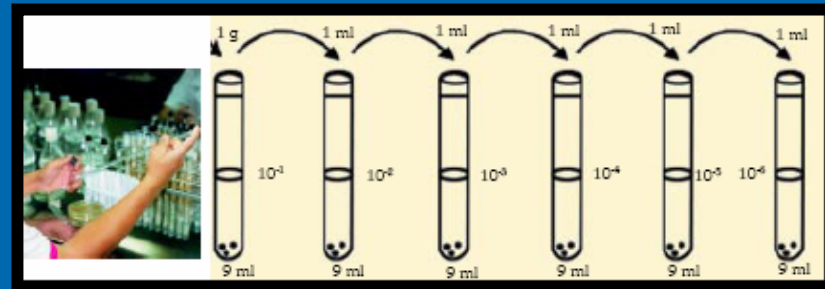
## Preparación preinóculo



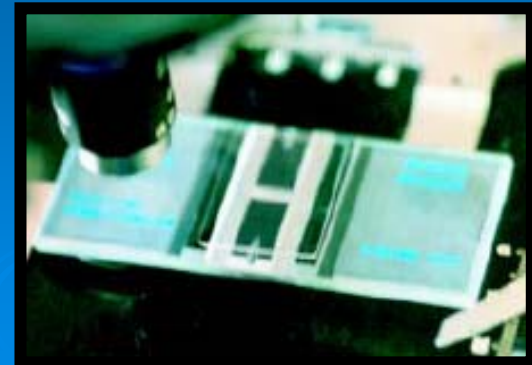
*Trichoderma* sp.

*The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library*

Tween 80 0.5%



Caldo arroz 3%  
25°C por tres días  
100 rpm  
(Otalora y col, 2001)



# FERMENTACIONES

## Líquida en Reactor



- 1 vvm
- Medio arroz al 3%
- 25°C por ocho días

## Líquida en Shaker



- 100 rpm
- Medio arroz al 3%
- 25°C por ocho días

## Sólida



- 200 g arroz + 137.7 ml agua
- 25°C por ocho días

## Control de calidad

- Concentración de esporas
- Porcentaje de Germinación (18 y 24 horas)
- Porcentaje de Pureza



# EVALUACIÓN DE LOS SUSTRATOS



- Arroz y Agua destilada
- Arroz y Melaza 3%
- Arroz y Melaza 10%

(Pérez y col, 2000)

# EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

TRATAMIENTO	COMPOSICION	
	CONDICIONES DE LUZ	TEMPERATURA
T1	L x 8	30°C
T2	O x 8	
T3	24 x 24	
T4	L x 8	25°C
T5	O x 8	
T6	24 x 24	
T7	L x 8	20°C
T8	O x 8	
T9	24 x 24	

L = Luz constante

O = Oscuridad constante



# ENSAYO DE ENRAIZAMIENTO

TRATAMIENTO	REPETICIONES (canastas)
Control Negativo= Agua	36
T1= Compost 70/30	27
T2= Microagro	10
T3= Compost + Microagro	10
T4= <i>Trichoderma</i> sp.	18
T5= <i>Trichoderma</i> sp. + Compost	10
T6= <i>Trichoderma</i> sp. + Microagro	10
T7= <i>Trichoderma</i> sp. + Compost + Microagro	10

- Peso fresco foliar (g)
- Peso fresco radicular (g)
- Longitud foliar (cm)
- Longitud radicular (cm)
- Peso seco foliar (g)
- Presencia de fitopatógenos
- Presencia de *Trichoderma* sp.

140 Unidades experimentales por canasta





# ENSAYO EN CAMAS DE PRODUCCIÓN

T	COMPOSICION
C-	C (1x al suelo)+ M ( C-).
T1	C (1x y desde enraizamiento) + M (T1).
T3	C (2x al suelo) + M (C-).
T4	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(1x) (C-).
T5	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(1x) (T1).
T6	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(1x) (T4).
T7	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(2x) (C-).
T8	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(2x) (T1).
T9	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(2x) (T4).

• **Altura (cm)**

• **Peso fresco de ramos (g)**

• **Peso fresco radicular (g)**

• **Peso seco radicular (g)**

• **Producción (número de ramos/tratamiento nacional y exportación)**



# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A todos los datos analizados se les realizó la prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad

- Pruebas de antagonismo

Prueba T para dos muestras

- Evaluación y Selección del proceso de producción

Densidad Poblacional y Porcentaje de Pureza: Test Wilcoxon Rank

Porcentaje de Germinación a 18 y 24 horas: Prueba T para dos muestras

# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Evaluación y Selección del sustrato para la producción de *Trichoderma sp.*

Densidad Poblacional y Porcentaje de Pureza: Prueba de Kruskal Wallis

Porcentaje de Germinación a 18 y 24 horas: ANOVA

- Evaluación y Selección de las condiciones de cultivo para la producción de *Trichoderma sp.*

Densidad Poblacional, Germinación a 18 y 24 horas: ANOVA

Porcentaje de Pureza: Kruskal Wallis

# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Ensayo de enraizamiento

Peso Fresco Foliar, Peso Seco Foliar, Peso Fresco Radicular: Prueba de Kruscal Wallis

Longitud Foliar, Longitud Radicular: ANOVA

- Ensayo en camas de producción

Tratamientos con aplicación de Hormona de Enraizamiento

Numero de ramos exportación: ANOVA

Longitud foliar, Peso fresco y seco radicular, Peso fresco foliar, numero de ramos nacional: Prueba de Kruscal Wallis

# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tratamientos sin aplicación de Hormona de Enraizamiento

Longitud foliar: ANOVA

Comparación de longitud foliar en tratamientos con y sin hormona de enraizamiento

T3, T4, T5 y T6: Prueba T para dos muestras

T1 y T7: Test Wilcoxon Rank

# RESULTADOS Y DISCUSION

## AISLAMIENTO DE *Trichoderma* sp.



Recuento:  $23 \times 10^{10}$  ufc/g

Crecimiento concéntrico

Coloración amarillo –  
verdosa

Revés amarillo

Hifas hialinas tabicadas

Fiálides en forma de  
botella

Conidios ovoides, hialinos

# PRUEBAS DE ANTAGONISMO

	% ANTAGONISMO	
	<i>Trichoderma nativa</i>	<i>Trichoderma cepario</i>
<i>Fusarium sp.</i>	37.7	62.5
<i>Rhizoctonia sp.</i>	38.8	46.5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	22.7	45.1

- Micoparasitismo
- Antibiosis (Gliovirina)
- Competencia por nutrientes y/o espacio
- Producción de enzimas

# EVALUACION DE PROCESO DE PRODUCCION

## Fermentación Líquida en Reactor



	LIQUIDA REACTOR	LÍQUIDA SHAKER
<b>Conidios/ml</b>	33 X 10 <sup>15</sup>	37 x 10 <sup>15</sup>
<b>% Germinación 18 horas</b>	46.8	85.2
<b>% Germinación 24 horas</b>	52.4	91.2
<b>% Pureza</b>	44.2	76.8
<b>Conidios/g arroz</b>	11 X 10 <sup>16</sup>	24 x 10 <sup>16</sup>



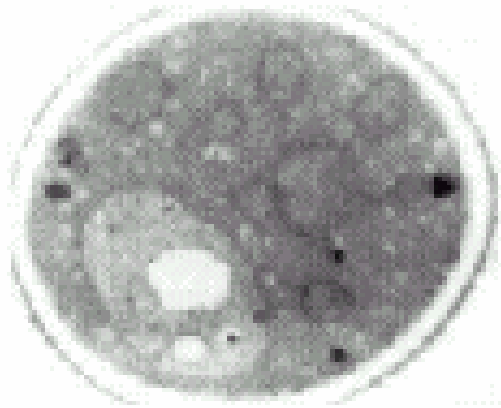
# EVALUACION DE PROCESO DE PRODUCCION

Fermentación Líquida en Shaker

Fermentación sólida

	FERMENTACIÓN SÓLIDA	FERMENTACIÓN LÍQUIDA (SHAKER)	
Conidios/ml	$40 \times 10^{16}$	$37 \times 10^{15}$	$p = 0.0001$
% Germinación 18 horas	90.4	85.2	$p = 0.0010$
% Germinación 24 horas	92	91.2	$p = 0.2830$
% Pureza	92.3	76.8	$p = 0.0001$
Conidios/g arroz	$52 \times 10^{15}$	$24 \times 10^{16}$	

Datos correspondientes a cinco repeticiones



**Espora de *Trichoderma* sp.  
producida en fermentación  
líquida**



**Espora de *Trichoderma* sp.  
producida en fermentación  
sólida**

# EVALUACION DEL SUSTRATO DE PRODUCCION

	Arroz – Agua destilada	Arroz –Melaza 3%	Arroz –Melaza 10%
<b>Conidios/ml</b>	40 x 10 <sup>16</sup>	23 x 10 <sup>10</sup>	50 x 10 <sup>10</sup>
<b>% Germinación 18 horas</b>	90.4	60.76	64.8
<b>% Germinación 24 horas</b>	92	61.24	65.1
<b>% Pureza</b>	92.3	42.2	38.5

Datos correspondientes a cinco repeticiones



**Crecimiento de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo arroz y agua destilada**

# EVALUACION DE CONDICIONES DE CULTIVO

TRATAMIENTOS		Conidios/ml	% Germinación 18 horas	% Germinación 24 horas	% Pureza
Luz	30°C	11 x 10 <sup>11</sup>	59.9	66.5	60.2
	25°C	45 x 10 <sup>18</sup>	88	96	92.1
	20°C	29 x 10 <sup>15</sup>	82.4	92.2	91
Oscuridad	30°C	32 x 10 <sup>11</sup>	62.6	77.6	78.2
	25°C	13 x 10 <sup>16</sup>	87.6	93.6	92.7
	20°C	46 x 10 <sup>12</sup>	70.4	81.9	90.9
Periodos Alternos	30°C	15 x 10 <sup>11</sup>	65.8	69.9	78.4
	25°C	13 x 10 <sup>18</sup>	80.1	93.1	92.5
	20°C	22 x 10 <sup>13</sup>	73.4	85.9	91.7
p		0.0019	0.0002	0.0033	0.00001

Datos correspondientes a tres repeticiones

	TRATAMIENTO	G. HOMOGENEOS
Conidios/ml	T4	A
	T6	A
% Germinación 18 horas	T4	A
	T5	A
% Germinación 24 horas	T4	A
	T5	A
% Pureza	T5	A
	T6	A

T4: Luz constante a 25°C, T5: Oscuridad constante a 25°C, T6: Períodos alternos de 24 horas luz 24 horas oscuridad a 25°C



Crecimiento de *Trichoderma* sp. con exposición constante de luz a 25°C (T4)

# ENSAYOS DE ENRAIZAMIENTO EN CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)

TRATAMIENTO	REPETICIONES
Control Negativo= Agua	36
T1= Compost 70/30	27
T2= Microagro	10
T3= Compost + Microagro	10
T4= <i>Trichoderma</i> sp.	18
T5= <i>Trichoderma</i> sp. + Compost	10
T6= <i>Trichoderma</i> sp. + Microagro	10
T7= <i>Trichoderma</i> sp. + Compost + Microagro	10



140 plántulas por repetición

# ESTADISTICA DE VARIABLES AGRONOMICAS

TRATAMIENTO	VARIABLE AGRONOMICA				
	Peso Seco Foliar	Peso Fresco Radicular	Longitud Foliar	Longitud Radicular	Peso Fresco Foliar
	RM	RM	M	M	RM
<b>CONTROL</b>	148,4 c	221,6 ab	11,524 c	4,804 bcd	148,4 b
<b>T1</b>	196,7 ab	179,6 abc	12,104 abc	4,86 bc	193,8 ab
<b>T2</b>	174,9 bc	201,1 abc	11,912 bc	5,49 a	176,6 ab
<b>T3</b>	179,5 ab	144 c	11,304 c	4,208 e	189,3 ab
<b>T4</b>	229,6 ab	248,8 a	12,732 ab	4,71 bcde	245,6 a
<b>T5</b>	208,9 ab	169,7 bc	11,86 bc	4,266 de	202,4 ab
<b>T6</b>	217,9 ab	244,5 a	12,958 a	4,948 ab	206,1 ab
<b>T7</b>	248,2 a	194,7 abc	12,612 ab	4,348	241,8 a
<b>p</b>	0,00001	0,00001	0,232	0,3505	0,0002

Alfa= 0.05, RM= Rango de Mediana, M= Media, GH= Grupos Homogéneos



# ENSAYOS EN CAMAS DE PRODUCCION EN CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*)



T	COMPOSICION
C-	C (1x al suelo)+ M ( C-).
T1	C (1x y desde enraizamiento) + M (T1).
T3	C (2x al suelo) + M (C-).
T4	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(1x) (C-).
T5	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(1x) (T1).
T6	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(1x) (T4).
T7	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(2x) (C-).
T8	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(2x) (T1).
T9	C (1x)+ M + <i>Trichoderma</i> sp.(2x) (T4).

# ESTADISTICA DE VARIABLES AGRONOMICAS (Tratamientos con hormona de enraizamiento)

	VARIABLE AGRONOMICA		
TRATAMIENTO	Longitud Foliar	Peso Fresco Radicular	Peso Seco Radicular
	RM	RM	RM
<b>CONTROL</b>	224,7 b	260,4 abc	252,1 ab
<b>T1</b>	181,6 b	189,6 c	196,4 b
<b>T3</b>	47,1 c	93 d	171,3 b
<b>T4</b>	368,6 a	317 a	290,3 a
<b>T5</b>	353,4 a	296,9 ab	285,3 a
<b>T6</b>	243,9 b	227,5 bc	224 ab
<b>T7</b>	240,5 b	206,9 c	191 b
<b>T8</b>	185,8 b	235,4 abc	230 ab
<b>T9</b>	184 b	202,9 c	189 b
<b>p</b>	0,00001	0,00001	0,00001

Alfa = 0.05, RM= Rango de Mediana, GH= Grupos Homogéneos

# ESTADISTICA DE VARIABLES AGRONOMICAS (Tratamientos sin hormona de enraizamiento)

	VARIABLE AGRONOMICA
TRATAMIENTO	Longitud Foliar
	M
CONTROL	88,006 abc
T1	88,216 abc
T3	89,324 abc
<b>T4</b>	<b>89,778 a</b>
T5	89,464 ab
T6	87,382 c
T7	87,626 bc
p	0,0961

Alfa = 0.05, M= Media, GH= Grupos Homogéneos

**PLANTAS EN TRATAMIENTO 4  
(FERTIRRIEGO + COMPOST (1X) + MICROAGRO +  
*Trichoderma sp.*)**



# ESTADISTICA DE VARIABLES EN PRODUCCION (Tratamientos con hormona de enraizamiento)

TRATAMIENTO	VARIABLE		
	Peso Ramos	Ramos Nacional	Ramos Exportación
	RM	RM	M
<b>CONTROL</b>	24 a	20,6 a	21,75 a
<b>T1</b>	22,8 a	15,5 a	24,5 a
<b>T3</b>	24,3 a	19,9 a	23,25 a
<b>T4</b>	31 a	19,6 a	29,75 a
<b>T5</b>	25,3 a	20,4 a	34,5 a
<b>T6</b>	25,4 a	15,5 a	18 a
<b>T7</b>	24,7 a	15,5 a	25,25 a
<b>T8</b>	18,9 a	20,1 a	27,25 a
<b>T9</b>	10,6 a	19,4 a	26,25 a
<b>p</b>	0,5323	0,921	0,6871

Alfa = 0.05, RM= Rango de Mediana, M: Media, GH= Grupos Homogéneos

# CONCLUSIONES

- Los aislamientos de cepas de *Trichoderma* sp., realizados en muestras de suelo, no presentaron características biocontroladoras sobre los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. mientras la cepa, proveniente del cepario de biotecnología presentó porcentajes de antagonismo *in vitro* de 45.1, 46.5 y 62.5%.
- En la fermentación sólida se obtuvieron recuentos de  $40 \times 10^{16}$  conidios/ml hongo *Trichoderma* sp., después de ocho días de fermentación, con un porcentaje de germinación del 92% a las 24 horas y un porcentaje de pureza de 92.3%.

# CONCLUSIONES

- En el medio arroz – agua destilada se obtuvieron recuentos de  $40 \times 10^{16}$  conidios/ml, con un porcentaje de germinación del 92% a las 24 horas y un porcentaje de pureza de 92.3%.
- Las condiciones luz constante y temperatura  $25^{\circ}\text{C}$  durante ocho días, para el cultivo de *Trichoderma* sp., en fermentación sólida con medio arroz – agua destilada, presentaron una producción de  $45 \times 10^{18}$  conidios/ml, con un porcentaje de germinación del 96% a las 24 horas y un porcentaje de pureza de 92.1%.

# CONCLUSIONES

- En enraizamiento, el mayor peso fresco foliar y radicular se obtuvo donde fue inoculado el hongo *Trichoderma* sp., la mayor longitud foliar donde fueron inoculados *Trichoderma* sp. y el caldo microbiano microagro, y la mayor longitud radicular y el mayor peso seco foliar donde fue inoculado microagro, y donde fue inoculado *Trichoderma* sp., microagro y compost respectivamente.
- En las pruebas realizadas en producción, los tratamientos con mayor longitud foliar, peso fresco y seco radicular, peso de ramos y mayor número de ramos de exportación, fueron aquellos donde se inoculó *Trichoderma* sp. y el caldo microbiano microagro.



# RECOMENDACIONES

- Realizar el procedimiento propuesto para la esterilización de la melaza y evaluar su efecto en la producción de conidios de *Trichoderma* sp. en matriz de fermentación sólida a una concentración del 3%.
- Desarrollar la identificación hasta especie de la cepa de *Trichoderma*, para profundizar en los aspectos relacionados con el control biológico de patógenos de plantas así como su efecto en las plantas de crisantemo.
- Evaluar el crecimiento de *Trichoderma* sp., en el medio arroz – agua destilada por medio de una curva de crecimiento del microorganismo, para determinar el período de tiempo requerido para la obtención de la mayor cantidad de biomasa fúngica.

# RECOMENDACIONES

- Efectuar pruebas *in vivo* con inoculación de patógenos en suelo en plantas de crisantemo para evaluar y comparar el efecto antagónico de la cepa de *Trichoderma* sp.
- Realizar pruebas de antagonismo entre el hongo *Trichoderma* sp., con los microorganismos presentes en el caldo microbiano Microagro, para identificar las posibles interacciones (antagónicas o sinérgicas) presentes entre *Trichoderma* sp., y los diferentes microorganismos presentes en el caldo microbiano.
- Verificar la producción de compuestos estimuladores de crecimiento vegetal por parte de la cepa de *Trichoderma* sp. como giberelinas y ácido indol acético.
- Caracterizar molecular y metabólicamente esta cepa de *Trichoderma* sp., y evaluar otros posibles efectos benéficos en la agroindustria.