

AISLAMIENTO DE *Trichoderma sp.*, EN LAS UNIDADES PRODUCTIVAS AGRÍCOLAS DEL CENTRO DE FORMACIÓN AGROINDUSTRIAL LA ANGOSTURA DE CAMPOALEGRE (HUILA)

Carolina Ávila Cubillos, *Bióloga*
Instructora, Centro de Formación Agroindustrial La Angostura
cavilac@sena.edu.co; cavilac@misena.edu.co

María Goretti Ramírez, *Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos*
Gestor Senior Línea Biotecnología y Nanotecnología, Centro de Formación Agroindustrial La Angostura
mgramirez0@misena.edu.co

Rodolfo Lizcano Toledo, *Especialista en Manejo Sostenible de Suelos*
Instructor, Centro de Formación Agroindustrial La Angostura
rodolfolizcano@gmail.com; rlizcanot@sena.edu.co

Resumen: Los hongos antagonistas se han convertido en importantes alternativas para el control biológico de fitopatógenos en el suelo. Las especies del género *Trichoderma* se destacan dentro de las más empleadas como agentes de control fúngico estableciendo simbiosis con las plantas, actuando en ciertos casos como antagonistas de hongos y bacterias fitopatógenas, tales como *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Pseudomonas*, entre otros; al igual que con invertebrados e incluso con malas hierbas. Su modo de acción se expresa mediante hiperparasitismo, antibiosis y/o competencia. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue aislar el hongo del género *Trichoderma*, de las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura, ubicado en el municipio de Campoalegre en el departamento del Huila. El estudio se desarrolló entre los meses de abril a septiembre de 2014. El trabajo comprendió dos fases: la primera fue la de campo, donde se utilizó la metodología de muestreo de suelos y trampeo utilizando como sustrato el arroz; en la segunda fase, que contempló el trabajo de laboratorio, se llevaron las muestras, para posteriormente realizar siembras de diluciones seriadas en base 10 y siembra de gránulos de suelo en medio de cultivo PDA, Sabouraud y Rosa de Bengala. Con esta última metodología, empleando agar Rosa de Bengala, se logró obtener el crecimiento de colonias aterciopeladas de color blanco verdoso, característico del hongo. Esto constituye un punto de partida para que en un futuro se realicen ensayos de antagonismo *in vitro* con patógenos fúngicos causales de enfermedad, como *Fusarium*, con el propósito de producir un bioinsumo efectivo y adaptado a las condiciones agroecológicas de la zona.

Palabras clave: bioinsumos, control biológico, fitopatógenos, micoparasitismo.

ISOLATION OF *Trichoderma sp.*, IN AGRICULTURAL PRODUCTION UNITS AGRIBUSINESS TRAINING CENTER LA ANGOSTURA CAMPOALEGRE (HUILA)

Abstract: Antagonistic fungi have become major alternatives to the biological control of plant pathogens in the soil. *Trichoderma* is the genus of fungi that is considered one of the most widely used as an agent of fungal control; establishing symbiosis with plants, in some cases acting as antagonists of plant pathogenic fungi and bacteria as *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Pseudomonas*, among others, invertebrates and even weeds. Hyperparasitism, antibiosis and / or nutrient competition are typical biocontrol actions of these fungi. In this sense, the objective of this study was to isolate the fungus *Trichoderma* from the agricultural productive units of the Agro-industrial Training Center La Angostura, located in the town of Campoalegre in the department of Huila. The study was conducted between April and September, 2014. This work was developed in two phases: the first phase was carried out on the field, where soil sampling methodology and trapping using rice as substrate was used. In the second phase, which included lab work, samples were taken to make serial dilutions on base 10 for sowing set as well as seed granules were sowed in the PDA crop, Sabouraud and Rose Bengal. Through this latter method, that is using Rose Bengal Agar, it was possible to obtain the growth of velvety greenish-white colonies, the distinctive color of the fungus. This is a starting point to perform future in vitro antagonistic tests with fungal pathogens that cause diseases such as *Fusarium*; in order to produce an effective bio-input adapted to the agro-ecological conditions of the area.

Key words: bio-inputs, biological control, plant pathogens, mycoparasitism.

Introducción

Para la agricultura convencional, los fungicidas constituyen la principal herramienta empleada para el control de hongos fitopatógenos. El uso a corto plazo de estos productos químicos, ha provocado a través del tiempo el desarrollo de resistencia a los fungicidas más empleados, como Mancoceb, Silvacur, Stratego, y Nativo, entre muchos otros. Por ello, la tendencia actual ha sido racionalizar el uso de fungicidas y desarrollar nuevas alternativas de control a través del uso de agentes biológicos, tales como: bacterias, hongos y virus entomopatógenos, hongos antagonistas, insectos predadores y parasitoides. De tal manera, se han desarrollado biopreparados a base de microorganismos antagonistas

como el hongo *Trichoderma sp.*, que pueden reducir el impacto generado por los patógenos en las raíces de las plantas (Centro de Educación y Tecnología, 2004).

Las especies del género *Trichoderma* poseen características hiperparasíticas, para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos. Se le ha atribuido el control de patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros (Ezziyyani, et al., 2004).

Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: 1. Competición directa por

el espacio o por los nutrientes; 2. Producción de metabolitos contra bacterias, ya sean de naturaleza volátil o no volátil; y 3. Parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos generadores de enfermedad (Infante, 2009).

Dentro de las cualidades que hacen de *Trichoderma* un género ideal para el desarrollo de trabajos de investigación se destacan su ubicuidad, la facilidad para aislamiento y cultivo de sus colonias, el crecimiento rápido en un gran número de sustratos, y el que no constituye una amenaza para las plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982).

El objetivo de este trabajo consiste en aislar el hongo *Trichoderma sp.*, a partir de muestras de suelo y trampas en sustratos con arroz en diferentes unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura, ubicado en el municipio de Campoalegre en el departamento del Huila.

Metodología

Desarrollo del tema: procedimiento para aislamiento de *Trichoderma sp.*

Toma de la muestra de suelo

Los ensayos experimentales efectuados para el aislamiento de *Trichoderma sp.*, se vienen adelantando desde el mes de abril hasta septiembre del año 2014, en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura. El área de estudio corresponde a las plantaciones de: pasifloras (*Passiflora edulis* y *Passiflora maliformis*), mango (*Mangifera indica*), cacao (*Theobroma cacao*), cítricos del género *Citrus sp.*, y policultivo (*Theobroma cacao* y *Musa sp.*); zonas donde se recolectó, en cada una, 15 muestras de suelo para aislar *Trichoderma sp.* Estas plantaciones se ubican en la cordillera central, con altitudes entre los 500 a 650 msnm y temperatura entre los 25 a 32 °C (Plan de Ordenamiento Territorial Campoalegre, 1999).

Para proceder al aislamiento de *Trichoderma sp.*, se realizó una colecta de suelo en las 5 unidades agrícolas del Centro de Formación. En cada una de estas, los muestreos fueron hechos en forma de zig-zag cerca de las raíces de la planta, a una profundidad de 20 centímetros. Se tomaron 15 submuestras/ha (Sadegian, 2004); de igual manera se tomaron las muestras al azar, para lo cual se seleccionaron diferentes puntos dentro del terreno, tratando de coleccionar una muestra de suelo de aproximadamente 500 g en cada área productiva. Las herramientas utilizadas fueron baldes, palines, machetes; debidamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 70 %, con el fin de evitar que durante la manipulación del suelo se pudieran contaminar con otros agentes patógenos. Se utilizaron dos metodologías para la manipulación del suelo: en la primera se emplearon guantes para incorporar el suelo recolectado dentro del balde, desterronando y ubicándolo en la bolsa; en la segunda metodología se utilizaron los terrones sin ningún tipo de manipulación (sin disturbar); además en otros sectores seleccionados, se colocaron trampas con sustrato a base de arroz cocido para muestrear el crecimiento macroscópico del *Trichoderma* (Smith *et al.*, 2002); las muestras se transportaron en bolsas de polietileno debidamente rotuladas, y enviadas al laboratorio de ciencias básicas del Centro de Formación, para finalmente ser procesadas.

La metodología que se desarrolló para realizar los respectivos análisis para la identificación de *Trichoderma sp.*, se describen a continuación:

Trampas con sustrato definido (arroz)

Se colocaron 15 trampas en diferentes lugares de cada una de las unidades productivas agrícolas seleccionadas (policultivo, cítricos, mangos, pasifloras, y cacao), cada trampa se realizó utilizando vasos desechables plásticos y bandejas de aluminio que se llenaron con arroz cocido, para un total de 75 trampas; estas se dispusieron a 20 cm de profundidad de la superficie del

suelo, quedando el sustrato hacia arriba. Cada trampa se identificó con banderas.

De las 75 trampas dispuestas en las cinco unidades productivas, se evidenció la posible presencia de *Trichoderma sp.*, en 3 de las trampas sembradas en suelo, dada la aparición del crecimiento de algunas colonias aterciopeladas de color blanco verdoso que se tornaba verde oliva con el tiempo, característica macroscópica descrita por Arias y Piñeros en el 2008. Adicionalmente, estas muestras fueron observadas bajo microscopio en objetivo de 40x (Foto 1). Estructura de hongo encontrado en la unidad productiva de cacao y que morfológicamente corresponde a *Trichoderma sp.*

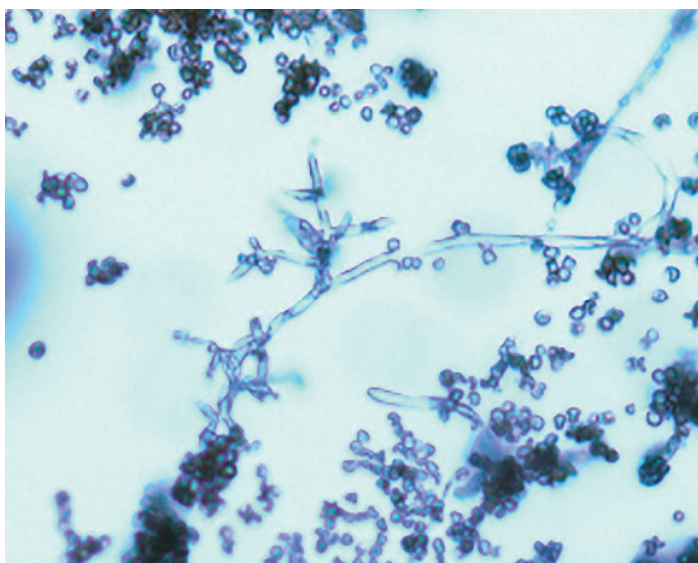


Foto 1. Raspado en fresco sobre estructura de hongo que posiblemente corresponde a *Trichoderma* observada con objetivo de 40x (fuente: autores, 2014).

Para el montaje de la muestra en el microscopio se empleó la técnica de la cinta pegante.

Técnica de la cinta pegante para identificación microscópica de hongos

Para la identificación microscópica de la posible presencia de *Trichoderma sp.*, en las muestras sembradas de cada una de las unidades productivas agrícolas, se realizó la técnica de la cinta pegante siguiendo el

procedimiento descrito en el *Manual de fundamentos de microbiología* (Escobar, 2005).

Diluciones seriadas en base 10

Las muestras de suelo obtenidas de cada una de las unidades productivas agrícolas, fueron de aproximadamente 500 gramos; estas se analizaron en el Laboratorio de Ciencias Básicas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura. Se efectuaron 3 diluciones seriadas en base 10, tomando 10 g de suelo previamente homogenizado y adicionado en 90 mL de solución salina estéril, obteniendo la dilución 10^{-1} y así sucesivamente hasta obtener la dilución 10^{-3} ; de cada una de estas diluciones se tomó 1 mL, que se sembró en profundidad en agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 25 °C durante 5 días. Se utilizaron otros medios de cultivo para siembra, tales como Rosa de Bengala y Sabouraud, sembrando en superficie 0,1 mL de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} .

De acuerdo a los resultados obtenidos, empleando la técnica de siembra por profundidad, no se evidenció el crecimiento del hongo en ninguna de las cajas, posiblemente por contaminación de la muestra en campo o en laboratorio, o porque las condiciones de siembra en el medio de cultivo, muy probablemente no resultaron ser favorables.

Después de constatar la estructura macroscópica y microscópica del hongo, se procedió a realizar la prueba de pureza para comenzar a aislar el hongo de interés.

Prueba de pureza

Se identificó la posible presencia de *Trichoderma sp.*, procedente de la plantación de pasifloras, correspondiente a la dilución 10^{-1} , en medio de cultivo PDA. Para confirmar la posible presencia de *Trichoderma sp.*, se tomó una muestra de la caja del medio de cultivo PDA, se sembró por punción en agar Rosa de Bengala y se incubó a 25 °C de 5 a 7 días (Foto 2). Prueba de pureza para identificación de características macroscópicas del género *Trichoderma sp.*

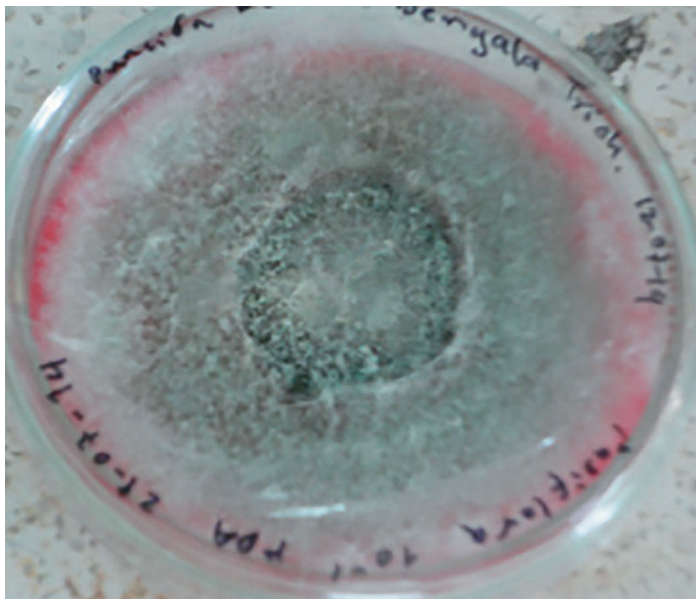


Foto 2. Prueba de pureza para identificación de características macroscópicas del género *Trichoderma* sp. (fuente: autores, 2014).

Adicionalmente, con la siembra en superficie de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , se obtuvo crecimiento de otros hongos que, de acuerdo a la estructura morfológica observada en las cajas de petri y bajo el microscopio, pueden corresponder a diferentes especies dentro de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y *Fusarium* (Arias y Piñeros, 2008). El mayor crecimiento de colonias de hongos ha sido observado sobre el medio de cultivo Rosa de Bengala, en las muestras correspondientes a las unidades productivas de cítricos y policultivo.

Gránulos o terrones de suelo

Para esta técnica se utilizaron los medios de cultivo Rosa de Bengala y PDA, en cada uno de ellos se sembraron 16 gránulos de suelo de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, conformando una matriz de 4 filas x 4 columnas, se incubaron a 25 °C de 5 a 7 días.

Mediante esta técnica se observó el crecimiento de colonias de diferentes hongos, notándose la posible presencia de *Trichoderma* (de acuerdo a sus características macroscópicas de colonia aterciopelada, radiada de color blanco verdoso) en las muestras de suelo

de las cinco unidades productivas y especialmente en los gránulos sembrados en medio de cultivo Rosa de Bengala, procedentes de la unidad productiva de pasifloras. Estos gránulos se rodearon inicialmente de un color blanco que posteriormente fue tornándose en una masa algodonosa de color verde oliva, característico del género *Trichoderma*. Ver foto 3. Gránulos de suelo de la unidad productiva de pasifloras con evidencia de posible crecimiento de *Trichoderma*.

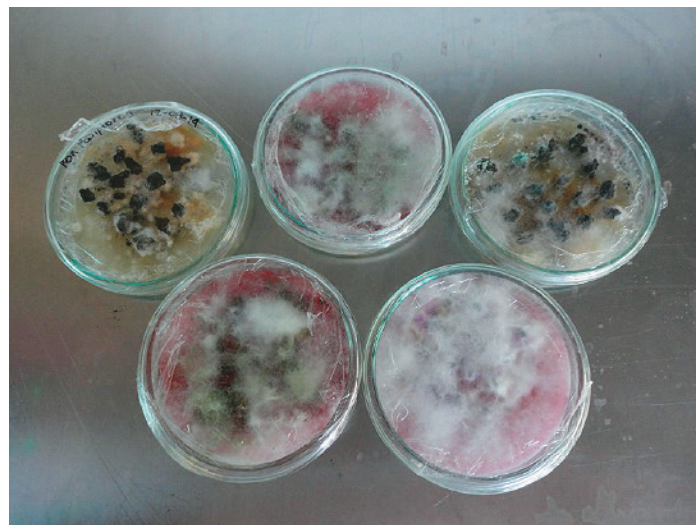


Foto 3. Gránulos de suelo de la unidad productiva de pasifloras con evidencia de posible crecimiento de *Trichoderma* con estructura algodonosa y coloración verde oliva (fuente: autores, 2014).

Conclusiones

- La metodología de terrones o gránulos de suelo permitió apreciar las características macroscópicas del hongo de interés en un período de tiempo más corto y con colonias mejor formadas.
- Las posibles colonias de *Trichoderma* se evidenciaron más claramente en medio de cultivo Rosa de Bengala.

Recomendaciones

- Para aislar más rápidamente el hongo, es necesario tomar la muestra de suelo en terrones y sembrar

en pequeñas porciones sobre el medio de cultivo; de preferencia agar Rosa de Bengala.

- En este ensayo se sembraron 16 terrones por cada caja, se hace necesario disminuir esta cantidad para garantizar el espacio suficiente para el crecimiento de los hongos.
- Realizar la siembra en superficie sobre los medios de cultivo, ya que este hongo crece mejor en ambientes aerobios.
- Dentro de los medios de cultivo empleados, se encontró mejor selectividad utilizando Rosa de Bengala.
- Realizar pruebas de biología molecular a las muestras obtenidas, con el propósito de identificar las especies nativas del Centro de Formación.
- Aplicar la metodología de trampas de arroz y toma de muestra de suelo para aislamiento de *Trichoderma* en zona de bosque y madera en descomposición.

Bibliografía

Arias, E. y Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde*. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.

Centro de Educación y Tecnología, CET (2004). *Manual Producción y utilización de Trichoderma spp.* Fundación para la innovación agraria. Santiago de Chile.

Dominguez, T. (1994). *Evaluación de nuevas cepas de Trichoderma spp. Como antagonistas de Botrytis cinerea y Phytophthora spp.* Tesis de grado. Facul-

tad de Agronomía. Universidad Católica de Chile, Santiago. 37pp.

Escobar, M. (2005). *Fundamentos de microbiología*. Tercera edición. Editorial CEJA. Bogotá D.C.

Ezziyyani, Mohammed; Sánchez, Consuelo Pérez; Sid, Ahmed; Requena, María Emilia & Candela, María Emilia (2004). "*Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.)". *Anales de Biología* 26: 35-45.

Infante, Danay; Martínez, B.; González, Noyma y Reyes, Yusimy (2009). "Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos". *Rev. Protección Veg.* Vol. 24 No. 1: 14-21.

Papavizas, GC; Lewis JA & Abd-Elmoity, TH. (1982). "Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities". *Phytopathology* 72: 126-132.

Sadegian, Siavoch (2002). *Muestreo de suelos agrícolas*. CENICAFE. Manizales.

Smith, V. L.; Wilcox, W. F. and Harman, G. E. (1990). "Potential for biological control of *phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium spp*". *Phytopathology* 80:880-885.

Smith, Jhon (2002). *Identificación y muestreo de suelos agrícolas*. USDA, Riverside, California.

Venegas, V., R., Palazuelos, F., P., Hirsch-Reinschagen, B. P.(1996). *Aplicación de Trichoderma en la protección de almacigos de lechuga Lactuca sativa*. Memoria Congreso de Agronomía.

Gobernación del departamento del Huila (1999). Plan de Ordenamiento Territorial, Campoalegre, Huila. Colombia.