

PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN ENDURECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MORA PRODUCIDAS *IN VITRO* (EFECTO DE LA APLICACIÓN DE *TRICHODERMA KONINGIOPSIS TH003*)

Beltrán Acosta Camilo Rubén¹, Cotes Prado Alba Marina¹

RESUMEN

Con el propósito de mejorar las condiciones en el establecimiento de plántulas de mora producidas *in vitro*, se evaluó un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) a una concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹ en dos frecuencias de aplicación, una cada siete días y otra cada 14 días desde el momento de la siembra, como parte del proceso de endurecimiento utilizando turba como sustrato. Las variables evaluadas fueron peso fresco y peso seco. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionó la aplicación del bioplaguicida cada 14 días, con el cual se obtuvieron los mayores valores de peso seco promedio (0.22 g.) con más del 46.6% y 33.3% en producción de biomasa respectivamente con relación al testigo (0.15 g.) y con la aplicación del bioplaguicida cada 7 días (0.17 g.), este último tratamiento sólo presentó un 13.3% de aumento en biomasa con relación al testigo. Así mismo se observó mejor establecimiento, desarrollo y vigor de las plántulas reflejado en el crecimiento del sistema radicular, tallos y hojas.

El resultado obtenido evidenció que la aplicación del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003) en plántulas de mora producidas *in vitro* presentó efectos benéficos en su crecimiento y adaptabilidad al sustrato.

PALABRAS CLAVE: *Rubus glaucus*, *Trichoderma koningiopsis*, bioplaguicida, promoción de crecimiento, producción limpia.

INTRODUCCIÓN

Una estrategia para el manejo de los problemas fitosanitarios en un programa de agricultura sostenible, es el control biológico, utilizado de manera integral con las diversas prácticas culturales usadas en el manejo del cultivo. El uso de buenas prácticas para la producción de la mora es un requisito indispensable para su comercialización y para la apertura de nuevos mercados. Dentro de ese contexto, la implementación de sistemas de producción de semilla de alta calidad que

¹ Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), CORPOICA, Km. 14 vía Mosquera, Cundinamarca.

Autor de correspondencia: Alba Marina Cotes, Ph.D. Fitopatología, e-mail: amcotes@corpoica.org.co

asegure la sanidad del cultivo, es un paso esencial para la producción limpia, siendo el control biológico uno de los elementos principales.

El control biológico de los agentes patógenos de las plantas se define como la reducción del inóculo de un agente patógeno o de su actividad patogénica mediante la utilización de uno o más organismos diferentes al hombre (Baker, 1987). Los microorganismos biocontroladores han demostrado ventajas frente al uso de moléculas químicas ya que no generan riesgos para el medio ambiente; no son tóxicos; no presentan problemas de residualidad y, en muchos casos, la eficacia demostrada ha sido comparable a la de otros productos químicos recomendados (Van Lenteren, 2000, Shtienberg y Elad, 2002).

Ciertos agentes biocontroladores como *Trichoderma* spp. utilizan varios mecanismos de acción para controlar un agente patógeno.

Diferentes autores han atribuido el fenómeno de control del micoparasitismo y a la capacidad de este antagonista para producir toxinas. Dicho fenómeno ha explicado el control ejercido por diferentes cepas contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia americana* (Weinding, 1934), *Phytophthora* spp. (Howel y Stipanovic, 1980), *Pythium ultimum* (Lumsden et al., 1992), entre otros. Otros autores han atribuido el fenómeno de control a la competencia del hongo por espacio y nutrientes y particularmente por la habilidad de algunas cepas para colonizar la rizósfera (Howel et al., 2000; Harman, 2001). Recientemente, se ha evidenciado que el fenómeno de control de diversos agentes patógenos depende de la producción de enzimas líticas de *Trichoderma* spp. del tipo quitinasas y glucanasas. Estas enzimas demuestran capacidad para romper los polisacáridos quitina y B-glucanos, constituyentes de la pared de los agentes patógenos que le confieren rigidez a su pared celular (Howell, 2003). Esta acción enzimática ha sido descrita en la interacción cebolla- *Sclerotium cepivorum* - *T. koningii* (Metcalf y Wilson, 2001). Igualmente, Lorito et al. (1998), transfirieron el gen que codifica una endoquitinasa de *T. harzianum* en tabaco y papa y obtuvieron en estas plantas una resistencia de amplio espectro contra diferentes agentes patógenos. Otro concepto interesante con relación a la acción de las enzimas de *Trichoderma* spp. es descrito por Elad y Kapat (1999), quienes demostraron que la protección conferida por *T. harzianum* contra *B. cinerea* en frijón se debe, principalmente, a la producción de proteasas que inactivan las exo y endopoligalacturonasa, pectin-metilesterasa, pectato liasa poligalacturonasa, celulasa y cutinasa del agente patógeno. El principal rol fue atribuido a una cistein proteasa (Elad, 2000).

Del mismo modo, la inducción de resistencia en la planta hospedera es otro mecanismo que ha sido demostrado en plántulas de cohombro en las que, después de la inoculación con *T. harzianum* se observó aumento de las actividades de peroxidasa y quitinasa, así como acumulación de calosa (Yedidia et al., 1999). Posteriormente, en la misma interacción se demostró que la inoculación con *T. harzianum* inducía diferentes proteínas relacionadas con la patogénesis dentro de las que se destacan hidrolasas (Yedidia et al., 2000). Un estudio similar demostró que, al inocular semillas de algodón con *T. virens* o con sus filtrados de cultivo, se estimula en las raíces de las plántulas, la síntesis de altas concentraciones de terpenoides altamente inhibitorios de *R. solani* (Howell et al., 2000). También se demostró que, al aplicar *T. harzianum* en sitios espacialmente separados de aquel en el que se inoculaba *B. cinerea* se logra entre un 25 y un 100% de reducción de la enfermedad en tomate, lechuga, pimentón, frijón y tabaco. Este efecto se relacionó con la inducción de resistencia sistémica lo cual ha sido igualmente demostrado cuando se usa una cepa de *T. hamatum* en rábanos (Krause et al., 2003), y en pepino (Khan et al., 2004) y una cepa de *T. harzianum* contra *Phytophthora capsici* en pimiento. En este último se observó acumulación de capsidiol (Sid Ahmed et al., 2000).

Un efecto de *Trichoderma* que también podría tener un rol en el control ejercido contra diferentes elementos patógenos es la estimulación del crecimiento vegetal, ya que este microorganismo tiene la habilidad de incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plántulas, en

especial del sistema radical. Este efecto estimulante de crecimiento causado por *Trichoderma* ha sido demostrado al aplicarse *T. harzianum* en plántulas de pepino, lo cual se atribuye a la penetración del biocontrolador dentro de las raíces y el control de agentes patógenos en la rizósfera. Esta respuesta ha sido descrita por Ahmad y Baker (1987) en cultivos de pepino, arveja, tomate y rábano, y, además, Windham *et al.* (1986) en tabaco y tomate, entre otros autores. Se han sugerido algunas explicaciones a este fenómeno que involucran desde la inhibición y alteración de la microflora normal de las raíces, la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento (factores de crecimiento y fitohormonas) y la liberación de nutrientes en el suelo (Yedia *et al.*, 1999).

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA (CBB), se realizan diferentes investigaciones que han permitido aislar, seleccionar, producir, formular y evaluar microorganismos nativos altamente eficaces en el control de agentes fitopatógenos. Es el caso del hongo nativo *T. koningiopsis* (aislamiento Th003) con el cual se ha obtenido entre 70% y 100% de control en los siguientes patosistemas: *R. solani* en frijol (Cotes, 1993); *P. splendens* en frijol y pepino (Cotes *et al.*, 1996); *R. solani* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en tomate (Cotes *et al.*, 2001); *B. cinerea* y *Oidium* sp. en tomate (Moreno, 2003); *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar *et al.*, 2004). Dichos modelos han involucrado actividades a nivel de laboratorio, pruebas experimentales bajo condiciones controladas en invernadero y a nivel de cultivos comerciales, en campo abierto e invernadero.

A este aislamiento no solamente se le ha atribuido una acción directa en el control de fitopatógenos en la interacción tomate - *F. oxysporum* (Cotes, 2001), sino un efecto de inducción del crecimiento vegetal (Cotes *et al.*, 2001) y un efecto en inducción de respuestas de defensa en las plantas (Cotes *et al.*, 1996; Cotes *et al.*, 2001).

A partir de este aislamiento se ha desarrollado en CORPOICA un bioplaguicida microbiano el cual consiste en un granulado dispersable que puede ser aplicado directamente al suelo o dispersado en agua y se utiliza para el tratamiento de semillas y sustratos de siembra, ya que puede ser empleado con equipos comunes de aspersión. El presente artículo muestra los resultados obtenidos con el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003) en material de mora seleccionado participativamente con agricultores de Silvania (ver artículo Espinosa *et al.*, de esta compilación).

MATERIALES Y METODOS

Se evaluó el efecto de la aplicación de un bioplaguicida granulado a base de *T. koningiopsis* Th003 (Figura 1) sobre la promoción de crecimiento vegetal en plántulas de mora de las accesiones Monteloro, Monterrico y Sin Espinas seleccionadas de acuerdo a criterios participativos con agricultores de Silvania y propagadas *in vitro* en el Laboratorio de Micropropagación de Plantas del CBB (ver artículos Espinosa *et al.* y Valderrama *et al.* de esta compilación, Figura 2).

Ocho días previos al transplante de las plántulas de mora, se humedeció según la capacidad del campo, el sustrato de siembra (turba) con una suspensión del producto granulado Th003 a una concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹, con el fin de establecer el antagonista en el sustrato. Previo al transplante, las plántulas de 28 días *in vitro*, de las tres accesiones mencionadas se sumergieron en una suspensión de Th003 a igual concentración (Figura 3). Se realizaron tres tratamientos: un primer tratamiento (testigo) consistió en plántulas sembradas en sustrato humedecido a capacidad de campo con agua de la llave y dos tratamientos con sustrato humedecido con una suspensión del bioplaguicida Th003 a una concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹. Estos últimos se diferenciaron en las aplicaciones de refuerzo del bioplaguicida, realizadas cada siete días durante un mes y aplicaciones de refuerzo cada catorce días durante un mes en el proceso de endurecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el peso seco promedio de las plantas, se encontraron diferencias significativas entre el peso seco de las plantas tratadas con el bioplaguicida granulado de Th003, aplicado en el momento del transplante, con una frecuencia de 14 días, respecto a los demás tratamientos. Presentaron un peso seco promedio de 0.22 gramos con más del 46.6% en la producción de biomasa respecto al testigo 33.3% (0.15 g.) y con la aplicación del bioplaguicida granulado cada 7 días (0.17 gramos) (Figuras 4 y 5).

El peso seco entre plántulas con aplicación del bioplaguicida granulado aplicado al momento del transplante cada 7 días durante un período de 28 días (0.17 g.) y el testigo absoluto (0.15 g.), no presentó diferencias significativas (Figura 5). Sin embargo, cuando las plántulas fueron tratadas con el bioplaguicida cada 14 días, durante la fase de endurecimiento, se adaptaron mejor y presentaron los mayores valores de peso seco promedio con relación a los demás tratamientos (Figuras 4 y 5). En las plantas correspondientes al testigo se observó menor crecimiento y desarrollo del sistema radicular, tallos y hojas, además de hojas secas y cloróticas debido al estrés ocasionado al retirarlas del contenedor y del medio de crecimiento.

Con la aplicación de *T. koningiopsis*, las plantas presentaron una mejor tolerancia y adaptabilidad al sustrato y se observaron efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de las plantas respecto al control (Figuras 4 y 5).

CONCLUSIÓN

La aplicación del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003) en plántulas de mora producidas *in vitro* produjo efectos benéficos en su crecimiento y adaptabilidad al sustrato.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Micropropagación de Plantas del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA por proveer el material multiplicado *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, J.S., Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. **77**:182-189.
- Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plants pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. **25**: 67-85.
- Cotes, A.M. 1993. Study of common bean protection against damping-off by treatment of seeds with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de Doctorado. Gembloux, Facultad de Ciencias Agronómicas. Bélgica. 120 p.
- Cotes, A. M., Lepoivre, P., Semal, J. 1996. Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. *European Journal of Plant Pathology*. **102**: 497-506.
- Cotes, A.M. 2001. Biocontrol of fungal plant pathogens - from the discovery of potential bio-control agents to the implementation of formulated products. *IOBC Bulletin*. **24**: 43-47.
- Cotes, A. M., Cárdenas, A., Pinzón, H. 2001. Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *IOBC Bulletin*. **24**: 259-263.

- Elad, Y., Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. **105**:177-189.
- Elad, Y. 2000. *Trichoderma harzianum* T 39 preparations of biocontrol of plant disease- control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladisporium fulvum*. *Biocontrol science and technology*. **10**: 499-507.
- Harman, G.E. 2001. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*. **84**: 377-393.
- Howell, C.R., Stipanovic, R.D. 1980. Suppression of *Phytophthora ultimum* induced damping-off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology*. **70**: 712-715.
- Howell, C.R., Hanson, L.E., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. **90**: 248-252.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. **87**: 4-10.
- Khan, J., Ooka, J.J., Miller, S.A., Madden, L.V., Hoitink, H.A.J. 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against phytophthora crown rot and leaf blight. *Plant Disease*. **88**: 280-286.
- Krause, M.S., De Ceuster, T.J., Tiquia S.M., Michel Jr., F.C., Madden L.V., Hoitink, H.A. 2003. Isolation and characterization of rhizobacteria from composts that suppress the severity of bacterial leaf spot of radish. *Phytopathology*. **93**: 1292-1300.
- Lorito M., Woo S.L., Garcia-Fernandez I., Colucci G., Harman G.E., Pintor-Toro J.A., Filipone E., Muccifora S., Lawrence C., Zoia A., Tuzun S., Scala F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **95**: 7860-7865.
- Lumsden, R.D., Locke, J.C., Adkins, S.T. Walter, J.F., and Ridout, C.J. 1992. Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Glocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathology*. **82**: 230-235
- Metcalf D.A., Wilson C.R. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology*. **50**: 249-257.
- Moreno, C.A. 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con énfasis en mildew polvoso (*Oidium* sp.). Trabajo de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. 106p.
- Shtienberg, D., Elad, Y. 2002. Is it possible to cope with variability of biological control? (abstract). En: Y. Elad, J. Köhl y N. Delen (eds.). Influence of abiotic and biotic factors on biocontrol agents. Seventh meeting of the working group IOBC. May. Turkey. Pune Bay, Kusadasi. p.19.
- Sid Ahmed, A., Pérez, C., Candela M.E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*. **106**: 817-824.
- Van Lenteren, J.C. 2000. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy?. *Crop Protection*. **19**: 375-384.
- Villamizar, L., Moreno, C., Paris, A., Cotes, A., Garzón, C. 2004. Development of biopesticide prototypes for controlling pathogens in vegetables. En: Diseases Biocontrol. International Workshop: Development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food productions systems. Book of abstracts. Sevilla, España. Ediciones de la UdL. p. 136.
- Weinding R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*. **24**: 1153-1179.
- Windham, M., Elad, Y., Baker., R. 1986. Mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. **76**: 518-521.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. 1999. Induction of defense in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology*. **65**:1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2000. Induction and accumulation of pathogenesis related protein activity during the early stages of root colonization by *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **38**: 863-873.

FIGURAS

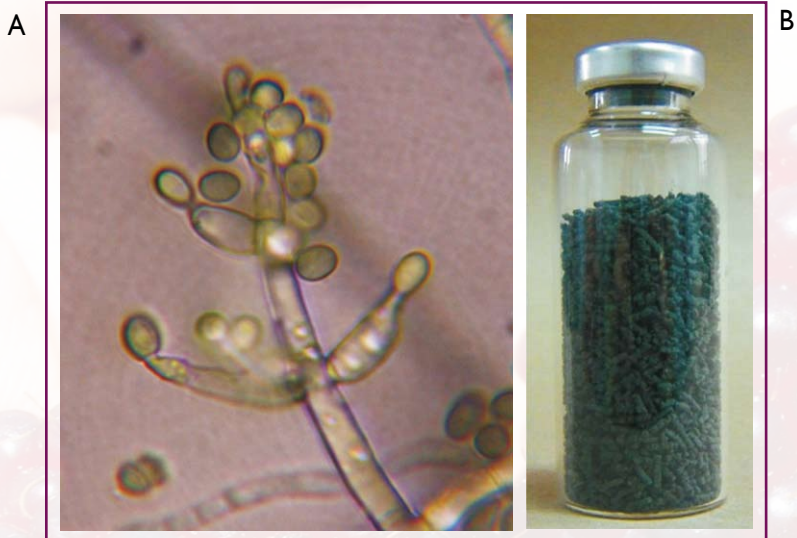


Figura 1. A. Observación microscópica de *T. koningiopsis* (40x). **B.** Producto granulado a base de *T. koningiopsis* (Th003).



Figura 2. Plántulas de mora producidas *in vitro*.

Figura 3. Plántulas de mora *in vitro* sumergidas en una suspensión de un bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* (Th003) a una concentración de 1×10^6 conidios.mL⁻¹.



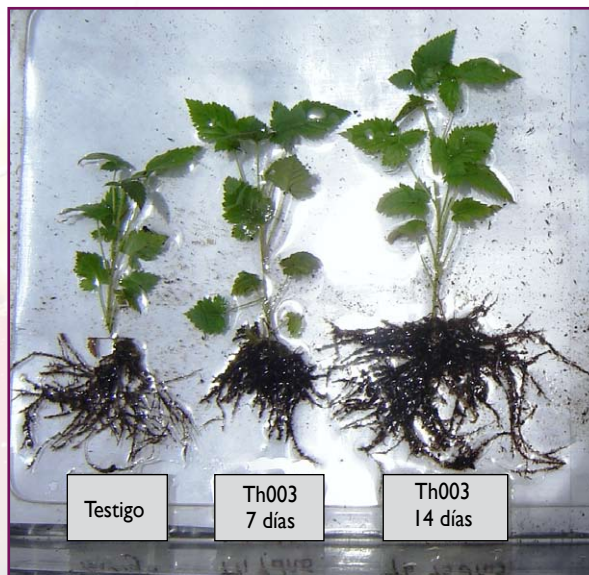


Figura 4. Comparación de plántulas de mora del genotipo Monteloro producidas *in vitro* e inoculadas con *T. koningiopsis* Th003. La aplicación se hizo al momento del transplante y cada siete días (Th003 7 días) y al momento de transplante y cada catorce días (Th003 14 días). Evaluación después de 35 días post-transplante.

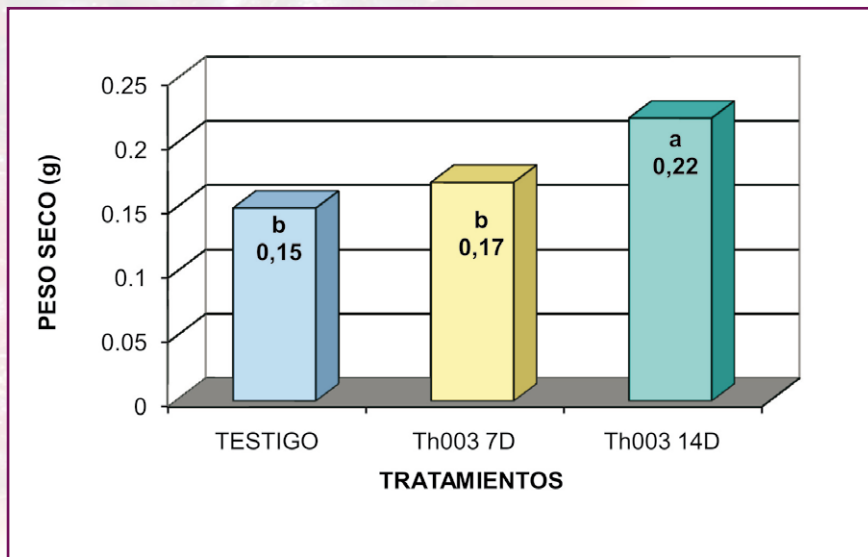


Figura 5. Peso seco promedio de plántulas de mora producidas *in vitro* inoculadas con *T. koningiopsis* Th003 (evaluación a los 35 días). La aplicación se hizo al momento del transplante y cada siete días (Th003 7D), o al momento de transplante y cada catorce días (Th003 14D). Valores con letras distintas difieren significativamente entre sí, conforme a Kruskal Wallis, LSD. ($\alpha=0.05$).