

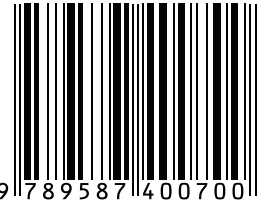


UN PRODUCTO
Corpoica
 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
libra
 librería virtual agropecuaria
www.corpoica.org.co



USO DE *Trichoderma koningiopsis* Th003 PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS EN HORTALIZAS

ISBN: 978-958-740-070-0





USO DE
***Trichoderma koningiopsis* Th003**
PARA EL CONTROL DE
FITOPATÓGENOS EN HORTALIZAS

Gómez, M.I y Santos, A.M. (Eds.) // Uso de *Trichoderma koningiopsis* Th003 para el control de fitopatógenos en hortalizas. CORPOICA: Mosquera. Colombia. 2011. 64 p.

Palabras clave: CONTROL BIOLÓGICO, TOMATE, LECHUGA, FORMULACIONES, BIOPLAGUICIDAS, FERMENTACIÓN.



© Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

Línea de atención al cliente: 018000121515

atencionalcliente@corpoica.org.co

www.corpoica.org.co

ISBN: 978-958-940-070-0
Código único interno: 1291
Código de agenda: 1457
Primera edición: Septiembre de 2011
Tiraje: 600 Ejemplares

EQUIPO TÉCNICO:

Investigadores

Ph.D. Martha Isabel Gómez Álvarez
I. A. M.Sc. Carlos Andrés Moreno Velandia
Ph.D. Alba Marina Cotes Prado
Microbiólogo Alexander Smith May
D. Sc. Laura Fernanda Villamizar Rivero
I.Q. M. Sc. Andrés Díaz García
Microbióloga M. Sc. Magda Xiomara García Rodríguez
I. Q. Fredy Mauricio Cruz Barrera
Ingeniera Ambiental Jenny Alexandra Molina Monroy

Estudiante

John Alexander Rodríguez Parra

Auxiliares de campo y laboratorio

Víctor Martín Díaz Rodríguez
Juan Carlos Barrios Murcia
Claudia Mesa
Gabriela Perdomo

Editores

Martha Isabel Gómez Álvarez
Adriana Marcela Santos

Diseño y diagramación:

Hernando Mejía Osorio

Producción editorial:

Impresión y encuadernación



<http://www.produmedios.org>

Teléfono: 422 73 56 - Bogotá, D.C.

Impreso en Colombia
Printed in Colombia

TABLA DE CONTENIDO

- 9** AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN
DE *Trichoderma koningiopsis*
- 19** FORMULACIONES A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*
- 27** ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOPLAGUICIDA
A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003
- 43** ESTUDIOS PARA AJUSTAR LA FORMA DE APLICACIÓN
DEL BIOPLAGUICIDA WP A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003
EN EL CULTIVO DE TOMATE



INTRODUCCIÓN

El sector hortícola de la sabana de Bogotá y de la región del Sumapaz ofrece enormes oportunidades en los mercados nacionales e internacionales por su cercanía al mayor centro de consumo y distribución de hortalizas del país. No obstante, este potencial está seriamente comprometido debido a los problemas de contaminación de suelos, el uso indiscriminado de agroquímicos, suelos erosionados y degradados, contaminación microbiológica y sustancias tóxicas (como metales pesados en alimentos). El desarrollo de tecnologías apropiadas adecuadamente valoradas ambiental y socio económicamente se convierten entonces en una contribución importante para reducir la brecha en la obtención de productos hortícolas inocuos y de alta calidad para el mercado nacional e internacional.

Por un lado, el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) es afectado por una diversidad de patógenos, siendo las especies *Sclerotinia minor* Jagger y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary los hongos que ocasionan las mayores pérdidas económicas. Este hongo se puede encontrar en todas las áreas del mundo en donde se produce lechuga –tanto en campo abierto como en invernadero– ocasionando pérdidas de plantas que pueden oscilar entre un 10% y 50% (Nico *et al.*, 2001). Las dos especies de *Sclerotinia* presentan alta similitud en los aspectos biológicos y morfológicos, diferenciándose en que la primera (*Sclerotinia minor*) produce esclerocios de menor tamaño que la segunda (*Sclerotinia sclerotiorum*), aunque la *S. sclerotiorum* produce además frecuentemente apotecios, fenómeno que en la *S. minor* ocurre raramente (Subbarao, 1998). En el caso de la región hortícola de la sabana de Bogotá Occidente, no se tiene conocimiento de la especie del fitopatógeno más predominante en las áreas de cultivo, lo cual se-

ría importante para determinar los riesgos con respecto a la producción de inóculo (esclerocios y ascosporas), aspecto relevante para tomar decisiones de manejo de la epidemia.

La producción intensiva de lechuga en los municipios de la región Sabana de Occidente en el departamento de Cundinamarca se caracteriza por la dependencia exclusiva de fungicidas de síntesis química, cuyo uso es permitido en otros cultivos diferentes debido a que actualmente no existen productos registrados para el manejo de esta enfermedad en lechuga y dado que tampoco se cuenta con variedades resistentes a este patógeno. Esta situación es particularmente grave si se tiene en cuenta el corto ciclo del cultivo de la lechuga, que se consume como producto fresco y en el que además, por no haber productos registrados para este cultivo, no hay periodos de carencia definidos para la aplicación de fungicidas. Justamente, el exagerado e indiscriminado uso de fungicidas por parte de los agricultores aumenta los riesgos de contaminación ambiental, de desarrollo de resistencia y de residualidad de ingredientes activos en el producto de consumo.

Dadas las tendencias de cambio en los hábitos de consumo por alimentos sanos y el contexto actual de las negociaciones comerciales internacionales, es necesario plantear y dirigir esfuerzos de investigación, desarrollo y transferencia de tecnologías alternativas que fortalezcan la competitividad del cultivo de la lechuga en el país.

Por su parte, el tomate (*Lycopersicon esculentum*) es un cultivo de gran importancia a nivel nacional; de acuerdo con el Ministerio de Agricultura, en Colombia ocupa el 14,5% del área sembrada en hortalizas en el país. En el año 2006 se culti-

varon 8.668 ha, que correspondieron a una producción de 241.987 ton con un rendimiento de aproximadamente 26 ton/ha. Si esta misma área se produjera con alta tecnología, se podría llegar a rendimientos de producción de 100 ton/ha. Los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Norte de Santander, Santander y Boyacá representan las áreas de mayor producción de tomate con un 12%, 12%, 12%, 11% y 10% de la producción nacional respectivamente.

La importancia socioeconómica de este cultivo en el país radica en la generación de empleo y en que es fuente de ingreso en zonas rurales. Su producción se caracteriza por realizarse en pequeñas áreas, estar asociada generalmente con pequeños y medianos agricultores, abarcar un periodo vegetativo corto, ser intensiva en el uso de mano de obra e insumos y tener altos costos de producción (Vallejo, 1999). Ahora bien, la producción nacional ha venido decreciendo frente a la creciente demanda debido a una serie de problemas que afronta el cultivo relacionados con los bajos rendimiento y calidad, extrema susceptibilidad de los cultivares a insectos plaga, enfermedades, condiciones adversas de clima y suelo, elección desafortunada de materiales que se adapten a condiciones particulares, y carencia de tecnología apropiada para la producción y manejo poscosecha.

Las enfermedades más frecuentes en los cultivos de tomate en el país son causadas por los hongos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Oidium lycopersicum*, *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani*, las cuales inciden de manera importante en la disminución de los rendimientos (de Vis et al., 2001) y constituyen el motivo de las altas tasas de aplicación (frecuencia y dosis) de fungicidas de síntesis química.

Respecto a esto, el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA ha trabajado en la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades usando microorganismos antagonistas para el desarrollo de bioplaguicidas. Es así como se seleccionó la cepa nativa de *Trichoderma koningiopsis* Th003 (antes identificada como *Trichoderma ko-*

ningii) con demostrada actividad previa en varios patosistemas, donde se han obtenido resultados de control entre 50% y 70%. Es el caso de *Pythium splendens* en frijol y pepino (Jacqmin et al., 1993); *R. solani* en frijol (Mezui et al., 1994); *R. solani* en papa (Beltran et al., 2007), *R. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Cotes et al., 2001); *B. cinerea* y *Oidium* sp. en tomate (Moreno et al., 2007); *S. sclerotiorum* en lechuga (Cotes et al., 2007) y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar et al., 2004). Dichos modelos han involucrado actividades a nivel de laboratorio, pruebas experimentales en invernadero bajo condiciones controladas y en cultivos comerciales en campo abierto e invernadero.

El logro de un bioplaguicida implica el cumplimiento de diversas etapas técnicas que aseguren la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichos pasos comprenden el aislamiento del microorganismo y su conservación; la evaluación de su actividad biocontroladora; las investigaciones para conocer la ecología, fisiología y taxonomía del biocontrolador potencial; el estudio de los mecanismos de acción implicados en dicha actividad; su producción masiva y formulación; la determinación de dosis; las formas y frecuencias de aplicación; la evaluación del producto en campo; los estudios de impacto ambiental; y la caracterización molecular y/o huella genómica del microorganismo para lograr su posterior patentamiento cuando este proceso aplique y dependiendo del país.

En el presente trabajo se muestra parte de los resultados generados en el proyecto de investigación “**Desarrollo y ajuste de los procesos tecnológicos requeridos para el registro de dos formulaciones a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 para los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y lechuga (*Lactuca sativa*)**” financiado por el Corredor Tecnológico Agroindustrial y la Cámara de Comercio de Bogotá durante los años 2009 a 2010. El bioplaguicida desarrollado a base de *T. koningiopsis* para el control de fitopatógenos del suelo y foliares en este caso se evaluó sobre *S. sclerotiorum* y *S. minor* en el cultivo de lechuga, y sobre *R. solani* y *F. oxysporum* en el cultivo de tomate.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beltrán, C.; Cotes, A. M.; Paris, A. 2007. Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* Kuhn in potato. IOBC WPRS Bulletin, 30: 55-58. Corporación Colombia Internacional.
- Cotes, A. M.; Moreno, C. A.; Molano, L. F.; Villamizar, L.; Piedrahita, W. 2007. Prospects for integrated management of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce. IOBC WPRS Bulletin, 30: 391-394.
- Jacqmin, B.; Cotes, A. M. ; Lepoivre, P.; Semal, J. 1.993. Effect of the combination of seed priming and *Trichoderma* treatment on incidence of damping-off agents. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 58/3b: 1321-1328.
- De Vis, R.; Fuentes, L. S.; Escobar, H. y Lee, R. 2001. Manejo integrado de plagas y enfermedades. En: Lee, R. y Escobar, H. (Editores). Producción de tomate bajo invernadero. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Pp. 59-90.
- Jacqmin, B. ; Cotes, A. M. ; Lepoivre, P.; Semal, J. 1.993. Effect of the combination of seed priming and *Trichoderma* treatment on incidence of damping-off agents. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 58/3b, 1321-1328.
- Mezui, J. C.; Cotes, A. M.; Lepoivre, P.; Semal, J. 1.994. Evaluation of seed priming and *Trichoderma* treatment for the biological control of damping-off agents. In Diseases and Insects in Forest Nurseries. Ed. INRA, Paris (Les Colloques, N° 68). pp.189-196.
- Moreno, C. A.; Cotes, A. M.; Guevara, E. 2007. Biological control of foliar diseases in tomato greenhouse crop in Colombia: selection of antagonists and efficacy tests. IOBC WPRS Bulletin 30: 59-62.
- Nico, A.; Mónaco, C.; Rollan, M. C.; Dal Bello, G. 2001. Effect of organic amendments on survival and pathogenicity of *Sclerotinia minor*. IOBC WPRS Bulletin 24: 271.
- Subbarao, K. V. 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. Plant Disease, 82: 1068-1078.
- Vallejo, F. A. 1999. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 216 p.
- 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. pp. 136.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Corredor Tecnológico Agroindustrial y a la Cámara de Comercio de Bogotá por su apoyo financiero en la realización del trabajo:

Consuelo Caldas Cano

Presidenta Ejecutiva, Cámara de Comercio de Bogotá

María Isabel Agudelo Valencia

Vicepresidenta de Competitividad Empresarial
Cámara de Comercio de Bogotá

Nancy Roció Duran Hernández

Director Modelo Empresarial de Gestión Agroindustrial
Cámara de Comercio de Bogotá

Luis Felipe Duarte Ramírez

Coordinador Modelo Empresarial de Gestión Agroindustrial, Sede Sumapaz.
Cámara de Comercio de Bogotá.

Jesús Alberto Villamil

Director Ejecutivo
Corredor Tecnológico Agroindustrial

Rafael Florez Fauna

Servicio Nacional de Aprendizaje, Mosquera

De igual manera un reconocimiento al personal directo y administrativo del Centro de Investigación Tibaitatá y del Centro de Biotecnología y Bioindustria, por su valioso apoyo y disposición durante el transcurso del trabajo.

AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma koningiopsis*

Alba Marina Cotes

Investigadora Laboratorio de Control Biológico,
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA,
Km. 14 vía Bogotá-Mosquera.
E-mail: amcotes@corpoica.org.co



CAPÍTULO 1

El potencial de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico de fitopatógenos fue reconocido inicialmente en 1930, reportándose en los años subsiguientes el control de muchas especies (Aluko y Hering, 1970; Bliss, 1951; Chet, 1987; Elad y Kapat, 1999; Harman, 2001; Howell, 1982; Lifshitz *et al.*, 1986; Lumsden *et al.*, 1992, Sharon *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 1972; Yedidia *et al.*, 1999, 2000; Zhang *et al.*, 1996) y culminando en 2004 con 16 productos registrados ante la 'United States Environmental Protection Agency' (EPA) junto con muchos otros registrados en India, Israel, Nueva Zelanda y Suecia (Howel *et al.*, 2003), recomendados tanto para el control de patógenos del suelo y foliares como para la inducción del crecimiento vegetal.

A nivel nacional, los desarrollos sobre este microorganismo han sido lentos; los primeros estudios sobre *Trichoderma* como agente de control biológico se reportaron en 1980, y ha sido en los últimos años en que se han registrado ante el ICA

varios productos a base de este microorganismo, comercializados para el control de enfermedades causadas por hongos del suelo (ICA, 2009).

Con todo, y a pesar del potencial de este género en el control biológico, no todas las especies ni todas las cepas de una misma especie son eficientes como agentes de dicho control, razón por la que se requiere de un trabajo minucioso que permita evaluar diferentes aislamientos y seleccionar el que presente mayor actividad biocontroladora y consistencia en esta actividad. Es así como al evaluar la actividad biocontroladora contra *Pythium splendens* en frijol de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp. nativos de Colombia (codificados de 1 a 12), en comparación con un aislamiento de referencia (codificado como 13) y de uno que constituye el principio activo de un producto registrado en el mercado internacional (codificado como 14), se eligió el aislamiento nativo Th003, identificado como *Trichoderma koningiopsis* (Figura 1) (Cotes *et al.*, 1993).

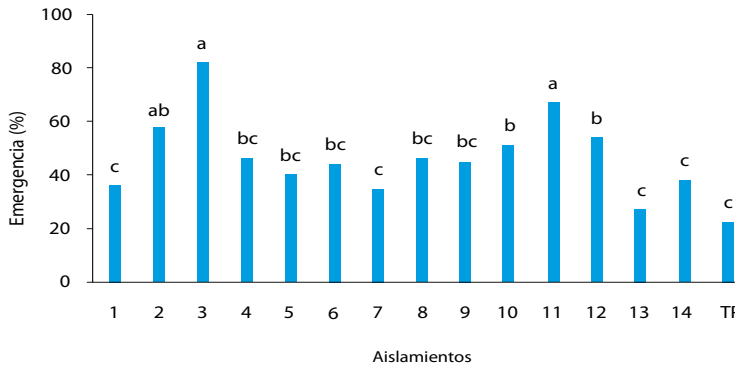


Figura 1. Efecto de 14 aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre la emergencia de plántulas de frijol en un suelo inoculado con *Pythium splendens*. TP (Testigo Patógeno). Las columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a $P < 0,05$.

Una vez seleccionado un agente de control biológico eficiente, el estudio de los mecanismos empleados por esta cepa microbiana es esencial no solo para ayudar a entender el fenómeno sino desde el punto de vista aplicado en la producción y formulación del biocontrolador, y en el manejo de las enfermedades en campo. Las investigaciones realizadas en el pasado han demostrado que los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., contra diversos patógenos son muchos, variando

para cada cepa y en cada interacción hospedero-patógeno (Howell, 2003); por ello, en la mayoría de los países la definición de este aspecto es fundamental para el registro de los productos.

Sin embargo, en Colombia son pocos los estudios llevados a cabo con microorganismos biocontroladores en general y menos aún los realizados particularmente con cepas nativas de *Trichoderma* spp. Es por esto que el conocimiento de los

mecanismos de acción permite hacer más efectivo el control ejercido por el agente de control biológico y entender sus limitaciones. Se pueden desarrollar sistemas efectivos de producción masiva, de formulación, de almacenamiento y de aplicación en campo, pero si los mecanismos de acción del microorganismo no se potencializan estos desarrollos pueden resultar fallidos en condiciones de su aplicación práctica.

En relación con los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., muchos autores han atribuido el fenómeno de control al micoparasitismo y a la capacidad de este antagonista para producir toxinas, lo que ha explicado el control ejercido por diferentes cepas contra *Rhizoctonia solani* (Weindling, 1932; Weindling, 1934), *Sclerotinia americana* (Weindling, 1934), *Phytophthora* spp. (Howell y Stipanovic, 1983) y *Pythium ultimum* (Lumsden *et al.*, 1992). Otros autores lo han atribuido a la competencia del hongo por espacio y nutrientes, y particularmente por la habilidad de algunas cepas para colonizar la rizósfera (Harman, 2001; Howell *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1996); y más recientemente se ha atribuido el fenómeno de control de diversos patógenos a la producción de enzimas líticas de *Trichoderma* spp. del tipo quitinasas y glucanasas. Estas enzimas han demostrado capacidad para romper los polisacáridos quitina y β -glucanos, que son constituyentes de la pared de los patógenos y que le confieren la rigidez a su pared celular (Howell, 2003).

La acción enzimática ha sido descrita en la interacción cebolla- *Sclerotium cepivorum*- *T. koningii* (Metcalf y Wilson, 2001). Diversos autores han trabajado para esclarecer el rol de las quitinasas en el mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. Por ejemplo, Lorito transfirió el gen que codifica para una endoquitinasa de *T. harzianum* en tabaco y papa y obtuvo en estas plantas una resistencia de amplio espectro contra diferentes patógenos (Lorito *et al.*, 1998). Cuando plantas de manzano fueron transformadas con los genes que codifican para una exo y una endoquitinasa de *Trichoderma atroviride*, se obtuvo resistencia a *Venturia inaequalis*.

Otro criterio interesante en relación con la acción de las enzimas de *Trichoderma* spp. es el descrito por Elad y Kapat (1999) y Elad (2000), quienes demostraron que la protección conferida por *T. harzianum* contra *Botrytis cinerea* en frijol es debida

principalmente a la producción de proteasas que inactivan las exo y endopoligalacturonasa pectinmetilesterasa, pectato liasa poligalacturonasa, celulasa y cutinasa del patógeno; el principal rol fue atribuido a una cistein proteasa (Elad y Kapat, 1999). Un mecanismo alterno propuesto para explicar la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. es la inducción de resistencia en la planta hospedera, concepto que ha sido verificado en pepino cohombro, donde después de la inoculación con *T. harzianum* se observó un aumento en la actividad de la peroxidasa y quitinasa, además de deposición 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). A su vez, otros dos estudios demostraron lo siguiente:

1. Que cuando se inoculaban semillas de algodón con *Trichoderma virens* o con sus filtrados de cultivo, se inducía en las raíces de las plántulas la síntesis de altas concentraciones de terpenoides altamente inhibitorios de *R. solani* (Howell *et al.*, 2000).
2. Que cuando se aplicaba *T. harzianum* en sitios espacialmente separados de aquel en el que se inoculaba *B. cinerea*, se logró una reducción de la enfermedad que osciló entre 25% y 100% en tomate, lechuga, pimentón, frijol y tabaco. El efecto fue atribuido a la inducción de resistencia sistémica.

Este fenómeno ha sido igualmente demostrado usando una cepa de *Trichoderma hamatum* en rábanos (Krause *et al.*, 2003) y en pepino (Khan *et al.*, 2004), contando una cepa de *T. harzianum* contra *Phytophthora capsici* en pimiento, en el que se observó acumulación de capsidiol (Sid Ahmad, 2000).

Un efecto de *Trichoderma* que también podría tener un rol en el control ejercido contra diferentes patógenos es la estimulación del crecimiento vegetal. Esta respuesta ha sido descrita por varios autores en cultivos de pepino, arveja, tomate, rábano, tabaco y tomate. El fenómeno no ha sido del todo esclarecido, aunque se han sugerido algunas explicaciones, las cuales mencionan la inhibición y alteración de la microflora normal de las raíces y la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento (factores de crecimiento y

fitohormonas); uno de los cuales ya ha sido extraído y caracterizado (Windham *et al.*, 1986).

A propósito, en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA se han realizado diferentes investigaciones que han permitido aislar, seleccionar, producir, formular y evaluar cepas nativas de microorganismos altamente eficaces en el control de fitopatógenos. Es el caso del hongo nativo *Trichoderma koningiopsis* (cepa Th003), antes identificado como *Trichoderma koningii*. Con esta cepa se ha obtenido entre el 70% y el 100% de control en los siguientes patosistemas: *Pythium splendens* en frijol y pepino (Cotes, 1993); *R. solani* en frijol (Cotes, 1993); *R. solani* en papa (Beltrán *et al.*, 2007), *R. solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (Cotes *et al.*, 2001); *B. cinerea* y *Oidium* sp. en tomate (Moreno, 2003); *S. sclerotio-*

rum en lechuga y *Alternaria dauci* en cilantro (Villamizar *et al.* 2004). Dichos modelos han involucrado actividades a nivel de laboratorio, pruebas experimentales en invernadero bajo condiciones controladas y a nivel de cultivos comerciales en campo abierto e invernadero.

Este fenómeno de protección se ha relacionado con varios mecanismos, los cuales se ilustran a continuación. Cuando *T. koningiopsis* (cepa Th003) fue aplicado en el suelo, se observó una correlación positiva entre la actividad de las enzimas exo- β -1,3 glucanasa y exoquitinasas producidas por este biocontrolador y el control del fitopatógeno del suelo *P. splendens* en frijol, sugiriendo que las enzimas producidas por *T. koningiopsis* en el suelo juegan un rol importante en la degradación de las paredes de los patógenos (Cotes *et al.*, 1994) (Figura 2).

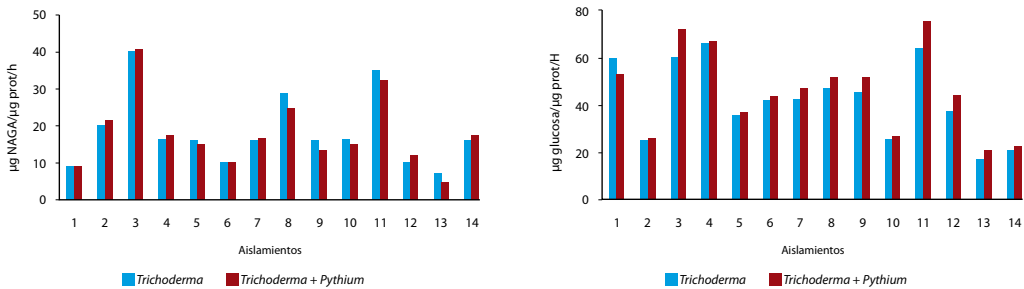


Figura 2. Determinación de la actividad quitinasa (A) y β -1,3 glucanasa (B) en extracto de suelo inoculado con 14 aislamientos de *Trichoderma* spp. o con *Trichoderma* spp. y *P. splendens*.

De otra parte, en diferentes experimentos se presentó también una correlación positiva (coeficiente de correlación 0,7) entre el tiempo de pregerminación de las semillas en presencia del antagonista, la actividad de enzimas de origen vegetal de tipo endo- β 1,3 glucanansas y endoquitinasas, y la protección conferida a las plantas de frijol, mostrando que *T. koningiopsis* puede estimular la producción de estas enzimas en el tejido vegetal, las cuales también podrían estar relacionadas con la degradación de la pared celular de los patógenos (Cotes *et al.*, 1996).

El efecto de las enzimas líticas de origen vegetal contra el patógeno fue posteriormente demostrado con esta misma cepa de *T. koningiopsis* en la interacción tomate - *F. oxysporum* (Clavijo y Cotes, 1998), y por otro lado, en investigaciones llevadas a cabo en las interacciones pepino cohombro - *P. splendens* (Jacqmin *et al.*, 1993), frijol - *R. solani* (Mezui *et al.*, 1994) y tomate - *R. solani*, tomate - *F. oxysporum* (Cotes *et al.*, 2001). Con esta cepa de *T. koningiopsis*, además de un control biológico efectivo ejercido contra estos patógenos, se presentó un fenómeno de inducción de crecimiento vegetal.

Tabla 1. Relación entre el tratamiento de semillas de frijol con celulasa, la colonización del tegumento por *Trichoderma* spp. y el efecto protector contra *P. splendens*.

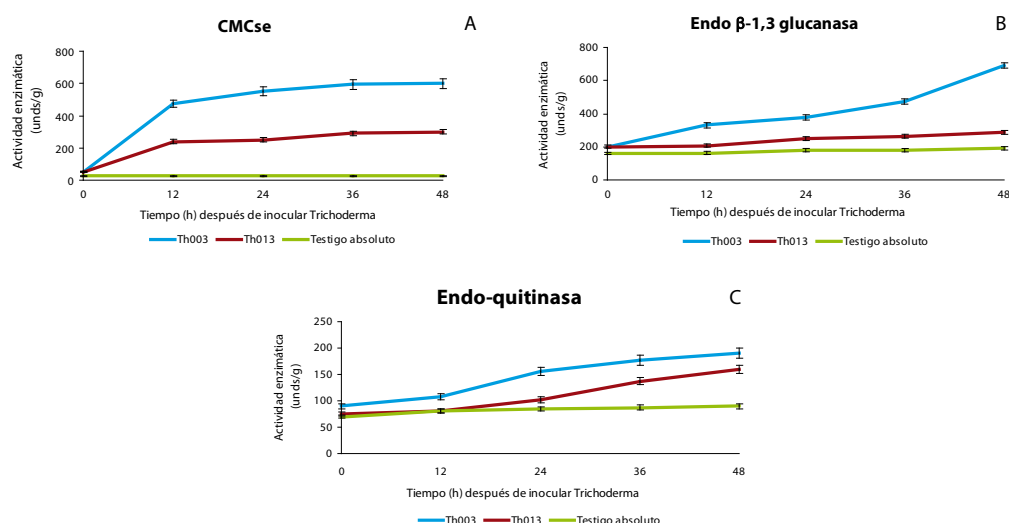
Tratamiento en semilla	Colonización (UFC.g ⁻¹)		Protección (%)		
	Th003	Th013	Th003	Th013	Testigo relativo
Agua	8x10 ⁴	8x10 ³	100	6.8	3.2
Celulasa	1x5 ⁵	7x10 ⁴	100	83.2	43.2

El aislamiento Th003 de *T. koningiopsis* fue seleccionado por su alta actividad biocontroladora de *P. splendens* y se contrastó con el aislamiento Th013, que presentó una baja actividad biocontroladora.

La alta actividad biocontroladora que ha mostrado la cepa Th003 de *T. koningiopsis* frente a diferentes patógenos en diferentes especies vegetales, también ha estimulado el desarrollo de algunas investigaciones realizadas por miembros del mismo grupo, tendientes a dilucidar sus mecanismos de acción.

Es así como al estudiar la interacción *T. koningiopsis* - frijol - *P. splendens*, Cotes *et al.* (1996) demostraron que el control superior al 95% ejercido contra el fitopatógeno al fitoinvigorizar semillas

mediante pregerminación controlada de semillas en matriz sólida durante 24 horas en presencia del biocontrolador estuvo relacionado con varios fenómenos, entre ellos la colonización de los tegumentos por parte de *T. koningiopsis* mediada por la capacidad celulolítica de esta cepa (Tabla 1); el consumo de los exudados de la semilla; la producción de enzimas líticas de origen microbiano del tipo celulazas, exoquitinasas y exo-β-1,3 glucanasas, las cuales demostraron su habilidad para degradar la pared celular del patógeno (Figura 3); y la inducción en el hospedero de proteínas relacionadas por la patogénesis del tipo endoquitinasas y endo-β-1,3 glucanasas que también demostraron su habilidad para degradar la pared celular del patógeno (Figura 4), sugiriendo así un fenómeno de inducción de resistencia.



La resistencia inducida es el proceso por el cual las defensas de la planta son activadas de tal forma que cuando el patógeno infecta es rápidamente reconocido por la planta que desarrolla adecuadas defensas para restringir su desarrollo. La re-

sistencia inducida puede ser localizada (en ésta el sitio de inducción es la única parte de la planta con elevada resistencia) o puede ser sistémica (cuando la inducción en una parte de la planta lleva a la protección de la planta entera).

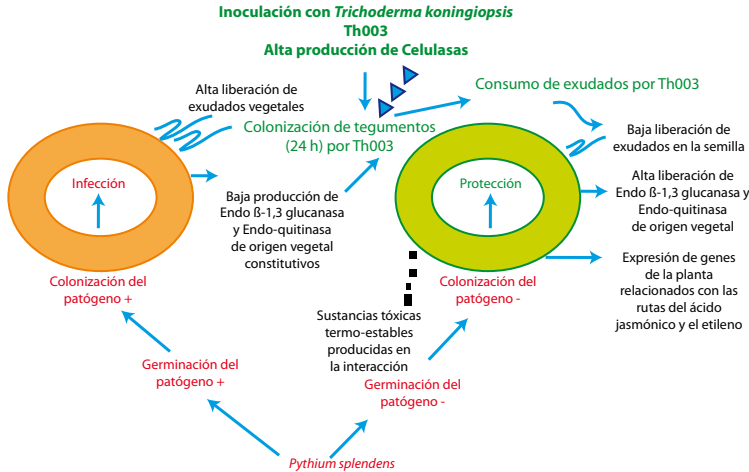


Figura 4. Modos de acción de *T. koningiiopsis* Th003 definidos para la interacción frijol - *P. splendens*. La expresión génica mencionada en el esquema es hipotética para frijol, ya que ésta fue demostrada en la interacción *T. koningiiopsis*-tomate - *F. oxysporum*.

La resistencia sistémica se divide en dos: 'resistencia sistémica adquirida' (SAR) o 'resistencia sistémica inducida' (ISR). La SAR es elicitada por patógenos necrótrofos que causan reacción hipersensible o por químicos tales como el ácido salicílico, el ácido indol acético (INA) o el ácido amino-butírico (BABA) (Ryu *et al.*, 2003). El tema de inducción de resistencia ha sido ampliamente estudiado en relación con las bacterias asociadas a las raíces, las cuales han demostrado que pueden aumentar la resistencia o los niveles de defensa de las plantas a un amplio espectro de patógenos (Whipps, 2001). Dichas bacterias viven en o dentro de las raíces de las plantas y se nutren de los exudados de las raíces (Pieterse *et al.*, 2002). Algunas cepas se conocen con el nombre de 'rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas' o PGPR (del inglés *plant growth-promoting rhizobacteria*) (Wei *et al.*, 1996), las cuales pueden ser usadas como biofertilizantes (Kennedy *et al.*, 2004). Estas bacterias producen efectos directos e indirectos sobre el crecimiento y sobre la resistencia a enfermedades (Kennedy *et al.*, 2004; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

La resistencia inducida por las bacterias es de tipo indirecto, eficiente contra plagas y enfermedades e incrementa la resistencia de la planta en los órganos aéreos al activar la formación de barreras físicas y químicas (Ryu *et al.*, 2003), fenómeno que es conocido como 'resistencia sistémica inducida' (Pieterse *et al.*, 2002). Su ruta de señalización es independiente del ácido salicílico, lo cual la hace diferente de la resistencia sistémica adquirida (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

En el caso de las PGPR se ha demostrado que el control biológico mediado por ISR es fundamentalmente diferente del control biológico debido al antagonismo. En el primero, un amplio rango de patógenos puede controlarse, dado que la protección ocurre en partes de la planta no tratadas o colonizadas por las PGPR; de tal forma que mientras las PGPR colonizan las raíces, una enfermedad foliar puede ser controlada por ISR. En este último caso, dado que las defensas generales del hospedero son activadas, una PGPR que elicita ISR puede provocar la supresión de múltiples patógenos—incluyendo hongos, bacterias, virus y nemátodos— e incluso en algunos casos suprimen

insectos. El estudio de la ISR elicitada por PGPR se ha concentrado en dilucidar las señales de las rutas metabólicas de la planta; sin embargo, evidencias preliminares sugieren que diferentes rutas metabólicas pueden activarse en las plantas, dependiendo de las cepas PGPR utilizadas y del patosistema estudiado.

Algunos géneros de hongos tales como *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Coniothyrium*, *Taloromyces* y *Ampelomyces* también han mostrado su habilidad para inducir resistencia sistémica en una gran variedad de cultivos (De Meyer *et al.*, 1998; Harman, 2001; Howell, 2003). Algunos de estos hongos pueden igualmente tener un efecto positivo sobre el crecimiento y la cosecha al aumentar la solubilidad y la toma de los nutrientes. La defensa sistémica adquirida ha sido ampliamente estudiada y varios genes han sido identificados (Maleck *et al.*, 2000; Glazebrook, 2001). La hipótesis que se ha formulado a partir de estos estudios es que una compleja red de rutas de señalización interdependientes lleva la información sobre la naturaleza del agresor al resto de la planta; no obstante, el conocimiento o entendimiento global de la resistencia de la planta y el control preciso de las relaciones entre las rutas de respuesta es todavía escaso. El reciente desarrollo de herramientas moleculares que permiten el análisis global de la expresión génica, admite responder las preguntas más globales y entender de manera integral fenómenos complejos como la resistencia de la planta o su defensa a fitopatógenos. Una de esas

herramientas son los microarreglos, los cuales permiten monitorear la expresión a nivel genómico (Mysore *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; López *et al.*, 2005).

Con el propósito de demostrar el fenómeno de inducción de resistencia de *T. koningiopsis* Th003, se utilizó el patosistema tomate - *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Para esto, se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) establecidas en cubos de enraizamiento con el sistema radical separado en dos porciones. Cuando Th003 se inoculó en una porción de la raíz 96h antes de inocular *F. oxysporum* en la otra porción, se presentó un retraso significativo de la colonización del fitopatógeno en el sistema vascular de la planta, en comparación con las plantas inoculadas solamente con el fitopatógeno. Este resultado demuestra que *T. koningiopsis* Th003 estimuló respuestas sistémicas de defensa en la planta, dado que el antagonista y el fitopatógeno permanecieron separados espacialmente. En un ensayo paralelo también se demostró la habilidad de *T. koningiopsis* para promover el crecimiento vegetal. Al utilizar microarreglos de tomate TOM1, se demostró que el tratamiento de las plantas con *T. koningiopsis* afectó los niveles de mRNA de 45 genes: 41 en raíces y 4 en hojas, siendo de particular interés la inducción de genes involucrados en las rutas del ácido jasmónico y del etileno. La expresión de los genes seleccionados fue validada utilizando PCR en tiempo real, demostrando correlación entre los dos métodos (Moreno *et al.*, 2009).

- Aluko, M. O.; Hering, T. F. (1970). The mechanism associated with the antagonistic relationship between *Corticium solani* and *Gliocladium virens*. *Trans. Br. Mycol. Soc* 55: 173 - 179.
- Beltrán, C.; Cotes, A. M.; Paris, A. (2007). Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* Kühn, in potato. *IOBC Bulletin Vol. 30* (6) 55 - 58.
- Bliss, D. E. (1951). The destruction of *Armillaria mellea* in *Citrus solis*. *Phytopathology* 41: 665-683.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma* – Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to plant Diseases Control*. I. Chet, ed. Jhon Wiley & Sons, New York. P. 137 - 160.
- Clavijo, G.; Cotes, A. M. (1998). Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate, mediante tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 1, No. 2, p. 58 - 66.
- Cotes (1993). Study of common bean protection against damping-off by treatment of seeds with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de doctorado. Universidad de Gembloux, Bélgica. 121 p.
- Cotes, A. M. ; Lepoivre, P.; Thonart, P. (1994). Relationship between the protective activities of several strains of *Trichoderma* against damping-off agents and their ability to produce hydrolytic enzymes activities in soil or in synthetic media. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 59/3a pp.931- 941.
- 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.; 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 WPRS Bulletin Vol. 24* (3) 259 - 263.
- Elad, Y. and Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathology* 105:177 - 189.
- Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*. P. 709 - 714.
- De Meyer; Bigirimana, J., Elad, Y.; Hofte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 279 - 286.
- Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* – 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301 - 308.
- Harman, G. E. (2001). Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84: 377 - 393.
- Howell, C.R. (1982). Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings *Phytopathology* 72: 496 - 498.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the control *Pythium ultimum Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248 - 252.
- Howell, C. R.; 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: Vol. 87* N° 1. P. 4 - 10.
- Instituto Colombiano Agropecuario ICA. (2009). Regulación y control de bioinsumos agrícolas – productos registrados. Oficina de coordinación de plaguicidas químicos de uso agrícola. Actualizado: 04 de febrero de 2009.
- Jacqmin, B. ; Cotes, A. M. ; Lepoivre, P.; Semal, J. (1993). Effect of the combination of seed priming and *Trichoderma* treatment on incidence of damping-off agents. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 58/3b, 1321 - 1328.
- Kennedy, I. R.; Choudhury, A. T. M. A.; Kecskes, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited *Soil Biology & Biochemistry* 36 (8): 1229 - 1244.
- Khan, J.; Ooka, 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Krause, M. S.; De Ceuster, T. J. J.; Ti-
quia, S. M.; Michel, F. C.; Madden, L.
V.; Hoitink, H. A. (2003). Isolation and
characterization of rhizobacteria
from composts that suppress the se-
verity of bacterial leaf spot of radish.
Phytopathology 93: 1292 - 1300.
- Lee, S.; Kim, S. Y.; Chung, E.; Joung,
Y. H.; Pai, H. S.; Hur, C. G.; Choi, D.
(2004). EST and microarray analyses
of pathogen-responsive genes in
hot pepper (*Capsicum annuum* L.)
non-host resistance against soybean
pustule pathogen (*Xanthomonas*
axonopodis pv. *glycines*). *Funct. Inte-
gr. Genomics* 4: 4.
- Lifshiz, R.; Windham, M. T.; Baker,
R. (1986). Mechanism of biological
control of preemergence damping-
off of pea by seed treatment with
Trichoderma spp. *Phytopathology*
76: 720 - 725.
- López, C.; Soto, M.; Restrepo, S.;
Piegu, B.; Cooke, R.; Delseny, M.; To-
hme, J.; Verdier, V. (2005). Cassava
gene expression profile in response
to *Xanthomonas axonopodis* pv.
manihotis infection using a cDNA
microarray. *Plant Molecular Biology*.
In press.
- Lorito, M.; Woo, S. L.; Fernández, I.
G.; Collucci, G.; Harman, G. E.; Pintor-
Toro, J. A.; Filippone, E.; Muccifora, S.;
Lawrence, C. B.; Zonia, A.; Tuzun, S.;
Scala, F. (1998). Genes from myco-
parasitic fungi as a source for im-
proving plant resistance to fungal
pathogens. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*
95: 7860 - 7865.
- Lumsden, R. D.; Locke, J. C.; Adkins,
S. T.; Walter, J. F.; Ridout, C. J. (1992).
Isolation and localization of the anti-
biotic gliotoxin produced by *Gliocladi-
um virens* from alginate prill in soil
and soilless media. *Phytopathology*
82: 230 - 235.
- Maleck, K.; Levine, A.; Eulgem, T.;
Morgan, A.; Schmid, J.; Lawton, K.
A.; Dangel, J. L.; Dietrich, R. A. (2000).
The transcriptome of *Arabidopsis*
thaliana during systemic acquired
resistance. *Nat. Genet.* 26: 403 - 10.
- Metcalfe, D. D. and Wilson, C.R. (2001).
The process of antagonism of Sclero-
tium cepivorum in white rot affect-
ed onion roots by *Trichoderma*
konigii. *Plant Pathol.* 50: 249 - 257.
- Mezui, J. C. ; Cotes, A. M. ; Lepoi-
vre, P. ; Semal, J. (1994). Evaluation
of seed priming and *Trichoderma*
treatment for the biological control
of damping-off agents. In *Diseases
and Insects in Forest Nurseries*. Ed.
INRA, Paris (Les Colloques, N° 68).
pp.189 - 196.
- Mysore, K. S.; D'Ascenzo, M. D.; He, X.;
Martin, G. B. (2003). Overexpression
of the disease resistance gene Pto
in tomato induces gene expression
changes similar to immune respon-
ses in human and fruitfly. *Plant Phy-
siology* 132: 1901 - 12.
- Moreno, V. C. A. (2003). Control bio-
lógico de enfermedades foliares
del cultivo del tomate (*Lycopersicon*
esulentum Mill.) con énfasis en mil-
deo polvoso (*Oidium* sp.). Trabajo de
grado. Ingeniero Agrónomo. Univer-
sidad Nacional de Colombia. 106 p.
- Moreno, C. A.; Castillo, F.; González,
A.; Bernal, D.; Jaimes, Y.; Chaparro,
M.; González, C.; Rodríguez, F.; Res-
trepo, S.; Cotes, A. M. (2009). Biolo-
gical and molecular characterization
of the response of tomato plants
treated with *Trichoderma koni-
giopsis*. *Physiological and Molecular
Plant Pathology*. Vol. 1 (1 - 10).
- Persello-Cartieaux, F.; Nussaume,
L.; Robaglia, C. (2003). Tales from
the underground: molecular plant-
rhizobacteria interactions. *Plant Cell
and Environment* 26 (2): 189 - 199.
- Pieterse, C. M. J.; Van Wees S. C. M.;
Ton, J.; Van Pelt, J. A.; Van Loon, L. C.
(2002). Signaling in rhizobacteria-
induced systemic resistance in *Ara-
bidopsis thaliana*. *Plant Biology* 4 (5):
535 - 544.
- Ryu, C. M.; Hu, C.H.; Reddy, M. S.;
Kloepper, J. W. (2003). Different sig-
naling pathways of induced resis-
tance by rhizobacteria in *Arabidop-
sis thaliana* against two *pathovars* of
Pseudomonas syringae. *New Phyto-
logist* 160 (2): 413 - 420.
- Sharon, E.; Bar-Eyal, M.; Chet, I.; He-
rrera-Estrella, A.; Kleifeld, O.; Spiegel,
Y. (2001). Biological control of the
root-knot nematode *Meloidogyne*
javanica by *Trichoderma harzianum*.
Phytopathology 91: 687 - 693.
- Sid Ahmad, A.; Sánchez, C. P.; Cande-
la, M. E. (2000). Evaluation of induc-
tion of systemic resistance in pepper
plants (*Capsicum annuum*) to *Phyto-
phthora capsici* using *Trichoderma*
harzianum and its relation with
capsidiol accumulation. *Eur. J. Plant.
Pathol.* 106: 817 - 824.
- Villamizar, L.; Moreno, C.; Paris, A.;
Cotes, A.; Garzón, C. (2004). Deve-
lopment of biopesticide prototypes
for controlling pathogens in vegeta-
bles. En: *Diseases Biocontrol. Inter-
national Workshop: Development
of biocontrol agents of diseases for
commercial applications in food
productions systems*. Book of ab-
stracts. Sevilla, España. Ediciones de
la UdL. pp. 136.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma*
lignorum on a parasite of other soil
fungi. *Phytopathology* 22: 837 - 845.
- Weindling, R. (1934). Studies on a
lethal principle effective in the para-
sitic action of *Trichoderma lignorum*
on *Rhizoctonia solani* and other soil
fungi. *Phytopathology* 24: 1153 -
1179.
- Wells, H. D.; Bell D. K. and Jaworski,
C. A. (1972). Efficacy of *Trichoderma*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfii*. *Phytopathology* 62: 442 - 447.
- Wei, G.; Kloepper, J.W. and Tuzun, S. (1996). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86: 221 - 224.
- Windham, M.; Elad, Y.; Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518 - 521.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and Biocontrol in the Rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487 - 511.
- Yedidia, I.; Benhamou, N. and Chet, I. (1999). Induction of defense in cucumber plants (*Cucumis sativas* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061 - 1070.
- Yedidia, I.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y. and Chet, I. (2000). Induction and accumulation of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant physiol. Biochem.* 38: 863 - 873.
- Zhang, J.; Howell, C.R. and Starr, J.L. (1996). Suppression of *Fusarium* colonization of cotton roots and *Fusarium* wilt by seed treatment with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. *Biocontrol. Sci. Technol.* 6:175 - 18.

FORMULACIONES A BASE DE *Trichoderma koningiopsis*

Laura Villamizar, Magda García, Alba Marina Cotes

Investigadores Laboratorio de Control Biológico,
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA,
Km. 14 vía Bogotá-Mosquera.
E-mail: lvillamizar@corpoica.org.co



CAPÍTULO 2

Una vez fue desarrollado un sistema de fermentación para el aislamiento de *Trichoderma koningiopsis* Th003, se iniciaron los estudios de formulación de la biomasa. Considerando que dicho aislamiento en estudios previos demostró su eficiencia tanto para el control de patógenos foliares como de patógenos del suelo, se diseñaron dos tipos de formulación: un granulado dispersable y un polvo mojable (Figura 5). El granulado dispersable fue diseñado teniendo en cuenta que pudiera ser aplicado directamente al suelo o después de ser reconstituido en agua en tratamiento de semillas y sustratos de siembra o directamente en

campo. Esta formulación incorporó varias fuentes nutricionales para favorecer la colonización del suelo por parte de *T. koningiopsis* y de esta forma darle una ventaja competitiva con respecto a los demás habitantes naturales del suelo. El polvo mojable consistió en una formulación diseñada principalmente para la aplicación foliar, donde la condición más limitante para la eficiencia del agente de biocontrol es el efecto de la radiación ultravioleta del sol; por tal razón, este prototipo incluyó en su composición protectores solares y otros auxiliares de formulación, como protectores de secado, adherentes y diluentes.



Figura 5. Bioplaguicidas a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 formulados como granulado dispersable (WG) y polvo mojable (WP).

La formulación granular presenta una concentración promedio de $5,8 \times 10^8$ conidios. g^{-1} y un porcentaje de germinación de 98% después de 16 horas de incubación. En cuanto a las características físicas, este granulado tiene un tamaño de partícula de 2 mm y un tiempo de desintegración inferior a 5 minutos. El producto en polvo presenta una concentración promedio de $1,0 \times 10^9$ conidios. g^{-1} , un porcentaje de germinación de 95% después de 16 horas de incubación y un tamaño de partícula menor a 100 μm .

Los dos prototipos de bioplaguicida fueron caracterizados y los resultados se presentan en la Tabla 2. Con dichos resultados se establecieron los límites de aceptación para todas las pruebas de control de calidad de producto terminado, los cuales son aplicados a cada lote de producción para asegurar la repetibilidad de los mismos. Las características de las dos formulaciones se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de las dos formulaciones a base de Th003

Característica	Granulado (WG)	Polvo (WP)
Viabilidad	1 x 10 ⁹ UFC/g	1 x 10 ⁹ UFC/g
Germinación	>80% en 24 horas	>80% en 24 horas
Contenido de contaminantes	< 5 x 10 ⁶ UFC/g	< 5 x 10 ⁶ UFC/g
Aspecto	Granular	Polvo
Tamaño de partícula	850 - 1500 µm	Inferior a 100 µm
Color	Verde	Verde claro a gris
Olor	Propio del producto	Propio del producto
Humedad	4 - 7%	4 - 7%
Densidad apisonada	600 - 620 Kg/L	500 Kg/L
pH	5 - 7	5 - 7
Protección ultravioleta ultravioleta	No incluye protección ultravioleta	Incluye filtros

El ideal en los productos biológicos es mantener viables y estables las características fisiológicas y de actividad biocontroladora del ingrediente activo; sin embargo, dadas las condiciones desfavorables para el microorganismo a nivel ambiental es preciso desarrollar formulaciones que mejoren su desempeño en campo, faciliten su manejo y aplicación, y permitan su almacenamiento en condiciones económicamente rentables con una pérdida mínima de las cualidades iniciales del producto (Elzein *et al.*, 2004). Uno de los requerimientos a tener en cuenta para la aceptación y comercialización de un producto biológico es su vida útil, la que se ve influenciada por factores de almacenamiento, entre los que se encuentran la temperatura, la humedad relativa y el tipo de empaque, determinando el mantenimiento de las características del agente de control biológico. Por tal razón y como parte de los estudios de formulación, se determinó la vida útil de dos prototipos de bioplaguicida.

Determinación de la vida útil de los prototipos de bioplaguicida

El estudio de vida útil de los bioplaguicidas comprendió la evaluación durante 18 meses de dos

prototipos de bioplaguicida, un granulado dispersable y un polvo mojable, cuyo principio activo consistió en conidios de *Trichoderma koningii* Th003.

Metodología

La producción masiva del microorganismo se realizó empleando un sustrato de crecimiento previamente estandarizado por el Laboratorio de Control Biológico. Posteriormente se elaboraron los dos prototipos de bioplaguicida, a los cuales se les realizaron como pruebas de control de calidad la determinación de la concentración de conidios, la humedad y pruebas microbiológicas para establecer la pureza de los productos desarrollados siguiendo las metodologías establecidas por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas BIOTÉCNICA.

La unidad experimental consistió en bolsas metalizadas selladas al vacío en las que se colocó una muestra de cada uno de los tratamientos por evaluar correspondientes a 1g del prototipo granulado dispersable, 0,1g del prototipo polvo mojable y 0,1g de conidios secos del microorganismo sin formular; las muestras y contramuestras fueron almacenadas a tres temperaturas: 4°C, 18°C y

28°C. Las evaluaciones se realizaron cada tres meses contando con seis repeticiones por tratamiento (3 de la muestra y 3 de la contramuestra) y determinando en cada tiempo de evaluación el porcentaje de germinación del microorganismo en medio Agar Extracto de Malta. Las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo con 9 ml de una solución de Tween 80 al 0,1% y se realizaron diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-3} . A partir de las dos últimas diluciones se sembraron 100 μ l en tres cajas de Petri con el medio antes mencionado y se llevaron a incubación a 25°C durante 24 horas, tiempo después del cual se determinó el porcentaje de germinación de los conidios mediante observación a microscopio de 10 campos ópticos.

Resultados

Los prototipos de los bioplaguicidas no presentaron una disminución de la germinación cuando fueron almacenados durante 18 meses a 4°C, mientras que los conidios sin formular redujeron su porcentaje de germinación del 96,97% al 20,1% para el noveno mes de almacenamiento. Este comportamiento sugiere que a una temperatura de 4°C los auxiliares de formulación de los dos prototipos de bioplaguicida posiblemente ejercieron un efecto positivo sobre los conidios del hongo durante el tiempo de almacenamiento, impidiendo la inducción de fuertes estados de latencia.

Dentro de los auxiliares de formulación empleados para la elaboración de los dos prototipos de bioplaguicida se encuentran algunas sustancias protectoras de secado y ciertos compuestos que tienen un efecto osmorregulador sobre el microorganismo. Los protectores de secado son principalmente sustancias que protegen la integridad de la membrana celular durante el proceso de deshidratación. Este efecto fue reportado por Jackson *et al.* (2006), quienes evaluaron diferentes formulaciones del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* con el propósito de

augmentar su tolerancia a la desecación y su estabilidad durante el almacenamiento. Los autores observaron un aumento significativo de la viabilidad de las blastosporas del hongo al ser almacenado durante 12 meses a 4°C y -20°C, respuesta que atribuyeron a la adición de protectantes a la formulación del bioplaguicida; a diferencia de ello, los conidios sin formular presentaron una disminución drástica en los porcentajes de germinación a partir del segundo mes de almacenamiento, llegando a obtener valores cercanos al 20%.

Compuestos de tipo poliol denominados solutos compatibles son comúnmente utilizados como protectores de secado. Estos compuestos son acumulados por las células permitiéndoles mantener el equilibrio osmótico intracelular, la integridad de las proteínas y protegiendo ciertas estructuras membranales. Dichos compuestos son generalmente azúcares o alcoholes que están relacionados con la tolerancia del microorganismo ante el estrés osmótico que se puede generar en el proceso de elaboración del bioplaguicida (Abadías *et al.*, 2000).

Cuando el almacenamiento se realizó a 18°C, el producto en polvo mantuvo estable su germinación durante los 18 meses de almacenamiento (Figura 6), obteniéndose valores de germinación que oscilaron entre el 94,8% y el 96,8%. Por el contrario, el tratamiento correspondiente a los conidios sin formular presentó una disminución progresiva de la germinación a partir del sexto mes de almacenamiento hasta obtener una germinación del 4,2% luego de 18 meses de almacenamiento. Un comportamiento similar fue observado para el producto granulado, el cual mantuvo su germinación por encima del límite de aceptación equivalente al 80%, hasta el noveno mes de evaluación. En el mes 12 se observó una reducción de la germinación, la cual presentó valores inferiores al 10%; con todo, después de incubar las muestras por 36 horas se alcanzaron niveles de germinación superiores al 95%, lo que

sugiere que el almacenamiento no causó la muerte celular sino que indujo al microorganismo en un estado de latencia o dormancia, que retardó la recuperación metabólica de las células y el proceso de germinación. Algunos autores han establecido que las formulaciones de microorganismos requieren que el ingrediente activo (conidios del hongo) entre en un estado de latencia durante el almacenamiento para mantenerse estable y no pierda sus características fisiológicas y de actividad biocontroladora en el momento de su aplicación (Murillo *et al.*, 2003).

La latencia es un estado en el que el microorganismo reduce su metabolismo dando lugar a una reactivación y recuperación fisiológica más lenta. Un comportamiento similar al presentado con *T. koningiopsis* Th003 fue observado por Moore *et al.* (1995) después de almacenar conidios de *Metarhizium flavoviride* durante 160 semanas a 8°C, los autores evidenciaron una reducción en la germinación del hongo la cual fue atribuida al hecho de que cada microorganismo posee una temperatura óptima para su desarrollo y cambios en ésta pueden generar una pérdida de su viabilidad y la entrada en estados de latencia.

En los resultados correspondientes a las muestras de bioplaguicida almacenadas a 28 °C se observó una reducción en la capacidad de germinación de *T. koningiopsis* tanto formulado como sin formular (Figura 6). Los conidios sin formular presentaron una disminución de su germinación del 93,6% luego de seis meses de almacenamiento, pero luego de incubar las muestras por 36 horas se alcanzó una germinación superior al 95%, lo que sugiere –al igual que cuando el almacenamiento se realizó a 18°C– que el microorganismo entró en un estado de latencia a causa del almacenamiento a 28°C. Para los dos prototipos de bioplaguicida la germinación se mantuvo por encima

del 80% hasta los seis meses de almacenamiento y a partir de dicho tiempo la germinación decayó drásticamente, siendo superior al 80% al incrementar los tiempos de incubación.

La temperatura de almacenamiento es un factor crítico que determina la conservación de la viabilidad y la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas. Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron observados por Zahng *et al.* en el 2006, quienes evaluaron el almacenamiento bajo dos temperaturas de una formulación a base de la levadura *Cryptococcus nodaensis*. Los autores observaron una viabilidad del principio activo entre 7,8 y 8 Log UFC g⁻¹ cuando el producto fue almacenado a 4°C, mientras que el almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) provocó una reducción en el conteo de unidades formadoras de colonia hasta valores inferiores de 5 Log UFC g⁻¹ luego de 14 semanas de almacenamiento.

Factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa determinan en gran medida la vida útil de los bioplaguicidas; es así como temperaturas de 4°C y humedades relativas cercanas al 12% mantuvieron alta la viabilidad y actividad biocontroladora de una formulación granular a base de *Alternaria alternata* durante 20 meses de almacenamiento. Esta misma formulación al ser almacenada a 20°C presentó una reducción significativa en su eficacia y viabilidad luego de 12 meses de almacenamiento (Lawrie *et al.*, 2002). Asimismo, el producto Pesta –cuyo principio activo es *Fusarium oxysporum* Foxy 2– presentó una reducción del 32% y 21% en su viabilidad luego de seis y doce meses de almacenamiento, respectivamente. Los autores afirmaron que la pérdida rápida de las reservas endógenas de carbono fue una de las posibles causas que ocasionaron bajos niveles de viabilidad del microorganismo almacenado a 25°C (Elzein *et al.*, 2004).

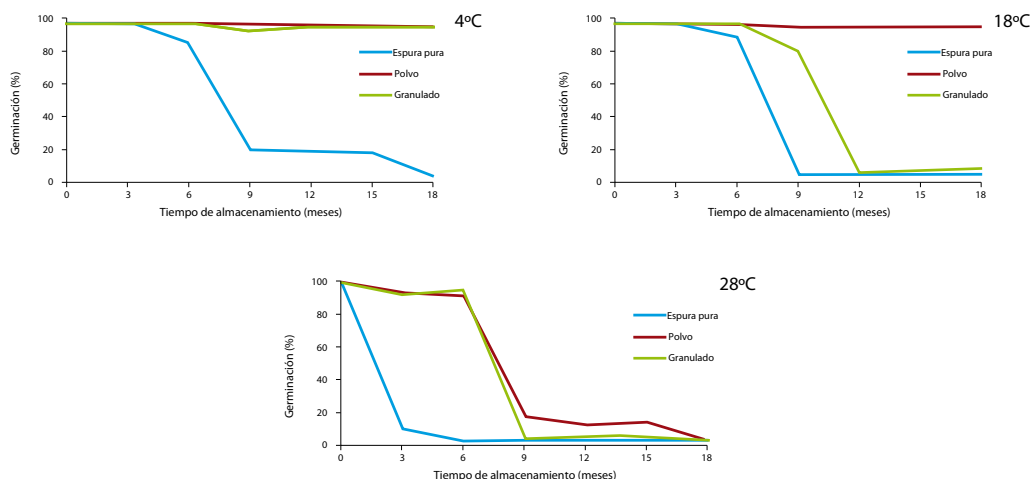


Figura 6. Cinética de la germinación de los conidios de *T. koningiopsis* Th003 formulados y sin formular, durante 18 meses de almacenamiento a diferentes temperaturas.

Por otra parte, formulaciones oleosas a base de *Metarhizium flavoviride* presentaron una disminución en la germinación y muerte de conidios luego de 8 horas de almacenamiento a temperaturas de 45°C, efecto atribuido por McClatche *et al.* (1994) al desarrollo de mecanismos de protección, como por ejemplo las proteínas de choque térmico. Al igual que en los ensayos anteriormente mencionados, *Trichoderma koningiopsis* Th003 mostró una mayor viabilidad y vida útil cuando fue almacenado a temperatura de 4°C, presentando una disminución en dichos valores a medida que se aumentó la temperatura de almacenamiento a 28°C. En todos los tratamientos evaluados en el presente estudio se observó que al aumentar la temperatura de almacenamiento aumentó el efecto deletéreo sobre la germinación, lo que sugiere que para aumentar la vida útil de los prototipos, estos deben ser almacenados a la menor temperatura posible.

Los resultados de las seis réplicas de la cinética de la germinación de cada tratamiento fueron sometidos a un análisis de regresión, a partir del

que se elaboró la línea de tendencia, sobre la cual se extrapoló la vida útil de cada producto, teniendo en cuenta una germinación mínima del 80%.

Los mayores tiempos de vida útil se obtuvieron con el prototipo en polvo almacenado a 4°C y 18°C, así como con el prototipo granulado a 4°C (Tabla 3). Por otra parte, la temperatura de 28°C presentó un efecto nocivo sobre el microorganismo, observándose tiempos de vida útil de 3,3 y 3,7 meses para los productos granulado y polvo respectivamente, y 0 meses para las esporas sin formular.

Estos resultados evidencian el efecto protector que tienen los excipientes sobre el microorganismo, asegurando su estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento, ayudando a su aplicación en campo, protegiendo el producto de condiciones ambientales desfavorables y promoviendo la efectividad del bioplaguicida sobre el agente blanco.

Tabla 3. Tiempo de vida útil de prototipos de bioplaguicida a base de Th003

Producto	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de vida útil (meses)
Conidios sin formular	4	3,7
Conidios sin formular	18	3,3
Conidios sin formular	28	0
Prototipo granulado	4	18
Prototipo granulado	18	5,2
Prototipo granulado	28	3,3
Prototipo polvo	4	18
Prototipo polvo	18	18
Prototipo polvo	28	3,7

Aunque la mayoría de bioplaguicidas que se encuentran en el mercado internacional deben ser almacenados en condiciones de refrigeración, a partir de los resultados del estudio se puede re-

comendar el almacenamiento del prototipo en polvo a una temperatura promedio de 18°C. Para el prototipo granulado se recomienda el almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

- Abadías, M.; Teixido, N.; Usall, J.; Vine A.; Magan, N. (2000). Solute stresses affect growth patterns, endogenous potentials and accumulation of sugars and cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 1009 - 1017.
- Elzein, A.; Jurgen, K.; Muller-stover, D. (2004). Optimization of Storage Conditions for Adequate Shelf-Life of 'Pesta' Formulation of *Fusarium oxysporum* 'Foxy 2', a Potential Mycoherbicide for Striga: Effects of Temperature, Granule Size and Water Activity. *Biocontrol Science and Technology*. 14 (6) 545 - 559.
- Jackson, M.; Erhan, S.; Poprawski, T. (2006). Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology*. 16(1), 61 - 75.
- Lawrie, J.; Down, M.; Greaves, P. (2001). Effects of Storage on Viability and Efficacy of Granular Formulations of the Microbial Herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Science and Technology*. 11: 283 - 295.
- McClatche, G.V.; Moore, D.; Bateman, R.P. & Prior, C. (1994). Effects of temperature on the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. *Mycological Research* 9, 749 - 756.
- Moore, D.; Bateman, P.; Carey, M.; Prior, C. (1995). Long term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation for the control of locust and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*. 5: 193 - 199.
- Murillo, R.; Lasa, R.; Goulson, D.; Williams, T.; Muñoz, D.; Caballero, P. (2003). Effect of Tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 96, 1668 - 1674.
- Zhang, S.; Schisler, D.; Jackson, M.; Boehm, M.; Slininger, P.; Lewis L. (2006). Cold shock during liquid production increases storage shelf-life of *Cryptococcus nodaensis* OH 182.9 after air-drying. *Biocontrol Science and Technology*. 16(3): 281 - 293.

ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DEL BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003

Martha Gómez Ph.D.; Andrés Díaz MSc; Mauricio Cruz I.Q

Investigadores Laboratorio de Control Biológico,
Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
CORPOICA, Km 14 vía Bogotá-Mosquera.
E-mail: mgomeza@corpoica.org.co



CAPÍTULO 3

Las prospecciones económicas y comerciales de la producción de bioplaguicidas dependen en gran medida del éxito o del fracaso de su escalamiento. El escalamiento es un mecanismo mediante el cual se trasladan condiciones y variables de operación de un proceso en un equipo o sistema determinado, a otro de tamaño diferente (Gallego *et al.*, 2002). Con el escalamiento de la producción de bioplaguicidas se busca mantener tanto las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo como la generación y separación de metabolitos y/o biomasa encontrados a nivel de laboratorio, obteniendo resultados similares en cuanto a rendimientos y productividades. Para el escalamiento se debe recoger la mayor cantidad de información posible del proceso que se escalará en condiciones de laboratorio, lo que implica conocer la fenomenología del proceso y factores tales como la temperatura, la concentración de nutrientes, el pH y la actividad del agua, entre otros. Adicionalmente, con los datos experimentales generados se deben realizar balances de materia y determinar los rendimientos en términos de cantidad de microorganismo por sustrato y cantidad de sustrato por producto final (Duarte, 1995). Teniendo en cuenta estos aspectos, para el escalamiento a nivel planta piloto de la producción del bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003, surgieron las operaciones y puntos críticos descritos en la Figura 7.

Entre las técnicas de fermentación más estudiadas para la producción de hongos filamentosos se encuentran la fermentación sólida (SSF), la fermentación sumergida (SmF) y la fermentación bifásica (mezcla de SSF y SmF). Para los procesos de SSF los factores más importantes incluyen el tipo de sustrato, microorganismo, el contenido de humedad, el pH y la altura de la matriz sólida. Por otro lado, en la fermentación sumergida (SmF) para hongos filamentosos los factores más importantes a controlar son las condiciones reológicas de operación como la viscosidad, densidad y las velocidades de agitación; de igual forma el pH y la concentración de oxígeno disuelto (Singhania *et al.*, 2008).

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA, tras varios estudios de crecimiento comparativo para la producción masiva de *Trichoderma koningiopsis*

Th003 se desarrolló un método de producción masiva eficiente en un medio sólido compuesto por cereales y que luego fue codificado como SS1. No obstante, las condiciones del proceso de fermentación para este hongo no habían sido estandarizadas a nivel planta piloto, por lo que se hizo necesario su estandarización para la obtención de conidios del hongo biocontrolador.

Una vez las condiciones de producción masiva de *T. koningiopsis* a escala piloto se estandarizaron, este principio activo fue formulado para la obtención de un bioplaguicida en forma de polvo mojeable (WP). Las operaciones unitarias de separación, mezcla y secado fueron escaladas a nivel planta piloto, y la eficiencia de las mismas se evaluó teniendo en cuenta los puntos críticos de estos procesos (Figura 7).

El escalamiento de la producción a nivel planta piloto fue realizado en la planta de bioplaguicidas ubicada en CORPOICA, Tibaitatá. Esta planta cuenta con instalaciones adecuadas para la producción de bioplaguicidas a nivel semicomercial y equipos apropiados para las operaciones de fermentación, separación del principio activo, mezcla, granulación y secado. La planta también cuenta con áreas para el control de calidad de materias primas, así como de productos terminados y en proceso.

Escalamiento del proceso de fermentación de *T. koningiopsis* Th003

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el capítulo anterior sobre producción masiva, selección del medio de cultivo y condiciones de fermentación para Th003, se establecieron y estandarizaron las metodologías de fermentación para la producción a escala planta piloto. Para la estandarización se evaluó la fermentación bifásica y sólida con el fin de determinar cuál de las dos metodologías alcanzaban mayores rendimientos en términos de cantidad de conidios/kilogramo de sustrato/hora de fermentación (conidios/kg/h).

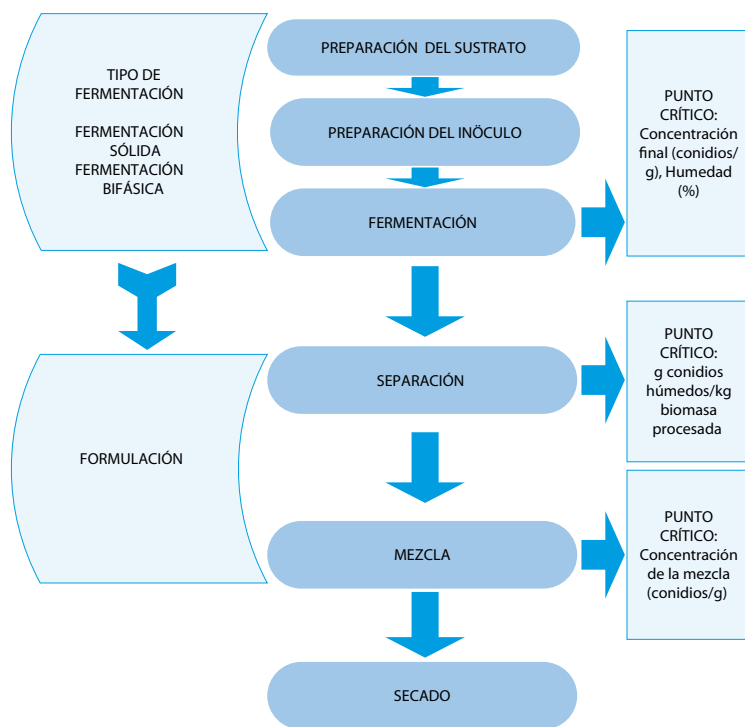


Figura 7. Esquema general del escalamiento de producción del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.

Fermentación bifásica

Para la estandarización de la fermentación bifásica se realizó inicialmente la fermentación líquida, determinando las condiciones óptimas para maximizar la producción de conidios de Th003 en un fermentador de tipo Airlift. Este medio de cultivo fue el inóculo para la fermentación sólida realizada en un fermentador de bandejas. Ambos fermentadores fueron diseñados y puestos en marcha previamente en el Laboratorio de Control Biológico.

La cepa del microorganismo fue suministrada por el Banco de Germoplasma del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA. Su mantenimiento a corto plazo (3 - 5 semanas) se realizó mediante el almacenamiento de cajas de Petri con el hongo esporulado, en medio agar PDA a 4°C. Para la conservación a largo plazo (6 - 48 semanas) suspensiones de conidios de *T. koningiopsis*

se mantuvieron en un medio con peptona 1%, y un agente crioconservante (glicerol 10%) a -72°C.

Primera fase: Fermentación líquida

• Preparación del preinóculo

A partir de cultivos en medio agar PDA con el hongo crecido de 7 días de edad, se removieron los conidios mediante la adición 10 ml de una solución de Tween 80 al 0,1% (v/v). La suspensión de conidios obtenida se ubicó en un tubo estéril y se homogeneizó en un agitador vibratorio durante 30 segundos; a partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones seriadas usando una solución de Tween 80 al 0,1% (v/v), con el fin de obtener una suspensión de 1×10^7 conidios/ml.

Consecutivamente, se inocularon 2,5 ml de la suspensión de conidios mencionada anteriormente en erlenmeyers de 125 ml de capacidad que contenían 25 ml del medio estéril codificado como SL1 (Peña, 2002). Los erlenmeyers se incubaron a 25°C con agitación constante (180 rpm) en un baño termostático Lindberg Blue® durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó el control de calidad del caldo de fermentación mediante una coloración de Gram buscando detectar presencia de bacterias y de azul de lactofenol para visualizar las estructuras fúngicas. Posteriormente, se llevaron a cabo tres cambios de volumen sucesivos en erlenmeyers de 125 ml, 500 ml y 1000 ml manteniendo una relación volumen medio de cultivo: volumen del erlenmeyer de 1/5. Los erlenmeyers fueron incubados bajo las mismas condiciones descritas arriba, y las coloraciones antes mencionadas fueron realizadas para verificar la pureza del cultivo y para observar microscópica-

mente la morfología del hongo. Finalmente, los preinóculos se inyectaron a un fermentador tipo Airlift para la evolución de la fermentación líquida y estandarización del proceso.

• Fermentación en biorreactor Airlift de 20 litros

El fermentador Airlift (Figura 8) es un equipo neumático de contacto gas-líquido en el que el gas (aire u oxígeno) cumple las funciones de agitación, contribución a la transferencia de calor y suministro de oxígeno (Flórez, 2002).

En el diseño del equipo se tuvieron en cuenta parámetros como la geometría, el volumen del reactor, el tipo de lazo, la relación altura-diámetro, el separador gas-líquido, la instrumentación y el material de construcción. En la Tabla 4 se resumen las principales características del fermentador Airlift diseñado (Flórez, 2002).



Figura 8. Fermentador Airlift

Tabla 4. Principales características del fermentador Airlift, diseñado en el Laboratorio de Control Biológico.

Característica	Descripción
Volumen	20 litros
Tipo de Lazo	lazo interno
Relación altura-diámetro	5
Tipo de distribuidor de aire	Anular
Material de construcción	Acero inoxidable y vidrio

La selección de los factores y niveles por evaluar para la fermentación líquida de *T. koningiopsis* Th003 se realizó teniendo en cuenta las características relacionadas con el equipo (altura de la zona de ascenso) y condiciones físicas de la

fermentación (caudal de aire y volumen de anti-espumante) (Tabla 5). Para la estandarización, se empleó un diseño experimental factorial fraccionado a la mitad que incluyó seis fermentaciones (Tabla 6). Todas las fermentaciones fueron evaluadas a 25°C y por un tiempo de 48 horas.

Tabla 5. Factores y niveles evaluados durante la fermentación líquida del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 en un biorreactor Airlift de 20 litros.

Factores	Nivel bajo	Nivel alto	Variable de respuesta
Altura de la zona de ascenso	44,3 cm	55,1 cm	Concentración de biomasa (micelio principalmente, g/L)
Caudal del gas de entrada	0,5 vvm	0,75 vvm	
Volumen de antiespumante	0,075% (v/v)	0,1% (v/v)	
	15 ml	20 ml	

Tabla 6. Matriz del diseño experimental factorial fraccionado para la fermentación líquida del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 en un biorreactor Airlift de 20 litros.

Variable			
Fermentación	Altura de la zona de ascenso (cm)	Caudal de aire (vvm)	Volumen de antiespumante (ml)
1	44,3	0,75	15
2	44,3	0,75	20
3	55,1	0,5	15
4	55,1	0,5	20
5	58,7	0,42	22
6	68,3	0,20	18

Durante las fermentaciones llevadas a cabo se presentó una morfología mixta con presencia de agregados de diversos tamaños, observándose un rápido crecimiento micelial que incrementó la viscosidad del líquido y cambió gradualmente el color del medio a medida que transcurrió el período de incubación (48 horas). En concordancia con lo anterior, durante las fermentaciones 1 y 2 en las que la velocidad de agitación fue elevada ($\geq 0,75$ vvm), el micelio libre fue la forma de biomasa predominante. Por el contrario, en las fermentaciones 3, 4, 5 y 6 a velocidades de agitación bajas ($\geq 0,5$ vvm), la forma de biomasa presente estuvo constituida en su totalidad por micelio en forma de agregados; sin embargo, en ningún caso se presentó una limitación de oxígeno, pues el oxígeno disuelto se mantuvo en valores superiores a 50% con todos los caudales de aire evaluados.

Los datos de peso seco obtenidos experimentalmente permitieron comprobar la hipótesis de que los factores evaluados afectaron directamente la productividad del proceso de fermentación líquida, ya que las diferencias entre tratamientos presentaron una variación hasta del 10,23% y al realizar el análisis estadístico de los datos empleando la prueba LSD –con un 95% de confianza– se determinó que existieron diferencias significativas entre fermentaciones. Los mejores resultados en términos de biomasa seca (15,61g/l) se obtuvieron bajo las condiciones definidas en la fermentación 4, las cuales fueron: altura del riser 55,1 cm; caudal de aire 0,5 vvm; y volumen de antiespumante 20 ml.

De otra parte, se observó que el contenido de glucosamina fue directamente proporcional a la

concentración de biomasa fúngica, independientemente del tiempo de fermentación y de la edad del microorganismo. Estos resultados coinciden con los trabajos descritos por Tomaselli *et al.* (2001) y Drysdale *et al.* (1972), en los que se determinó que el factor más importante en los procesos de escalamiento fue la aireación.

Se llegó a la conclusión que el cambio en la morfología del hongo fue un elemento que influyó de manera negativa sobre la producción de biomasa al final del proceso, siendo necesaria la realización de un control exacto sobre las condiciones de incubación respecto a la etapa del precultivo, la temperatura y de la agitación.

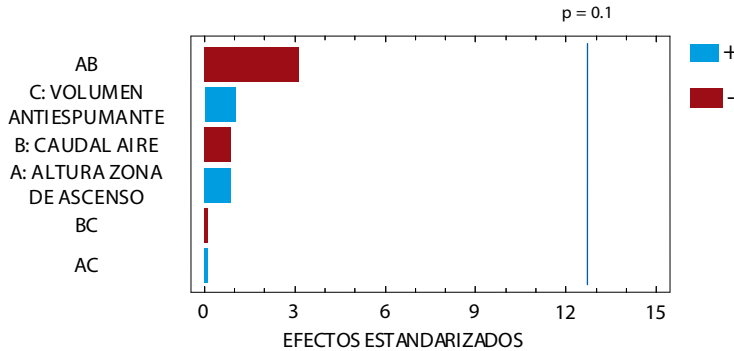


Figura 9. Diagrama de Pareto para los factores evaluados durante la fermentación líquida en un biorreactor Airlift. Codificación de los factores: A: Altura zona de ascenso; B: Caudal de aire; C: Volumen de antiespumante.

De acuerdo con el análisis Pareto (Figura 9) ninguno de los factores presentó un efecto significativo sobre la concentración de biomasa obtenida después del proceso de fermentación líquida. Se pudo observar que el efecto más importante fue la interacción de dos factores altura de la zona de ascenso y caudal de aire (AB) con un efecto negativo, mientras que el menor efecto lo presentó caudal de aire y volumen de antiespumante (BC), de forma negativa. En cuanto a la combinación altura de la zona de ascenso y volumen de antiespumante su efecto fue positivo.

lecho empacado con aireación forzada, el tambor rotatorio y las bandejas con sustrato estático (Gervais, *et al.*, 2003), a este último grupo pertenece el fermentador utilizado y ubicado en el Laboratorio de Control Biológico.

Para determinar las condiciones óptimas de operación, se aplicó un diseño experimental simplex. La elección de los factores se efectuó teniendo en cuenta 3 tipos de características: las relacionadas con el equipo (número de bandejas), las condiciones físicas de la fermentación (temperatura) y las relacionadas con el hongo *T. koningiopsis* cepa Th003 (volumen de inóculo).

Segunda Fase: Fermentación Sólida

Una vez conocidas las mejores condiciones para la producción de *T. koningiopsis* Th003 en fermentación líquida y utilizando este caldo resultante como inóculo, se evaluó la fase de fermentación sólida. Para esta segunda fase se utilizó el sustrato sólido compuesto por granos de cereales, codificado como SS1. Existen tres grandes tipos de biorreactores para la fermentación sólida: el

Se eligió la temperatura, debido a que éste es un factor clave dentro del proceso de fermentación sólida y así mismo está directamente relacionado con la actividad metabólica del microorganismo y la velocidad de crecimiento (Krishna, 2005). El volumen del inóculo líquido obtenido en el fermentador Airlift y aplicado al sustrato sólido es un factor importante, ya que de su concentración final depende la velocidad de colonización del sustrato sólido (Krishna, 2005 y Pandey, 2003). La cantidad de bandejas empleada para llevar a cabo cada co-

rrida experimental es importante, puesto que el espacio entre bandejas limita la entrada de luz al sistema (sustrato + microorganismo). La variable respuesta escogida fue la concentración final de

conidios, y los niveles seleccionados para cada uno de los factores se determinaron teniendo en cuenta los valores reportados por la literatura consultada para este tipo de procesos (Tabla 7).

Tabla 7. Factores y niveles evaluados para la fermentación sólida del hongo *T. koningiopsis* Th003 en un biorreactor de bandejas.

VARIABLES DE ESTUDIO	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO	VARIABLE RESPUESTA
Temperatura	25°C	27°C	Concentración de conidios (conidios/g)
Cantidad de bandejas	10	15	
Volumen de inóculo líquido	110 ml	220 ml	
Caudal de aire inyectado	0 vvm; 0,25 vvm; 0,5 vvm y 1 vvm		

El sustrato sólido se inoculó con el caldo de fermentación proveniente del biorreactor Airlift; la temperatura y el caudal de aire se ajustaron según las condiciones de fermentación establecidas.

a la concentración del inóculo proveniente de la fermentación líquida anterior y no presentó efecto alguno sobre la conidiación del hongo *T. koningiopsis* Th003 (Figura 10).

La evaluación del proceso de esporulación del hongo se hizo al día 7 de fermentación. Los factores evaluados durante el proceso de fermentación bifásica tuvieron diferentes efectos sobre la concentración de conidios obtenida. Al analizar por separado el efecto de los factores principales, se registró que la cantidad de bandejas fue el factor que tuvo mayor influencia sobre la variable de respuesta, siendo éste un efecto negativo. En segundo lugar en magnitud se encontró el factor temperatura, el cual presentó un efecto positivo sobre la concentración de conidios; mientras que el tercer factor en orden de magnitud se refiere

En función de los resultados obtenidos se pudo concluir que el volumen de inóculo empleado (en forma de micelio principalmente) no presentó un efecto significativo sobre la concentración de conidios obtenida al final de la fermentación bifásica, debido a que los niveles de los volúmenes evaluados fueron suficientes para cubrir de forma homogénea el sustrato sólido y permitir así una esporulación similar; aunque la combinación del volumen de inóculo con el factor temperatura mostró tener el mayor efecto negativo sobre la producción final de los conidios del hongo.

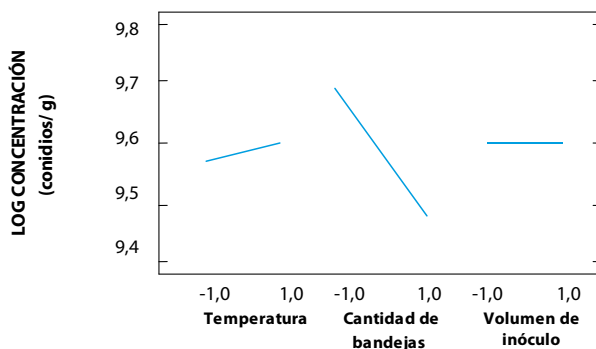


Figura 10. Representación gráfica de los efectos principales sobre la concentración de conidios de los factores evaluados en la fermentación sólida.

Los mayores resultados de concentración del hongo fueron alcanzados bajo las condiciones de temperatura de incubación de 27°C, 0 vvm de flujo de aire y 220 ml de inóculo (Tabla 8, Figura

11). La concentración de conidios en las bandejas estuvo en el orden de 10⁹ conidios/g, siendo el valor máximo 2,79x10⁹ conidios/g y un valor promedio de 1,29x10⁹ conidios/g.

Tabla 8. Resultados fermentación bifásica de *T. koningiopsis*

Bandeja	Concentración (conidios/g)	Log concentración
1	1,71x10 ⁹	9,23
2	9,80x10 ⁸	8,99
3	2,79x10 ⁹	9,45
4	9,84x10 ⁸	8,99
5	6,70x10 ⁸	8,83
6	1,13x10 ⁹	9,05
7	1,08x10 ⁹	9,03
8	1,00x10 ⁹	9,00
	Desviación estándar	0,19
	Promedio concentración	1,29x10 ⁹
	Coefficiente de variación (%)	0,02

Tras 9 días de fermentación, divididos en 2 días en fermentación líquida y 7 días en fermentación sólida, la productividad promedio de la fermentación bifásica fue de 5,97x10⁹ conidios/kg/h. Este valor es relativamente bajo comparado con los

alcanzados por Kubota (1995) junto con Agosin y colaboradores (1997), quienes obtuvieron valores de 6,0x10¹⁰ conidios/kg/h y 1,4x10¹¹ conidios/kg/h respectivamente, en fermentación sólida de *Trichoderma harzianum*.

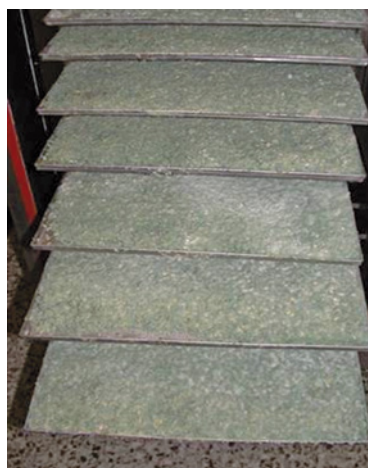


Figura 11. Crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 por fermentación bifásica

La baja productividad alcanzada en la fermentación bifásica fue consecuencia del largo tiempo de fermentación (216 h) que incluye la producción del preinóculo (48 horas), haciendo que la concentración del orden de 10^9 conidios/g encontrada al final de la fermentación sólida no sea suficiente para alcanzar una productividad superior a $1,0 \times 10^{10}$ conidios/kg/h.

• Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido (SSF) se define como el cultivo de microorganismos sobre un soporte sólido humedecido, un vehículo inerte o sobre sustratos insolubles que además pueden ser usados como fuente de carbono y de energía. La fermentación tiene lugar en ausencia o con muy baja cantidad de agua libre (Holker *et al.*, 2004). La fermentación sólida es utilizada en varios bioprocesos como bioremediación, biodegradación de compuestos tóxicos y biotransformación de residuos agrícolas, así como en la producción de metabolitos secundarios como antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de plantas, enzimas, ácidos orgánicos, biocombustibles y bioplaguicidas. Frente a la fermentación líquida, la sólida presenta rendimientos más altos para el caso de hongos filamentosos; esto se atribuye principalmente a que la fermentación sólida simula el hábitat natural del microorganismo (Pandey, 2003).

La fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003 se llevó a cabo en el mismo fermentador sólido estático de bandejas descrito anteriormente. El sustrato fue el mismo que el utilizado para la fermentación bifásica, es decir el codificado como SS1.

Con el fin de estandarizar los procedimientos de fermentación sólida a escala piloto, y teniendo en cuenta los resultados encontrados en la fermentación bifásica en cuanto a la influencia del número de bandejas, se realizaron 4 lotes con 14 bandejas cada uno.

El inóculo se preparó a partir de cajas con medio agar PDA con el hongo crecido después de 7 días, se adicionaron 10 ml de una solución de Tween 80 al 0,1% (v/v) y se removieron los conidios de Th003 usando un asa bacteriológica. La suspensión de conidios obtenida fue ajustada a valores cercanos a $1,0 \times 10^7$ conidios/ml.

A diferencia de la fermentación bifásica, donde la inoculación del sustrato se hizo desde la bomba de inyección a través de boquillas de 1 mm, la inoculación del sustrato con *T. koningiopsis* Th003 en fermentación sólida se realizó por aspersión directa. Posteriormente, éstas fueron incorporadas al fermentador, donde se mantuvieron en condiciones promedio de 27°C, una humedad entre 60% y 65%, y sin inyección de aire.

Tras seis días de incubación, se hizo un muestreo al azar de 5 g del sustrato colonizado por cada bandeja. A estas muestras se les determinó la concentración (conidios/g) por recuento en cámara de Neubauer y el contenido de humedad (%) usando una balanza halógena OHAUS MB 45, y a los resultados obtenidos se les determinó el coeficiente de variación para verificar el nivel de reproducibilidad entre lotes.

En los cuatro lotes se observó que la humedad del sustrato dentro del fermentador mostró variabilidad entre bandejas, presentándose los menores valores en las bandejas cercanas a la resistencia del fermentador (bandeja 13 y 14) (Figura 12). Adicionalmente, los coeficientes de variación entre lotes fueron superiores al 10%, encontrándose valores entre 14,75 y 18,44% (Tabla 9). Esta variabilidad en el contenido de humedad podría ser causada por el gradiente dentro de la cámara del fermentador. Resultados similares fueron encontrados por Cruz (2007), quien reportó un gradiente de humedad al finalizar la fermentación entre 19% y 39%.

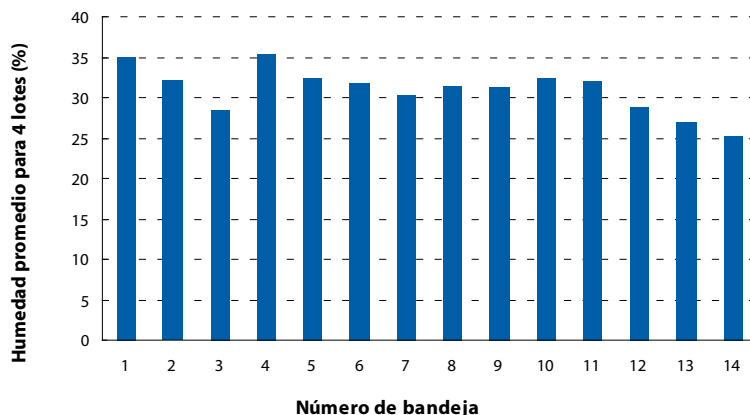


Figura 12. Humedad (%) del sustrato colonizado por *T. koningiopsis* Th003 en fermentación sólida

Tabla 9. Coeficientes de variación de la humedad (%) y concentración final (conidios/g) del sustrato esporulado para la fermentación sólida.

Lote	Coefficiente de variación para la concentración (%)	Coefficiente de variación para la humedad (%)
Lote 1	14,75	1,14
Lote 2	15,69	2,60
Lote 3	18,10	2,42
Lote 4	18,44	1,64

En cuanto a la concentración del sustrato colonizado, después de seis días de fermentación en los cuatro lotes se encontraron en la mayoría de los casos valores por encima de $1,0 \times 10^9$ conidios/g (Figura 13), demostrándose una homogeneidad en el crecimiento del hongo en la totalidad de lotes evaluados. Este crecimiento

fue uniforme no solo en la superficie del sustrato sino también en su interior (Figura 14). Al determinar los coeficientes de variación por lote (Tabla 9) se encontraron valores entre el 1,14 y 2,60%, valores inferiores al 10% que nos indican que la producción entre lotes fue reproducible en el tiempo.

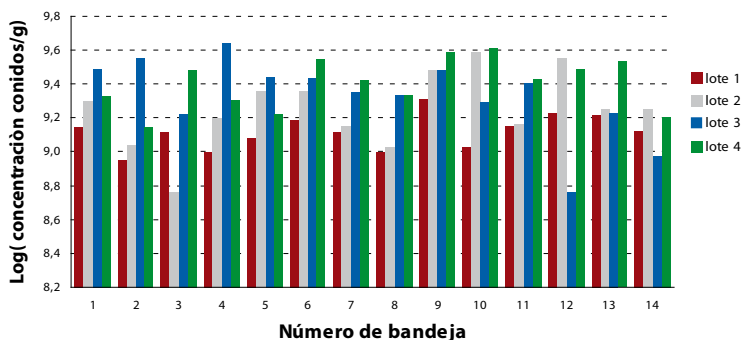


Figura 13. Concentración (conidios/g) de *T. koningiopsis* Th003 en el sustrato colonizado por fermentación sólida.

Al evaluar el rendimiento en los cuatro lotes en términos de conidio/kg/h se encontraron valores entre $9,15 \times 10^9$ y $1,93 \times 10^{10}$ conidios/kg/h con un valor promedio de $1,42 \times 10^{10}$ conidios/kg/h (Tabla 10). Estos resultados son cercanos a los encontrados

por Kubota (1995) y Agosin y colaboradores (1997), quienes describieron rendimientos de $6,0 \times 10^{10}$ conidios/kg/h y $1,4 \times 10^{11}$ conidios/kg/h respectivamente, con una cepa de *T. harzianum* para fermentaciones sólidas con granos de maíz como sustrato.



Figura 14. Crecimiento de *T. koningiopsis* Th003 por fermentación sólida

Tabla 10. Rendimiento en el proceso de fermentación sólida de *T. koningiopsis* Th003

Lote	Rendimiento SSF (conidios/kg/h)
Lote 1	$9,15 \times 10^9$
Lote 2	$1,41 \times 10^{10}$
Lote 3	$1,63 \times 10^{10}$
Lote 4	$1,93 \times 10^{10}$

Al comparar los resultados de rendimiento de la producción de conidios tanto en fermentación bifásica ($5,97 \times 10^9$ conidios/kg/h) como en fermentación sólida ($1,42 \times 10^{10}$ conidio/kg/h) se puede concluir que el proceso SSF presentó cerca del

doble de rendimiento. Este análisis permitió seleccionar la fermentación SSF como el proceso estándar para la producción de la biomasa utilizada como principio activo del biopláguicida a base de *T. koningiopsis* Th003.

Cabe anotar que el producto de la fermentación sólida tiene algunas ventajas, ya que la pared celular de las esporas es mucho más gruesa, aumentando su durabilidad y permitiendo que ésta persista por más tiempo en condiciones adversas. De hecho, se ha demostrado que la pared celular de las esporas aéreas es el doble de gruesa que la de las esporas producidas en medio líquido.

Otro factor de relevancia son las propiedades hidrofóbicas que exhibe una spora producida en un sistema de fermentación sólida, determinado por la acumulación en la pared celular de proteínas hidrofóbicas y compuestos como las tricozianinas, que en conjunto repelen el agua. Esto tiene gran importancia para una rápida y persistente adherencia a la superficie de las plantas y de otros hongos, los cuales tienen iguales propiedades de hidrofobicidad (Jenkins *et al.*, 2000).

Escalamiento del proceso de formulación de *T. koningiopsis* Th003

Una vez estandarizada la metodología de fermentación para la producción masiva de *T. koningiopsis* Th003, se desarrolló el escalamiento a nivel planta piloto de la formulación del bioplaguicida diseñado como un polvo mojable WP, teniendo en cuenta las operaciones descritas en la Figura 7.

Para el escalamiento del proceso de formulación se definieron los puntos críticos de cada una de las operaciones unitarias involucradas. La importancia de los puntos críticos radica en el control que ejercen sobre los procesos, de manera que permiten definir si un lote terminado o en proceso es aprobado. Los puntos críticos del proceso de formulación fueron, en su orden: el rendimiento de separación en g de conidios húmedos/kg de biomasa procesada, la concentración de la mezcla (conidios/g) y la concentración final después del proceso de secado (conidios/g). Para el

escalamiento de las operaciones de formulación se evaluaron cuatro lotes piloto de aproximadamente 10 kg, y a los resultados encontrados se les determinó el coeficiente de variación con el fin de evaluar la reproducibilidad entre lotes.

Operación de separación

Los conidios obtenidos en el proceso de fermentación sólida fueron separados usando procesos previamente estandarizados. Al final de la operación, se determinó el rendimiento en términos de g conidios húmedos obtenidos por kg de sustrato procesado para los cuatro lotes evaluados.

Los conidios húmedos obtenidos en los 4 lotes presentaron humedades entre el 61,08% y 63,65%, con una media de 62,36%. En cuanto a la concentración, se encontraron valores entre $1,5 \times 10^{10}$ y $3,0 \times 10^{10}$ conidios/g, con un valor promedio de $2,25 \times 10^{10}$ conidios/g (Figura 15). Para lograr que el polvo mojable de *T. koningiopsis* presente una concentración final de $1,0 \times 10^9$ conidios/g es necesario partir de conidios húmedos con una concentración mínima de $1,0 \times 10^{10}$ conidios/g; los cuatro lotes evaluados estuvieron dentro de este rango, con lo cual se garantiza que el producto final cumplirá con los límites de aceptación establecidos.

En cuanto al rendimiento en términos de g de conidios/kg de biomasa procesada, se observaron valores entre 73,20 y 84,40 g conidios/kg biomasa (Tabla 11), variable que fue considerada como un punto crítico para el desarrollo de la operación de separación.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos para estos cuatro lotes y los resultados previamente encontrados en condiciones de laboratorio, se decidió establecer como límite un rendimiento de separación mínimo de 70 g de conidios/kg de biomasa procesada.

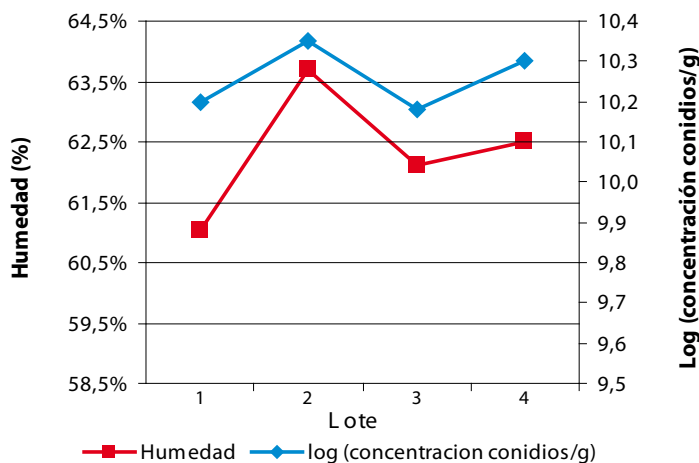


Figura 15. Concentración (conidios/ g) y humedad (%) de conidios húmedos de *T. koningiopsis* obtenidos después del proceso de separación.

Tabla 11. Resultados obtenidos para la operación de separación para cuatro lotes de *T. koningiopsis*.

Lote	Concentración (conidios/g)	Rendimiento (g conidios/húmedos/kg biomasa procesada)	Humedad (%)
1	$1,56 \times 10^{10}$	73,20	61,08
2	$2,19 \times 10^{10}$	82,73	63,65
3	$1,51 \times 10^{10}$	84,42	62,07
4	$1,99 \times 10^{10}$	81,80	62,44

Operación de mezcla

Los conidios húmedos fueron mezclados con excipientes que brindan al bioplaguicida final propiedades de desintegración y protección frente a los rayos ultravioleta del sol. El tiempo de mez-

cla ideal fue determinado evaluando diferentes tiempos (10, 15 y 20 minutos) por triplicado. La distribución del microorganismo en la mezcla se determinó mediante el IM (Índice de Mezcla), utilizando como trazador la concentración de conidios de *T. koningiopsis*.

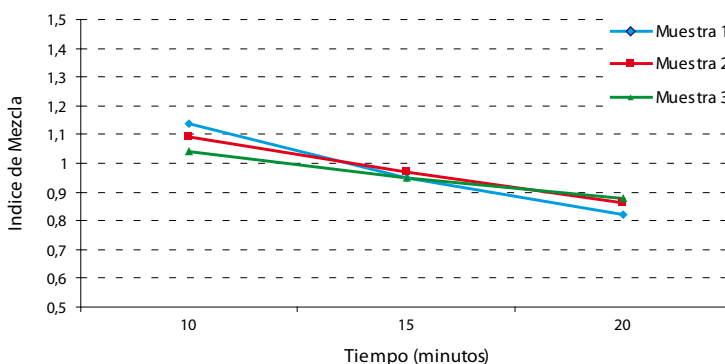


Figura 16. Índice de Mezcla (IM) para el lote 1 de *T. koningiopsis* Th003

En la Figura 16 se observa que a los 10 y 20 minutos el IM está alejado del valor de 1, mientras que a los 15 minutos es igual o cercano a 1, es decir que los valores teóricos de la concentración de conidios y los determinados experimentalmente fueron muy similares; por esta razón, un tiempo de mezcla de 15 minutos fue seleccionado como

el tiempo óptimo de mezcla. Este comportamiento también se observó en los demás lotes evaluados (Tabla 12). En cuanto a la humedad final de la mezcla, no se encontraron diferencias significativas entre lotes, por lo que se estableció para esta característica un rango de aceptabilidad comprendido entre 43% y 45%.

Tabla 12. Resultados de la operación de mezcla húmeda de 4 lotes de *T. koningiopsis*

Lote	Tiempo de mezcla ideal (minutos)	Humedad (%)	Concentración promedio (conidios/g)
1	15	44,06	7,60 x 10 ⁸
2	15	44,96	9,40 x 10 ⁸
3	15	44,24	8,31 x 10 ⁸
4	15	43,18	9,21 x 10 ⁸

Para garantizar una concentración final de 1,0x10⁹ conidios/g en el producto final seco se estableció como límite de aceptación en el proceso de mezcla una concentración mínima de 6,0x10⁸ conidios/g en los tres puntos muestreados. Los cuatros lotes fabricados cumplieron los límites establecidos tanto de humedad como de concentración, garantizándose la homogeneidad del producto obtenido.

Operación de secado

Los valores del porcentaje de humedad son de vital importancia, ya que para que el microorganismo se encuentre en un estado de latencia es necesario almacenarlo a bajas humedades. En la mayoría de productos de control biológico se sugiere mantenerlos con humedades inferiores al 10% (Burges, 2000).

Buscando evaluar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de germinación y la pérdida de humedad de los conidios de *T. koningiopsis*, se evaluaron cuatro cinéticas de secado a 27°C, 30°C, 33°C y 36°C. La cinética a 27°C se mantuvo como control por ser ésta la temperatura recomendada en estudios previos realizados en condiciones de laboratorio. Una vez iniciadas las cinéticas de secado se tomaron dos muestras cada dos horas durante aproximadamente 25 horas con el fin de determinar la humedad (%) y la germinación de

los conidios (%) mediante las técnicas de pérdida de peso y microscopía, respectivamente.

Al realizar las cinéticas de secado a las diferentes temperaturas (27°C, 30°C, 33°C y 36°C) se observó, respecto a la pérdida de humedad, que a mayor temperatura el producto se seca más rápido, hasta llegar a valores de humedad por debajo del 6% (Figura 17). Para llegar a este valor de humedad se requirió de 17 horas a 27°C y de 17,5 horas, 13 horas y 5 horas a 30, 33 y 36°C respectivamente. En cuanto a la germinación (%) los resultados demuestran que con el aumento de temperatura la germinación de los conidios se ve afectada negativamente, acentuándose este efecto a mayores tiempos de exposición (Figura 18). A 27°C después de 17 horas de secado se presentó una reducción de la germinación en un 5,1%, mientras que a 30°C la germinación disminuyó 7,08% después de 19 horas de secado. A 33°C la disminución de la germinación fue relativamente alta (12,10%), sin embargo, el mayor efecto se presentó a 36°C, ya que con solamente 5 horas de secado los valores de germinación (%) se redujeron en un 30% (Figura 19). La pérdida en la germinación a 30°C no fue significativamente diferente comparada con la obtenida a 27°C, por lo que estas temperaturas podrían ser utilizadas en el proceso de secado. Las temperaturas de 33 y 36°C no fueron recomendadas para el secado, ya que aunque los tiempos de secado fueron cortos, las pérdidas en germinación fueron superiores al 10%.

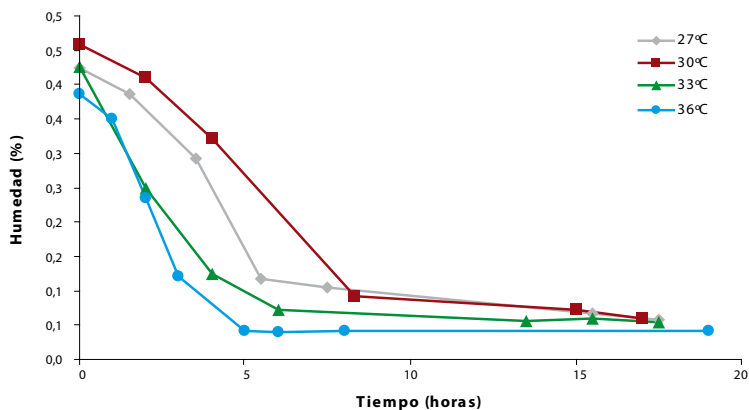


Figura 17. Humedad (%) del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* secado a cuatro temperaturas diferentes.

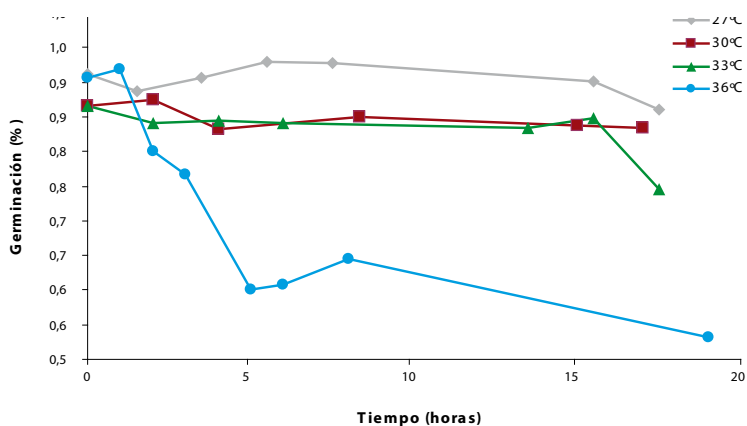


Figura 18. Germinación (%) del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* secado a cuatro temperaturas diferentes.

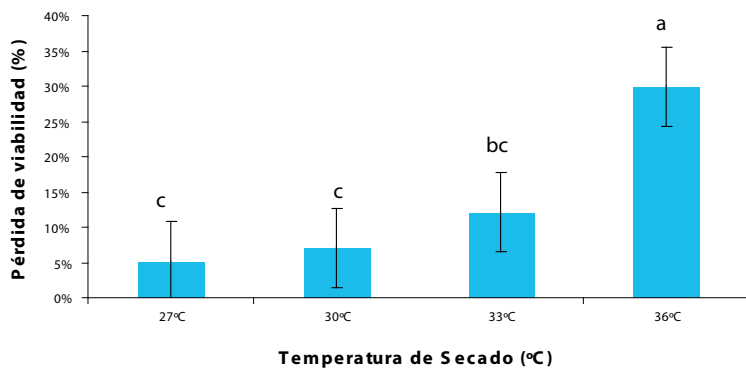


Figura 19. Pérdida de germinación (%) del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*, secado a cuatro temperaturas diferentes.

Control de calidad

El producto seco obtenido se sometió a control de calidad en el laboratorio certificado (Biotécni-

ca), verificando que cumpliera con los parámetros de aceptación previamente definidos.

- Agosin, E.; Latorre B.; San Martín, R.; Vásquez, G. (1997). Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against botrytis bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*, 16, 209 - 214.
- Cruz, C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 127.
- Díaz, A. (2005). Comunicación personal
- Drysdale, R. B.; Ride, J. P. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiology Plant Pathology*. Vol 2: 7 - 15.
- Duarte, A. (1995). Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Ed. Universidad Nacional de Colombia.
- Flórez, J. (2002). Diseño y puesta en marcha de un reactor Airlift para la producción masiva de microorganismos de interés en control biológico. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad de América. 20 - 35.
- Gallego, D.; Laverde, M. (2002). Introducción a la ingeniería bioquímica, Universidad Nacional de Colombia.
- Gervais P; Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13 (2003) 85 - 101.
- Hölker, U.; Höfer, M.; Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175 - 86.
- Jenkins, N. E.; Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents-Assurance of product performance. *Biocontrol Science Technology*. 10. 753 - 777.
- Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol 25: 1 - 30.
- Kubota, T. (1995). *Trichoderma harzianum* SK-55 fungus fungicide containing it, method of manufacture of the same and its use. United States Patent 5, 422, 107.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 13: 81 - 84.
- Peña, V. (2002). Efecto de diferentes sustratos sobre la producción de conidios de *Trichoderma koningii* en medio sólido. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 153.
- Singhania, A. K.; Patel C. R.; Soccolc, A. P. (2008). Recent advances in solid-state fermentation a Biotechnology Division, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (formerly Regional Research Laboratory) CSIR, Trivandrum 695 019, India School of Life Sciences, North Maharashtra University, Jalgaon-425 001, India.
- Tomaselli, C.; Vergoignan, C.; Feron, G.; Durand, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 7: 1 - 5.

ESTUDIOS PARA AJUSTAR LA FORMA DE APLICACIÓN DEL BIOPLAGUICIDA WP A BASE DE *Trichoderma koningiopsis* Th003 EN EL CULTIVO DE TOMATE

**Carlos Andrés Moreno Velandia M. Sc.¹,
John Alexander Rodríguez²
y Alexander Smith May B. Sc.¹**

¹Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB,
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA,
Km 14 vía Bogotá-Mosquera.

E-mail: cmoreno@corpoica.org.co.

²Estudiante de Ingeniería Agronómica,
Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá.



CAPÍTULO 4

En estudios anteriores el prototipo granulado (WG) a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003, desarrollado por el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, se ha aplicado en el cultivo del tomate de forma directa en cada sitio de trasplante; en este caso el aplicador hace el hoyo y coloca en el fondo aproximadamente dos 0,5 g de producto que toma con los dedos, para posteriormente colocar la plántula y suministrar el riego. Una semana después del trasplante, el prototipo se ha aplicado como una suspensión en agua en concentración de 1×10^6 conidios. ml^{-1} con una frecuencia semanal durante el primer mes postrasplante. En este caso, la aplicación de la suspensión se ha realizado con una fumigadora de espalda, retirándole la boquilla y dirigiendo el chorro (30 mL) a la base de la planta a fin de que el producto llegue a la zona de la rizósfera.

En un estudio llevado a cabo en el centro de investigación Tibaitatá de CORPOICA se observó que bajo condiciones de alta humedad en el suelo (época de invierno) las aplicaciones posteriores en drench, con frecuencias de 8 y 15 días, favorecieron el desarrollo de la enfermedad marchitez ascendente causada por *Fusarium oxysporum*; mientras que cuando se aplicó el bioplaguicida de forma directa solo en el momento del trasplante, el nivel de enfermedad fue el más bajo. CORPOICA también desarrolló un prototipo en polvo (WP) a base del mismo hongo antagonista, diseñado para aplicarlo a la filósfera de las plantas, mostrando alta eficacia en el control de *Botrytis cinerea* y *Oidium lycopersicum* en tomate. No obstante, los estudios de valorización de la tecnología indicaron alta factibilidad económica tanto para el prototipo en polvo como para aplicación al suelo y aplicación foliar.

Teniendo en cuenta que en los sistemas de producción de tomate el bioplaguicida puede ser incorporado con diferentes equipos que podrían ofrecer mayor eficiencia técnica y económica – como el fertirriego, equipos para aplicación en drench y equipos de aspersión–, en este estudio se evaluó la sobrevivencia del antagonista en el suelo, se midió el efecto de la presión de aplicación sobre la germinación de los conidios, se evaluaron equipos para incorporar el bioplaguicida WP en sistemas de producción comercial de tomate y se midió la actividad biocontroladora de fitopatógenos del suelo (que no había sido medida con este prototipo).

SOBREVIVENCIA DE *T. koningiopsis* Th003 EN LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE TOMATE

Objetivo

Determinar el efecto de diferentes formas de aplicación del bioplaguicida al suelo sobre la densidad de propágulos viables de *T. koningiopsis* Th003.

Metodología

Ubicación

Se llevaron a cabo dos experimentos para medir la población del hongo *T. koningiopsis* Th003 en la rizósfera de las plantas de tomate: un experimento se realizó en materas con suelo franco arcilloso en un invernadero de vidrio en el centro de investigación Tibaitatá (en Mosquera), y el segundo se realizó en un suelo arcilloso en un invernadero de producción comercial de tomate, ubicado en la vereda alto del molino del municipio de Pasca, Cundinamarca, invernadero No. 1 de la finca El Mirador.

Primer experimento

En este experimento se evaluó el efecto de dos formas de aplicación de los prototipos de bioplaguicida granulado dispersable en agua (WG) y polvo mojable en agua (WP) a base de Th003 sobre la permanencia del hongo en la rizósfera del tomate (*Solanum lycopersicum*).

Sustrato

Se preparó una mezcla de suelo con cascarilla de arroz quemada (80%), en proporción 1:1 (v/v) para llenar las materas. El sustrato no recibió ningún tratamiento de desinfección; sin embargo, antes de la aplicación de los tratamientos se tomaron muestras y se determinó que *Trichoderma* spp. no estaba presente.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de tomate tipo milano híbrido Rocío (Semillas Syngenta), las cuales fueron lavadas con agua de grifo para eliminar el fungicida adherido a la superficie. Antes de sembrar la semilla en el sustrato (una semilla por materia), el sustrato se humedeció con agua de grifo hasta capacidad de campo. Luego de 24 horas se aplicaron los tratamientos.

Tratamientos

Teniendo en cuenta que el prototipo de bioplaguicida WG fue diseñado para ser reconstituido en agua o para ser aplicado directamente al sue-

lo, y que el prototipo WP fue diseñado para ser reconstituido en agua y aplicarse con equipos de fumigación, en este bioensayo se evaluaron estas tres formas de aplicación de los prototipos y se incluyó un testigo sin aplicación de bioplaguicida. Después de la siembra se aplicó un riego diariamente (30 ml.materia⁻¹).

- T1: Testigo.
- T2: Aplicación directa de los bioplaguicidas en dosis de 0,5 g por materia (5x10⁸ conidios en cada materia) a 2 cm de profundidad en el sitio de siembra (Figura 20). El producto se cubrió con una fina capa de suelo y luego se colocó la semilla a 0,5 cm de profundidad.



Figura 20. Aplicación directa del prototipo de bioplaguicida WG a base de Th003

- T3: Aplicación del prototipo de bioplaguicida WG reconstituido en agua en dosis de 1 g/L (1x10⁶ conidios ml⁻¹). Se aplicaron 30 ml/materia (3x10⁷ conidios/materia) después de la siembra (Figura 21).



Figura 21. Aplicación del prototipo de bioplaguicida WG a base de Th003 suspendido en agua

- T4: Aplicación del prototipo de bioplaguicida WP reconstituido en agua en dosis de 1 g/L (1×10^6 conidios ml^{-1}). Se aplicaron 30 ml/materia

tera (3×10^7 conidios/materia) después de la siembra (Figura 22).



Figura 22. Aplicación del prototipo de bioplaguicida WP a base de Th003 suspendido en agua

Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en una materia. Los datos estimados de UFC/g de sustrato se transformaron con Log_{10} y se sometieron a análisis de varianza (ANAVA) y a una comparación de medias de tratamientos mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Muestras y procesamiento de muestras

Para evaluar la densidad de propágulos viables de Th003 en la rizósfera de las plantas se tomaron muestras a los 30 y 60 días después de la aplicación de los tratamientos. Para tomar la muestra de rizósfera se sacó la plántula del sustrato de crecimiento, halándola cuidadosamente desde la base

del tallo. Estando afuera, se golpeó suavemente la base del tallo para desprender parte del sustrato y tomar 1 g de aquel que queda adherido a la raíz (Figura 23). La muestra de sustrato se dispuso en 9 ml de solución estéril Tween 80 (0,1% v/v) y se realizaron diluciones seriadas decimales hasta 10^{-4} . En cada dilución se agitó el tubo de ensayo con Vortex en máxima velocidad durante 1 min. Asimismo, de cada dilución se tomó una alícuota de 100 μL que fue sembrada en una caja de Petri con medio de cultivo TSM modificado (Askew y Lang, 1993) (Anexo 1) y con ayuda de un rastrillo de vidrio estéril se distribuyó el inóculo en la superficie del medio de cultivo. Este procedimiento se realizó por triplicado, y las cajas de Petri se llevaron a incubación en condiciones de oscuridad a 24°C . Después de 10 días de incubación, se realizó el conteo de colonias de *T. koningiopsis* Th003 y se estimó el número de colonias por 1 g de sustrato de la rizósfera.



Figura 23. Procedimiento para tomar la muestra de sustrato de la rizósfera de las plantas de tomate

Segundo experimento

Teniendo en cuenta los resultados encontrados en el experimento realizado en condiciones controladas en materas, se seleccionó el prototipo de bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* Th003 para ser incorporado en el cultivo de tomate para el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. En este experimento, efectuado en un invernadero comercial, se midió la población de propágulos viables de Th003 en el suelo después de la aplicación en drench del bioplaguicida formulado.

Dado que en el suelo de este invernadero ya se habían realizado aplicaciones previas de *T. koningiopsis* Th003 un año antes (2007), se tomaron muestras del suelo anterior a la aplicación del tratamiento, determinándose la presencia y el nivel de población en términos de propágulos viables de *Trichoderma* sp. en él. La población de *Trichoderma* en la parcela tratada se comparó con la población del hongo en una parcela testigo.

Material vegetal y aplicación del tratamiento biológico

En este experimento se utilizó tomate tipo chonto var. Atala (las plántulas fueron adquiridas por

el agricultor en un semillero comercial en donde no aplicó *Trichoderma* sp). La aplicación de la suspensión del bioplaguicida (1×10^6 condios m^{-1}) se realizó inmediatamente después del trasplante. Para la aplicación se utilizó una fumigadora de espalda operada por palanca (Guarany[®]), a la cual se le retiró la boquilla, realizando una descarga dirigida a la base de cada planta (30 ml aproximadamente) y operando continuamente la palanca para tener presión en el interior del equipo.

Diseño experimental, muestreo y procesamiento de muestras

Se utilizó una parcela única compuesta por cinco camas de cultivo de 1,2 m de ancho por 20 m de largo cada una (120 m^2). Para separar las dos parcelas se dispuso una cama de cultivo (Figura 24), con una distancia de siembra empleada por el agricultor de 20 cm entre surcos y 40 cm entre plantas al tres bolillo.

Después de la aplicación del bioplaguicida en drench se tomaron cuatro muestras de suelo periódicamente (14, 21, 29 y 35 días), una de las cuales estuvo constituida por 100 g de suelo y que fue tomada de diferentes plantas en la parcela. Para esto se sacó la planta del suelo y se sacudió, retirando parte del suelo y tomando aquella parte adherida a la raíz (Figura 24).



Figura 24. Muestreo de la rizósfera de plantas de tomate en el experimento en invernadero comercial

Cada muestra fue homogenizada y de ella se tomaron 10 g que se colocaron en 90 ml de solución estéril Tween 80 (0,1% v/v) y se realizaron

diluciones, de las cuales se tomaron alícuotas de suspensión que se sembraron en el medio de cultivo TSM, como se describió anteriormente.

Resultados

Primer experimento

El análisis microbiológico realizado a las muestras de sustrato antes de la aplicación de los tratamientos mostró que *Trichoderma* spp. no estaba presente, con lo cual se pudo asegurar

que las muestras del hongo obtenidas después de la aplicación correspondieron a *T. koningiopsis* Th003. De otra parte, en las muestras de rizósfera del testigo tampoco se presentó *Trichoderma* spp. después de la aplicación de los tratamientos. El hongo aplicado como una formulación reconstituida en agua se recuperó eficientemente de las muestras de sustrato tratado y creció bien en el medio de cultivo selectivo (Figura 25).

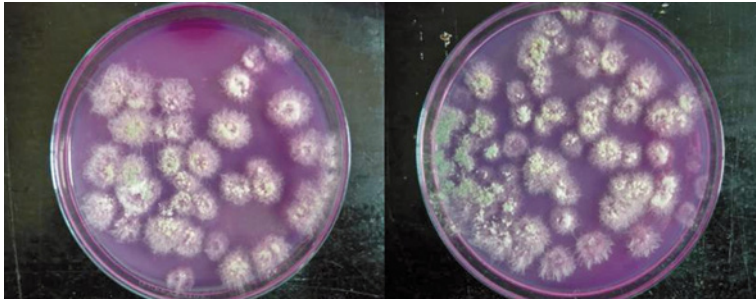


Figura 25. Crecimiento de colonias de *T. koningiopsis* Th003 en el medio de cultivo TSM.

En las cajas de Petri se inocularon 100 μ l de suspensión diluida de suelo rizosférico, tratado con el antagonista de las muestras tomadas en el experimento realizado en materas.

En las unidades experimentales tratadas con los prototipos de bioplaguicida se observó una población más alta de propágulos viables de Th003 30 días después de la siembra, en comparación con la población encontrada a los 60 días. La aplicación del prototipo granulado di-

rectamente al suelo mantuvo los niveles más altos de población de Th003 en la rizósfera de las plantas de tomate en los dos tiempos de evaluación, siendo estos de $5,3 \times 10^5$ UFC/g a los 30 días y de $3,9 \times 10^4$ UFC/g a los 60 días después de la aplicación (Figura 26).

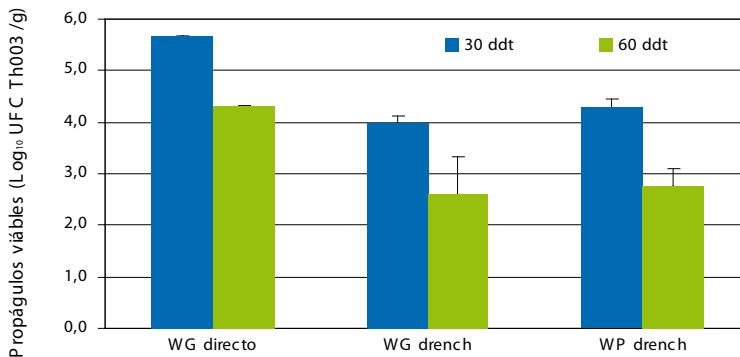


Figura 26. Efecto de la forma de aplicación de los prototipos de formulación WG y WP a base de *T. koningiopsis* Th003 al suelo sobre la sobrevivencia del hongo antagonista en la rizósfera de plantas de tomate. WG directo: el producto se colocó en el fondo del sitio de la siembra (0,5 g); WG drench: el producto se reconstituyó en agua (1 g/L) y se aplicó después de la siembra (30 ml); WP drench: el producto se reconstituyó en agua (1 g/L) y se aplicó después de la siembra (30 ml). Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar de los datos (n= 9).

Cuando los prototipos de bioplaguicida se reconstituyeron en agua y se aplicaron en drench, se observó que la formulación polvo mojable mantuvo los niveles de población más altos entre los dos tratamientos, siendo estos de $3,9 \times 10^4$ UFC/g a los 30 días y de $1,5 \times 10^3$ UFC/g a los 60 días; mientras que con la formulación WG aplicada en drench la población de Th003 en la rizósfera fue de 1×10^4 UFC/g en el primer tiempo y de $5,1 \times 10^2$ UFC/g en el segundo tiempo.

Sin embargo, hay dos aspectos que se deben tener en cuenta en éste análisis: el primero es que en la aplicación directa del prototipo de bioplaguicida WG se aplicó al suelo una densidad de conidios 17 veces más alta que en los otros dos tratamientos, ya que mientras en la aplicación directa se aplicaron 5×10^8 conidios en la unidad experimental, en los otros dos tratamientos se aplicaron 3×10^7 conidios. El segundo aspecto que se debe tener en cuenta es que debido a que en la aplicación directa Th003 se concentró en un sitio en el sustrato, y en la aplicación en drench la población de conidios se dispersó en el sustrato, se esperaba una mayor colonización de la rizósfera para el primer caso. En el muestreo realizado 30 días después de la aplicación de los tratamientos, se observó que la población de Th003 encontrada en la rizósfera guardó la proporción con respecto al número de conidios aplicado entre los tratamientos WG directo y WP drench, siendo ésta 13 veces mayor en el primer caso, aunque dicha proporción se perdió cuando se comparó con el tratamiento WG drench, en donde la población de propágulos viables fue 52 veces más alta.

El establecimiento de *Trichoderma* spp. en el suelo cuando ha sido introducido como agente de control biológico de fitopatógenos no ha sido

estudiado suficientemente, pero las investigaciones realizadas demuestran que los factores físicos y químicos del suelo afectan las poblaciones del hongo y su actividad biocontroladora. La reducción en la densidad de la población de los microorganismos introducidos en control biológico es deseable desde el punto de vista ambiental, ya que este comportamiento indica un bajo impacto sobre las poblaciones naturales de microorganismos presentes en el suelo. En el presente estudio se encontró que la pérdida de propágulos de Th003 en la rizósfera fue similar entre los tres tratamientos. Al comparar la población de Th003 a los 30 y 60 días después de la aplicación se encontraron pérdidas de 24%, 34% y 35% (en términos de cifras logarítmicas) para la aplicación directa, WG drench y WP drench respectivamente.

Segundo experimento

En el suelo del invernadero de producción comercial de tomate se encontró una población inicial de *Trichoderma* sp. de 9×10^3 UFC/g. Catorce días después de la aplicación se observó que la población del antagonista aumentó considerablemente en la rizósfera de las plantas tratadas con el bioplaguicida, mientras que la población del hongo en la rizósfera de las plantas testigo fue significativamente más baja. En ambos casos se presentó una tendencia inicialmente de descenso de la población de *Trichoderma* sp. en la rizósfera y posteriormente de ascenso, si bien en todas las fechas de muestreo el nivel de población de propágulos viables fue mayor cuando se realizó la aplicación del bioplaguicida (Figura 27).

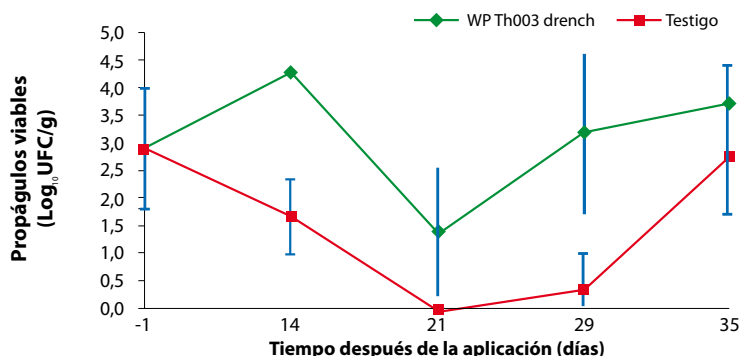


Figura 27. Fluctuación de la población de propágulos viables de *Trichoderma koningiopsis* Th003 en la rizósfera de plantas de tomate cultivadas en un suelo arcilloso en el municipio de Pasca, Cundinamarca. La aplicación del antagonista se realizó como una suspensión del producto WP en concentración de 1×10^6 conidios/mL. Las barras en el marcador de cada serie indican la desviación estándar de los datos ($n = 3$). La población del hongo en el tiempo -1 hace referencia a la población encontrada antes de la aplicación del bioplaguicida.

Los datos presentados muestran de forma general el comportamiento de la población de *T. koningiopsis* Th003 en la rizósfera de plantas de tomate sembradas en dos tipos de suelo y no pretende informar acerca de la distribución del hongo en la rizósfera. La literatura científica ha descrito que el comportamiento de los microorganismos en la rizósfera está relacionado con su habilidad para crecer y tener actividad en esta zona, lo cual ha sido llamado 'competencia rizosférica' y es evaluado sobre la base de la densidad de población en función de la profundidad de la raíz.

Particularmente esto ha sido demostrado en el caso de *Trichoderma harzianum* (Ahmad y Baker, 1987; Sivan y Chet, 1989; Sivan y Harman 1991) y *Trichoderma koningii* (Tsahouridou y Thanassouloupoulos, 2002), quienes encontraron que la población del microorganismo en función de la profundidad de la raíz presentó una forma de U, en la cual las altas densidades se encuentran en la base y en las puntas de la raíz, antes que en la parte media. Este fenómeno ha sido atribuido al incremento en los exudados desde la semilla o de las raíces laterales (Cook y Baker, 1983).

Además se ha demostrado que los parámetros abióticos edáficos afectan positiva y negativamente la actividad biocontroladora de *Trichoderma*; tal es el caso de la descripción realizada por Duffy *et al.* (1997), quienes encontraron variación en la actividad biocontroladora de *T. koningii* sobre *Gaeumannomyces graminis* en diferentes tipos de suelos sembrados con trigo, encontrando un aumento en la eficacia del hongo en suelos con alto contenido de hierro o arcilla y en suelos con pH o concentración de fósforo disponible bajos.



EFICACIA DEL BIOPLAGUICIDA EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES DEL TOMATE

Objetivo

Determinar el efecto de formas de aplicación del bioplaguicida al suelo sobre la incidencia de las enfermedades pudrición de corona y de raíces y damping-off.

Metodología

Ubicación

El experimento se realizó en el invernadero No. 3 de la finca El Mirador en Pasca, Cundinamarca.

Material vegetal y tratamientos

Se utilizaron plántulas de tomate chonto var. Atala adquiridas por el agricultor en un semillero comercial en donde no se aplicó *Trichoderma* sp. Se compararon dos formas de aplicación del bioplaguicida WP a base del hongo *T. koningiopsis* Th003 suspendido en agua (1 g/L, 1×10^6 conidios. ml⁻¹): una de estas formas consistió en la aplicación vía sistema de riego por goteo y la otra fue la aplicación en drench utilizando la fumigadora de espalda, tal como se describió en la primera parte de este documento.

Los tratamientos biológicos se aplicaron tres días antes y tres días después del trasplante, humedeciendo previamente para la primera aplicación las camas de cultivo. El control biológico se comparó con el tratamiento empleado por el agricultor para regular las enfermedades del suelo, el cual consistió en la aplicación del fungicida Tolclofos Metil (Rizolex®), en dosis de 1 g/L. Para su aplicación, el agricultor utilizó también una fumigadora de espalda operada por palanca y dirigió la mezcla de producto a la base de las plantas.

Diseño experimental y variables medidas

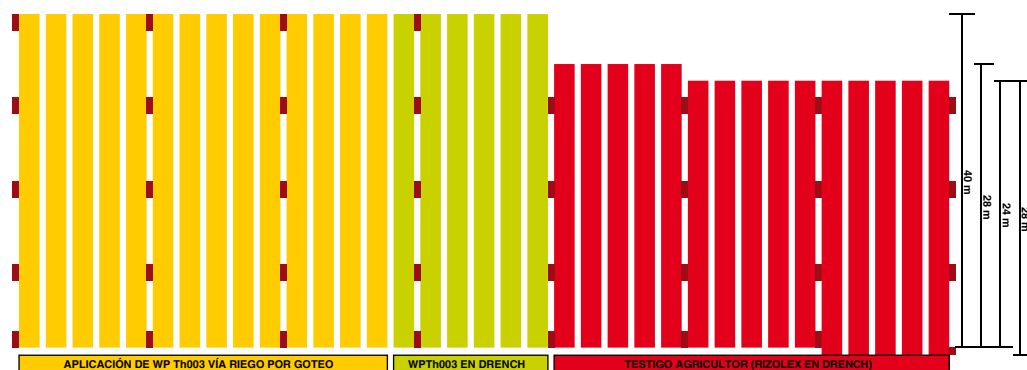


Figura 28. Mapa que muestra la distribución de los tratamientos en el invernadero No. 3 de la finca El Mirador en Pasca, Cundinamarca.

Se utilizó una parcela única, cuyo tamaño varió de acuerdo a la independencia del riego en las naves (Figura 24). Por consiguiente, el tratamiento biológico empleando el sistema de riego por goteo se aplicó en 14 camas de cultivo, la aplicación de Th003 con la fumigadora de espalda se hizo en 6 camas de cultivo y el tratamiento químico en 15 camas (Figura 28).

Una vez por semana se registró la incidencia de las enfermedades damping-off causada por *Rhizoctonia solani*, y pudrición del cuello y de las raíces causada por *Fusarium oxysporum*. El muestreo se realizó en zig-zag en 20 parcelas fijas de 4 m de longitud, aproximadamente con 26 plantas cada una.

Resultados

La enfermedad damping-off (Figura 29) causada por *R. solani* se apreció en la segunda y tercera semanas después del transplante, notándose que la incidencia fue más baja en las parcelas tratadas con el biofungicida (Figura 30), aunque no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos evaluados debido a una alta variabilidad de los datos entre las muestras. La eficacia promedio en la reducción de esta enfermedad, mostrada por la aplicación del biofungicida a través del riego y con la fumigadora, fue de 68% a 71% respectivamente.



Figura 29. Síntomas causados por *R. solani* (arriba izquierda y derecha) y *F. oxysporum* (abajo izquierda) en las plantas de tomate del experimento.

Los síntomas de la enfermedad causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Figura 29) se apreciaron un mes después del trasplante, teniendo ésta mayor progreso en la parcela tratada con el fungicida químico comparado con las parcelas tratadas con el bioplaguicida; sin embargo, se observó que la aplicación del producto biológico por el sistema de riego presentó una reducción de la enfermedad significativamente más alta (67%) en comparación con la aplicación con la fumigadora de espalda (38%) (Figura 30).

En la medición de la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium* se notó que la variabilidad

de los datos fue más baja en el tratamiento biológico aplicado en el sistema de riego. Es posible que con esta forma de aplicación se obtenga mayor área de cubrimiento, lo cual permite que el antagonista colonice el suelo y la rizósfera homogéneamente. Los resultados del experimento sugieren que la suspensión del producto en polvo llegó a la zona radicular y el hongo protegió la planta contra las infecciones de los fitopatógenos; igualmente permite suponer que la forma de aplicación de los productos biológicos es un factor que se debe considerar para conseguir una alta eficacia en el control de enfermedades, lo que también debe evaluarse detalladamente.

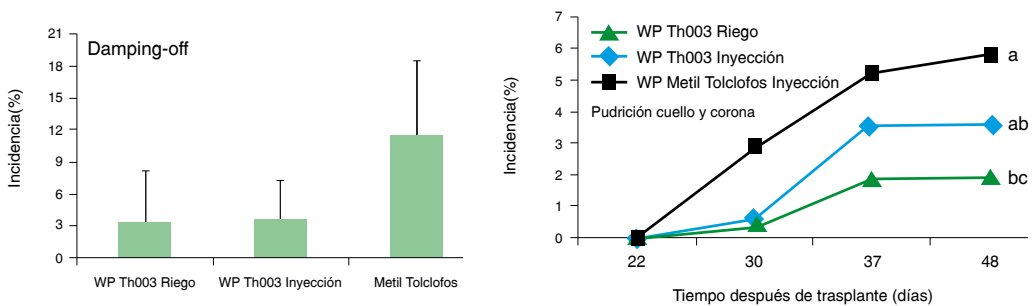


Figura 30. Efecto de la forma de aplicación del bioplaguicida polvo mojable a base de *T. koningiopsis* Th003 sobre la incidencia de las enfermedades causadas por *R. solani* (damping-off) y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (pudrición del cuello y de raíz). Para el primer caso, se presenta la incidencia a los 22 días después del trasplante. El bioplaguicida se utilizó en dosis de 1 g/L (1×10^9 conidios. ml^{-1}) y se aplicó 3 días antes y 3 días después de dicho trasplante. El fungicida Tolclofos Metil (Rizolex) se utilizó en dosis de 1 g/L. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar de los datos entorno al promedio ($n=20$). Los marcadores al final de cada serie con igual letra no son diferentes significativamente, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

EFECTO DE LA PRESIÓN HIDRODINÁMICA SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS CONIDIOS DE *T. koningiopsis* Th003

Objetivo

Determinar si la presión de operación común en la cámara del equipo de fumigación afecta la viabilidad de los conidios de *T. koningiopsis* Th003.

Metodología

Ubicación

El experimento se ejecutó en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA en Mosquera, Cundinamarca.

Preparación de la suspensión del bioplaguicida

El hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 constituyó el principio activo (1×10^9 conidios. g^{-1}) de una formulación polvo mojable (WP). Dicho producto

se reconstituyó en 20 l de agua potable en dosis de 10 g/l para obtener una concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} , y según las recomendaciones de uso se utilizaron 20 ml de una base oleosa en la suspensión como agente adyuvante. La suspensión se homogenizó y se dispuso en el tanque de una fumigadora de presión previa retenida (Calimax® Colinagro Ind.), la cual se desinfectó previamente con solución detergente e Hipoclorito de Sodio (2,5 %) para luego lavarla con abundante agua potable.

Tratamientos y muestreo

Las muestras fueron tomadas en una cabina de flujo laminar. Antes de tomar cada muestra se agitó vigorosamente el tanque con el fin de homogenizar la suspensión, se flameó la boquilla (material de bronce) de la lanza de aspersion y se abrió la llave de salida durante 5 s con el fin de eliminar el residuo de la desinfección. Cada muestra de suspensión se colectó en un tubo de ensayo estéril. La primera muestra correspondió a la presión 0 PSI, suministrando posteriormente la presión requerida en el interior del tanque a través del movimiento del émbolo en el pistón interno; así se tomó la siguiente muestra para la presión de 20 PSI y se repitió el procedimiento para las presiones de 40, 60, 80, 100 y 120 PSI.

Medio de cultivo para evaluar la germinación de Th003

De cada tubo de ensayo con las muestra obtenida se tomó una alícuota de 200 μl ; para esto el tubo de ensayo se agitó en un Vortex en máxima velocidad durante 20 s. Este volumen se colocó en el medio de cultivo Agar-Agua (20 g/l) suplementado con Cloranfenicol ($0,25 \text{ mg.l}^{-1}$) y Tetraciclina ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) en cajas de Petri. La muestra inoculada se dispersó en la superficie del medio de cultivo con un rastrillo de vidrio estéril. A continuación se incubó en condiciones de oscuridad a 24 °C.

Diseño experimental y análisis de datos

Después de 16 y 24 h de incubación se tomó una muestra de 1 cm^2 de medio de cultivo de cada caja de Petri y se adicionó una gota de azul de lactofenol. Se hicieron observaciones al microscopio con el objetivo 40X y se contaron los conidios germinados y no germinados en varios campos hasta obtener 100 conidios, estimándose el porcentaje de germinación. Un conidio se consideró como germinado si la longitud del tubo germinativo era mayor al diámetro del conidio. La unidad experimental fue la caja de Petri, y se utilizaron tres repeticiones por tratamiento. Éstas se acomodaron en la incubadora bajo un diseño experimental completamente al azar. Los datos de porcentajes de germinación se sometieron a ANAVA y pruebas de comparación de promedios con la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$).

Resultados

La germinación del hongo fue menor a las 16 h de incubación que a las 24 h. A las 16 h se observó una germinación entre 39% y 75%, siendo menor la germinación de los conidios cuando la presión en el interior de la cámara fue de 0 a 40 PSI (Figura 31). Los valores de germinación obtenidos cuando la presión de la cámara fue 0 y 20 PSI no fueron diferentes significativamente entre sí, pero estos sí presentaron diferencias significativas con la germinación obtenida en los demás tratamientos. Al cabo de 24 h de incubación la germinación de los conidios osciló entre 91% y 98%, muy similar entre todos los tratamientos. Los resultados sugieren un aparente efecto estimulante de la presión evaluada hasta 60 PSI sobre la germinación de los conidios de Th003 (Figura 31).

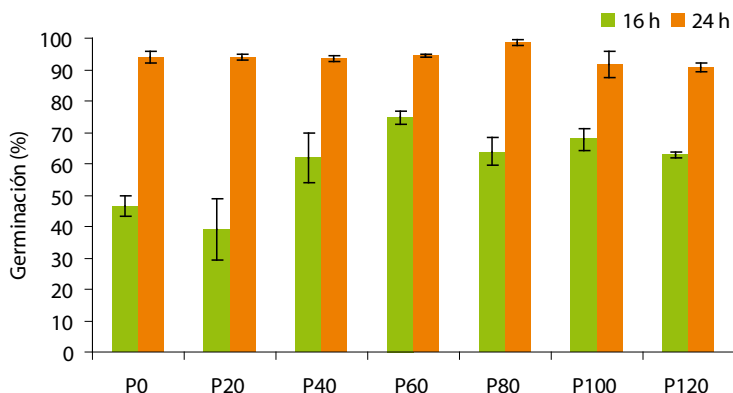


Figura 31. Efecto de la presión hidrodinámica sobre la germinación de conidios del hongo *T. koningiopsis* Th003 al cabo de 16 y 24 h de incubación en oscuridad y 24 °C. Se utilizó una formulación WP en dosis de 10 g/l, para obtener una suspensión en concentración de 1×10^7 conidios/ml. Las marcas sobre cada barra indican la desviación estándar (n=3).

Los estudios para medir el efecto de las condiciones de aplicación sobre los microorganismos utilizados en control biológico son escasos. En el 2004 Garzón evaluó el efecto de las presión (0 a 100 PSI) en la cámara de una fumigadora Calimax® sobre la viabilidad de los conidios de *Lecanicillium lecanii* y en general, los resultados fueron similares a los del presente estudio, puesto que la presión hidrodinámica no afectó la viabilidad de los conidios del hongo. No obstante, las evaluaciones que hizo este autor a las 20 y 24 h de incubación muestran una tendencia contraria a la observada en el presente estudio, ya que la germinación de los conidios de *L. lecanii* fue menor a medida que aumentó la presión en la cámara de la fumigadora. Nilsson y Gripwall (1999) en un estudio sobre técnicas de aplicación de agentes de control biológico, registraron que presiones superiores a 435 PSI afectaron negativamente la viabilidad de los conidios de *L. lecanii*; sin embargo, los equipos se que utilizan usualmente para la aplicación de productos fitosanitarios no emplean presiones mayores a 140 PSI (por ejemplo, las fumigadoras más utilizadas, de presión variable operadas por palanca, entregan una presión promedio de 100 PSI, mientras que las fumigadoras de espalda a motor operan a una presión promedio de 140 PSI. Otros equipos poco comunes ahora pero que sí se utilizan son las fumigadoras estacionarias, las cuales, a pesar de que si pueden llegar a manejar presiones superiores a 200 PSI, podrían poner en riesgo la viabilidad de los microorganismos an-

tagonistas, por lo cual se recomienda evaluar el efecto de altas presiones con estos equipos para generar recomendaciones adecuadas).

Conclusiones

Las presiones hidrodinámicas en la cámara de la fumigadora hasta 120 PSI no afectan negativamente la germinación de los conidios del hongo *T. koningiopsis* Th003.

EVALUACIÓN DE EQUIPOS DE ASPERSIÓN SOBRE LA COBERTURA DE *T. koningiopsis* Th003 EN LA SUPERFICIE FOLIAR DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

Objetivo

Determinar la influencia del equipo de aspersión sobre el cubrimiento del antagonista Th003 en la superficie foliar.

Metodología

Ubicación

Los experimentos se realizaron en el invernadero de producción comercial de tomate del centro de investigación Tibaitatá de CORPOICA, Mosquera. El área experimental (1.000 m²) se encontraba sem-

brada con tomate tipo milano híbrido San José. La edad del cultivo al momento del montaje del experimento fue de 180 días, en etapa productiva y con una altura promedio de las plantas de 2,5 m. El sistema de siembra fue surco sencillo, con distancias de siembra de 1,2 m entre surcos y 0,3 m entre plantas (Figura 32), con una longitud de los surcos de 30 m. La densidad de plantas en una cama era igual a 100 (25.200 plantas/ha).



Figura 32. Vista general de uno de los bloques de producción de tomate en el invernadero comercial donde se realizó el experimento (izquierda) y detalle del sistema de siembra (derecha).

Equipos de aspersión

Los equipos de aspersión utilizados en este estudio se presentan en la Tabla 13. En cada experimento se evaluó la combinación de un equipo de aspersión con dos implementos y dos boquillas.

Se utilizaron dos tipos de fumigadoras (Figura 33), una de espalda operada por palanca (Guarany[®]) – cuya presión es variable– y un equipo motorizado estacionario (Maruyama[®] estacionaria) –cuya presión de operación se puede fijar antes de la aspersión y durante la labor ésta es constante–. La capacidad del tanque de la fumigadora de espalda usada es de 20 l con el tanque lleno, y con la máxima carga de presurización este equipo entregó una presión de salida del líquido igual a 100 PSI. El equipo estacionario se ajustó para trabajar a una presión igual a 200 PSI.

Junto con las fumigadoras se utilizaron también dos implementos de aplicación y dos tipos de boquilla (Figura 34). En el primer caso se utilizó una lanza curva convencional que consiste en un tubo de aluminio de 0,5 cm de diámetro y 0,6 m de longitud y de una sola salida donde se coloca la boquilla; y un aguilón, equipo fabricado artesanalmente con tubería PVC de ½" de diámetro, de 1 m de longitud y con tres orificios de salida (separados entre sí 0,5 m) donde se instalan las boquillas (Figura 34).

Las boquillas que se utilizaron fueron una de cono hueco TeeJet TXVK-6, cuyas características de operación son presión máxima de PSI y caudal de descarga de l/min, y una boquilla de cono lleno TeeJet TG-1 con una presión máxima de operación de PSI y caudal de descarga de l/min.

Tabla 13. Equipos de aspersión utilizados en el experimento para evaluar su efecto sobre la cobertura del bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* en la superficie foliar de plantas de tomate sembradas bajo invernadero.

Aspersor		Implemento		Boquilla	
Abreviación		Abreviación		Abreviación	
Ep	Fumigadora de espalda manual con bomba de pistón	L	Lanza convencional	Ch	TXVK-6
Et	Fumigadora motorizada estacionaria con bomba de pistón	A	Aguilón	Cl	TG-1



Figura 33. Aspersores utilizados en los experimentos con *T. koningiopsis* Th003 para estudiar la cobertura en la superficie foliar del tomate. Fumigadora de espalda operada manualmente con bomba de pistón (Izquierda), fumigadora motorizada estacionaria con bomba de pistón (derecha).



Figura 34. De izquierda a derecha, lanza curva convencional con válvula, aguilón artesanal en PVC con tres salidas, boquilla TeeJet TXVK-6 acoplada al aguilón.

Formulación de bioplaguicida

Se utilizó la formulación WP a base del hongo *T. koningiopsis* Th003 en dosis de 1 g/l. En cada experimento se prepararon 5 l de suspensión del bioplaguicida en agua potable. Se utilizó un adyuvante oleoso para la preparación de las suspensiones, siguiendo las recomendaciones de uso.

Aforo y calibración de la aplicación del bioplaguicida

A continuación se presentan las instrucciones que se definieron para realizar el aforo del volumen de suspensión aplicado (Figura 35) y la calibración del equipo y de la velocidad de aplicación del personal que hizo la aspersión.

Aforo

- Identifique los implementos de aplicación (lanza y aguilón), equipos (fumigadoras) y boquillas.
- Llene el tanque de cada fumigadora con agua hasta su capacidad máxima.
- Coloque un manómetro en el extremo de salida de cada implemento.
- Presurice el interior del tanque de la fumigadora de espalda moviendo vigorosamente la palanca o utilice la presión que entrega el equipo en el caso de la fumigadora motorizada estacionaria.
- Instale la boquilla con la que se realizará el aforo.
- Ubique la boquilla en un recipiente aforado (probeta o recipiente para coleccionar el líquido).
- Abra la llave de paso del implemento, y al mismo tiempo de inicio al cronómetro manténgala abierta durante 1 minuto (Figura 35). Mantenga el movimiento de la palanca en la fumigadora de espalda.
- Registre el volumen de líquido coleccionado durante este tiempo; ése es el valor de caudal de descarga.

- Repita el procedimiento tres veces en cada combinación de aspersor con implemento y boquilla.

Calibración

- Indique al operario que realizará la aplicación que recorra una longitud determinada haciendo la aplicación del agua a las plantas (en el caso de este estudio se utilizó toda la cama de siembra (33 m) aplicando el líquido en ambos lados del surco).
- Registre el tiempo que demoró el operario en realizar la labor indicada.
- Con los datos obtenidos en el aforo del volumen y el tiempo registrado, estime el volumen de suspensión que necesita para el área de cultivo que se va a tratar. Tenga en cuenta que tanto el aforo como la calibración de la operación cambian con la edad del cultivo.

En este estudio la calibración de la operación se realizó para cada combinación de los equipos de aplicación.



Figura 35. Calibración de equipos de fumigación

Procedimiento de muestreo

La aplicación del tratamiento biológico con cada combinación de equipo de aspersión se hizo en una cama de cultivo y se dejaron dos surcos sin tratar para separar un tratamiento de otro (Figura 36). Antes de aplicar la suspensión de bioplaguicida se

ubicaron cuadros (1 cm²) de papel hidrosensible TeeJet (Spraying Systems Co.® USA) en la superficie de los foliolos del tomate, tanto en el haz como en el envés (Figura 36) y en los tres estratos del dosel. La unidad experimental consistió en una planta y se utilizaron 5 repeticiones. La planta seleccionada para la evaluación se marcó con una tira de plástico de color buscando facilitar la colecta.

Después de la aplicación del bioplaguicida (Figura 37) se colectaron los cuadros de papel hidrosensible en bolsas ziploc debidamente rotuladas. Posteriormente se hizo el conteo de las gotas y se estimó la cobertura para cada combinación de equipo de aspersión (gotas/cm²).

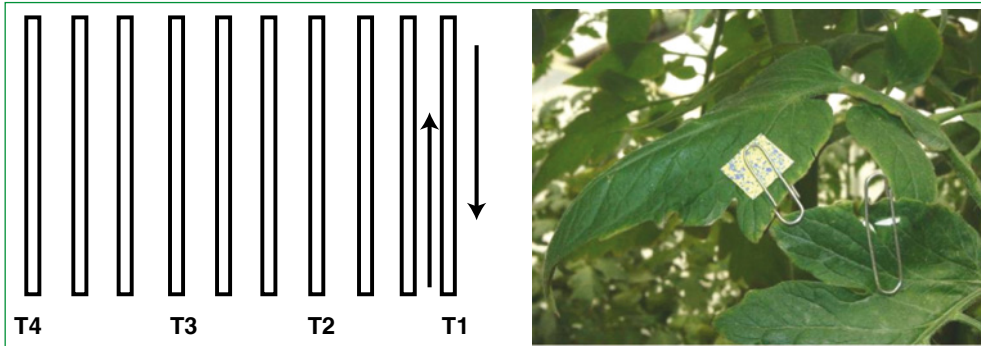


Figura 36. (Izquierda) distribución de los tratamientos para evaluar la cobertura de la suspensión de Th003 WP en la superficie de las hojas del tomate. Las flechas indican la circulación del operario para realizar la aplicación en un surco. (Derecha) papel hidrosensible ubicado en el haz y en el envés de los foliolos.



Figura 37. Operario realizando la aplicación de la suspensión de bioplaguicida Th003 WP con la fumigadora estacionaria combinada con el aguilón (izquierda) y con la lanza convencional (centro) y vista del operario manejando la fumigadora de espaldas (derecha).

Resultados

En el proceso de calibración de equipos el volumen de líquido descargado estuvo dentro del

rango indicado en la ficha técnica de las boquillas a las presiones indicadas (Tabla 14).

Tabla 14. Comparación del volumen de aplicación descargado en un minuto en la calibración realizada con el volumen de descarga según la ficha técnica de la boquilla utilizada en cada caso.

Fumigadora de espalda operada manualmente			Fumigadora motorizada estacionaria		
Tratamientos	Aforo 100 PSI (l/min)	Ficha técnica 150 PSI (l/min)	Tratamientos	Aforo 200 PSI (l/min)	Ficha técnica 150 PSI (l/min)
Ep L TXVK-6	0,44	0,68	Et L TXVK-6	0,79	0,68
Ep L TG-1	0,81	1,91	Et L TG-1	1,49	1,91
Ep A TXVK-6	1,21	2,04	Et A TXVK-6	2,37	2,04
Ep A TG-1	1,93	5,73	Et A TG-1	3,77	5,73

Ep: Fumigadora de espalda manual con bomba de pistón; Et: Fumigadora motorizada estacionaria con bomba de pistón; L: implemento lanza convencional de una salida; A: implemento aguilón en material PVC con tres salidas; TXVK-6: boquilla de cono hueco; TG-1: boquilla de cono lleno.

El volumen de suspensión estimado para aplicar en una cama de cultivo de tomate varió de acuerdo con la combinación del equipo de fumigación, siendo mayor el volumen cuando se utilizó el implemento aguilón con tres boquillas, en

comparación con la lanza convencional; también fue mayor cuando se utilizó la boquilla de cono lleno en comparación con la boquilla de cono hueco (Tabla 15).

Tabla 15. Volumen de suspensión de bioplaguicida estimado para aplicar en el área experimental

Tratamiento	Fumigadora de espalda operada manualmente			Volumen Aforo (L/min)	Volumen necesario (L/cama)
	Calibración del operario (tiempo)*				
	min.	seg.	(min)		
Ep L TXVK-6	1	57	1,95	0,44	0,85
Ep L TG-1	1	46	1,77	0,81	1,44
Ep A TXVK-6	1	34	1,57	1,21	1,89
Ep A TG-1	1	8	1,13	1,93	2,19
Tratamiento	Fumigadora motorizada estacionaria			Volumen Aforo (L/min)	Volumen necesario (L/cama)
	Calibración del operario (tiempo)				
	min.	seg.	(min)		
Et L TXVK-6	0	59	0,98	0,79	0,78
Et L TG-1	1	18	1,30	1,49	1,93
Et A TXVK-6	0	48	0,80	2,37	1,89
Et A TG-1	0	55	0,92	3,77	3,46

*Calibración del operario: tiempo que demora la persona realizando la aplicación a una cama de cultivo
Ep: Fumigadora de espalda manual con bomba de pistón; Et: Fumigadora motorizada estacionaria con bomba de pistón; L: implemento lanza convencional de una salida; A: implemento aguilón en material PVC con tres salidas; TXVK-6: boquilla de cono hueco; TG-1: boquilla de cono lleno.

Evaluación de la combinación de los equipos de aplicación e implemento de la boquilla

Se observó que la cobertura de la suspensión de bioplaguicida fue mayor cuando se utilizó la fumigadora de motorizada estacionaria (1.294 gotas/cm² en promedio) en comparación con la fumigadora de espalda operada manualmente (549

gotas/cm² en promedio) (Figura 38); también fue mayor cuando se utilizó el implemento aguilón (772 gotas/cm² con la fumigadora de espalda y 1.944 gotas/cm² con la fumigadora estacionaria) en comparación con la lanza convencional (327 gotas/cm² con la fumigadora de espalda y 644 gotas/cm² con la fumigadora de espalda); y aunque el efecto no fue tan pronunciado, la cobertura fue mayor con la boquilla de cono hueco en comparación con la boquilla de cono lleno (683 y 416 gotas/cm² respectivamente con la fumigadora de espalda; 1.342 y 1.246 gotas/cm² respectivamente con la fumigadora estacionaria). En general, también se observó que la cobertura del bioplaguicida fue mayor en el haz que en el envés de los foliolos de las plantas (Figura 38).

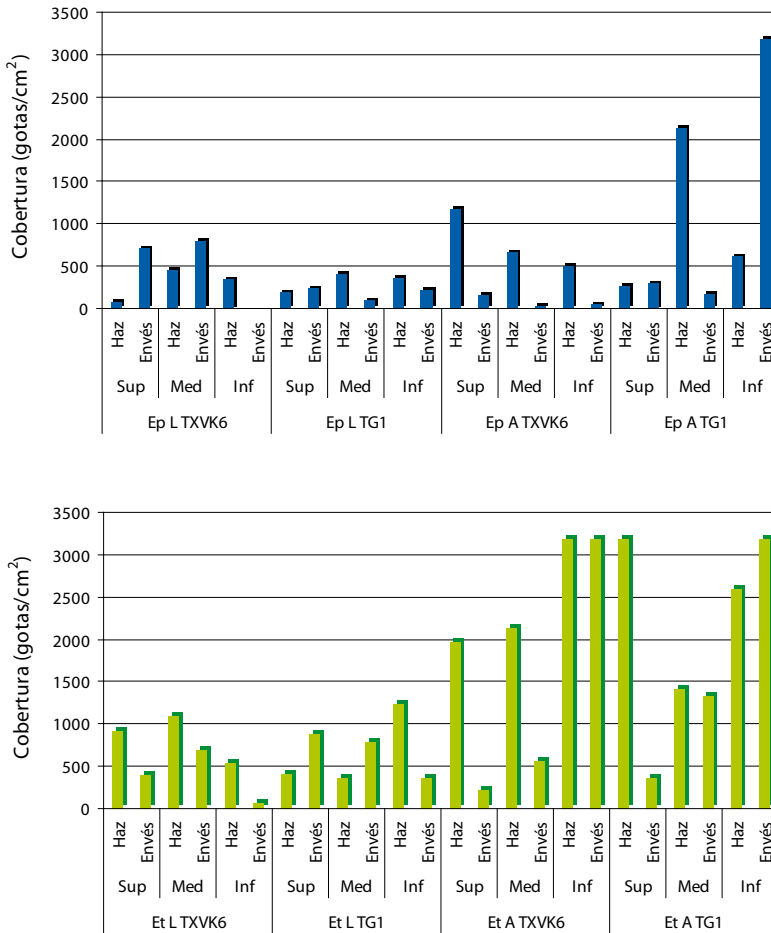


Figura 38. Efecto de la combinación de la fumigadora de espalda operada manualmente (arriba) y de la fumigadora motorizada estacionaria (abajo) con los implementos de aplicación lanza convencional y aguilón y con boquillas de cono hueco (TXVK-6) y cono lleno (TG-1) sobre la cobertura de la suspensión de bioplaguicida Th003 WP en las plantas de tomate cultivadas bajo invernadero.

Con la combinación de la fumigadora de espalda operada manualmente y el implemento aguilón se observaron dificultades en la operación, pues el operario presentó cansancio físico rápidamente debido a que se necesita alta presión en el tanque para que opere este equipo y se corre el riesgo de perder homogeneidad de la aplicación y de elevar los costos de la aplicación. Por estas razones no resulta conveniente en la práctica utilizar dicha combinación de equipos para la aplicación del bioplaguicida.

Teniendo en cuenta los mecanismos de acción de los agentes de control biológico y los efectos negativos que podrían tener algunos factores del medio ambiente sobre estos (radiación UV, HR, temperatura y pH, entre otros), es deseable incorporar altas densidades de propágulos en la superficie vegetal para que haya un establecimiento de una población activa que pueda competir y contrarrestar las infecciones de los fitopatógenos. En este sentido, la combinación de equipos que entrega mayor concentración del antagonista por unidad de área foliar es la fumigadora estacionaria y el aguilón.

Los resultados sugieren que la presión entregada por la fumigadora estacionaria generó mayor cobertura y menor variabilidad en todos los tratamientos en comparación con lo observado con la fumigadora operada por palanca; así mismo, los volúmenes de aplicación fueron similares entre los tratamientos y se redujo el tiempo de la actividad, y además se observaron mejores condiciones de operación para el operario. Igualmente

con este equipo se observó que el volumen de aplicación fue homogéneo en la cama de cultivo, lo cual puede traducirse en optimización de uso de los recursos.

El implemento aguilón tiene tres boquillas de salida de producto, con lo cual se procura mayor homogeneidad de la aplicación en el dosel de las plantas en comparación con la lanza convencional, con la cual el operario debe realizar movimientos verticales o de “abanico” para cubrir la planta, corriendo el riesgo de dejar sitios del dosel sin producto, lo que no es deseable en control biológico. Contraponiéndolo con la lanza vertical, con el aguilón también se presentó una mejor cobertura en el envés de las hojas en los tres tercios de la planta. La posición de la boquilla frente a la planta es un aspecto importante a tener en cuenta para el cubrimiento del haz y el envés (en el estudio la posición de las boquillas de frente a la planta resultó en una alta cobertura).

En este estudio se estimaron los costos de la aplicación foliar del bioplaguicida teniendo en cuenta el volumen necesario de suspensión de acuerdo con la calibración de los equipos y la mano de obra para realizar la actividad. De esta forma, se determinó que el uso de la fumigadora estacionaria optimizó el uso de la suspensión y de mano de obra (Tabla 16). Contrario a lo que se pensaba, el hecho de requerir dos personas para la operación de la fumigadora estacionaria no representó un aumento en los costos por este concepto; en contraste, la alta maniobrabilidad y eficiencia en el uso del tiempo significó una ventaja importante al usar este equipo de fumigación.

Tabla 16. Costos de aplicación de la suspensión del bioplaguicida WP a base de *T. koningiopsis* con diferentes equipos de aplicación.

Tratamiento	Th003 Volumen (l/ha)	Th003 WP (g/ha)	Costo Th003 WP (\$/ha)	Jornales (Unidad/ha)	Costo de jornales (\$/ha)	Costo total de la aplicación (\$/ha)
Ep L TXVK-6	215	215	26.875,00	1,02	25.500,00	52.375,00
Ep L TG1	474	474	59.250,00	0,82	20.500,00	79.750,00
Ep A TG1	547	547	68.375,00	0,595	14.875,00	83.250,00
Et L TXVK6	202	202	25.250,00	0,525	13.125,00	38.375,00
Et L TG1	487	487	60.875,00	0,68	17.000,00	77.875,00
Et A TXVK6	472	472	59.000,00	0,42	10.500,00	69.500,00

En un estudio previo, Moreno (2007) aplicó el producto Th003 WP con una fumigadora de espalda operada manualmente igual a la que se utilizó en el presente trabajo, con una lanza convencional y una boquilla de cono hueco. Este autor encontró una reducción del 38% de la incidencia de *B. cinerea* en el tallo de las plantas de tomate cultivadas bajo invernadero y una del 85% de reducción de la severidad del mildew polvoso. De todas formas, para complementar los resultados del presente estudio y poder generar unas recomendaciones con mayor precisión, se recomienda evaluar el efecto de la combinación de la fumigadora de espalda con el implemento lanza convencional comparando las dos boquillas (TXVK-6 y TG-1), y la combinación de la fumigadora estacionaria comparando los dos implementos (lanza convencional y aguilón) y las dos boquillas sobre el

control de las enfermedades foliares moho gris (*Botrytis cinerea*) y mildew polvoso (*Oidium lycopersicum*) en el tomate.

Conclusiones

La combinación de los equipos de fumigación fumigadora motorizada estacionaria con el implemento aguilón y la boquilla de cono lleno entregó la mayor cobertura de la suspensión del producto Th003 WP a base del hongo antagonista *T. koningiopsis* Th003 en la superficie foliar de las plantas de tomate.

El uso de la fumigadora estacionaria para la aplicación foliar del bioplaguicida Th003 WP resultó importante para reducir los costos de una aplicación convencional.

Anexo 1.

Composición del medio de cultivo TSM modificado por Askew y Laing (1993) (g/l)

MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄	0,9
KCL	0,15
NH ₄ NO	1
Glucosa	3,0
Rosa de Bengala	0.15
Agar	25

Estos componentes fueron añadidos a 950 ml de agua destilada y posteriormente esterilizados en autoclave. El medio es suplementado con componentes biocidas Cloranfenicol (0,25), Quintozene

(0,2), Captan 50 WP (0,2) y Previcur-N (Propamocarb) (1,2 ml). Las sustancias biocidas se disuelven en 50 ml de agua destilada estéril y luego se añaden al medio de cultivo estéril.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, J. S.; Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77, 182 - 189.
- Askew, D. J.; Laing, M. D. (1993). An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* Species. *Plant pathology* 42, 686 - 690.
- Cook, R. J.; Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Duffy, B. K.; Ownley, B. H. and Weller, D. M. (1997). Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology* 87:1118 - 1124.
- Garzón, M. I. (2004). Evaluación de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* aplicado con un equipo neumático para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Trabajo de pregrado Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 61 p.
- Moreno, C. A. (2007). Sobrevivencia de *Trichoderma koningii* en la filósfera de plantas de tomate y evaluación de su actividad biocontroladora sobre patógenos foliares. Trabajo de grado Maestría en Biología Aplicada, énfasis Fitoprotección. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá. Director del trabajo: Alba Marina Cotes Prado Ph. D. 70 p.
- Nilsson, U.; Gripwall, E. (1999). Influence of application technique on the viability of the biological control agents *Verticillium lecanii* and *Steinernema feltiae*. *Crop Protection*. 19: 53 - 59.
- Sivan, A.; Chet, I. (1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* in rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79, 198 - 203.
- Sivan A.; Harman, G. E. (1991). Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Genetic Microbiology* 137, 23 - 29.
- Tsahouridou P. C. and Thanassoulou-poulos, C. C. (2002). Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping - off by *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 767 - 776.

Terminó de imprimirse
en septiembre de 2011 en



Bogotá, DC, Colombia