

Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana[§]

Juan Moya, Socorro García, Elpidio Avilés, Feliciano Andújar y Pedro Núñez

La producción de vegetales en invernaderos es una actividad de importancia económica en la República Dominicana. En el año 2009 se dedicaron a esta actividad 294 hectáreas. Los cultivos en agricultura bajo ambiente protegido (invernaderos) presentan problemas de enfermedades radiculares causadas por hongos de suelo, las cuales reducen los rendimientos. La mayoría de los productores manejan estos problemas con la aplicación de plaguicidas químico-sintéticos. Esto provoca resistencia, contaminación ambiental y toxicidad. Se ha propuesto la búsqueda de sistemas de manejo alternativos. Este estudio tiene como objetivo aislar cepas de *Trichoderma* en invernaderos, con potencial antagonista en el control de hongos fitopatógenos radiculares. El estudio se realizó en el periodo julio a septiembre del año 2010, en cinco zonas productoras de vegetales en invernaderos de la República Dominicana. Se aplicó un muestreo exploratorio no probabilístico, en 35 estructuras de invernaderos (siete por zona). Se evaluaron 89 muestras (35 de suelos, 16 de sustratos y 38 de raíces de plantas). Se prepararon diluciones seriadas 10^{-2} y 10^{-3} en medio de cultivo PDA. El número de aislados (número de colonias) de *Trichoderma* fue evaluado ocho días después de la siembra y se identificaron las colonias en base a las características morfológicas. Se aislaron 95 colonias con crecimiento característico de *Trichoderma*, de las cuales 56 colonias provenían de estructuras bajo ambiente protegido que no han utilizado productos con *Trichoderma*. La mayor cantidad de aislados se obtuvo en las muestras de sustratos y raíces. Se recomienda probar en laboratorio y estructuras bajo ambiente protegido la efectividad antagonista de los aislados frente a hongos fitopatógenos radiculares.

Palabras clave: Estudio exploratorio, hongos antagonistas, control biológico

INTRODUCCIÓN

La producción de vegetales en estructuras bajo ambiente protegido (invernaderos) es una actividad económicamente importante en la República Dominicana. En el año 2009, se dedicaron a esta actividad aproximadamente 294 hectáreas, en esta área se obtuvo 53.5 millones de libras de vegetales de las cuales se exportó 34.2 millones, que generó ingresos de 31.6 millones de dólares. Los invernaderos están localizados principalmente en los municipios de Constanza, Jarabacoa, San José de Ocoa, Rancho Arriba y Villa Trina, y se dedican esencialmente a la producción ajíes (*Capsicum annum* L.), tomates (*Solanum lycopersicum* L.) y pepinos (*Cucumis sativus* L.), Promefrin (2010).

Los cultivos en invernaderos presentan problemas de enfermedades radiculares causadas por hongos de suelo, las cuales reducen los rendimientos y calidad de frutos y, por tanto, disminuyen su capacidad competitiva y su rentabilidad. La mayoría de los productores manejan estos problemas con prácticas culturales y la aplicación de plaguicidas químico-sintéticos. Estos plaguicidas pueden provocar riesgo de resistencia, contaminación ambiental y toxicidad, por esta razón, se busca la utilización de sistemas de controles alternativos, García *et*

al. (2006). Adicionalmente, cada día los mercados de alimentos demandan la producción de alimentos orgánicos, Ferrucci (2000) y Cummings *et al.* (2009). Entre los sistemas de manejo o control está disponible la utilización de microorganismos antagonistas para el control de hongos patógenos de suelo, herramienta importante dentro del manejo de cultivos, Cook y Baker (1983).

Trichoderma es un género de hongos antagonistas eficaz en el manejo integrado de hongos fitopatógenos en diversos cultivos, Stefanova (2007). Son hongos asexuales (anamorfos) con especies genéticamente vinculadas al género *Hypocrea* (teleomorfo). Están presentes en el suelo, la raíz y el follaje de plantas, Samuels (2004) y Samuels (2007). Han sido reportados como eficientes micoparásitos en una amplia gama de patógenos, incluyendo *Armillaria mellea* Valh., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Chondrostereum purpureum* Fr. Pouzar, *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., Cook y Baker (1983). También, se ha reportado su eficiencia contra *Fusarium* spp., Chet (1990), y contra *Botrytis cinerea* Pers. y *Sphaeroteca fuliginea* Schlechtend que atacan a nivel foliar, Harman (2000).

¹ Investigadores del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF).

[§] Estudio realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) y de la Cooperativa Zafarraya.

El uso de cepas nativas de *Trichoderma* puede servir para crear sistemas de manejo o control biológico de hongos fitopatógenos que afectan principalmente el sistema radicular de los cultivos. Estas cepas pueden estar mejor adaptadas que las introducidas a las condiciones agroecológicas locales, y por tanto, pueden ser más eficientes en el manejo de las plagas. Además, su uso podría disminuir los costos de producción, promover la industria nacional y contribuir con el ahorro de divisas.

Esta investigación se realizó con el objetivo de aislar cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de cultivos y malezas en invernaderos, con potencial antagonista en el control de hongos fitopatógenos radiculares del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó durante el período julio a septiembre del año 2010 en cinco zonas representativas del país en la producción de vegetales en invernaderos. Las zonas fueron Constanza, Jarabacoa, Moca (Villa Trina y Juan López), San José de Ocoa y La Vega (parte baja). En Constanza se incluyó invernaderos de las localidades: El Valle, El Arroyaso, La Palma y Arroyo Arriba; en Jarabacoa en las localidades: La Joya y La Quebrada; en Moca en las comunidades: Los Guayuyos, Los Guayuyos Abajo y Jamao Afuera, pertenecientes a Villa Trina y en El Pozo de la Palma, perteneciente a Juan López; en San José de Ocoa en las localidades: Sabana Larga, Nizao y El Alambique; mientras que en la parte baja de La Vega, en las comunidades: El Pinito y Pontón.

Para el estudio, se realizó un muestreo exploratorio no probabilístico (Hernández *et al.* 1998), en donde se evaluaron 35 estructuras de invernaderos (siete por zona). Se exploraron 89 muestras (35 de suelos, 16 de sustratos y 38 de raíces de plantas) Tabla 1. Los criterios de selección de los invernaderos fueron la accesibilidad, la disponibilidad al momento de la visita y la autorización de uso de su propietario.

Para obtener informaciones generales sobre el manejo de los cultivos se entrevistaron a los encargados o los propietarios de los invernaderos muestreados. Los

invernaderos fueron georeferenciados mediante sistema de posicionamiento global (GPS). La localización se presenta en la Figura 1.

Toma de muestras

Dentro de cada invernadero se tomó una muestra de suelo de aproximadamente 800 cm³, también una muestra de sustrato y una muestra de raíces, según la existencia de sustrato o plantas al momento de la evaluación. Para la muestra de raíces se extrajo el sistema radicular de una planta sana del cultivo. Donde había dos cultivos se extrajo una muestra de raíz por cada cultivo. Donde no había cultivo se extrajo el sistema radicular de una o dos plantas de malezas. Para la muestra de suelo y la de sustrato se tomaron 10 submuestras de cada una a profundidad de 0 a 20 cm. La cantidad de muestras tomadas se presenta en la Tabla 2.

Las submuestras se tomaron de manera sistemática por hileras, abarcando la totalidad del área del invernadero. En invernaderos grandes (40 m x 120 m) la primera submuestra se tomó a una distancia entre 5 y 10 pasos (5 a 10 metros) del borde del pasillo central o del borde lateral del invernadero, y la segunda a una distancia



Figura 1. Localización de los invernaderos muestreados (Indicados por los cuadros)

Tabla 1. Cantidad de invernaderos muestreados por zona

Zona	Número de invernaderos muestreados	Número de muestras
Constanza	7	18
Jarabacoa	7	18
Moca Villa Trina	5	13
Moca Juan López	2	04
San José de Ocoa	7	18
Parte baja de La Vega	7	18
Total	35	89

Tabla 2. Número de muestras tomadas por zona, según tipo de muestra

Zona	Tipo de muestra				Total
	Suelo	Sustrato	Raíz cultivo	Raíz maleza	
Constanza	7	4	7	0	18
Jarabacoa	7	5	6	0	18
Moca Villa Trina	5	3	5	0	13
Moca Juan López	2	0	2	0	4
San José de Ocoa	7	4	7	0	18
La Vega	7	0	6	6	18
Total	35	16	33	5	89

entre 70 y 75 pasos (70 a 75 metros) de la primera. Luego se dejaron cuatro hileras sin evaluar y se evaluó la quinta, y así sucesivamente hasta completar las 10 submuestras. En invernaderos medianos y pequeños, las submuestras se tomaron de manera que quedaran equidistantes una de otra y dejando aproximadamente dos pasos (2 metros) de los bordes laterales del invernadero.

La extracción de suelo y de sustrato se realizó con un barreno helicoidal tipo holandés con hélice de 6.5 cm de ancho, 20 cm de largo y grosor de 3.5 cm. También, se utilizó un palín (pala) de 4 pulgadas de ancho y 10 pulgadas de largo. La submuestra se recogió a todo lo largo de la hélice del barreno o del cuerpo del palín, tomando con las manos aproximadamente 80 cm³, y se colectó hasta completar la muestra en una funda plástica transparente (14 x 20 cm). Las muestras se homogeneizaron agitando la funda, se identificaron y se colocaron en nevera hielera portátil para su mantenimiento en frío y traslado al laboratorio.

Análisis y procesamiento de las muestras

Se utilizó el protocolo descrito por Acuña y Peña (2005). Se utilizó medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) preparado 3 a 5 días antes de la siembra. Para la preparación se usaron 39 g/l de PDA sintético Oxoid CM0139, más 5 gramos de agar bacteriological (Oxoid LP 0011). Esta preparación se colocó en plato agitador caliente durante 45 a 60 minutos hasta disolver el agar. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 1.2 kg/cm² de presión. Antes de distribuirlo en platos Petri se dejó bajar la temperatura a unos 45 °C, se le adicionaron 200 mg/l de estreptomycin y 0.62 ml/l (30 gotas) de ácido láctico 80%. Se distribuyeron 10 ml del medio de cultivo en cada plato Petri.

Las muestras de suelo y las muestras de sustrato se homogeneizaron y se tamizaron en tamiz con abertura de 4.75 mm. De cada muestra se preparó una dilución madre en frasco con capacidad para 125 ml. Para esto se colocaron 10 g de la muestra en el frasco con 90 ml de agua destilada y esterilizada, el frasco se agitó hasta

preparar una suspensión total del suelo o del sustrato. Las muestras de raíces se sacudieron hasta desprender la mayor parte del suelo o sustrato de estas. Se cortaron en trozos de 0.5 a 1.0 cm de largo, se colocaron (2 a 10 g) en frasco matraz con capacidad de 300 ml y se les aplicó 150 ml de agua destilada y esterilizada. Luego se agitaron durante 20 minutos en agitador horizontal compacto, para preparar la dilución madre.

Las diluciones madres se llevaron a la cabina de flujo laminar y se prepararon diluciones seriadas 10-2 y 10-3. De estas diluciones se realizaron siembras en plato petri con el medio de cultivo PDA. Para esto se colocó 0.1 ml de la dilución y se distribuyó sobre toda la superficie del medio. Se utilizaron dos platos petri en cada dilución y se llevaron al incubador a temperatura entre 25 y 30 °C.

Variables evaluadas

Se evaluó el número de aislados (número de colonias) de *Trichoderma* por zona y tipo de muestra. La evaluación se realizó ocho días después de la siembra y se identificaron las colonias en base a sus características morfológicas. Se registró la cantidad de colonias color verde o amarillo verdoso, de crecimiento rápido y abundante esporulación, característico de *Trichoderma*.

Purificación y conservación de aislados de *Trichoderma*

Para la purificación de los aislados se realizaron cultivos con puntas de hifas en medio PDA. Cuando los cultivos estuvieron bien esporulados, entre 12 y 15 días, se recogieron esporas en tiras de papel filtro estéril con dimensiones de 0.5 cm x 3.0 cm, y se conservaron en microtubos de 2 ml a temperatura de 5 °C en la oscuridad.

Análisis de datos

Los datos se analizaron con estadística descriptiva mediante el uso de tablas de distribuciones de frecuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las entrevistas aplicadas a los encargados o los propietarios de los invernaderos se encontró que en 20 invernaderos (57.1%) no se aplica productos a base de *Trichoderma*. En cinco (14.3%) se utilizan productos con *Trichoderma* y en diez invernaderos (28.6%) no se sabe, Tabla 3.

En todas las muestras procesadas se aislaron 95 colonias con crecimiento morfológico característico de *Trichoderma*, colonias color verde o amarillo verdoso, Figura 2. De estas, 56 colonias son provenientes de invernaderos que no han utilizado productos con *Trichoderma*, 13 provienen de invernaderos que han utilizado este tipo de productos y 26 colonias proceden de invernaderos donde no se sabe si se ha utilizado *Trichoderma*. La mayor cantidad de colonias provenientes de invernaderos que no utilizan productos a base de *Trichoderma* se encontró en San José de Ocoa y Villa Trina, Tabla 4.

La cantidad de aislados encontrados en los invernaderos que no utilizan productos con *Trichoderma* en las muestras de raíz, sustrato y suelo, fue 29, 14 y 13, respectivamente, Figura 3.

En la mayoría de los tipos de muestras de las zonas estudiadas, se encontraron colonias de *Trichoderma*. Solo en los sustratos de Constanza y en las raíces de cultivos de La Vega no se obtuvieron aislados de *Trichoderma*. En términos absolutos en las muestras de raíces se encontró la mayor cantidad de aislados, con

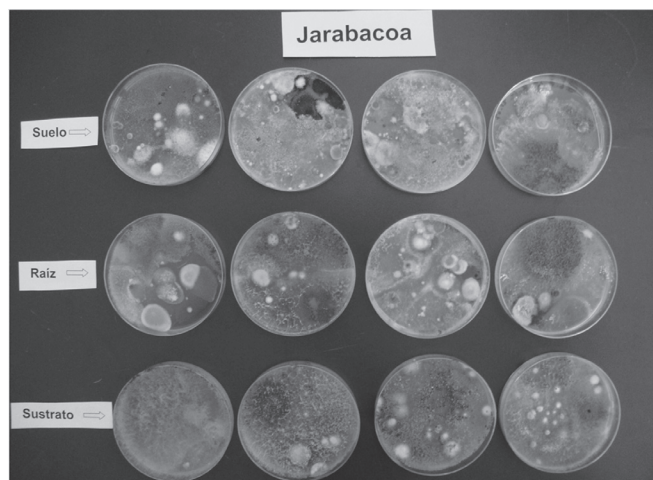


Figura 2. Platos Petri con algunas colonias de *Trichoderma* spp.

Tabla 3. Invernaderos que utilizan, no utilizan y no se sabe si utilizan productos a base de *Trichoderma* según zona.

Zona	Invernadero (Unid.)			Total
	No utiliza	Utiliza	No se sabe	
Constanza	6	1	0	7
Jarabacoa	3	0	4	7
Moca Villa Trina	2	2	1	7
Moca Juan López	0	2	0	7
San José de Ocoa	6	0	1	7
La Vega	3	0	4	7
Total	20	5	10	35
%	57.1	14.3	28.6	100

Tabla 4. Número de aislados de *Trichoderma* encontrados en las muestras, según la utilización de productos con *Trichoderma* en los invernaderos, por zona

Zona	Total	Productos con <i>Trichoderma</i> en invernaderos		
		No utiliza	Utiliza	No se sabe
Constanza	9	8	1	0
Jarabacoa	20	8	0	12
Moca Villa Trina	23	14	4	5
Moca Juan López	8	0	8	0
San José de Ocoa	27	20	0	7
La Vega	8	6	0	2
Total	95	56	13	26

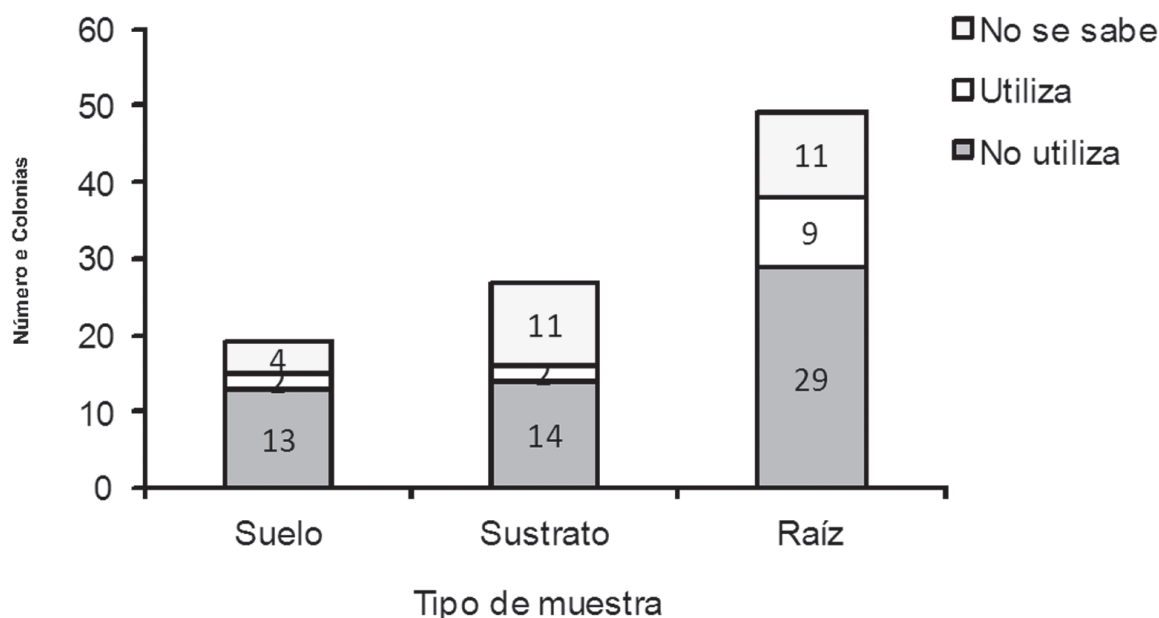


Figura 3. Número de aislados de *Trichoderma* encontrados por tipo de muestra, según la utilización de productos con *Trichoderma* en invernadero

49 colonias, seguida por las muestras de sustratos con 27 colonias, y por último las muestras de suelos con 19 colonias Tabla 5. Sin embargo, en proporción a la cantidad de muestras procesadas según el tipo de muestra, en los sustratos se encontró el mayor porcentaje de aislados de *Trichoderma*, con 168.75%, seguida por las raíces, con 125.64%; mientras que, en las muestras de suelo se encontró un 54.28% de aislados, Tabla 6.

Estos resultados confirman que *Trichoderma* es fácilmente aislado del suelo, restos orgánicos y raíces, debido a su rápido crecimiento y esporulación, y a su habilidad de colonizar y desarrollarse en las raíces de las plantas, Samuels (2004).

Tabla 5. Aislados de *Trichoderma* por zona según tipo de muestra

Zona	Tipo de muestra				Total
	Suelo	Sustrato	Raíz cultivo	Raíz maleza	
Constanza	5	0	4	N.A.	9
Jarabacoa	4	8	8	N.A.	20
Moca Villa Trina	2	5	16	N.A.	23
Moca Juan López	2	N.A.	6	N.A.	8
San José de Ocoa	3	14	10	N.A.	27
La Vega	3	N.A.	0	5	8
Total	19	27	44	5	95

N.A. = No aplica, ya que la muestra no se tomó porque no existía en el invernadero al momento del muestreo.

Tabla 6. Proporción de aislados de *Trichoderma* encontrados según cantidad y tipo de muestra.

Tipo de muestra	Muestras tomadas (Unid.)	Aislados de <i>Trichoderma</i> (Colonias)	Proporción aislados/muestras (%)
Suelo	35	19	54.28
Sustrato	16	27	168.75
Raíz	38	49	125.64
Total	19	27	44

CONCLUSIONES

Se aislaron 95 colonias de *Trichoderma* de las cuales 56 son provenientes de 20 invernaderos que no han utilizado productos con *Trichoderma* y están ubicados en Constanza, La Vega, San José de Ocoa, Villa Trina y Jarabacoa.

La mayor cantidad de aislados se obtuvo en las muestras de sustrato y raíces de invernaderos de San José de Ocoa y Villa Trina.

RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Evaluar en laboratorio e invernadero la efectividad antagonista de los aislados frente a hongos fitopatógenos radiculares;
- Identificar (morfológica y molecularmente) los aislados de *Trichoderma*;
- Continuar con las exploraciones en suelos, sustratos y raíces en otras localidades para aislar nuevas cepas promisorias para el manejo de plagas.

LITERATURA CITADA

Acuña, O.; Peña, W. 2005. Determinación de poblaciones de microorganismos en el suelo mediante técnicas de recuento directo. En: Protocolos de metodologías para análisis de indicadores microbiológicos. Proyecto Innovaciones tecnológicas para el manejo y mejoramiento de la calidad y salud de suelos bananeros en América Latina y el Caribe. Eds. Imbap, Universidad de Costa Rica. San José, CR. Pp. 4-7.

Chet, I. 1990. Biological control of soilborne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. In: Biological control of soilborne plant pathogens. Ed. D. Hornby C.A.B. International. (UK) GB. Cap. 2. Pp. 15-24.

Cook, R.; Baker, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Eds APS. U.S. Pp. 33, 283-311, 374-389.

Cummings, J.; Miles, C.; Du Toit, L. 2009. Greenhouse evaluation of seed and drench treatments for organic management of soilborne pathogens of spinach. Plant Dis. 93:1281-1292.

Ferrucci, F. 2000. La importancia del Mercado en la investigación agraria para el desarrollo alternativo. Orientación de la investigación agraria hacia el desarrollo alternativo. Proyecto IICA-GTZ. Lima, PE. Pp. 35-36.

García, R.; Riera, R.; Zambrano, C.; Gutiérrez, L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región Andina Venezolana. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba. Fitosanidad 10(2): 115-121.

Harman, G. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in Perception derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84(4):377-393.

Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. 1998. Metodología de la investigación científica. 2da. Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. México, MX. Pp. 58, 59, 226

Promefrín (Programa de Mercados, Frigoríficos e Invernaderos, DO). 2010. Avances de la agroplasticultura en la República Dominicana al cierre del año 2009. Estadísticas 2004-2009. (En línea). Consultado el 6 de mayo 2011. Disponible en: http://www.promefrin.org/paginapromefrin1/Estadistica_Index.html

Samuels, G. 2004. *Trichoderma*: a guide to identification and biology. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Systematic Botany and Mycology Laboratory. Beltsville, USA. 40 p.

_____. 2007. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Systematic Botany and Mycology Laboratory. Beltsville, USA. Phytopathology 96:195-206.

Stefanova, M. 2007. Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Ciudad de La Habana, Cuba. Fitosanidad 11(3):75-79.