

DIAGNÓSTICO DE LA CALIDAD DE UN BIOPREPARADO COMERCIAL DEL HONGO *TRICHODERMA HARZIANUM*

¹Yamilet Chirino S., ¹Iraima Rodríguez y ²Judith García

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, ¹Instituto de Química y Tecnología, ²Instituto de Agronomía Apdo.1579, Maracay 2101-A.

Recibido: 11 de febrero de 2011

Aceptado: 30 de junio de 2011

RESUMEN

Chirino, Y., Rodríguez, I. y García, J. 2010. Diagnóstico de la calidad de un biopreparado comercial del hongo *Trichoderma harzianum*. Fitopatol. Venez. 24:14-19.

Para diagnosticar la calidad de un formulado granulado comercial de *T. harzianum*, se evaluaron las características microbiológicas (concentración de esporas, viabilidad, cinética de germinación acumulada y pureza), fisicoquímicas (pH, contenido de humedad, humectabilidad, suspensibilidad y aspecto comercial), y la patogenicidad *in vitro* frente a *Rhizoctonia solani* en cultivo dual y cultivo mixto. Los datos se procesaron, según el caso, promediando los valores de las muestras, a través de estadística descriptiva obteniendo intervalos de confianza, y aplicando ANAVAR y la prueba de medias de Tukey. Se obtuvo que el biopreparado comercial presentaba /g de producto una concentración de esporas de 10⁸ esporas, tasa de germinación <31% y fase lag previa a la germinación de 4 h ca; viabilidad promedio de 10⁷ esporas viables, más de 85% de pureza con 10⁵ UFC de contaminantes, pH entre 4.79 y 4.85, contenido de humedad entre 12,95 y 13,34%, humectabilidad entre 0,16 y 0,17 min, suspensibilidad de 64,28%, aspecto comercial adecuado para conservarlo en lugar fresco y seco, baja capacidad de competencia por sustrato (2 cm en 72 h) frente a *R. solani* pero buena efectividad biológica (grado antagonístico 4) y capacidad de disminuir e incluso inhibir la formación de esclerocios del patógeno. Se define entonces el producto a base de *T. harzianum*, de bajo porcentaje de germinación, pureza adecuada, aceptables características fisicoquímicas y de buena capacidad patogénica frente a *R. solani*.

Palabras clave: antagonista, bioplaguicidas, control biológico, formulado granulado, patogenicidad.

ABSTRACT

Chirino, Y., Rodríguez, I. and García, J. 2010. Diagnosis of the quality of a fungus commercial biopreparations *Trichoderma harzianum*. Fitopatol. Venez. 24:14-19.

To diagnose the quality of a commercial granular formulated of *T. harzianum*, were evaluated microbiological characteristics (spore concentration, viability, kinetics of cumulative germination and purity), physicochemical (pH, moisture content, wettability, suspensibility and business side), and pathogenicity *in vitro* against *Rhizoctonia solani* in dual culture and mixed culture. The data were processed, as appropriate, by averaging the values of the samples, using descriptive statistics to obtain confidence intervals, and using ANOVA and Tukey mean test. It was found that the commercial had biopreparation/g of product a spore concentration of 10⁸ esporas, rate of germination <31% and lag phase prior to germination of approximately 4 h, viability average of 10⁷ esporas viable, more than 85% purity with 10⁵ CFU of pollutants, between 4.79 and 4.85 pH, moisture content between 12.95 and 13.34%, wettability between 0.16 and 0.17 min, 64.28% suspensibility, appropriate business side to keep it cool, dry, low level of competition for substrate (2 cm in 72 h) against *R. solani* but good biological effectiveness (degree antagonistic 4) and ability to reduce and even inhibit the formation of sclerotia of the pathogen. We define the product based on *T. harzianum*, low germination percentage, purity suitable, acceptable and good physicochemical properties against pathogenicity *R. solani*.

Additional key words: antagonist, biological control, biopesticides, formulated granular, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

Trichoderma harzianum Rifai es el hongo antagonístico más usado para el control biológico de algunos hongos fitopatógenos. Según Fernández-Larrea (8), esto es posible a través de la producción masiva de sus estructuras reproductivas (hifas, clamidosporas y conidios) bajo diferentes métodos de fermentación de sustrato, el producto final serán las estructuras reproductivas, según sea el caso, o formuladas con un material inerte. Luego que se obtiene el producto terminado surge la obligatoriedad de aplicarle pruebas de control de calidad que den garantía de las propiedades biológicas y fisicoquímicas que este producto ofrece (19).

En Venezuela es reciente y creciente la implementación de los sistemas de control biológico por parte de los productores agrícolas (9). La producción nacional de biopreparados a base de *Trichoderma* sp. se sustenta en gran parte en la aplicación de métodos de producción artesanal y semi-industrial, sin embargo existen empresas como PROBIOAGRO C.A y

AGROBICA C.A, que producen bajo el método industrial. No obstante para comercializar un producto biológico es necesario la certificación y obtención del registro sanitario que otorga la autoridad sanitaria, que es el Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA), este último trabaja en la actualización de la reglamentación sobre la producción de agentes biológicos de uso agrícola con el objeto de considerar para la certificación de un producto biológico el soporte científico, la fabricación, formulación, comercialización y uso agrícola del bioplaguicida dando especial énfasis en las pruebas de control de calidad. En la actualidad son muy escasas las investigaciones que ofrecen una descripción detallada de las pruebas de control de calidad de bioplaguicidas que deben efectuarse al producto terminado (8, 10, 11, 13, 19). En este sentido se considero importante evaluar algunas variables asociadas a la calidad de un granulado comercial a base de *T. harzianum* con el objeto de verificar si cumple o no con los parámetros establecidos por las normas nacionales e internacionales existentes en esta materia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis para el diagnóstico de la calidad del biopreparado se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV). El producto comercial "TRICOMAIZ" fue elaborado y donado por el Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la UCV. La presentación del producto comercial es un granulado a base de conidios de *T. harzianum* Rifai y excipientes, envasado en recipiente de plástico que incluye 100 g del material biológico. La etiqueta especifica que contiene 1×10^{12} esporas totales de *T. harzianum* y que este es efectivo en *R. solani* del cultivo de maíz aplicado a una dosis de 100 g de producto/ha. Se hizo una recolección al azar de 5 muestras representativas del lote de producción del mes de Julio de 2006, los cuales se conservaron a temperatura ambiente (20-25 °C), siendo analizadas 1 mes después de producidas. Los datos fueron procesados con el programa STATISTIX versión 8.0 (Software 2005). El análisis descriptivo de las variables de calidad del producto comercial se desarrolló como descrito a continuación.

Evaluación microbiológica.

Para definir la concentración de esporas, viabilidad y pureza se utilizaron 3 repeticiones y se establecieron intervalos de confianza de todo el lote y ANAVAR entre las muestras.

Concentración de esporas. Se depositó 1 g de muestra en 10 mL de agua destilada estéril (ADE) + tween 80 al 0,1%. [Suspensión Madre (SM) 10^0]. Cada SM (previo reposo de 15 min) fue agitada por 10 min en un vortex, luego se realizaron diluciones seriadas de la SM, hasta 10^{-2} . Se colocaron 10 μ l en cada compartimiento de la cámara de Neuvauer y en 40X del microscopio se contabilizó el N° total de esporas presentes en los 5 cuadrantes. El valor obtenido, se utilizó para calcular la concentración de esporas/mL y por g según lo indicado por Velez *et al.* (19).

Viabilidad. En placas de Petri contentivas de agar agua al 1,5% se marcaron al dorso 5 puntos equidistantes. De la dilución 10^{-2} se extrajeron 10 μ l y se inocularon sobre las marcas. Se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Se aplicó azul de lactofenol, se cortó el área de cada alícuota, y se observó, en 40X *ca* 100 esporas totales a través de toda la alícuota. El cálculo de la Viabilidad se obtuvo tomando en consideración los criterios de Velez *et al.* (19).

Cinética acumulada de germinación. Esta evaluación se basó en la metodología sugerida por Monzón (13), modificada en el Laboratorio de Procesos Fermentativos del IBE-UCV (Dr. Blas Dorta, Comunicación personal). Fase I.- Preparación de la cámara húmeda y medio: Se preparó 1 cápsula/muestra que contenía papel de filtro, soporte y lámina portaobjeto. Se esterilizaron y luego se les aplicó a la lámina \pm 1mL del medio agar-agua al 1,5% estéril. Fase II.- Cálculo del Volumen Requerido (V_r). Fase III.- Cinética acumulada de germinación: Se esparció el V_r sobre la lámina. Se incubaron a temperatura ambiente y se evaluó el porcentaje de germinación (%G) en intervalos de cada 2 h x 24 h.

Pureza. Se inoculó con 0,1 mL la superficie central de las placas contentivas de sobaroux dextrosa agar (SDA) con cloranfenicol al 0,016%, a razón de 2 cápsulas/muestra/dilución (10^{-2} y 10^{-1}) y se incubaron a temperatura ambiente.

Cada 24 h x 3 d se contó el número de UFC de los microorganismos presentes. Con los datos obtenidos, se calculó la pureza del producto.

Evaluación fisicoquímica

Caracterización macroscópica. El aspecto comercial del producto se evaluó tomando como base las características sugeridas por Agüero (2): color (simple vista), la textura (sensación al tacto como seca o pegajosa) y la condensación (ausente, incipiente o evidente en el empaque).

pH. Se tomó 1 g de muestra y se adicionó 10 mL AD (proporción 1:10). Se homogenizó y determinó el pH.

Contenido de humedad. Se determinó según el método de desecación en estufa y circulación de aire utilizado en la Cátedra de Análisis de Alimentos II de FAGRO-UCV (Prof.^a Rosaura Isturiz, Comunicación personal).

Humectabilidad. En un vaso de precipitado de 250 mL (7 cm de diámetro interno *ca*) con 200 mL de AD, se depositaron 5 g de muestra en un punto fijo de la superficie del agua. Luego se midió los min entre el instante en que se agrega el producto y el momento en que este desaparece de la superficie (19).

Para las pruebas de pH, contenido de humedad y humectabilidad se realizaron 3 repeticiones/muestra. A los datos por muestra se les aplicó ANAVAR y se estableció el intervalo de confianza del lote completo.

Suspensibilidad. Para determinarla hubo que reformular la dosis de aplicación recomendada en la etiqueta 100g/300L agua/ha. Así la suspensibilidad del producto comercial, según Oriusbiotecnología (16), se evaluó con una dosis de aplicación de 500 g/ha, aplicada a bajo volumen de agua en una asperjadora de espalda manual que gasta entre 50-150 L/ha (14). Se mezcló 10 g de la muestra con 50 mL de agua destilada (AD), se agitó y pasó a un erlenmeyer de 1000 mL, se enrasó con AD [Solución Madre (SM)]. Se calculó la concentración inicial de esporas/mL (CI esporas/mL). El volumen se distribuyó en cilindros graduados de 250 mL, dejándolos en reposo por 50 min. Se introdujo 1 pipeta de 10 mL 15 cm por debajo de la lectura superior del cilindro. Se tomó 10 mL/erlenmeyer y se calculó la concentración final de esporas/mL (CF esporas/mL). La suspensibilidad se obtuvo aplicando la fórmula correspondiente.

Evaluación de patogenicidad o bioensayo

Bioensayo en cultivo dual. Esta prueba se basó en la metodología recomendada por Fernández-Larrea (8), con algunas modificaciones. Fase I.- Obtención del hongo fitopatógeno que especifica la etiqueta del producto comercial (*Rhizoctonia solani* Kühn aislado de maíz): La Cepa P2tur6 *R. solani* proviene del Laboratorio de Fitopatología del DANAC, de comprobada virulencia y patogenicidad (17). Fase II.- Obtención del aislado de *T. harzianum* puro a partir del producto comercial. Fase III.- Crecimiento de *T. harzianum* y *R. solani* bajo condiciones homogéneas. Fase IV.- Enfrentamiento en cultivo dual. Fase V.- Evaluación de la velocidad de competencia por sustrato y espacio: Se midió el crecimiento radial en cm de cada colonia de *T. harzianum* y *R. solani* cada 24 h hasta que ocurrió su encuentro. Fase VI.- Evaluación de la capacidad antagónica: Se continuó midiendo el crecimiento radial de *T. harzianum* cada 24 h en el transcurso de 6-10 d. Se dejaron por 7 d más en contacto el

crecimiento de *T. harzianum* con esclerocios de *R. solani*, luego se evaluó parasitismo de *T. harzianum*. El ensayo se llevó a cabo bajo un diseño de bloques al azar con 4 tratamientos y tres repeticiones para cada uno. Los tratamientos quedaron identificados como (T1) *T. harzianum* interactuando con *R. solani*, (T2) *R. solani* interactuando con *T. harzianum*, (T3) *R. solani* testigo y (T0) *T. harzianum* testigo. Para evaluar la velocidad de competencia por sustrato y la velocidad de colonización se realizó un ANAVAR y la prueba de comparación de medias de Tukey de todas las muestras. El porcentaje de invasión de *T. harzianum* sobre la colonia de *R. solani*, se estableció a través de estadística descriptiva calculando intervalos de confianza. Estos resultados permitieron definir el grado antagónico del tratamiento mediante una escala hedónica elaborada en base al % de invasión de *T. harzianum* del espacio ocupado por *R. solani* [grados: 0(0%), 1(1-26%), 2(27-50%), 3(51-76%), 4 (77-100%)].

Bioensayo en cultivo mixto. El cultivo mixto es una metodología utilizada en el Laboratorio de Procesos Fermentativos UCV-IBE (Dr. Blas Dorta, Comunicación personal), la cual fue adaptada de tal manera que permitiera la evaluación de la capacidad antagónica de *T. harzianum* sobre *R. solani*: Fase I y Fase II: similar a cultivo dual. Fase III.- Preparación del medio para cultivo mixto: Se mezcló mazina (subproducto de la obtención del aceite de maíz), cascarilla de arroz y agua destilada, en una relación 1:1 de sólidos y 50% de humedad. Se esterilizó y sirvió en cápsulas estériles. Fase IV- Bioensayo en Cultivo Mixto: Con una densidad de inóculo de *R. solani* de 3 esclerocios/10 g de sustrato, diariamente, hasta por 4 d según el tratamiento [(*R. solani* con diferentes tiempos de establecido (T1= 0 d, T2= 1 d, T3= 2 d, T4= 3 d, T5= 4 d + sus respectivos testigos)], se inoculó *T. harzianum* con 0,1 mL de la suspensión de 10^8 esporas/g. Fase V.- Evaluación del grado de invasión de *T. harzianum* sobre la colonia de *R. solani*: Se evaluó el crecimiento diametral en cm cada 24 h x 7 d y se calcula el % de invasión de *T. harzianum* al espacio infectado por *R. solani* utilizando una equivalencia de cm de diámetro de una placa de Petri en porcentaje de invasión (de 0,1 a 2,3 cm= 1-26%; 2,4 a 4,5 cm= 27-50%; 4,6 a 6,8 cm= 51-76%; 6,9 a 9,0 cm= 77-100%). Además de medir el crecimiento diametral de la colonia de *T. harzianum*, se consideró tanto el crecimiento miceliar como el evidenciado por la esporulación. Culminadas las 168 h de observación de cada tratamiento, se observó la presencia o no de esclerocios en el sustrato. Se utilizó un diseño en bloques al azar, con 5 tratamientos y 3 repeticiones/tratamiento. Para evaluar el porcentaje de invasión de *T. harzianum* sobre la colonia de *R. solani* se realizó un ANAVAR y prueba de comparación de medias de Tukey de todas las muestras. Estos resultados permitieron el uso de la Escala de Grado Antagónico (EGA), con el fin de establecer el grado antagónico del aislamiento comercial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación Microbiológica

Los resultados evidenciaron que el lote es homogéneo en cuanto a las características microbiológicas evaluadas.

Concentración de esporas: Con un nivel de confianza de 95%, la concentración de esporas por g del producto comercial se encuentra entre $1,4 \times 10^8$ y $1,8 \times 10^8$ esporas/g

(Cuadro 1). Existen productos comerciales como el TRICHO-D® WP, que presenta 10^8 esporas/g, solo que la presentación comercial es de 300 g (16); sin embargo, este valor está por debajo del recomendado (10^9 esporas/g) para *Trichoderma* masificado artesanalmente en el INISAV, Laboratorio de Hongos Biocontroladores, Cuba (Dr. O. Elosegui, Comunicación personal).

Viabilidad. La germinación, con 95% de confianza, se halla entre 28,15 y 29,13 % (Cuadro 1) y la viabilidad promedio es de $4,7 \times 10^7$ esporas viables/g. Algunos autores coinciden en que el porcentaje de germinación, 24 h después de iniciada la evaluación, debe ser superior a 85% (19, 10). Monzón (13) recomienda valores de germinación por encima de 95%. El porcentaje de germinación encontrado en esta investigación, si bien es el resultado más frecuente en pruebas de calidad de productos biológicos (8; 11,46 y 36 % en AICATRICHODERMA, MYCOBAC-WP y TRICOBIOOL, respectivamente); no debería considerarse aceptable pues incumple lo recomendado por varios autores (%G > 85%) (6). El Dr. Dorta (Comunicación personal) da una posible explicación de este valor de germinación, indica que el material de naturaleza amilácea típico (usado como inerte para la formulación del granulado) posee una a_w cercana a 0,8 y cuando el contenido de humedad del producto es mayor a 12% en base húmeda, se establece una hr de equilibrio dentro del envase alrededor del 80% que podría ser propicia para que ocurra la germinación y al momento de hacer la prueba (1 mes después de producido el formulado), ya habría germinado una gran cantidad de esporas. Sin embargo, en ninguna de las observaciones microscópicas, se observaron esporas germinadas ni micelios durante el tiempo de almacenamiento (1 mes) previo al análisis.

Cinética acumulada de germinación. Como la cinética de germinación de cada muestra no se observaron diferencias significativas. Se graficó la cinética de germinación para todo el lote (Fig. 1), de donde se obtuvo la fase Lag previa a la germinación (4 h ca) y el punto crítico de germinación (17,64 h). La espora, al estar en contacto con el ambiente, toma un tiempo de adaptación para su posterior germinación, así que, mientras más pronto se adapte a estas condiciones y germine, más rápido alcanzará el proceso de crecimiento o infección y tendrá ventaja sobre otros microorganismos (1). Tenemos pues, que el producto comercial presenta, en cuanto a su ingrediente activo, (esporas de *T. harzianum*), un período de latencia corto (4 h ca), en comparación con la fase lag de germinación de otro hongo considerado agresivo como *Aspergillus flavus*, el cual es de 10 h (12). La fase lag del producto sería un período de latencia corto si se considera que previa a la germinación deben activarse mecanismos bioquímicos propios de las esporas que requieren un tiempo mayor a 4 h.

Pureza: Con un 95% de confianza, la pureza del producto comercial osciló entre 85,16 y 94,83 % (Cuadro 1). Este resultado es aceptable según la recomendación de Vélez *et al.* (19), donde la pureza de un bioproducto debe ser > 90%. Jenkins and Grzynacz (11) y Elosegui (Comunicación personal) coinciden en que la carga permisible de contaminantes (hongos y bacterias) depende del método de producción y refieren según su caso, industrial y artesanal respectivamente, menos de 1×10^6 UFC contaminantes/g de producto. En relación a esto, el producto comercial evaluado presentó 10^5 UFC contaminantes/g de producto, que expresado en el total del producto y con un 95% de confianza, evidenció una contaminación entre 2,47 y 11,58 % en hongos de los géneros *Rhizopus* y *Aspergillus* y entre 1,0 y 4,91 % de contaminación por bacterias.

Cuadro 1. Calidad microbiológica de un producto comercial a base de *Trichoderma harzianum*.

	Esporas/g	Esporas/mL	Porcentaje de germinación	Porcentaje de pureza	Contaminantes (%)			Humedad (%)	pH	Humectabilidad
					Hongos	Bacterias	Total			
Limite inferior	1,4 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁷	28,15	85,16	2,5	1,0	5,16	12,95	4,79	0,16
Limite superior	1,8 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁷	29,13	94,83	11,6	4,9	14,80	13,34	4,85	0,17
CV (95%)	21,74	21,74	4,14	9,70	117,04	119,45	87,27	2,72	1,07	5,40

Evaluación Físicoquímica

Caracterización macroscópica. El producto comercial tiene apariencia seca (textura seca sin condensación evidente) y color verde característico de algunos productos a base de *T. harzianum*. Agüero (2) demostró que la viabilidad de un micoinsecticida almacenado entre 2-4 °C, era mas estable en el tiempo (540 d) cuando el producto, en apariencia comercial, no presentaba textura pegajosa y condensación evidente. Considerando sus observaciones y el efecto del contenido de humedad, el producto comercial muestra la apariencia esperada para mantener la viabilidad en un lugar fresco y seco.

pH: Con un 95% de confianza, se sabe que los valores de pH están contenidos entre 4,79 y 4,85 (Cuadro 1). Vélez *et al.* (19) sugieren un pH para la formulación a base de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, entre 5,5 y 7,0. En este sentido, se entiende que el producto comercial refleja un pH por debajo del rango recomendado por Vélez *et al.* (19).

Contenido de humedad: Se conoce con un 95% de confianza que el valor está contenido entre 12,95 y 13,34 % (Cuadro 1). La mayoría de los autores recomiendan valores por debajo de 10% de humedad para formulados biológicos. El producto excede ligeramente los valores recomendados por diversos autores (5,8,10,13). No se encontraron diferencias significativas (p<,005) entre las muestras por lo que se asume que el lote es homogéneo en relación a las variables humedad y pH.

Humectabilidad: Con un nivel de confianza del 95%, la humectabilidad del producto está entre 0,16 y 0,17 min(Cuadro 1). Se encontró que existían diferencias significativas (p<,0,05) entre las muestras. Esta variabilidad puede tener origen experimental y se presume se deba a la imprecisión que tiene la caída del formulado sobre el agua. Aunque el producto comercial haya sido formulado como un

granulado, a niveles prácticos tiene apariencia de polvo (micro granulado), para este efecto las Normas Técnicas Obligatorias Nicaragüenses NTON 02011-2002 (15) para plaguicidas, establece para polvos solubles en agua, un máximo de 1 min de humectabilidad si este formulado no requiere agitación, así el producto cumple con tales especificaciones.

Suspensibilidad. El valor promedio obtenido en el producto es de 64,28%, medida en una dosis de aplicación de 500 g de producto/ha, aplicada a bajo volumen de agua (50 L) con una asperjadora de espalda manual. Este valor cumple con las especificaciones de NTON 02011-2002 (15) que definen la suspensibilidad para polvos mojables como la capacidad de mantener por un tiempo determinado más del 60% del ingrediente activo.

Evaluación de patogenicidad o bioensayo

Bioensayo en cultivo dual. En las 3 observaciones (24, 48 y 72 h) se encontraron diferencias significativas (p<,0,05) entre los tratamientos. En los tratamientos T2 (*R. solani* interactuando con *T. harzianum*) y T1 (*T. harzianum* interactuando con *R. solani*) se observó, que la colonia de *R. solani* tuvo mayor velocidad de competencia por sustrato y espacio que la colonia de *T. harzianum* (Fig. 2). Sin embargo, al comparar T2 con T3 (*R. solani* testigo) y T1 con T0 (*T. harzianum* testigo) se observa que ambos disminuyeron su velocidad de competencia por sustrato respecto a su testigo. En relación al crecimiento micelial y esporulación del aislado de *T. harzianum* comercial, los resultados obtenidos no coinciden con la prueba *in vitro* de *T. harzianum* frente a *R. solani* realizada por Alarcón *et al.* (3) quienes demostraron la alta capacidad competitiva por sustrato de *T. harzianum* frente a un patógeno. Una vez que ocurrió el encuentro de las colonias de *T. harzianum* y *R. solani* (72 h), T2 detuvo su crecimiento y el testigo de *R. solani* (T3) ya había cubierto la placa (Fig. 2). A partir de allí las medidas en crecimiento radial arrojadas por T0 y T1 se expresaron en velocidad de crecimiento de *T. harzianum* sobre *R. solani*. La patogenicidad evaluada bajo condiciones *in vitro*, no refleja las limitantes ambientales, es por ello que en esta investigación se estableció como valor mínimo el “grado 4” en la EGA. El aislamiento comercial de *T. harzianum* alcanzó el grado 4 en la EGA después de 120 h, obteniéndose con un 95% de confianza valores entre 76,67 y 79,25 % de invasión de la colonia de *R. solani*. *T. harzianum* cubrió toda la colonia de *R. solani* al cabo de 168 h, observándose esporulación sobre esta. Estos resultados coinciden con los encontrados por Chacón (6) (grado 3= 100% de invasión de la colonia del patógeno y grado 4= esporulación sobre la colonia del patógeno), el cual observó en 2 cepas comerciales, los más altos grados en la escala antagónica (3 y 4) al cabo de 7 d una vez ocurrido el encuentro de las colonias (*T. harzianum* y *R. solani*). En T2 se observó de 0–5 esclerocios/placa, mientras que en T3 se cuantificó un promedio de 22 esclerocios/placa. No se observó germinación

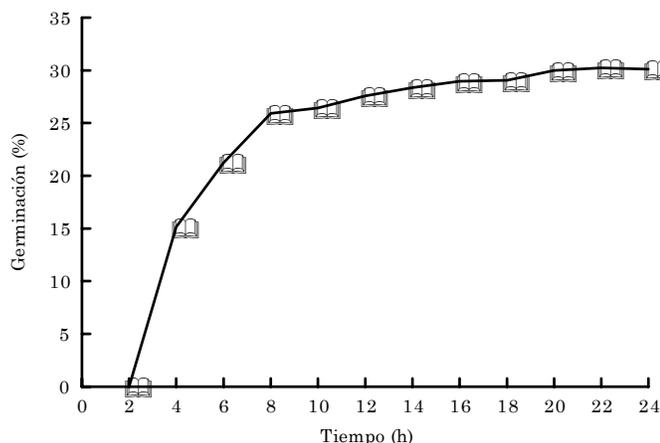


Fig. 1. Cinética acumulada de germinación de un producto comercial a base de *Trichoderma harzianum*.

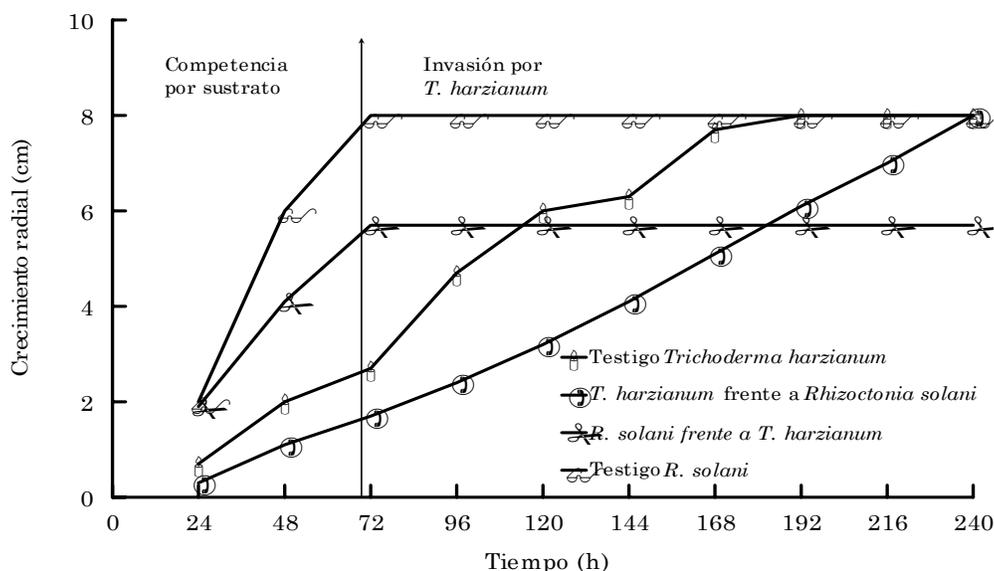


Figura 2. Velocidad de crecimiento radial (cm/h) de un aislado comercial de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia solani* y sus respectivos testigos en cultivo dual.

de los esclerocios en APD, y sobre estos fue evidente el crecimiento de *T. harzianum*.

Bioensayo en cultivo mixto. En cada una de las observaciones (72, 96, 120, 144 y 168 h) se originaron 5 grupos de medias, siendo T1 el tratamiento con mayor % de invasión en todos los casos. En los tratamientos T4 (*T. harzianum* aplicado a *R. solani* con 3 d de establecido) y T5 (*T. harzianum* aplicado a *R. solani* con 4 d de establecido), la gota del inóculo de *T. harzianum* quedó retenida en la superficie del micelio de *R. solani*, esto se tradujo en 7,26% de invasión para T4 y 7,0% de invasión para T5. Es decir, el aislamiento comercial de *T. harzianum* no logró invadir la colonia de *R. solani* cuando esta tenía 3 d y 4 d de establecida en el medio. El tratamiento T3 detuvo su crecimiento a las 96 h, logrando invadir solo el 18,33% de la superficie ocupada por *R. solani*. Esto quiere decir que el grado antagónico del aislado comercial de *T. harzianum* es muy bajo cuando este se enfrenta a *R. solani* con 2 d de establecida en el medio. El tratamiento T2 detuvo su crecimiento a las 120 h e invadió 45,93% de la superficie ocupada por *R. solani*, es decir, el aislado comercial de *T. harzianum* alcanzó el grado 2 de antagonismo cuando se enfrentó a *R. solani* con 1 d de establecida en el medio. El tratamiento T1, a partir de las 96 h disminuye sensiblemente su crecimiento hasta que se detiene definitivamente a las 168 h invadiendo el 62,13% de la superficie ocupada por *R. solani*. En otras palabras, el aislamiento comercial de *T. harzianum* alcanzó el grado antagónico 3 cuando se enfrentó a *R. solani* con 0 d de establecida en el medio. En los tratamientos T1, T2, y T3 se evidenció mayor espesor del micelio, probablemente originado por el menor espacio disponible para su crecimiento por la presencia de *T. harzianum*. No se observó formación de esclerocios en T1, T2 y T3, no así en T4 y T5 quienes iniciaban la formación de esclerocios al momento de la inoculación con *T. harzianum*. El testigo de *R. solani*, a las 96 h, inició la formación de esclerocios distribuidos en todo el medio. A través de una evaluación cualitativa se observó en todos los tratamientos disminución del crecimiento micelial de *T. harzianum* cuando se compararon con su respectivo testigo de *T. harzianum*. Todos los testigos de *T. harzianum* ocuparon la superficie de

la placa a las 144 h después de ser inoculadas. Con todo lo anteriormente descrito se entiende que el aislado comercial de *T. harzianum* disminuye su capacidad de invadir la colonia de *R. solani* a medida que el patógeno aumenta su tiempo de establecimiento, a la vez que, el aislado de *T. harzianum* es capaz de inhibir la producción de esclerocios de *R. solani* (T1, T2 y T3) neutralizando de esta forma la estrategia de preservación en el tiempo del patógeno. Esto induce a recomendar la aplicación de *T. harzianum* de forma preventiva al ataque de *R. solani* en el cultivo, evitando el uso de *T. harzianum* luego que aparezcan los síntomas de la enfermedad en las plantas tal y como lo señalan Chet and Henis (7), Stefanova (18), Cabrera (4) y Zambrano *et al.* (20) quienes recomiendan la aplicación de *T. harzianum* a las semillas, en la cama del semillero, en la raíz de las plántulas, y directamente a la plantación.

Tomando en consideración los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico, microbiológico y patogénico de un producto comercial a base del hongo *T. harzianum*, podemos señalar que el mismo posee bajo porcentaje de germinación, pureza adecuada, aceptables características fisicoquímicas y es de buena capacidad patogénica frente al patógeno para el cual es recomendado.

LITERATURA CITADA

1. Agrios, G.N. 1991. Fitopatología. 1° edición. Edit. Noriega-Limusa. México. 756 pp.
2. Agüero, C.E. 1995. Producción masiva, formulación y estabilización de biopreparados a partir de *Verticillium lecanii* (zimm) viejas y *Paecilomyces fumosoroseus* (wize) Brown and Smith aislados de *Bemisa tabaci* en Venezuela. Trabajo de grado M. Sc., Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela. 78 pp.
3. Alarcón, L., Reyes, T., Rodríguez, G. y Pupo, A. 2005. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* Sacc en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Fitosanidad (Cuba) 9 (3): 57-60.
4. Cabrera, S. 2001. Prácticas de manejo para el control de la mancha bandeada de la hoja (*Rhizoctonia*). Determinación de los niveles de

- incidencia, severidad y efecto sobre el peso de la mazorca en siembras comerciales de maíz. Memoria VIII Curso sobre producción de maíz. Portuguesa. Venezuela. p. 399.
5. Carballo, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). Hoja Técnica N° 47: i-iv.
 6. Chacón, H. 2003. Evaluación de la calidad de diferentes productos biológicos a base de *Trichoderma* spp., comercializados en Venezuela. Trabajo de Grado Ing. Agr. Universidad Nacional Experimental del Táchira. San Cristóbal, Venezuela. 77 pp.
 7. Chet, I. and Henis, Y. 1985. *Trichoderma* as a biocontrol agent against soilborne root pathogens. In: Ecology and management of pathogens. C. Parker, A. Rovira, K. Moore, P. Wong and J. Kollmorgn (eds.) Minnesota USA. The American Phytopathological Society. 353 pp.
 8. Fernández-Larrea, O. 2001. Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas. 1° edición. Edit. CIDISAV. INISAV. La Habana, Cuba. 138 pp.
 9. García, R., Riera, R., Zambrano, C. y Gutiérrez, L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. Fitosanidad 10:115-121.
 10. Jenkins, N. and Grzywacz, D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of product performance (en línea). Biocontrol Science and Technology. 10: 753-777. Disponible en <<http://Search.epnet.com/login.asp>>. Consultado 19 febrero 2007.
 11. Jenkins, N.E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A. and Lomer, C. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Informations. 19(1):21N-31N.
 12. Mejía, L. 2004. Estudio sobre factibilidad de uso de *Trichoderma harzianum* para el control de *Aspergillus flavus* en granos de maíz almacenados. Trabajo de Grado M. Sc. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 133 pp.
 13. Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63: 95-103.
 14. Muñoz, J. y Martínez, J. 1997. Manual técnico: productos agroquímicos, semillas y equipos. 2° edición. AGROISLEÑA C. A., Cagua, Venezuela. 190 pp.
 15. Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense NTON 02011-2002. 2002. Norma para el control de calidad de plaguicidas químicos formulados de uso agrícola (en línea). Managua, Nicaragua. Disponible en: <http://www.dgpsa.gob.ni/biblioteca/ver_documento.php?id=49>. Consultado 10 mayo 2007.
 16. Orius biotecnología. 2005. TRICHO-D® WP el primer biorregulador de enfermedades en plantas previene y biorregula las enfermedades (en línea). Disponible en: <<http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.phptricho>>. Consultado 14 mayo 2006.
 17. Perdomo, R., Hernández, A., González, A., Pineda, J. y Alezone, J. 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. Interciencia 32:48-53.
 18. Stefanova, M. 2000. Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos (en línea). Informe Técnico de Investigación INISAV, La Habana, Cuba. Disponible en: <<http://www.aguas calientes.gob.mx/agro/produce/TRICHODE.htm>>. Consultado 25 agosto 2005.
 19. Vélez, P. Posada, F. Marín, P. González, M.T., Osorio, E. y Bustillo, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No 17. CENICAFE. Chinchina-Caldas. Colombia. 37 pp.
 20. Zambrano, C. Molina, N. Cabrera, S. y Cardona, R. 1999. Avances en el manejo integrado de *Rhizoctonia* spp. en el cultivo de maíz. Turén, estado Portuguesa, Venezuela. Fitopatol. Venez. 12: 60. (Resúmen).