



INSTITUTO DOMINICANO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES



7mo Congreso de la Sociedad Dominicana de
Investigadores Agropecuarios y Forestales (SODIAF)



“Adaptación *in vitro* de cuatro cepas nativas de
Trichoderma spp. a sustratos orgánicos”



PROYECTO
CONIAF-UASD

Marisol Morel R., Colmar A. Serra
marisolmorel25@hotmail.com,

Bávaro, Punta Cana,
República Dominicana.
11 de noviembre de 2016

INTRODUCCIÓN

- En República Dominicana anualmente se siembran alrededor de 10,000 hectáreas de tomate *Solanum lycopersicum* L.
- De este cultivo se realizan exportaciones, siendo los estados unidos el principal mercado consumidor en el 2011 dichas exportaciones generaron unos US\$ 3, 214,999.80 (CEI-RD 2011).

...INTRODUCCIÓN

➤ El cultivo de tomate bajo ambiente protegido en suelos y/o sustratos es afectado por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, entre ellos:

- *Phytophthora capsici*,
- *Rhizoctonia solani*,
- *Fusarium solani*,
- *Athelia rolfsii* (González 1989)



Fig. 1 Cultivo de tomate en Invernadero foto: J. Moya

INTRODUCCIÓN

➤ Han sido manejados con el uso de productos químicos sintéticos los cuales pueden:

- Inducir resistencia de las plagas
- Dejar residuos en las cosechas
- Contaminar el medio ambiente

➤ La aplicación inadecuada de agroquímicos puede causar rechazos de las exportaciones de los vegetales (Hunts Point 2009)

...INTRODUCCIÓN

- La obtención de sustratos locales para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp., contribuiría al manejo biológico de hongos fitopatógenos.
- Según Fernández-Larrea (2001) *Trichoderma* spp., son fáciles de manipular y se pueden adaptar a diferentes sustratos.

...INTRODUCCIÓN

- *Trichoderma* spp., están catalogados como agentes antagonistas que previenen y controlan microorganismos patógenos (Martínez y Guerrero 2011).
- Los resultados de esta investigación ayudarán a reducir los costos de control de enfermedades en los diferentes sistemas de producción.

OBJETIVO

- Determinar la adaptación *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Trichoderma* spp. a dos sustratos orgánicos y su mezcla con y sin esterilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Localización del estudio**

- Estación Experimental Mata Larga, del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), en el laboratorio de protección vegetal, San Francisco de Macorís, República Dominicana. En el periodo de Julio a septiembre del 2013.
 - Altitud: 150 msnm
 - Pluviometría promedio anual: 1,450 mm
 - Temperatura promedio anual: 26.2°C

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ El material Biológico fue obtenido bajo el proyecto:

“Determinación de Alternativas Biológicas para el control de hongos fitopatógenos de suelo, realizado por investigadores del IDIAF con financiamiento del CONIAF.

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Materiales Biológicos

Tabla 1. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. utilizadas en el ensayo.

Cepas	Códigos del ensayo	Procedencia
<i>T. longibrachyatum</i>	Tl-12A	La Vega, zona baja
<i>T. harzianum</i>	Th-19B	Jarabacoa
<i>T. asperellum</i>	Ta-25A	Constanza
<i>T. asperellum</i>	Ta-36A	Jarabacoa

...MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación
molecular por la
región ITS r DNA.

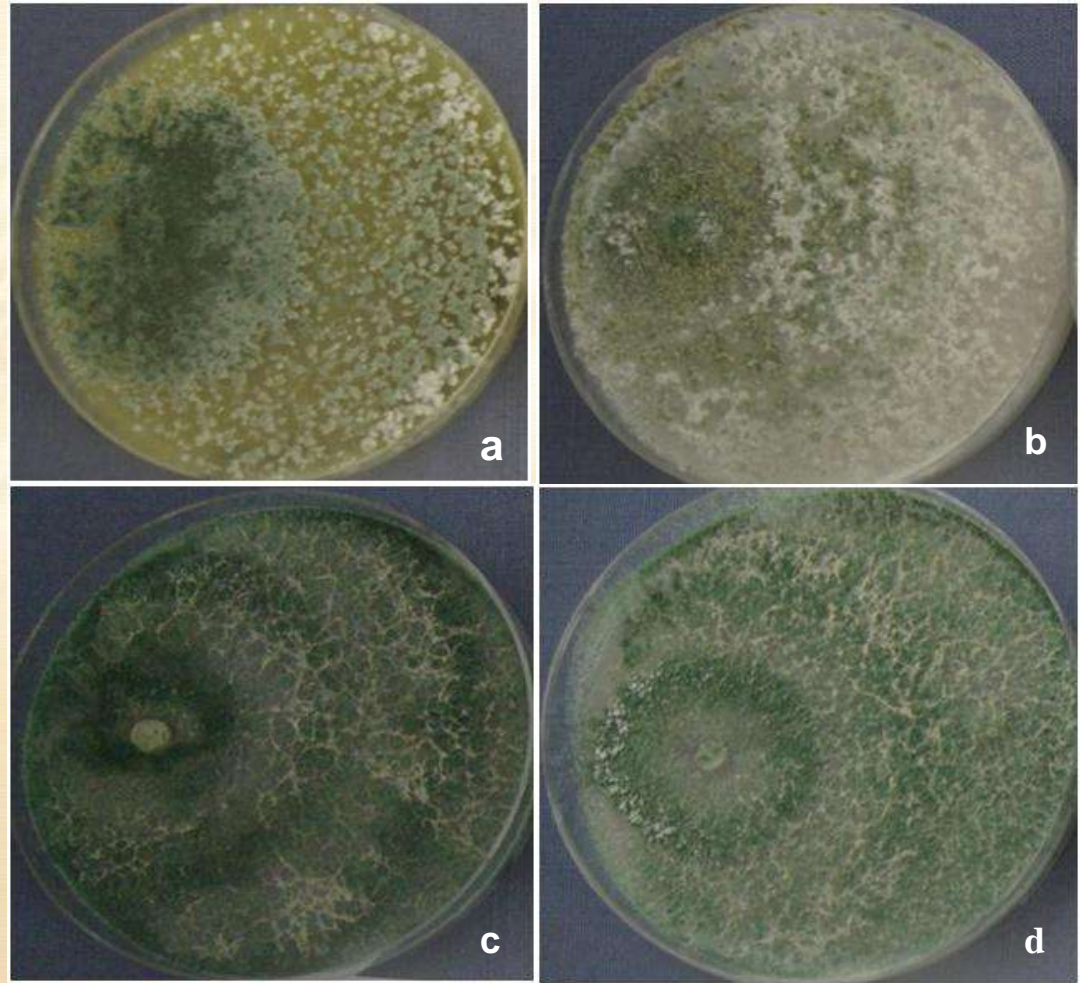


Fig. 2. Cepas de *Trichoderma* spp. a) *T. longibrachiatum*-12 A, b) *T. harzianum*-19B, c) *T. asperellum*-25A, d) *T. asperellum*-36 A (Fuente: García et al. 2015)

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Materiales orgánicos

Tabla. 2- Materiales orgánicos utilizados en el ensayos

Material	Humedad %	pH g/mol/l	C.E ppm
Fibra de coco	66.7	4.65	0.50
Cáscara de arroz carbonizada	50.00	7.6	0.50

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Tratamientos

Tabla 3. Descripción de los tratamientos

Factor A	Factor B	Factor C
Esterilización	Sustratos	<i>Trichoderma</i> spp.
a1) con	b1) Fibra de coco (FC)	<i>Tl- 12A</i>
	b2) Cáscara de arroz carbonizada (CAC)	<i>Th-19B</i>
a2) sin	B3) CAC 50 % +FC 50 %	<i>Ta-25A</i>
		<i>Ta-36A</i>

Factor (A) parcela principal con 2 niveles, Factor (B) sub-parcela con 3 niveles, Factor(C) 4 niveles

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Diseño experimental

- Parcela Divididas BCA
- En 4 experimentos
- Unidad experimental: 1 frasco Erlenmeyer



Fig. 3. Frasco de Erlenmeyer con el sustrato más el inoculo respectivo

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Variables Respuestas

- 1. Producción de conidios:
Unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de sustrato a los 15 días de inoculados.
- 2. Viabilidad de los conidios:
% de conidios germinadas a las 24 horas de cultivo en PDA en portaobjeto.

...MATERIALES Y MÉTODOS

- Preparación de sustratos: 15 g de cada sustrato en frascos de Erlenmeyer + 30 ml de agua.



Fig. 4. Pesado de los sustratos y colocación en frasco erlenmeyer

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Inoculación (sustratos)

- Con un disco de micelio de *Trichoderma* spp. de 5 mm de diámetro (19.6 mm^2).
- Concentración promedio de 1 a 1.9×10^7 conidios / disco.



Fig. 5. Inoculación de los sustratos con un disco de medio de cultivo conteniendo el micelio de *Trichoderma* spp.

...MATERIALES Y MÉTODOS

- El ensayo se colocó sobre una meseta por 15 días, a temperaturas entre 25 y 30 °C.



Fig. 6. Frasco Erlenmeyer con 15 gramos de sustrato más el inóculo

...MATERIALES Y MÉTODOS

- **Extracción de conidios de *Trichoderma* spp.**
- A cada frasco de Erlenmeyer se le aplicó 100 ml de agua y se preparó una suspensión madre (1×10^0).
- De cada suspensión madre se tomó 1.0 ml y se diluyó en 9.0 ml de agua contenida en tubos de ensayos (1×10^{-1}).



Figura 7. Extracción de conidios de *Trichoderma* spp. a los 15 días de inoculados en los sustratos

...MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Conteo de conidios *Trichoderma* spp.

- De la dilución 1×10^{-1} se colocó una muestra en la cámara de Neubauer
- Número conidios/g sustrato (Ncgs) = suma de 5 CS x 50,000 x 100 x 10 ml / 15 g.** (French y Hebert, 1982).

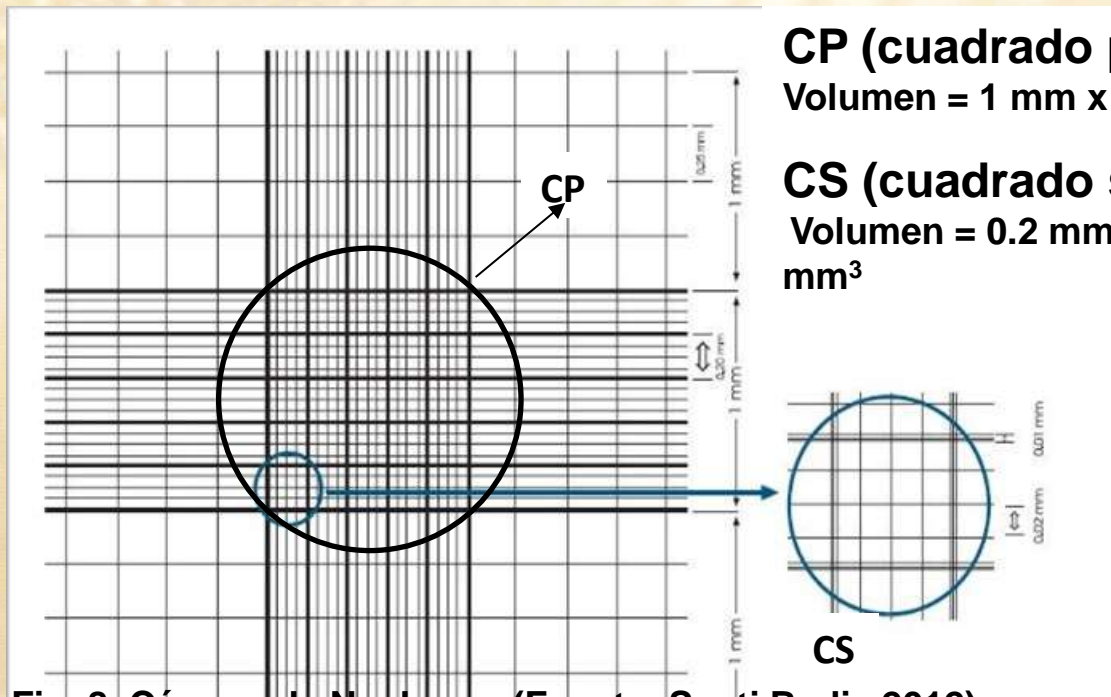


Fig. 8. Cámara de Neubauer (Fuente: Santi Badia 2012)

...MATERIALES Y MÉTODOS

- **Prueba de viabilidad de conidios de *Trichoderma* spp.**
 - Se determinó en función del % de germinación según Monzón (2001).
 - El % de conidios germinados (CG) se determinó con la formula:
$$\%CG = \frac{\text{total CG} \times 100}{\text{total conidios encontrados}}$$

...MATERIALES Y MÉTODOS

- **Análisis Estadísticos de los Datos**
 - Programa InfoStat® (versión 2011)
 - Análisis de varianza (ANAVA) al 5 %
 - Análisis con Kruskal-Wallis
 - Analisis contrastes ortogonales

RESULTADOS

- **Producción de conidios: En (UFC) por gramo de sustrato seco**

- En la producción de conidios ($p=0.0001^{***}$) entre los sustratos y las interacciones entre los factores:
 - Sustrato x Esterilización,
 - Sustrato x Cepas,
 - Esterilización x Cepas,
 - Sustrato x Esterilización x Cepas.

...RESULTADOS

a

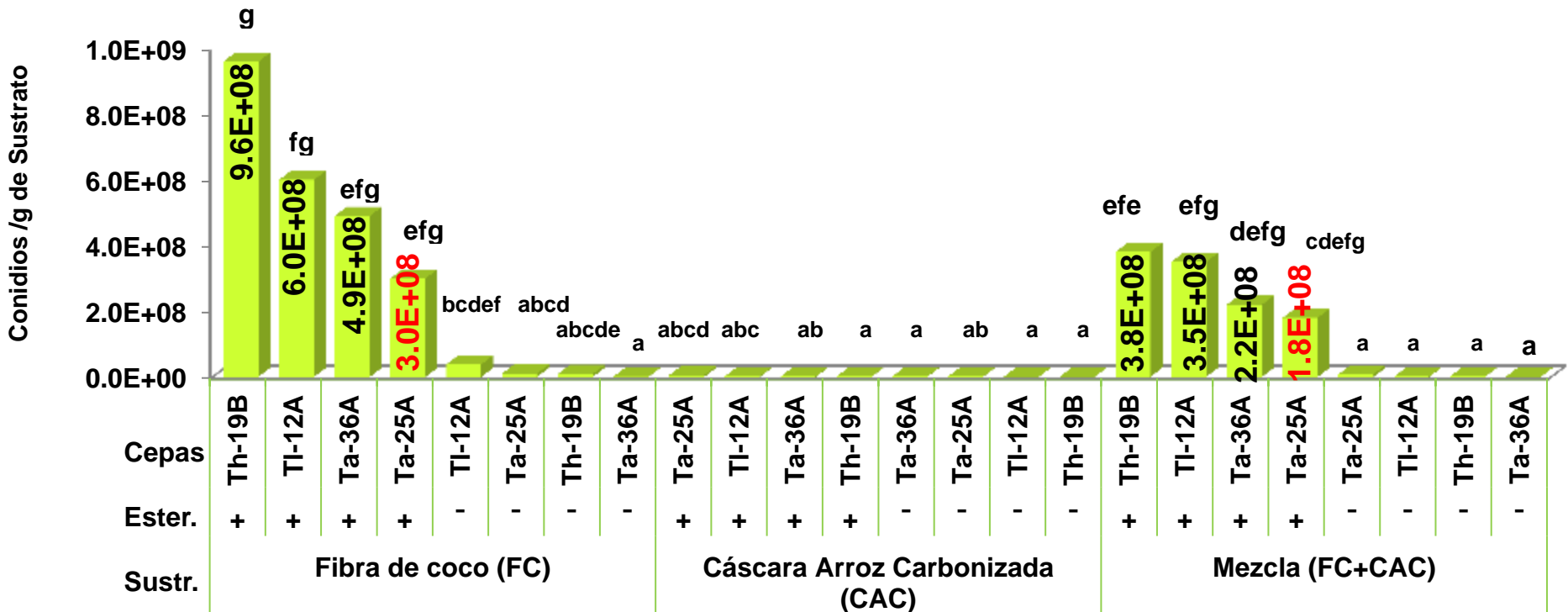


Fig. 9. Producción de conidios (x 10^{0x} /g sustrato) de cuatro cepas nativas de *Trichoderma* spp. en dos sustratos y una mezcla sin (-) y con (+) esterilización

...RESULTADOS

- Crecimiento de color verde (conidios y micelio) de *Trichoderma* spp., a los 8 días de inoculados en los sustratos.



Fig. 10. Crecimiento (conidios y micelios) de *T. harzianum* (Th-19B) a los 8 días de inoculados

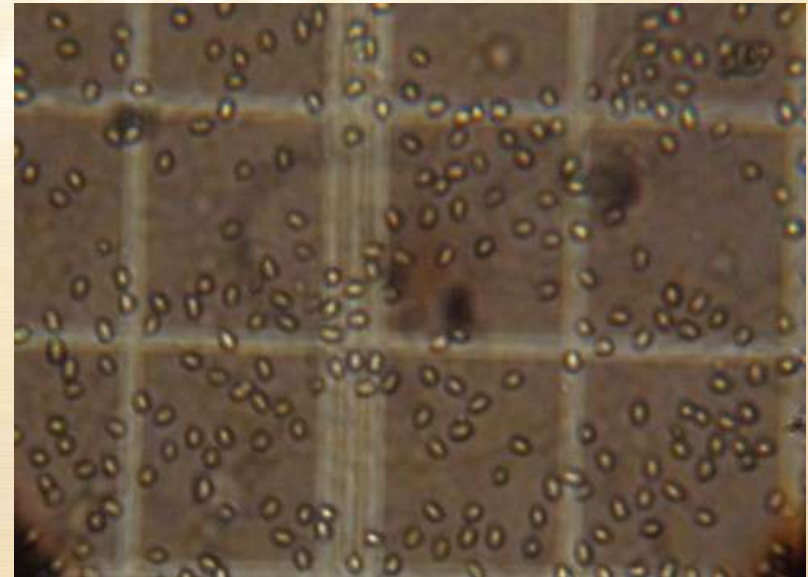


Fig. 11. Conidios de *T. longibrachiatum* (Tl-12 A) en cámara de Neubauer observados en el microscopio (aumento 400 x)

RESULTADOS

- Mediante análisis de contrastes se encontraron ($p=0.0001^{***}$) entre los tratamientos.

Tabla 4. Análisis de contraste en la producción de conidios de *Trichoderma* spp.

Contraste	Tratamientos	Descripción de los Contrastes	Media
1	1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23	Sustratos con <i>versus</i>	2.9×10^8 a
	2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24	sin Esterilización	5.8×10^6 b
CV=	32.23		
P=	0.0001***		

RESULTADOS

- Especie de *Trichoderma* en el sustrato fibra coco en dos procesos de esterilización.

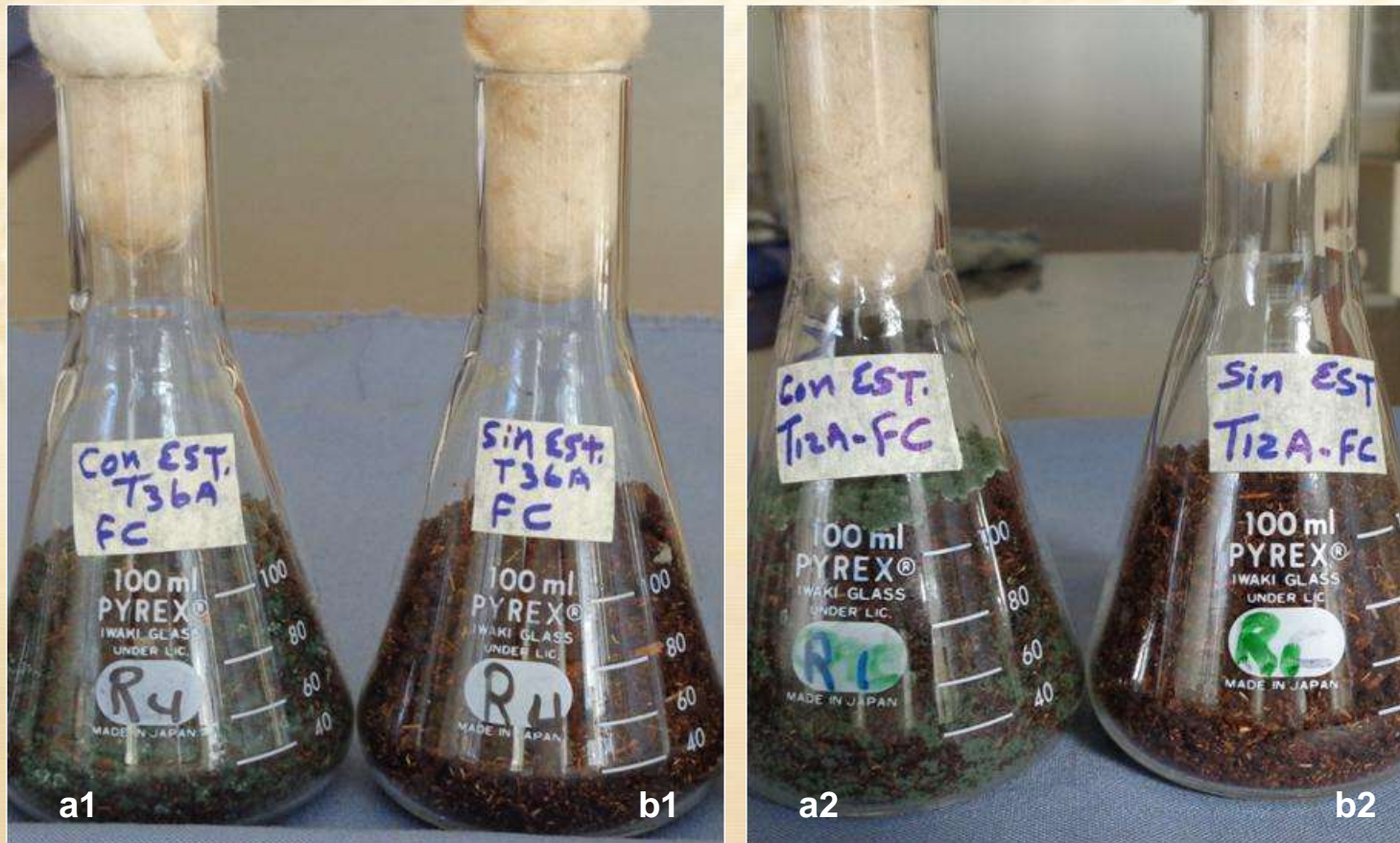


Fig. 12. *T. longibrachiatum* (Tl-12A) y *T. asperellum* (Ta-36 A) Fibra de coco (a1, a2) con esterilización y (b1,b2) sin esterilización

RESULTADOS

➤ Viabilidad de conidios: ($p=0.0001^{***}$)

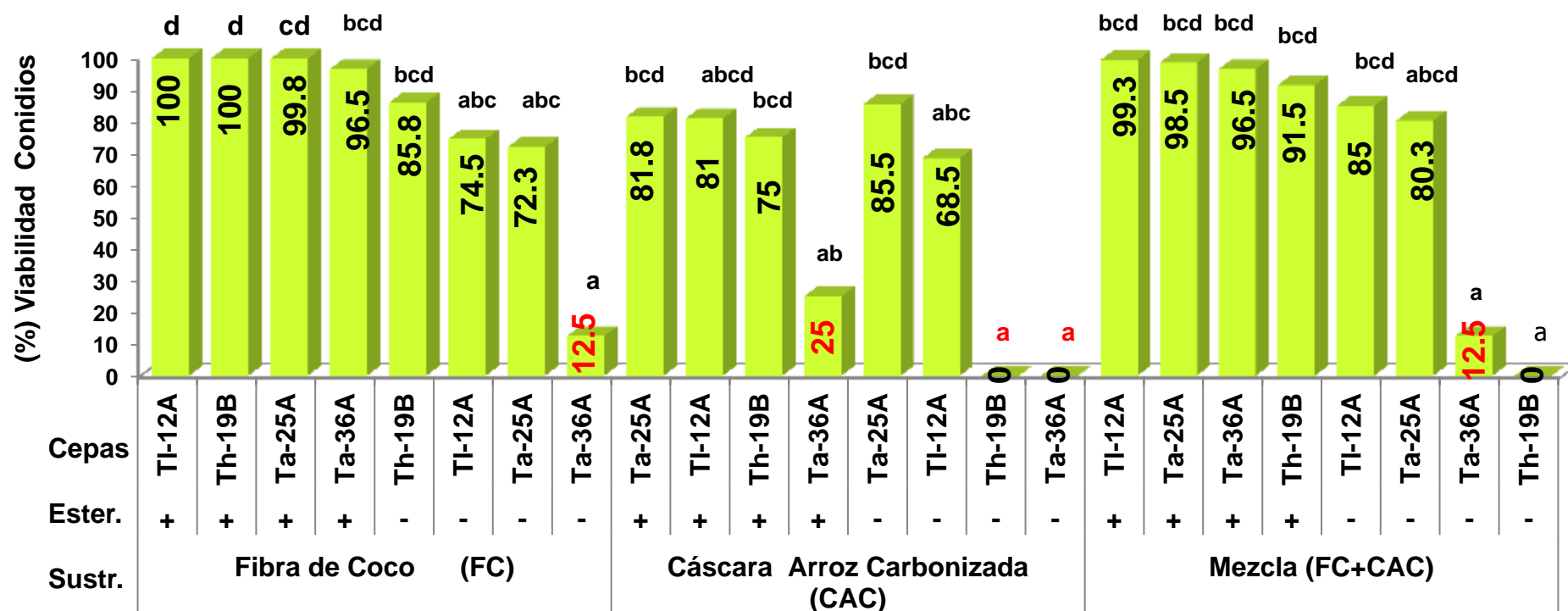


Fig. 13. Viabilidad de esporas de cuatro cepas de *Trichoderma* spp., a los 15 días de inoculados en dos sustratos y la mezcla de ambos sin (-) y con (+) esterilización

CONCLUSIONES

- El sustrato Fibra de Coco (FC) fue el mejor probado *in vitro* en la adaptación de las especies de *Trichoderma* spp.
- Con el proceso de esterilización en el sustrato fibra de coco las cuatro especies de *Trichoderma* spp. produjeron la mayor cantidad de conidios (UFC/g de sustrato)
- Mediante análisis de contrastes se determinó que la esterilización del sustrato favoreció la producción de conidios de 2.9×10^8 conidios/g de sustratos con esterilización a 5.8×10^6 conidios/g de sustratos sin esterilización.

RECOMENDACIONES

- Utilizar el sustratos fibra de coco y la mezcla con la cáscara de arroz carbonizadas en la producción del hongo antagonista *Trichoderma* spp.
- Complementar este estudio probando otros sustratos orgánicos y sus mezclas en la adaptación de conidios de *Trichoderma* spp.

AGRADECIMIENTOS

- **A; Mi Dios Todopoderoso: que puso en mí la capacidad para el aprendizaje y el anhelo de estudiar.**
- **A; la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD).**
- **Al; Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestal (IDIAF).**
- **Al; Consejo Nacional de Investigaciones agropecuarias y Forestales (CONIAF).**
- **A; Elpidio Avilés Quezada**
- **A; mi asesor Dr. Colmar Serra: Mil gracias por su dedicación.**
- **A; todos los profesores que impartieron clase en la Maestría Manejo Integrado de Plagas (MIP).**
- **A; mis compañeros de Maestría**

GRACIAS

