

Evaluación de *Trichoderma* sobre hongos contaminantes de semillas de palma híbrida interespecífica OxG (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*)

Evaluation of *Trichoderma* on contaminant fungi of interspecific hybrid seed palm OxG (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*)

Avaliação de *Trichoderma* sobre fungos contaminantes de sementes de palma híbrida interespecífica OxG (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*)

Oscar Eduardo Ladino-Rey¹, Gabriel Arturo Chaves-Betancourt², José David Rubio-Gómez³,
Christian Andrei Chacin-Zambrano⁴

Forma de citar: O.E. Ladino-Rey, G.A. Chaves-Betancourt, J.D. Rubio-Gómez y C.A. Chacin-Zambrano, "Evaluación de *Trichoderma* sobre hongos contaminantes de semillas de palma híbrida interespecífica OxG (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*)", *Respuestas*, vol. 22, no. 1, pp. 96-102, 2017.

Recibido:
Junio 30 de 2016

Aceptado:
octubre 14 de 2016

96

Resumen

El proceso de germinación de semillas de palma híbrida interespecífica OxG (*E. oleifera* x *E. guineensis*) de la empresa Indupalma Ltda ha presentado una disminución en la producción, lo que se ve reflejado en pérdidas económicas, debido a la existencia de hongos filamentosos que afectan las semillas. Estudios previos evidenciaron el potencial controlador de *Trichoderma* sp. sobre estos hongos. En esta investigación se evaluaron cepas nativas y comerciales de *T. harzianum* y *T. viride* frente a hongos contaminantes prevalentes de semillas de palma híbrida interespecífica. Se aislaron e identificaron once hongos patógenos prevalentes a partir de semillas de palma híbrida interespecífica que fueron eliminadas de las diferentes etapas del proceso de germinación. Se llevaron a cabo pruebas de plato dual a los hongos contaminantes seleccionados y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) y micoparasitismo. Estos hongos fueron inhibidos en su crecimiento por el efecto antagonista de *T. harzianum* y *T. viride*. De igual manera *T. viride* comercial evidenció gran potencial biocontrolador al inhibir por encima del 60% a siete de las once cepas de hongos contaminantes.

Palabras clave: Antagonismo, germinación de semillas, PICR.

Abstract

The germination process of hybrid palm interspecific OxG (*E. oleifera* x *E. guineensis*) seeds in the company Indupalma Ltda has filed a decrease in production, which is reflected in economic losses due to the existence of filamentous fungi that affect seeds. Previous studies have shown the potential controller *Trichoderma* sp. on these fungi. Commercial and native strains of *T. harzianum* and *T. viride* were evaluated against prevalent fungal contaminants of interspecific hybrid palm seeds. They were isolated and identified eleven strains of pathogenic fungi from interspecific hybrid palm seeds that were removed from the different stages of germination. Dual plate tests were conducted at prevalent fungi and the percent inhibition of radial growth (PICO) and mycoparasitism were determined. These fungi were inhibited in growth by the antagonistic effect of *T. harzianum* and *T.*

¹Microbiólogo Industrial
Oscarladino92@hotmail.com
orcid.org/0000-0002-9247-7556
Facultad de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales
Universidad de Santander
Bucaramanga-Colombia

²Ingeniero Agroforestal.
gchaves07@gmail.com
orcid.org/0000-0002-0726-7977
Departamento de Investigación y
desarrollo Indupalma Ltda -
San Alberto-Colombia

³MSc Entomología
Jose.d.rubio@gmail.com
orcid.org/0000-0002-1321-7239
Departamento de Investigación y
desarrollo - Indupalma Ltda.
San Alberto-Colombia

⁴Msc en Biotecnología
Microbiana
cchacin@udes.edu.co
orcid.org/0000-0001-7241-3822
Facultad de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales,
Universidad de Santander
Bucaramanga-Colombia



viride. Similarly, *T. viride* showed a great potential as a biocontrol agent to inhibit over 60% seven out of eleven strains of contaminating fungi.

Keyword: Antagonism, seed germination, PICR.

Resumo

O processo de germinação de sementes de palma híbrida interespecífica OxG (*E. oleifera* x *E. guineensis*) da empresa Indupalma Ltda., tem apresentado uma diminuição na produção, que se reflete em perdas econômicas, devido à existência de fungos filamentosos que afetam as sementes. Estudos prévios evidenciaram o potencial controlador de *Trichoderma* sp. sobre estes fungos. Nesta pesquisa cepas nativas e comerciais de *T. harzianum* e *T. viride* foram avaliadas frente a fungos contaminantes prevalentes de sementes de palma híbrida interespecífica. Foram isolados e identificados onze fungos patógenos prevalentes a partir de sementes de palma híbrida interespecífica que foram eliminadas das diferentes etapas do processo de germinação. Foram realizados tests de placa dupla aos fungos contaminantes selecionados e se determinou a porcentagem de inibição de crescimento radial (PICR) e micoparasitismo. Estes fungos foram inibidos em seu crescimento pelo efeito antagonista de *T. harzianum* e *T. viride*. Da mesma forma *T. viride* comercial evidenciou grande potencial biocontrolador, inibindo a mais do 60% das onze cepas fúngicas contaminantes.

Palavras-chave: Antagonismo, germinação de sementes, PICR.

1. Introducción

Indupalma LTDA es una empresa dedicada al cultivo, extracción de aceite y producción de semillas de palma híbrida interespecífica OxG (*E. oleifera* x *E. guineensis*) [1]. Uno de los productos de mayor auge y demanda son los embriones de semilla híbrida, el cual pasa por un proceso desde fruto carnoso hasta obtener semillas germinadas.

Actualmente, este proceso ha sido afectado por la presencia de hongos, la cual se presenta en las etapas de calefacción, germinación y conservación de embriones, repercutiendo en pérdidas económicas, al disminuir el porcentaje de germinación, destruir y consumir el embrión de la semilla germinada y no germinada, o estar en el embrión y consumir el endospermo [2]. Como contaminantes del proceso de germinación de semillas, se aislaron hongos de los géneros: *Aspergillus* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Penicillium* sp., y donde la aplicación de fungicidas no causaron control efectivo

sobre ellos [3],[4]. Sin embargo, la aplicación de *Trichoderma* sp., un hongo conocido por su capacidad antagonista y micoparasítica [5], logró inhibir los hongos presentes.

Por lo anterior, este estudio evaluó el efecto antagonista de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. contra hongos contaminantes en el proceso de germinación de semillas de palma híbrida interespecífica OxG (*E. oleifera* x *E. guineensis*).

2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en el laboratorio agronómico y en el germinador del departamento de investigación y desarrollo de la empresa indupalma ltda, ubicada en el km 10 via al mar, San Alberto, Cesar, Colombia 07° 47'42" y 07° 36'45" de l n, 73° 23'33" y 73° 34'48" de l o de Greenwich. La plantación se encuentra ubicada a 120 msnm, con humedad relativa del 75% y temperatura media ambiental de 27 ±5°C.

Las muestras fueron las semillas de palma híbrida interespecífica OxG eliminadas del proceso de germinación de semillas por tener contaminación fúngica superficial. El muestreo se realizó al azar, tomando semillas de cada etapa del proceso en un intervalo de 20 a 30 días entre cada toma de muestra y de diferentes lotes. En cada toma de muestra, se seleccionaron 50 semillas en la etapa de Calefacción, 200 de germinación y 100 de conservación de embriones.

2.1 Aislamiento e identificación de hongos contaminantes

Las semillas fueron raspadas con un asa bacteriológica en la zona afectada, principalmente en el opérculo. Se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa- agar (PDA) por triplicado; se incubaron a 25°C durante siete días o el tiempo que requirió cada cepa. Se repicaron de nuevo en cajas de Petri con medio de cultivo PDA para obtener cepas puras.

Se observaron los hongos en microscopio de luz a 40 y 100X con azul de lactofenol o hidroxido de Potasio. Además, los morfotipos fueron identificados mediante claves taxonómicas de [6].

Para la evaluación del efecto antagónico se seleccionaron aquellos hongos contaminantes que presentaron prevalencia mayor a 2% en alguna de las etapas del proceso de germinación de semillas o aquellos reportados en estudios anteriores realizados [4].

2.2 Evaluación del efecto antagónico de las cuatro cepas de *Trichoderma*.

La evaluación del efecto antagónico se realizó con dos cepas comerciales *T. harzianum* (TharC) y *T. viride* (TvirC) y dos nativas, la primera *T. harzianum* (TharN) obtenida a partir de suelo de *E. oleifera* y la segunda *T. viride* (TvirN) fue aislada a partir de espigas masculinas de *E. guineensis*. Se usó

la metodología de plato dual [7]. Las cepa del hongo antagonista se enfrentó contra los hongos prevalentes aislados y fueron seleccionados aquellos hongos contaminantes que presentaran una prevalencia superior al 2% en alguna de las etapas del proceso. Se sembró a 60 mm de distancia en la caja Petri con medio de cultivo PDA. Se tomó medida del radio diariamente durante ocho días. Se incubó a 30°C. Cada ensayo se realizó cinco veces.

En la ecuación (1) Se estudiaron los siguientes parámetros: Radio de Crecimiento Antagonista (RCA), Radio de crecimiento hongo aislado (RCP), Micoparasitismo (MICMO) y Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR). La competencia por nutrientes y espacio se valoró comparando la velocidad de crecimiento del aislado fungico (RCP) y de los antagonistas (RCA) [7]. Para la evaluación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) (Ecuacion 1) se empleó la fórmula donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento [8].

$$PICR = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100 \quad (1)$$

Para evaluar el micoparasitismo se usó la escala creada por [8] para la evaluación de la capacidad micoparasítica, de acuerdo a la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma* sp. sobre los hongos donde se presente crecimiento sobre el micelio del patógeno.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza. En los casos donde se observaron diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$) como comparador de medias entre tratamientos. El análisis se realizó mediante el software estadístico Minitab® 16, hecho por Minitab Inc.

3. Resultados y análisis

Los hongos encontrados en cada una de las fases no difieren a los aislados en otros reportes [4]. Sin embargo, presentando las mismas condiciones, no se aislaron hongos del género como *Sclerotinia* sp., o especies de *Aspergillus* como *A. clavatus* o *A. ochraceus* que anteriormente fueron reportados por dichos autores. Cabe mencionar que se encontraron hongos como *A. flavus*, o *Penicillium*, que no entran dentro de los hongos reportados

en este estudio, debido a que su presencia en las muestras fue esporádica (<2%). *Schizophyllum* sp. y *Syncephalastrum* sp., son los mayores contaminantes en las muestras obtenidas (Tabla I), a pesar de ello, no se presentaron en ensayos anteriores [4]. Esto puede mostrar que existe posiblemente alguna rotación o disposición de los hongos, con respecto al tiempo o inclusión de los mismos desde campo.

Tabla I. Los hongos y otros microorganismos aislados de las diferentes etapas del proceso

Microorganismo	C (%)	G (%)	E (%)
<i>A. flavus</i>	0,00	1,35	0,00
<i>A. fumigatus</i>	0,00	2,20	3,03
<i>A. niger</i>	10,17	3,75	0,00
<i>A. terreus</i>	8,33	10,00	2,82
<i>Basipetospora</i> sp.	0,00	0,00	0,63
<i>Fusarium</i> sp.	0,00	1,90	10,29
<i>Fusarium</i> sp.	0,00	0,99	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	0,00	0,17	1,90
<i>Mucor</i> sp.	54,02	16,66	10,35
<i>Penicillium</i> sp.	0,00	2,07	0,63
<i>Penicillium</i> sp.	5,70	1,16	0,63
<i>Penicillium</i> sp.	0,00	0,79	0,32
<i>Penicillium</i> sp.	0,6	0,70	0,00
<i>Rhizopus stolonifer</i>	4,40	4,95	0,00
<i>Schizophyllum</i> sp.	11,62	26,03	52,29
<i>Syncephalastrum</i> sp.	0,00	18,41	4,22
<i>T. harzianum</i>	0,00	0,19	0,00
<i>T. viride</i>	0,00	4,83	0,73
Bacterias	2,52	0,00	0,41
Levaduras	2,63	3,86	11,74

C= Calefacción; G= Germinación; E= Embriones
Fuente: autores

Los hongos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Schizophyllum* sp. se presentan como contaminantes de semillas de palma de aceite. *Schizophyllum* sp. es conocido como contaminante de semillas de palma de aceite y logra disminuir la tasa de germinación por debajo del 65% y es

prevalente en todo el proceso del 11-52% [9],[10].

El efecto antagónico de *T. harzianum* y *T. viride* sobre los hongos contaminantes aislados seleccionados (Tabla II).

Evaluación de *Trichoderma* sobre hongos contaminantes de semillas de palma híbrida interespecífica OxG (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*)

Tabla II. Valores de PICR obtenido de las cuatro cepas de *Trichoderma* sp. sobre hongos contaminantes prevalentes.

		<i>TharC</i>	<i>TharN</i>	<i>TvirC</i>	<i>TvirN</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IPS01	55 b III	50 b I	62 a IV	59 a IV
<i>Aspergillus niger</i>	IPS02	47 a 0	18 c 0	43 a I	35 b IV
<i>Aspergillus terreus</i>	IPS03	57 a 0	44 c 0	61 a 0	61 b II
<i>Fusarium</i> sp.	IPS04	69 c 0	68 c 0	85 a IV	76 b IV
<i>Fusarium</i> sp.	IPS05	30 b 0	24 b 0	59 a IV	52 a II
<i>Mucor</i> sp.	IPS06	66 c I	60 b 0	70 ab IV	71 a II
<i>Penicillium</i> sp.	IPS07	25 b 0	20 b 0	43 a III	47 a IV
<i>Penicillium</i> sp.	IPS08	23 b 0	16 b 0	52 a IV	43 a 0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	IPS09	37 a IV	32 b III	39 a IV	31 b IV
<i>Schizophyllum</i> sp.	IPS10	43 c 0	34 d 0	65 a I	53 b 0
<i>Syncephalastrum</i> sp.	IPS11	66 b 0	60 c 0	80 a IV	73 a IV

Las medias seguidas por la misma letra en la fila no difieren entre si por la prueba de Tukey (P<0,05)

Grados de escala MICMO: 0: No invasión de superficie de patógeno; I: Invasión del 25% de la superficie del patógeno; II: Invasión del 50% de la superficie del patógeno; III: Invasión total de la superficie del patógeno; IV: Invasión total y esporulación sobre la superficie del patógeno.

Fuente: autores

Al comparar el efecto antagonico de las cuatro cepas de *Trichoderma* frente a los hongos contaminantes seleccionados se observan diferencias significativas en todos los tratamientos (P=0.0). El tratamiento TvirC fue el mayor controlador de hongos, inhibiendo el crecimiento de seis de los once hongos estudiados en por lo menos el 60% de PICR, el cual es el valor determinado para una cepa promisorio de uso como antagonista [11], además micoparasitó y esporuló sobre la superficie de ocho cepas de hongos contaminantes estudiados.

Se observa grandes diferencias entre los valores de PICR para los enfrentamientos entre las cuatro cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* sp., demostrando la necesidad de especificidad del hongo antagonista sobre el hongo fitopatogeno. Este enfrentamiento ha evidenciado valores de PICR promisorios en aislamientos realizados en maíz (73%) [12] y Maracuya (65%) [7].

Ensayos *in vitro* de *Trichoderma* pueden presentar inhibición y micoparasitismo sobre *Schizophyllum* sp. el cual hace parte de los hongos alimentados de madera en

descomposición, sin embargo, estudios han demostrado que esta actividad disminuye al realizar ensayos *in vivo* sobre bloques de madera [13],[9].

Algunos géneros como *Mucor* sp., *Syncephalastrum* sp. y *Rhizopus* sp. no están documentados como patógenos de semillas de palma; sin embargo, estos se aislaron con frecuencia en las muestras tomadas, siendo *Syncephalastrum* sp. uno de los hongos que se presentó en las tres fases estudiadas.

4. Conclusiones

Las cuatro cepas de *Trichoderma* sp. inhibieron el crecimiento de los hongos contaminantes de semillas de palma híbrida interespecífica.

La cepa de *T. viride* comercial es la más promisorio para el uso como antagonista, debido a que inhibe en gran medida al menos 60% de PICR en seis de los once hongos estudiados. Además, esta cepa presentó micoparasitismo en diez de los once hongos evaluados y en ocho de ellos colonizó y esporuló la mitad o más del micelio del patógeno.

5. Referencias

- [1] Indupalma, “Informe de sostenibilidad 2011”, 2001. [En línea]. Disponible en: http://www.indupalma.com/sites/default/files/file_attach/Informe%20Sostenibilidad%20INDUPALMA%202010-2011.pdf.
- [2] S. Mora, C. Chinchilla, A. Sanchez y R. Escobar, “Innovación en los procesos para mejorar la calidad de las semillas germinadas y de las planturas de palma de aceite”. *Palmas*, vol. 28. no. especial, tomo 1, pp. 265-272, 2007.
- [3] A. Sanchez Potes, “Enfermedades de la palma de aceite en América Latina”. *Palmas*, vol 1, no. 4, pp. 5-38, 1990.
- [4] A. Corena, C. Zambrano y A. Gualdrón, “Evaluación in vitro de fungicidas para el control de hongos patógenos en semillas híbridas *Elaeis guineensis* jacq x *Elaeis oleifera* Bailey, en el germinador de Indupalma Ltda. San Alberto, Cesar”. Tesis de Grado Profesional Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad de Santander, Bucaramanga, 2011.
- [5] M. Chavez, “Producción de *Trichoderma* sp y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)”, Tesis de Grado Profesional Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá DC, 2006.
- [6] H.L. Barnett and B.B. Hunter, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, Fourth Edition, St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, 1998.
- [7] R.J Fernandez Barbosa y C.L Suarez Meza, “Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlechr F. sp *passiflorae* en Maracuya (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana”. *Revista Facultad Nacional Agronómica de Medellín*, vol 62, no 1, pp. 4743-4748, 2009.
- [8] M. Ezziyani, S. Perez, M. Requena, L. Rubio y M. Candela, “Biocontrol por *Streptomyces rochei* de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*”, *Anales de Biología*, vol 26, pp. 69-78, 2004.
- [9] A. Dikin, K. Sijam, Z.A Mior Ahmad, and I. Abu Sean, “Biological Control of Seedborne pathogen of oil palm, *Schizophyllum commune* Fr. With antagonistic Bacteria”, *International Journal of Agriculture & Biology*, vol. XX, pp. 507-512, 2003.
- [10] T. Agarwal, A. Malhotra, M. Biyani, and P. Trivedi, “In vitro interaction of *Trichoderma* isolates against *Aspergillus niger*, *Caetomium* sp. and *Penicillium* sp”, *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, vol. 1, no 3, pp. 125-128, 2011.
- [11] R. Noveriza and T.H Quimio, “Soil Mycoflora of black pepper rhizosphere in the philippines and their *in vitro* antagonism against *Phytophthora capsici* L”, *Indonesian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 1-10, 2004.
- [12] S. Suhaida, and M.Z Nur AinIzzati, “The efficacy of *Trichoderma harzianum* T72s as a biocontrol agent of *Fusarium* ear rot disease of maize”. *International Journal of Agriculture and Biology*. vol. 15, pp. 1175-1180, 2013.

- [13] T. Highley and J. Ricard, “Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against wood decay fungi”, *Material und Organismen*, vol. 23, pp. 157- 169, 1988.