

Efecto de diversos aislamientos de *Trichoderma* spp. en la absorción de nutrientes en fríjol (*Phaseolus vulgaris*) en dos tipos de suelo

The effect of various isolates of *Trichoderma* spp. on nutrient uptake in beans (*Phaseolus vulgaris*) in two soil types

LILLIANA HOYOS-CARVAJAL^{1, 4}

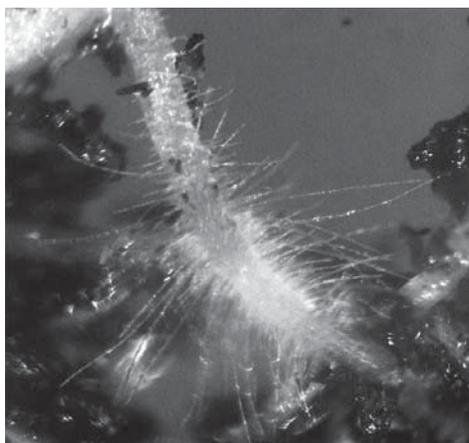
ANDRÉS CARDONA²

WALTER OSORIO³

SERGIO ORDUZ³

Raíces inoculadas con *Trichoderma*.

Foto: L. Hoyos-Carvajal



RESUMEN

Trichoderma es un género de hongos ampliamente conocido por la supresión de patógenos y la promoción del crecimiento en plantas, aumentando la disponibilidad y la absorción de nutrientes, incrementando concentraciones foliares de nutrientes en diferentes plantas. Con el objetivo de probar y prospectar el uso agrícola de aislamientos nativos colombianos, siete aislamientos previamente seleccionados en pruebas in vitro fueron probados para medir su efecto sobre los niveles de nutrientes y variables de crecimiento en fríjol bajo condiciones de invernadero. Para ello se sembraron las plantas en un andisol y en un ultisol como sustrato, luego estas fueron inoculadas con las diferentes cepas de *Trichoderma*. En estas plantas de fríjol se cuantificó el tiempo para alcanzar las diferentes etapas o estadios del cultivo. En floración se midieron área foliar, número de nudos y materia seca así como la concentración foliar de N, P, K, S, Mg, Ca, Fe, Zn, B, Cu y Mn. En cuanto a solubilización de nutrientes, en plantas establecidas en andisoles, la inoculación con algunos aislamientos de *Trichoderma* incrementa las concentraciones foliares de Cu, Fe, Ca, Mg y K con diferencias estadísticas significativas. En ultisoles las concentraciones foliares de P y Cu son mayores en plantas de fríjol inoculadas con *Trichoderma*, ratificando el efecto positivo del hongo en la concentración foliar de nutrientes. Demostrando que la solubilización de nutrientes por *Trichoderma* es un fenómeno influenciado por el sustrato o suelo agrícola entre otros factores.

Palabras clave adicionales: microorganismos, solubilización, crecimiento, leguminosas.

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia).

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia).

³ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia).

⁴ Autor para correspondencia. limhoyosca@unal.edu.co

ABSTRACT

Trichoderma is a genus of fungi widely known for suppressing pathogens and promoting plant growth, enhancing the availability and absorption of nutrients and increasing foliar nutrient concentrations in different plants. With the goal of proving the prospect for agricultural use of Colombian native isolates, seven isolates that were previously selected in *in vitro* tests were tested to measure their effect on the nutrient levels and growth variables in beans grown under greenhouse conditions. The bean plants were sown in an Andisol and Ultisol, as the substrate, then they were inoculated with different strains of *Trichoderma*. The time these bean plants needed to reach the various stages of cultivation was assessed. For the flowering, the leaf area, number of nodes and dry matter and foliar concentrations of N, P, K, S, Mg, Ca, Fe, Zn, B, Cu and Mn were measured. In terms of nutrient solubilization in the plants established in Andisols, inoculation with the *Trichoderma* strains increased the foliar concentrations of Cu, Fe, Ca, Mg and K, with statistically significant differences. With the Ultisoles, the foliar concentrations of P and Cu were higher in the bean plants inoculated with *Trichoderma*, confirming the positive effect of the fungus on the leaf nutrient concentrations and demonstrating that nutrient solubilization by *Trichoderma* is a phenomenon influenced by the substrate or agricultural soil.

Additional key words: microorganisms, solubilization, growth, Leguminosae.

Fecha de recepción: 17-09-2015

Aprobado para publicación: 20-11-2015

INTRODUCCIÓN

La solubilización de elementos minerales es un fenómeno de gran importancia en los suelos agrícolas ya que tanto los macro como los micronutrientes se hallan en un complejo y dinámico equilibrio, influenciado, entre otros, por el pH y la microflora del suelo. Esta, mediada por microorganismos, resulta bastante común e importante, pero su uso en agricultura no es masivo, y se remite a casos en los cuales ocurren translocación de nutrientes, tales como micorrizas, bacterias fijadoras de nitrógeno (N) bien sea simbióticas o de vida libre (Nehra y Choudhary, 2015). Dentro de estos microorganismos se incluyen cepas con habilidades específicas de solubilización de minerales pertenecientes a los géneros de hongos como *Mortierella*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Trichoderma* (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009a; Osorio y Habte, 2014; Yadav *et al.*, 2011; Woo *et al.*, 2014). De entre estos, *Trichoderma* es un género de hongos ampliamente conocido y el cual tiene en agricultura

bondades como el establecimiento de una comunidad microbiana antagónica en la rizosfera; la supresión de patógenos; la promoción del crecimiento; elicitación de resistencia a estreses bióticos y abióticos y aumento de la disponibilidad y la absorción de nutrientes (Vinale *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2014). *Trichoderma* es un hongo que crece libremente en sustratos o medios axénicos, siendo su multiplicación mucho más simple que otros microorganismos, además tiene una fuerte capacidad de movilizar y tomar nutrientes en el suelo, lo cual lo hace un bioinoculante eficiente y competitivo (Vinale *et al.*, 2014).

Se ha demostrado la habilidad de aislamientos específicos o cepas de *Trichoderma* para llevar minerales a formas disponibles por las plantas minerales bajo sistemas *in vitro* e *in vivo* reportando solubilización o aumentos en concentraciones foliares de nutrientes como Ca, Mg, P, Na, Fe y K (Altomare *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2015;

Rawat y Tewari, 2011; Singh *et al.*, 2014; Yobo *et al.*, 2009); en estos se encuentra que los atributos de solubilización de minerales son específicos de aislamientos y no están ligados a taxa o especies particulares y son dependientes de la forma química del mineral y genotipo de la planta (Tucci *et al.* 2011). En algunos de estos trabajos como los realizados por Cuevas (2006) y Srivastava *et al.* (2006) se demuestra que la inoculación con *Trichoderma* aumenta los rendimientos y calidades de cosecha en cultivos; y se documenta la disminución en uso de fertilizantes cuando se aplica este *Trichoderma*, obteniendo resultados similares o superiores en comparación con dosis comercialmente usadas (Ortega-García *et al.*, 2015).

De acuerdo con estos antecedentes *Trichoderma* spp. tiene efecto sobre la solubilización de elementos minerales del suelo, los aislamientos que estimulan crecimiento en plántulas de fríjol (*P. vulgaris* var. Cargamanto Mocho) empleados por Hoyos-Carvajal *et al.* (2009b) generan incremento o variación en la toma de nutrientes y de esta forma puede ser explicada la promoción del crecimiento en la planta. Para lo cual se plantea como objetivo de esta investigación analizar la toma de elementos mayores (N, P, K, Mg, S y

Ca) y menores (Fe, Zn, Bo, Cu, Mn) en plantas de fríjol en periodo de prefloración, inoculadas con aislamientos *Trichoderma* que estimulan crecimiento en dicha planta en andisoles y ultisoles usados como sustratos en los experimentos, al ser tipos de suelos comunes en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de *Trichoderma*

Fueron usados diez aislamientos provenientes del cepario de la Corporación para Investigaciones Biológicas (Medellín, Colombia), previamente seleccionados por estimulación o inhibición de crecimiento de fríjol (Hoyos-Carvajal *et al.* 2011) e identificados en investigaciones anteriores (Hoyos-Carvajal *et al.* 2009a) (tabla 1).

Pruebas de toma de nutrientes en plántulas bajo condiciones de invernadero

Con el fin de probar la actividad de las cepas de *Trichoderma*, se sembraron plántulas de fríjol en estado 03 de la escala BBCH, estas fueron sembradas en un suelo inoculado con una solución

Tabla 1. Aislamientos de *Trichoderma* empleados en experimentos de nutrición en fríjol (*P. vulgaris* var. Cargamanto mocho).

Aislamientos	Código	Efecto sobre plántulas de fríjol	Test <i>in vitro</i> de producción de metabolitos ¹		
			Solubilización de fosfato	Producción de sideróforos	Producción de AIA y/o análogos
<i>T. harzianum</i>	T02	Inhibición	+	-	-
<i>T. virens</i>	T08	Estimulación	-	-	-
<i>T. harzianum</i>	T15	Estimulación	-	-	-
<i>T. harzianum</i>	T17	Estimulación	-	-	-
<i>T. longibrachiatum</i>	T18	Estimulación	-	-	-
<i>T. asperelloides</i>	T25	Estimulación	-	-	-
<i>T. asperellum</i>	T30	Inhibición	+	-	+
<i>T. asperellum</i>	T31	Estimulación	-	-	+
<i>T. asperellum</i>	T46	Estimulación	-	-	+
<i>T. reesei</i>	T118	Estimulación	+	-	-

¹ Hoyos-Carvajal *et al.* (2009a).

de cada una de las cepas a 1×10^5 conidias/g. El control fue asperjado con agua destilada estéril. Cada maceta contenía 1,5 kg de suelo, mantenido a una humedad entre el 50-60% de la capacidad máxima de retención (MCRH). Las condiciones ambientales fueron una temperatura de 18 a 25°C, humedad relativa 60% y un ciclo 12 h luz:oscuridad. Un primer experimento se realizó con horizonte A de un andisol como sustrato (pH 5,8, materia orgánica 26,4%, Fe 162 mg kg⁻¹, Mn 3 mg kg⁻¹, Cu 14 mg kg⁻¹, Zn 2 mg kg⁻¹) y para el segundo experimento se seleccionaron los aislamientos con mejor comportamiento en términos de aumento de concentraciones foliares de nutrientes, como sustrato de siembra se empleó un ultisol (pH 4,9, materia orgánica de 7,1%, Fe 140 mg kg⁻¹, Mn 51 mg kg⁻¹, Cu 3 mg kg⁻¹, Zn 3 mg kg⁻¹). Ambos suelos fueron tamizados y se les adicionó Ca, Mg, K, P, N, B según lo recomendado por Guerrero (1995). Las plantas fueron mantenidas condiciones de invernadero a una temperatura de 20 a 37°C en el día, 20 a 26°C en la noche, con una humedad relativa promedio de 38% día, 43% noche y un ciclo de luz de 12 h.

Análisis en plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. de crecimiento y desarrollo de plantas

Para cuantificar variables de crecimiento y desarrollo en ambos experimentos se monitorearon los parámetros altura de la planta (cm) medida desde el nivel del suelo hasta la altura del penúltimo nodo apical a intervalos de 10 d. En estado de floración (60 en escala BBCH) se determinó el área foliar (cm²/planta) para todas las hojas funcionales usando el Sistema ROOTEDGE 2.2c de USDA-ARS (Ames, Iowa) y se tomaron pesos secos de órganos aéreos (hojas, tallos y flores) y raíces (g/planta) por ser en este estado donde las concentraciones de nutrientes no se han empezado a translocar a la fuente vertedero (fruto). Para evaluar el efecto en desarrollo se cuantificaron los días a estados fenológicos de la escala BBCH los estados 12 (dos hojas enteras (primer par de hojas), desplegadas), 13 (tercera hoja verdadera

(primera hoja trifoliada), desplegada), 51 (primeros botones florales visibles fuera de las hojas) y 60 (primeras flores abiertas, esporádicamente). Se analizaron las concentraciones foliares de N, P, K, S, Mg, Ca, Fe, Zn, B, Cu y Mn siguiendo las metodologías de Rojas y Lora (1989) y Jones *et al.* (1991) en el laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Densidad de inóculo de *Trichoderma*

Se monitoreó la densidad poblacional de cada aislamiento de *Trichoderma* en el suelo en cada uno de los ensayos para esto se tomaron muestras de cada tratamiento a intervalos de 21 y 18 días para el primero y segundo ensayo respectivamente. Con estos se realizaron diluciones seriadas, las cuales se sembraron por triplicado en PDA con Igepal (0,5%, p:v) como detergente (Porras *et al.*, 2007). Después de 3-5 d de incubación se contaron las colonias por caja de Petri y se calculó la concentración de cada aislamiento de *Trichoderma*.

Diseño experimental

Se realizó un diseño completo al azar con 11 tratamientos (tabla 1) y cinco repeticiones (macetas) para el experimento I en el cual el sustrato fue el andisol, y para el experimento II, se emplearon cinco tratamientos y ocho repeticiones usando como sustrato el ultisol, tomando en ambos casos como unidad experimental una planta. El análisis estadístico empleado es el diseño completo al azar con una prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toma de nutrientes de plantas inoculadas con *Trichoderma* en un andisol

Concentración foliar de nutrientes. En las condiciones experimentales de plantas en andisoles, los elementos Ca, Mg, K, Fe y Cu mostraron

aumentos significativos con respecto al control cuando fueron inoculados con aislamientos de *Trichoderma* spp. (tabla 2). De todos estos elementos, el Cu es al cual todos los aislamientos empleados presenta respuesta de incrementos estadísticamente significativos en concentración foliar en plantas de *P. vulgaris*, seguido de K (*T. asperelloides* T25, *T. asperellum* T31 y T 46), Mg (*T. asperelloides* T25, *T. asperellum* T31 y T 46), Fe (*T. asperellum* T31 y T 46), y Ca (*T. asperellum* T46). Ninguno de los aislamientos aumentó significativamente los nutrientes N, Mn, Zn y B. *Trichoderma asperellum* T30 incrementó el porcentaje de P en el tejido de la planta con respecto al control pero sin presentar diferencias estadísticas significativas y *T. asperellum* T 46 disminuyó el nivel de este nutriente con respecto al control. Estos elementos solubilizados son una ventaja, de acuerdo con lo afirmado por McDaniel *et al.* (2012), ya que muchos andisoles en el mundo tienen problemas de fertilidad, basados en su fijación de P ya que estos suelos está conformados básicamente por arcillas TOT, con alto contenido de Al y en los que es común que se presenten decrecimientos en la concentración de cationes como Mg, Ca y K (Osorio y Habte, 2014).

Para esta prueba los aislamientos eficientes en solubilizar nutrientes o en aumentar los valores en partes foliares de plantas inoculadas con estos fueron *T. asperelloides* T25, *T. asperellum* T30, T30, T31 y T46, *T. virens* T08 y *T. longibrachiatum* T18. Aislamientos como *T. harzianum* T02 y T15 y *T. reesei* T118 presentaron menor capacidad de solubilizar nutrientes, pero ninguno de ellos fue igual o inferior al control no inoculado. Con respecto a los dos aislamientos seleccionados por inhibir crecimiento en semilleros de fríjol *T. harzianum* T02 y *T. asperellum* T30, el primero de ellos consistentemente tuvo el comportamiento esperado sin estimulación de crecimiento: sin embargo, no fue inferior al control. Por otro lado *T. asperellum* T30 presentó aumento en el porcentaje promedio de toma de P con respecto al control sin presentar diferencias estadísticas significativas, e incremento significativo en cantidades en $\mu\text{g g}^{-1}$ de

Cu y Fe. Los resultados arrojados en este primer experimento en términos de incremento foliar de nutrientes resultan ser de potencial utilidad, que requiere ser confirmados en otros tipos de suelos y por ello se emplea en el segundo ensayo un ultisol, suelo con alta capacidad de fijación de minerales

Crecimiento y desarrollo de las plantas. Para las condiciones en las que se realizó el primer experimento de invernadero, los aislamientos *T. harzianum* T17 y *T. longibrachiatum* T18 aumentaron significativamente el área foliar de plantas de fríjol y *T. asperelloides* T25 el número de nudos, pero no se reflejó en aumento de las variables materia seca aérea ni de raíces (resultado no mostrado). Los ensayos de semillero realizados por Hoyos-Carvajal *et al.* (2009a) sobre plantas de fríjol demuestran que en el estadio 13 de la escala BBCH, en la cual hay emergencia del primer par de hojas trifoliadas, se presenta una respuesta diferencial en parámetros fisiológicos debida a aplicaciones de algunos aislamientos de *Trichoderma* spp. Según los resultados encontrados aquí, en etapas posteriores de desarrollo fisiológico como la floración (estadio 60 escala BBCH) las respuestas a inoculaciones con *Trichoderma* son muy moderadas con respecto a los controles no inoculados. Esta supuesta inconsistencia o discontinuidad en estimulación de crecimiento vista desde el crecimiento y desarrollo de la planta, resulta común en ensayos con microorganismos, ya que las respuestas de promoción de crecimiento, además de depender del aislamiento utilizado y su tipo de interacción con tejidos de la planta y exudados radicales, también obedece a la concentración de inóculo aplicada, la forma de aplicación del inóculo y de factores edáficos y ambientales como pH, temperatura y humedad (Lu *et al.*, 2004). Pero en el caso concreto puede indicar que la estimulación de crecimiento puede ser dependiente también de la etapa fisiológica de la planta; no obstante crecimiento inicial acelerado puede favorecer la planta por escape de enfermedades propias de patógenos que atacan en estados iniciales, como fue demostrado bajo

sistemas *in vitro* para los aislamientos *T. harzianum* T17, *T. asperelloides* T25 y *T. harzianum* T31 y T46 (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2011), en el caso de *T. asperelloides* T25 se sabe que este aislamiento

puede disminuir el ataque de *Rhizoctonia solani* significativamente con respecto al control en plantas de algodón en estados iniciales (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008).

Tabla 2. Efecto de *Trichoderma* spp. en la concentración foliar de elementos en plantas de frijol (*P. vulgaris*) sembradas en un andisol. Los valores representan la media individual de los nutrientes para cada tratamiento.

Aislamientos	%					$\mu\text{g g}^{-1}$				
	N	P	Ca	Mg	K	Fe	Mn	Cu	Zn	B
<i>T. harzianum</i> T02	4,94 a	0,10 ab	0,81 bc	0,31 b	1,65 ab	86 bc	80 a	3 bc	57 a	57 a
<i>T. vires</i> T08	4,92 a	0,08 ab	1,18 abc	0,43 ab	1,59 ab	131 ab	109 a	3 bc	56 a	74 a
<i>T. harzianum</i> T15	4,39 a	0,08 ab	0,62 c	0,20 b	0,49 b	135 ab	111 a	3 bc	67 a	74 a
<i>T. harzianum</i> T17	5,66 a	0,10 ab	0,68 bc	0,30 ab	1,44 ab	93 bc	94 a	4 ab	49 a	77 a
<i>T. longibrachiatum</i> T18	5,93 a	0,10 ab	0,97 abc	0,31 ab	1,45 ab	110 abc	71 a	2 cd	48 a	58 a
<i>T. asperelloides</i> T25	4,65 a	0,09 ab	2,03 ab	0,58 a	3,29 a	123 ab	100 a	5 a	53 a	75 a
<i>T. asperellum</i> T30	5,22 a	0,11 a	2,16 abc	0,31 ab	1,61 ab	157 a	66 a	4 ab	57 a	66 a
<i>T. asperellum</i> T31	4,37 a	0,09 ab	1,48 abc	0,58 a	3,51 a	107 abc	106 a	4 ab	53 a	86 a
<i>T. asperellum</i> T46	3,27 b	0,08 ab	4,54 a	0,52 a	3,41 a	171 a	88 a	3 abc	56 a	57 a
<i>T. reesei</i> T118	5,48 a	0,08 ab	0,59 c	0,20 b	0,51 ab	75 c	77 a	4 abc	46 a	56 a
Control	5,58 a	0,09 ab	0,67 bc	0,21 b	0,49 b	88 bc	56 a	1 d	44 a	59 a

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

Tabla 3. Efecto de *Trichoderma* spp. en crecimiento en plantas de frijol sembradas en un andisol¹.

Aislamientos	Parámetros de crecimiento ²	Parámetros nutricionales incrementados ²	Antagonismo <i>in vitro</i> de patógenos del suelo ³	Aislamientos endófitico ⁴
<i>T. harzianum</i> T17	Área foliar	Cu	Sp1, Sh2, Ra1	Si
<i>T. asperelloides</i> T25	No. nudos	Mg, K, Fe y Cu	Sp1, Sh2, Ra1	No
<i>T. asperellum</i> T31	–	Mg, K y Cu	Sp1 y Sh2	Si
<i>T. asperellum</i> T46	–	Mg y Cu	Sp1, Sh2, Ra1	No

¹ Efectos determinados, basados en diferencias estadísticas significativas con respecto al control absoluto (ANAVA y Prueba de Duncan).

² Aumento en esta variable con respecto al testigo no inoculado.

³ Antagonismo *in vitro* alto según prueba de Kruskal-Wallis sobre *Sclerotium rolfsii* aislamientos Sp1 y Sh2 y *Rhizoctonia solani* Ra1 (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2011).

⁴ Hoyos-Carvajal *et al.* (2009b).

Toma de nutrientes de plantas inoculadas con *Trichoderma* en un ultisol

Concentración foliar de nutrientes. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en el experimento anterior, para el siguiente ensayo se seleccionaron los aislamientos indicados en la tabla 3 por presentar las características allí descritas y por la consistencia en los resultados encontrados en pruebas en estados de desarrollo 13 y 60 de la planta de fríjol; el comportamiento no estable en experimentos de los aislamientos *T. virens* T08, *T. harzianum* T15, y *T. reesei* T118 sugiere una alta influencia del ambiente en las propiedades de los aislamientos como ha sido reportado antes por otros autores (Bailey y Lusmdem, 1998) y el aislamiento *T. longibrachiatum* T18 por pertenecer a una sección del género *Trichoderma* que puede potencialmente ser riesgosa en salud humana (Druzhinina *et al.*, 2008; Thornton y Wills, 2013).

En el experimento II las plantas se sembraron en un ultisol, se eligió este tipo de suelo por ser, junto con los oxisoles, los suelos dominantes en la extensa región de tierras bajas de Suramérica tropical y por sus propiedades químicas desfavorables, que lo convierten en un buen candidato para evaluar el potencial de un microorganismo como biofertilizante y que se caracterizan por fuerte acidez, toxicidad de Al y/o Mn, baja disponibilidad de P, baja capacidad de intercambio catiónico y deficiencias de la mayoría de nutrientes esenciales para las plantas (Baquero, 2012).

El incremento de crecimiento de aislamientos de *Trichoderma* sobre plantas ha sido demostrado numerosas veces en ambientes con suelos con contenido mineral limitado, sugiriendo un rol directo de *Trichoderma* spp. en la solubilización y acumulación de elementos en plantas. En cuanto a las condiciones nutricionales, cuando las plantas son inoculadas con *Trichoderma* en ultisoles, en contraste con el experimento anterior sembradas en andisoles, se presentó una respuesta favorable, con diferencias estadísticas significativas con respecto al control en la toma de P (*T. harzianum*

T17 y *T. asperelloides* T25), Mn (*T. asperellum* T46) y B (*T. harzianum* T17) y se mantuvo consistente la respuesta de incremento de niveles de K (*T. harzianum* T17, *T. asperelloides* T25, *T. asperellum* T31), Cu (*T. harzianum* T17, *T. asperelloides* T25, *T. asperellum* T46) y B (*T. asperelloides* T25 y *T. asperellum* T31 y T46). Para el Fe sucede que en el caso de *T. asperellum* T46, este finaliza el ensayo con cantidades debajo de los valores del control. Para este segundo ensayo, igual que en el caso anterior, ninguno de los aislamientos aumentó significativamente el N, tampoco Ca ni Mg donde todos los elementos tienen un comportamiento similar al control (tabla 4). La capacidad de incrementar los niveles de K por los aislamientos de *Trichoderma* resulta ser de alto potencial ya que el tipo de nutrientes solubilizados, especialmente K y Mg se hallan en bajas cantidades en ultisoles (Soil Survey Staff, 1999). Contrastando, en el andisol, la inoculación con *Trichoderma* spp. incrementa las concentraciones foliares de Ca, Mg, K, Cu y Fe en plantas de fríjol diferencialmente según el aislamiento aplicado. El experimento 2 llevado a cabo sobre un ultisol ratificó que las concentraciones foliares de Cu son mayores en plantas de fríjol inoculadas con *Trichoderma* spp. y en este suelo algunos aislamientos tienen efecto sobre P y Mn, pero no así en los otros elementos probados en el andisol.

El Cu, el cual es el elemento consistentemente incrementado en tejidos de plantas inoculadas con diferentes aislamientos *Trichoderma* spp. bajo las condiciones experimentales empleadas en los dos ensayos, indicando que el hongo facilita su solubilización a la solución del suelo y propicia un aumento de la concentración de este elemento en la planta, es deficiente en suelos ácidos, tal como sucede con el P, y por ello, estos resultados resultan de potencial aplicación. Lo encontrado en esta investigación es consistente con los efectos sobre algunos nutrientes foliares reportados por algunos investigadores como Ögüt y Er (2006) quienes mencionan el aumento en Cu sobre plántulas de fríjol inoculadas con *T. harzianum*. Singh *et al.* (2014) encuentran que las cepas *T. harzia-*

Tabla 4. Efecto de *Trichoderma* spp. en la concentración foliar de elementos en plantas de fríjol sembradas en un ultisol¹.

Aislamientos ²	N	P	Ca	Mg	K	Fe	Mn	Cu	Zn	B
	%					μg g ⁻¹				
<i>T. harzianum</i> T17	3,09 a	0,10 ab	1,66 a	0,45 b	2,13 ab	231 b	69 d	4,5 bc	34 bc	166 a
<i>T. asperelloides</i> T25	4,12 a	0,11 a	1,83 a	0,47 ab	2,22 ab	317 ab	80 bcd	5,9 a	35 abc	147 ab
<i>T. asperellum</i> T31	3,75 a	0,09 bc	1,76 a	0,45 b	2,09 ab	354 ab	80 bcd	5,5 ab	32 c	146 ab
<i>T. asperellum</i> T46	4,46 a	0,09 bc	1,71 a	0,46 ab	1,99 b	121 a	86 abc	5,6 ab	36 abc	117 b
Control	4,02 a	0,06 c	1,73 a	0,46 ab	1,96 b	242 b	75 cd	3,6 c	34 bc	163 a

¹ Los valores representan la media individual de los nutrientes para cada tratamiento.

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

num BHU51 y BHU105 incrementan el contenido mineral de N, P, K, Ca, Mg Zn, Mn, Cu y Fe en plántulas de tomate variedad Navodya en comparación con los testigos sin adición de *T. harzianum* BHU51 y BHU105 pero inoculados con *Rhizoctonia* en un Inceptisol. Yedida *et al.* (2001) en suelo natural estéril bajo condiciones de invernadero demuestran que *T. harzianum* T-203 incrementó la concentración foliar de P, Cu, Mn y Zn en plantas de pepinos sembradas bajo sistema hidropónico de P, Cu y Fe en la misma planta sembrada. El aumento de la concentración foliar de P, Cu y Fe, los cuales son de baja movilidad en los tipos de suelos empleados en estos ensayos, demuestran que hay que tener en cuenta que este comportamiento de *Trichoderma* está asociado a factores ambientales ya mencionados y la planta, pero también con los mecanismos de fijación de estos minerales en el sustrato. Un ejemplo de esto lo constituyen los fosfatos, los cuales posiblemente pueden ser solubilizados a partir de fuentes orgánicas u otras, como evidentemente ocurre en el experimento 2 con el ultisol, pero en el caso del andisol en el experimento 1, la forma en la cual ocurre fijación de fosfatos no permite que el efecto de *Trichoderma* sea notorio, ya que puede ser fijado de forma fuerte y estable hasta un 95% del fósforo o fosfato aplicado en el suelo, no permitiendo que se observe un posible efecto de solubilización en esta clase de sustrato, como ha sido reportado por Weil (2000) en aplicaciones de fosfatos en andisoles

africanos.

Lo anterior tiene implicaciones prácticas en agricultura, e indica que debe tenerse en cuenta que el efecto de microorganismos que solubilizan fosfatos en suelo entre otros, es dependiente de los fenómenos de fijación que operan en el suelo y que además pueden ser direccionadas por las posibles interacciones con otros microorganismos como lo reportan Yobo *et al.* (2009) en aplicaciones simultáneas de *Trichoderma* y *Bacillus* sobre *P. vulgaris*, en estas plantas se incrementa la concentración de N, pero cuando se aplica únicamente *T. atroviride* SY3A se incrementa la concentración foliar de P.

Crecimiento y desarrollo de las plantas. Al evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. en el crecimiento del fríjol en un Ultisol se observó que las plantas tratadas con *T. harzianum* T-17, *T. asperellum* T-25, T-31 y T-46 no mostraron incrementos en crecimiento ni desarrollo o diferencias estadísticas significativas en estos parámetros con respecto al control. Por tanto, igual que en el caso de nutrientes, la respuesta de la planta a la inoculación con *Trichoderma* difiere por especies de plantas, estado fisiológico de esta o tipos de suelos, es decir la combinación planta/ambiente direcciona la naturaleza de la respuesta obtenida en la estimulación de crecimiento. Una serie de experimentos realizados por varios investigado-

res en dos aislamientos documenta claramente esta situación, observaciones iniciales realizadas por Baker *et al.* (1984) reportan aumentos de 2,74 veces en materia seca en plantas de rábano (*Raphanus sativus*) después de tratarlas con *T. harzianum* T-95. Posteriormente Chang *et al.* (1986) realizan ensayos con la misma cepa *T. harzianum* T-95 y adicionalmente con *T. harzianum* T-203 para probar su actividad en incrementar el crecimiento en varios cultivos ornamentales y hortícolas, encontrando que en plantas de fríjol var. Brittle Wax y rábano var. Chuma inoculadas con T-95 y T-203 no hubo respuestas de crecimiento. En un estudio similar se confirmó que *T. harzianum* (T-203) no estimula el crecimiento de fríjol ni rábano; sin embargo, sí incrementa el crecimiento de plantas de melón, tomate y pimienta (Kleifeld y Chet, 1992).

En las condiciones de este estudio en el segundo experimento, la tasa de crecimiento evaluada en función de la altura y la tasa de desarrollo determinada como tiempo para alcanzar cada etapa, tampoco presentaron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con los aislamientos de *Trichoderma* spp. y el entre los 10 y 44 d. Las variables como materia seca no arrojaron diferencias significativas, otros parámetros como la aceleración en la madurez fisiológica, son indicadores de un efecto negativo en rendimientos del cultivo, ya que ambas variables, madurez fisiológica y rendimiento, guardan una correlación significativa y negativa. Para el caso no hubo diferencias en madurez fisiológica, y, por consiguiente, puede inferirse que los aislamientos de *Trichoderma* no aceleran el desarrollo de la planta, por tanto no afectarán de forma negativa los rendimientos.

Densidad de inóculo de *Trichoderma* en suelos. En la tabla 5 se muestra comparativamente la concentración de los aislamientos en los dos suelos, sugiriendo una adaptación a estos ambientes dadas las cantidades a las cuales se

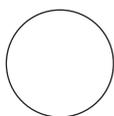
encuentran. *Trichoderma* spp. usualmente es inoculado en plantas, empleando por lo general una concentración aproximada a 10^5 ufc g^{-1} en el suelo o en el sustrato, tal densidad de hongo provee una efectiva interacción de *Trichoderma* con plantas y una alta capacidad de competencia en el suelo. Li *et al.* (2015) revelan que una cepa de *Trichoderma* SQR-T037 cepa comercial que solubiliza minerales se mantiene del orden de $3,0 \times 10^4$ UFC g^{-1} en suelo seco, siendo para este caso, mucho mayor la concentración de los hongos en suelo bajo las condiciones experimentales actuales, es decir siendo más competitivos en el sustrato. Indicando que los aislamientos empleados de *Trichoderma* sobreviven en el suelo y sus poblaciones permanecen durante el lapso de tiempo evaluado.

Esto, unido a las características anteriormente mencionadas hace que los aislamientos de *Trichoderma* tengan un amplio potencial de uso en plantas de fríjol como enmienda biológica en suelos, teniendo en cuenta que su acción no es constante, es direccionada por el tipo de cepa (además de la concentración y formulación), en interacción con la planta (genotipo, estado fisiológico), el ambiente (humedad, temperatura), otros microorganismos (antagonismo y predación) y por supuesto el suelo y sus características edafológicas (tipo de suelo, forma química de elementos, arcillas, etc.) como se demuestra en el presente estudio.

Tabla 5. Supervivencia de aislamientos de *Trichoderma* spp. en dos diferentes tipos de suelos.

Aislamientos	UFC g^{-1} de suelo Andisol (42 ddi ¹)	UFC g^{-1} de suelo Ultisol (44 ddi)
<i>T. harzianum</i> T17	$1,69 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$
<i>T. asperelloides</i> T25	$1,03 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$
<i>T. asperellum</i> T31	$1,63 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$
<i>T. asperellum</i> T46	$2,14 \times 10^5$	$1,39 \times 10^5$

¹ ddi: 42 y 44 días después de inoculados a una concentración inicial de 1×10^5 ufc g^{-1} .



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altomare, C., W. Norvell, T. Björkman y G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2926-2933.
- Bailey, B.A. y R. Lumsden. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. pp. 185-204. En: Harman, G.E. y C.P. Kubicek (eds.). 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*, enzymes, biological control and commercial applications. Vol. 2. Taylor & Francis, London.
- Baker, R., Y. Elad e I. Chet. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis in biological control. *Phytopathology* 74, 1019-1021. Doi: 10.1094/Phyto-74-1019
- Baquero, J.E. 2012. Los minerales en el suelo. pp. 24-57. En: Manejo de la nutrición mineral en sistemas ganaderos de los Llanos Orientales de Colombia. Corpoica, Bogotá.
- Chang, Y., R. Baker, O. Kleifeld e I. Chet. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70, 145-148. Doi: 10.1094/PD-70-145
- Cuevas, V.C. 2006. Soil inoculation with *Trichoderma pseudokoningii* Rifai enhances yield of rice. *Philipp. J. Sci.* 135, 31-37.
- Druzhinina, I., M. Komon-Zelazowska, L. Kredics, L. Hatvani, Z. Antal, T. Belayneh y C. Kubicek. 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiol.* 154(11), 3447-3459. Doi: 10.1099/mic.0.2008/021196-0
- Gurrero R., R. (1995). Fundamentos técnicos para la fertilización de cultivos. Fertilidad de suelos: diagnóstico y control. pp. 247-281. En: Silva, M.F. (ed.) Fertilidad de suelos, diagnóstico y control. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Bogotá.
- Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet y S. Orduz. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agron. Colomb.* 26(3), 451-458.
- Hoyos-Carvajal, L., G. Duque y S. Orduz. 2011. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Rev. Colomb. Cienc. Hort.* 2(1), 76-86. Doi: 10.17584/rcch.2008v2i1.1175
- Hoyos-Carvajal, L., S. Orduz y J. Bissett. 2009a. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet. Biol.* 46(9), 615-631. Doi: 10.1016/j.fgb.2009.04.006
- Hoyos-Carvajal, L., S. Orduz y J. Bissett. 2009b. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol. Control.* 51(3), 409-416. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.07.018
- Jones, J., J. Wolf y H. Mills. 1991. Plant analysis handbook. Micro-macro publishing, Athens, GA.
- Kleifeld, O. e I. Chet. 1992. *Trichoderma harzianum* - interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil* 144, 267-272. Doi: 10.1007/BF00012884
- Li, R. X., F. Cai, G. Pang, Q. Shen, R. Li y W. Chen. 2015. Solubilization of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS ONE* 10(6). Doi: 10.1371/journal.pone.0130081
- Lu, Z. X., R. Tombolini, S. Woo, S. Zeilinger, M. Lorito y J.K. Jansson. 2004. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3073-3081. Doi: 10.1128/AEM.70.5.3073-3081.2004
- Marschner, P. (ed.). 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- McDaniel, P.A., D.J. Lowe, O. Arnalds y C.-L. Ping. 2012. Andisols. pp. 33.29-22.48. En: Huangg, P.M., Y. Li y M.E. Summer (eds.). Handbook of soil sciences. 2nd ed. Vol 1: Properties and processes. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nehra, V. y M. Choudhary. 2015. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. *J. Appl. Nat. Sci.* 7(1), 540-556.
- Ögüt, M. y F. Er. 2006. Micronutrient composition of field-grown dry bean and wheat inoculated with *Azospirillum* and *Trichoderma*. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169(5), 699-703. Doi: 10.1002/jpln.200520597

- Ortega-García, J.G., R. Montes-Belmont, M. Rodríguez-Monroy, J. Ramírez-Trujillo, R. Suárez-Rodríguez y G. Sepúlveda-Jiménez. 2015. Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. *Sci. Hortic.* 195, 8-16. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.027
- Osorio, N.W. y M. Habte. 2014. Soil phosphate desorption induced by a phosphate-solubilizing fungus. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 45(4), 451-460. Doi: 10.1080/00103624.2013.870190
- Porras, M., C. Barrau y F. Romero. 2007. Effects of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. *Crop Prot.* 26(5), 782-787. Doi: 10.1016/j.cropro.2006.07.005
- Rawat, R. y L. Tewari. 2011. Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. *Curr. Microbiol.* 62(5), 1521-1526. Doi: 10.1007/s00284-011-9888-2
- Rojas, E. y L. Lora. 1989. El análisis de suelos, plantas y aguas para riego. pp. 175-209. En: Rojas, E., G. González, A. García, L. Castillo, G. Ortiz, E. Amézquita, R. Lora y J. Navas (eds.). El análisis de suelos, plantas y aguas para riego. Manual ICA de Asistencia Técnica N° 47. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá.
- Singh, S.P., H.B. Singh, D.K. Singh y A. Rakshit. 2014. *Trichoderma*-mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Egyp. J. Biol.* 16(1), 29-38. Doi: 10.4314/ejb.v16i1.4
- Soil Survey Staff. 1999. *Soil Taxonomy*. 2nd ed. NRCS-USDA Agric. Handb. 436, U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC.
- Srivastava, S.N., V. Singh y S.K. Awasthi. 2006. *Trichoderma* induced improvement in growth, yield and quality of sugarcane. *Sugar Technol.* 8(2-3), 166-169. Doi: 10.1007/BF02943654
- Thornton, C.R. y O. Wills. 2013. Immunodetection of fungal and oomycete pathogens: established and emerging threats to human health, animal welfare and global food security. *Crit. Rev. Microbiol.* 41(1), 27-51. Doi: 10.3109/1040841X.2013.788995
- Tucci, M., M. Ruocco, L. De Masi, M. De Palma y M. Lorito. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol. Plant Pathol.* 12(4), 341-354. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, S.L. Woo, M. Nigro, R. Marra y M. Lorito. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* 8(Suppl-1, M5), 127-139.
- Weil, R.R. 2000. Soil and plant influences on crop response to two African phosphate rocks. *Agron. J.* 92, 1167-1175. Doi: 10.2134/agronj2000.9261167x
- Woo, S. L., M. Ruocco, F. Vinale, M. Nigro, R. Marra, N. Lombardi y M. Lorito. 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycol. J.* 8(1), 71-126. Doi: 10.2174/1874437001408010071
- Yadav, J., J.P. Verma y K.N. Tiwari. 2011. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian J. Biol. Sci.* 4(3), 291-299. Doi: 10.3923/ajbs.2011.291.299
- Yedidia, I., N. Benhamou e I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1061-1070.
- Yedidia, I., A. Srivastva, Y. Kapulnik e I. Chet. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235, 235-242. Doi: 10.1023/A:1011990013955
- Yobo, K.S., M.D. Laing y C.H. Hunter. 2009. Effects of single and dual applications of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on performance of dry bean seedlings grown in composted pine bark growth medium under shadehouse conditions. *J. Plant Nutr.* 32(8), 1271-1289. Doi: 10.1080/01904160903005996