

**RIONEGRO, MAYO 24 DE 2019**

**OBJETIVO:**

Evaluar la actividad biocontroladora que ejerce el hongo *Trichoderma asperellum* sobre huevos y larvas de nematodos *Meloidogyne* sp.

**PROCEDIMIENTO:**

Para llevar a cabo el ensayo, se extrajo 100 larvas de *Meloidogyne* sp. (Imagen 1) de suelo con poblaciones altas de dicho nematodo, con estas larvas se llevó a cabo los tratamientos que se describen a continuación:

**Tratamiento 1:** Sobre un vidrio de reloj se dispuso 1 ml de agua estéril y se le adicionó 20 larvas del nematodo *Meloidogyne* sp. más tres gotas del hongo *Trichoderma asperellum* (Ver anexo 1) sin realizar ninguna dilución al preparado proporcionado por el laboratorio de Producción de Bioquirama S.A.S. La solución obtenida se dispuso en una caja de Pretri sobre una porción de papel filtro, el cual, fue humedecido con agua estéril para evitar la deshidratación de las larvas; después de esto, se procedió a sellar la caja con papel vinipel, para disminuir el riesgo de contaminación. De este tratamiento se realizaron 2 repeticiones (Imagen 2).

**Tratamiento 2:** Sobre un vidrio de reloj se dispuso 1 ml de agua estéril y se le adicionó 20 larvas del nematodo *Meloidogyne* sp. más tres gotas del hongo *Trichoderma asperellum* en una concentración de 2cc por litro; esta dilución se hizo a partir del preparado proporcionado por el laboratorio de Producción de Bioquirama S.A.S. La solución obtenida se dispuso en una caja de Pretri sobre una porción de papel filtro, el cual, fue humedecido con agua estéril para evitar la deshidratación de las larvas; después de esto, se procedió a sellar la caja con papel vinipel, para disminuir el riesgo de contaminación. De este tratamiento se realizaron 2 repeticiones (Imagen 2).

**Tratamiento 3:** Sobre un vidrio de reloj se dispuso 1 ml de agua estéril y se le adicionó 20 larvas del nematodo *Meloidogyne* sp. más tres gotas de agua estéril. La solución obtenida se dispuso en una caja de Pretri sobre una porción de papel filtro, el cual, fue humedecido con agua estéril para evitar la deshidratación de las larvas; después de esto, se procedió a sellar la caja con papel vinipel, para disminuir el riesgo de contaminación. Este tratamiento es el testigo del ensayo (Imagen 2).

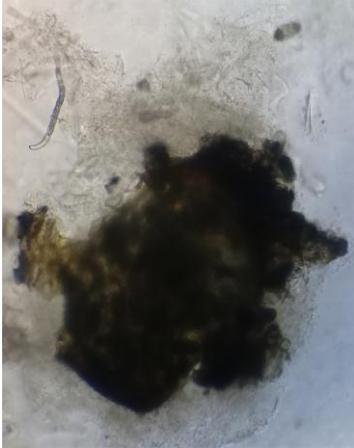
Además de realizar el ensayo con larvas, también se hizo con masas de huevos extraídas de raíces afectadas por *Meloidogyne* sp. (Imágenes 3 y 4). Los tratamientos realizados con estas masas de huevos y el hongo *Trichoderma asperellum* (Imagen 5) son los mismos que los realizados con las larvas (ver tratamientos 1, 2 y 3), excepto que aquí se utilizan masas de huevos y no larvas de *Meloidogyne* sp.

|  |  |
|--|--|
|  |  |
| <p><b>Imagen 1:</b> Larvas de <i>Meloidogyne</i> sp.</p> | <p><b>Imagen 2:</b> Tratamientos realizados con <i>T. asperellum</i></p> |

|   |   |  |
|---|---|--|
|   |   |  |
| <p><b>Imagen 3:</b> Masas de Huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. en raíces de Crisantemo</p> | <p><b>Imagen 4:</b> Masas de Huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. extraídas de raíces de Crisantemo</p> | <p><b>Imagen 5:</b> Tratamientos realizados con <i>T. asperellum</i></p> |

**RESULTADOS:**

Los tratamientos se realizaron el día 16 de Mayo de 2019 y para el día 20 de Mayo, 5 días después de la aplicación del *Trichoderma asperellum*, se empezó a observar el efecto del parasitismo causado, tanto a las masas de huevos como a las larvas de *Meloidogyne* sp., por parte del hongo *Trichoderma asperellum* (Imágenes 6 y 7).

|  |   |
|--|---|
|                    |          |
| <p><b>Imagen 6:</b> Masa de huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i></p> | <p><b>Imagen 7:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada por <i>T. asperellum</i></p> |

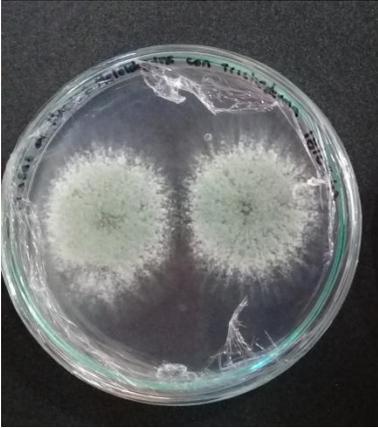
En el séptimo día, después del montaje del ensayo, se observó que los huevos que al quinto día presentaban inicios de parasitación, estaban completamente parasitados y por lo tanto inviables, es decir, destruidos y/o sin posibilidades de eclosión (Imágenes 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14).

|   |   |  |
|---|---|--|
|   |    |   |
| <p><b>Imagen 8:</b> Huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitados con <i>T. asperellum</i> 5 días después del inicio de tratamiento.</p> | <p><b>Imagen 9:</b> Huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitados con <i>T. asperellum</i> 6 días después del inicio de tratamiento.</p> | <p><b>Imagen 10:</b> Huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitados con <i>T. asperellum</i> 7 días después del inicio de tratamiento.</p> |

**EFFECTO DEL HONGO *Trichoderma asperellum* SOBRE HUEVOS  
Y LARVAS DEL NEMATODO *Meloidogyne* sp.**

|  |   |  |   |
|--|---|--|---|
|   |    |    |    |
| <p><b>Imagen 11:</b> Huevo de <i>Meloidogyne</i> sp. infectado por esporas de <i>T. asperellum</i> <b>5 días después</b> del inicio del tratamiento.</p> | <p><b>Imagen 12:</b> Huevo de <i>Meloidogyne</i> sp. infectado por esporas de <i>T. asperellum</i>. <b>6 días después</b> del inicio del tratamiento.</p> | <p><b>Imagen 13:</b> Huevo de <i>Meloidogyne</i> sp. infectado por esporas y con crecimiento de micelio de <i>T. asperellum</i>. <b>6 días después</b> del inicio del tratamiento.</p> | <p><b>Imagen 14:</b> Huevo de <i>Meloidogyne</i> sp. infectado por esporas y con crecimiento de micelio de <i>T. asperellum</i> <b>7 días después</b> del inicio del tratamiento.</p> |

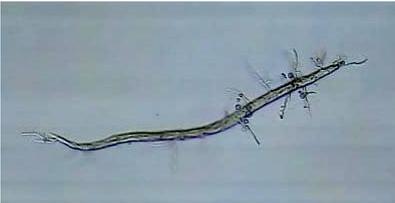
Dichos huevos y masas de huevos infectados, fueron sembrados en PDA acidificado para verificar el crecimiento del hongo *Trichoderma asperellum* y al tercer día, después de la siembra, se observó crecimiento de colonias características de dicho hongo (Imágenes 15 y 16) (ver anexo 1); por lo tanto, la inhabilidad de los huevos para eclosionar se le atribuye al parasitismo causado por este hongo antagonista.

|  |  |
|--|--|
|   |    |
| <p><b>Imagen 15:</b> Masas de huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. en PDA acidificado con crecimiento de <i>Trichoderma asperellum</i>, anverso de la caja de Petri.</p> | <p><b>Imagen 16:</b> Masas de huevos de <i>Meloidogyne</i> sp. en PDA acidificado con crecimiento de <i>Trichoderma asperellum</i>, reverso de la caja de Petri.</p> |

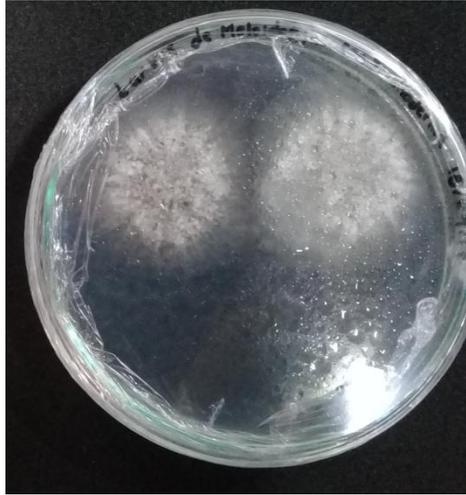
Por otra parte, las larvas parasitadas con *Trichoderma asperellum* se observaron con un movimiento más lento, con dificultad en su desplazamiento y varias de ellas se encontraron

muertas y con crecimiento de micelio al quinto día del tratamiento (Imágenes 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24).

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
|    |    |   |    |
| <b>Imagen 17:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>5 días después</b> del inicio del tratamiento. | <b>Imagen 18:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>5 días después</b> del inicio del tratamiento. | <b>Imagen 19:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>7 días después</b> del inicio del tratamiento. | <b>Imagen 20:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>7 días después</b> del inicio del tratamiento. |

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
|    |    |   |    |
| <b>Imagen 21:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>7 días después</b> del inicio del tratamiento. | <b>Imagen 22:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>7 días después</b> del inicio del tratamiento. | <b>Imagen 23:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>7 días después</b> del inicio del tratamiento. | <b>Imagen 24:</b> Larva de <i>Meloidogyne</i> sp. parasitada con <i>T. asperellum</i> <b>7 días después</b> del inicio del tratamiento. |

Algunas de las larvas muertas y con crecimiento de micelio, fueron pasadas a PDA acidificado para verificar el crecimiento del hongo *Trichoderma asperellum* y al tercer día, después de la siembra, se observó crecimiento de colonias características dicho hongo (Imágenes 25 y 26) (ver anexo 1); por lo tanto, la muerte de las larvas se le atribuye a la infección causada por este hongo.



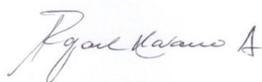
**Imagen 25:** Larvas de *Meloidogyne* sp. en PDA acidificado con crecimiento de *Trichoderma asperellum*, anverso de la caja de Petri.



**Imagen 26:** Larvas de *Meloidogyne* sp. en PDA acidificado con crecimiento de *Trichoderma asperellum*, reverso de la caja de Petri.

### CONCLUSIÓN:

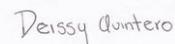
El hongo *Trichoderma asperellum* tiene una buena acción biocontroladora tanto en larvas como en huevos del nematodo *Meloidogyne* sp, por lo tanto, dicho hongo es un microorganismo controlador eficiente de las poblaciones de *Meloidogyne* sp., ya que, las larvas que logran salir del huevo, pueden ser parasitadas en sus estados juveniles y de esta manera controlar el crecimiento de la población del nematodo.



RAFAEL NAVARRO ALZATE  
Fitopatólogo, nematólogo



RODRIGO PATIÑO GUZMÁN  
Analista de Laboratorio



DEISSY QUINTERO ARCILA  
Bióloga, Analista de Laboratorio

## ANEXO 1

### Informe de identificación de Bacterias y hongos por PCR y secuenciación de fragmentos amplificados del segmento de ADNr de los genes 16S y 5.8S.

Juan Camilo Alvarez Díaz.  
Biólogo, M. Sc  
Laboratorio de Biología Molecular  
Universidad Católica de Oriente

#### Detalles del procedimiento.

Para la identificación de especies de bacterias se usaron los iniciadores **Back\_F** y **Back\_R** los cuales amplifican un fragmento del ADN correspondiente a la subunidad 16S bacteriana. Se secuenciaron ambos sentidos en este caso. Para los aislados de hongos se emplearon los iniciadores **ITS 5** e **ITS u4** los cuales amplifican un fragmento del ADNr de la subunidad 5.8S eucariota. Se secuenciaron ambos sentidos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el algoritmo BLAST contrastada contra la base de datos de nucleótidos no redundantes para hacer identificación de *novo*. A continuación se reporta el nombre de la identificación con mejor puntaje obtenido en el BLAST, de acuerdo con la identidad y cobertura de secuencia. Los valores de "E-value" cercanos a 0.0 indican una alta confiabilidad de la identificación. En todos los casos se emplearon solo las secuencias de buena calidad con valores de QC >25 el cual es el valor recomendado en la literatura para secuencias de ADN.

#### Resultados de identificación

**Muestra TRA0010** Nuestra identificación confirma la especie previamente reportada como *Trichoderma asperellum*

>Forward *Trichoderma asperellum*

```
TACCGAGTTTACAACATCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACAGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCC  
GGAACCAGGCGCCCGCCGAGGAACCAACCAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTC  
AAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AGAAATTCATTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTTCAGGCGGTATGTGAAGGTTCTGAGTCATTTGTTTT  
GTCTTGACGCAAAATGAGAACATGCTGGAATACTATATTTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCC
```

>Reverse *Trichoderma asperellum*

```
ACCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAAGTTGGGTGTTTTACGGACGTGGACGCGCCGCGCTCCCGGTGCGAGTTGTGCAAACTACA  
GCGCAGGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGTATTTTTGGGCCGGCACCCGTGTGAGGGGTCCCGATCCCCAACGCCGATACCCC  
GGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGC
```