

## Artículo original

# Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp)

Clemencia Guédez<sup>a,\*</sup>, Luis Cañizález<sup>a</sup>, Carmen Castillo<sup>a</sup> y Rafael Olivar<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Lab. de Fitopatología y Control Biológico "Dr. Carlos Díaz Polanco". Universidad de Los Andes;

<sup>b</sup> Ministerio de Educación. ETA. "Adolfo Navas Coronado".  
Estado Trujillo, Venezuela.

Recibido 16 de febrero de 2009; aceptado 03 de abril de 2009

**Resumen:** La podredumbre blanda (*Rhizopus stolonifer*), la podredumbre negra (*Mucor* spp., *Aspergillus niger* y *Pythium* spp.) son las enfermedades postcosecha más comunes de la fresa (*Fragaria* spp.) y generan grandes pérdidas de estas. Durante muchos años se han utilizado fungicidas sintéticos para controlar a estos patógenos, pero se ha demostrado que se hacen resistentes a dichos productos, además de representar un riesgo potencial al ambiente y la salud humana. Todo esto ha conllevado a la búsqueda de alternativas naturales como el empleo de extractos vegetales y antagonistas microbianos, siendo *Trichoderma harzianum* el antagonista más utilizado como control biológico. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antagónico de *T. harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha en fresa y conocer su mecanismo de acción. Las muestras de fresa fueron transportadas al laboratorio en los mismos empaques de venta, y posteriormente las fresas fueron colocadas en cámaras de germinación controlando la humedad para el desarrollo rápido de hongos presentes en la fruta. Se identificaron los hongos *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium* spp., sobre los cuales se realizó la prueba de antagonismo usando al hongo *T. harzianum*. La velocidad de crecimiento del biocontrolador fue mayor que el crecimiento de los hongos postcosecha ( $p < 0,01$ ) y a las 96 horas de incubación la caja de Petri estaba completamente cubierta y en la zona de encuentro entre éstos se observó que el mecanismo de acción del biocontrolador fue de tipo micoparasítico. *T. harzianum* resultó ser un excelente controlador *in vitro* de hongos postcosecha de frutos de fresa.

**Palabras claves:** Control biológico, enfermedades postcosecha, micoparasitismo, *T. harzianum*, antagonismo

## Antagonist effect of *Trichoderma harzianum* over some strawberry (*Fragaria* spp) post harvesting fungi pathogens

**Abstract:** Soft rotting (*Rhizopus stolonifer*) and black rotting (*Mucor* spp., *Aspergillus niger* and *Pythium* spp.) are the most common post harvesting strawberry (*Fragaria* spp.) diseases, generating great losses. During many years synthetic fungicides have been used to control these pathogens, but their development of resistance to these products has been demonstrated, following to the fact that they represent a potential environmental and human health risk. This has led to the search of natural alternatives such as the use of vegetal extracts and microbial antagonists, being *Trichoderma harzianum* the antagonist most widely used as biological control. The purpose of this study was to determine the antagonist effect of *T. harzianum* over some post strawberry harvesting pathogens and determine their mechanism of action. The strawberry samples were transported to the laboratory in the same packages in which they were sold, and then were placed in germination chambers, controlling humidity to obtain a rapid development of the fungi present in the fruit. We identified the following fungi: *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* and *Pythium* spp., which were tested for antagonism, using the *T. harzianum*. The growth speed of the biocontroller was greater than that of the post harvest fungi ( $p < 0,01$ ) and at 96 hours of incubation the Petri dish was completely covered, and the encounter area between them showed that the action mechanism of the biocontroller was of the mycoparasitic type. *T. harzianum* turned out to be an excellent *in vitro* controller of post strawberry harvest fungi.

**Keywords:** Biological control, post harvest diseases, mycoparasitism, *T. harzianum*, antagonism

\* Correspondencia:  
E-mail: clemencia.guedez@gmail.com

### Introducción

El cultivo de fresa durante su producción se ve afectado por numerosas enfermedades. Las más comunes son las

causadas por hongos, entre las cuales se encuentran podredumbre gris (*Botrytis cinerea*/*Sclerotinia fuckeliana*) y mancha púrpura (*Mycosphaerella fragariae*). Otros hongos

afectan el sistema radical o zona cortical del cuello como *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pythium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., y *Penicillium* spp.

Aún en los últimos años de este milenio, en el que se han realizado grandes adelantos en el desarrollo de la tecnología, se siguen presentando grandes pérdidas en postcosecha en todo el mundo, siendo difícil su cuantificación; se calcula que pueden alcanzar, dependiendo del país, hasta un 50% de la producción, jugando un papel muy importante los daños causados por microorganismos [1].

Algunos de estos hongos encontrados en frutas y vegetales después de la cosecha, como *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. producen micotoxinas importantes desde el punto de vista de salud pública, por ser capaces de provocar intoxicaciones peligrosas por aflatoxinas (*Aspergillus* spp.) y patulinas (*Penicillium* spp.), que producen efectos hepato-tóxicos y carcinógenos [2].

Entre los métodos tradicionales de combate de las pudriciones en postcosecha está el uso de la refrigeración y productos químicos y más recientemente el manejo integrado [4]. Con respecto a los fungicidas, el número que se puede emplear en postcosecha es muy reducido y con pocas perspectivas de nuevos ingredientes activos en el mercado [5]. Actualmente cada vez son mayores las objeciones de orden higiénico-sanitarias, puesto que los fungicidas se presentan como potenciales agentes oncogénicos cuando son aplicados a las frutas y verduras, y debido a este grave problema, ya se han establecido una serie de límites máximos de residuos bastantes restrictivos hasta por debajo de lo recomendado por el "Codex Alimentarius" [6].

Durante varios años se han empleado fungicidas sintéticos para controlar patógenos postcosecha, sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que estos compuestos han causado resistencia en microorganismos, incluyendo a los hongos y representan un potencial riesgo para la seguridad del medio ambiente y la salud humana. En la búsqueda de alternativas naturales para el control de pudriciones postcosecha se ha valorado el empleo de extractos vegetales, antagonismo microbiano (control biológico) y el quitosano [7,8].

El control biológico con microorganismos antagonistas comenzó a ser investigado de forma constante a partir de los años 80 [9]. *Trichoderma harzianum* se ha utilizado en el control de hongos como *Botrytis cinerea* postcosecha en uvas, controlando parcialmente la enfermedad *in situ* [10]. También se ha usado contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzanas, protegiendo durante dos meses al fruto *in situ* [11,12].

Los mecanismos de biocontrol atribuidos a *Trichoderma* spp. son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis [13], siendo el micoparasitismo el principal mecanismo de acción de este hongo. Este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células causándole un daño extensivo alterando y degradando la pared celular, causa retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma [14].

La identificación de hongos postcosecha en fresa representa un avance para determinar los mejores métodos de

control, siendo el control biológico uno de los más adecuados por ser inocuo a los seres humanos, y no deja efecto residual en el fruto como los fungicidas o agroquímicos en general. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antagonístico de *T. harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha en fresas, así como conocer su mecanismo de acción.

## Materiales y Métodos

**Análisis fitopatológico:** Los frutos de fresa de apariencia sana fueron obtenidos en 4 fruterías del estado Trujillo durante 4 semanas consecutivas, se conservaron en los mismos empaques de venta y fueron transportados al laboratorio para su análisis fitopatológico.

Dichos frutos fueron colocados en cámaras de germinación sobre una bandeja de aluminio con papel absorbente húmedo y una rejilla de alambre para evitar el contacto directo de la fruta con el papel húmedo, durante un periodo entre 4 a 5 días, hasta el crecimiento de los hongos. Posteriormente, los hongos fueron recuperados y pasados a tubos de ensayo con medio de cultivo PDA (agar-papadextrosa) para su posterior caracterización e identificación.

**Identificación de los hongos:** Los hongos fueron transferidos de los tubos de ensayos a placas de Petri con medio de cultivo PDA para observar el crecimiento, color y aspecto de las colonias; por último, se identificaron a través de las claves taxonómicas para hongos imperfectos de Barnett y Hunter [3].

**Control biológico "in vitro" (Prueba de antagonismo o cultivos duales):** El hongo *T. harzianum* (cepa Th-01) fue proporcionado por el laboratorio de fitopatología y control biológico "Dr. Carlos Díaz Polanco" de la Universidad de Los Andes, estado Trujillo. La prueba de antagonismo se realizó utilizando placas de Petri conteniendo 10 ml de medio de cultivo PDA, en donde se sembró el hongo *T. harzianum* en un extremo y el hongo postcosecha correspondiente en el otro extremo de la placa. Se utilizaron 5 placas de Petri por hongo, incubándolas a una temperatura de 25°C ± 2°C y posteriormente se realizaron observaciones y mediciones cada 24 horas hasta que el desarrollo fúngico cubrió completamente la placa de Petri.

**Mecanismo de acción de *Trichoderma harzianum* sobre hongos postcosecha en frutos de fresa:** A las 96 horas de incubación, tiempo en que *T. harzianum* alcanzó a invadir al hongo postcosecha, se tomó una porción de los hongos con parte de medio de cultivo en la franja de unión, se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio el mecanismo de acción del biocontrolador.

**Diseño experimental:** Se realizó un diseño completamente al azar, con 7 tratamientos y 8 repeticiones por tratamiento. Cada repetición representaba una placa de Petri.

- T1: *Trichoderma harzianum* (Testigo)  
 T2: *T. harzianum* con *Rhizopus stolonifer*.  
 T3: *T. harzianum* con *Penicillium digitatum*.  
 T4: *T. harzianum* con *Aspergillus Níger*  
 T5: *T. harzianum* con *Mucor* spp.  
 T6: *T. harzianum* con *Pythium* spp.  
 T7: *T. harzianum* con *Rhizoctonia solani*.

Los datos fueron analizados a través del análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias, utilizando el programa estadístico SPSS para Windows versión 11.0.

## Resultados y Discusión

**Análisis fitopatológico:** En el análisis fitopatológico se observó la presencia de diversos hongos postcosecha. Estos hongos presentaron un grado de desarrollo variable caracterizado por un vello superficial, acompañado de pudriciones basales y manchas superficiales, que desmeritan la apariencia y calidad de los frutos.

**Identificación de los hongos:** Se identificaron un total de seis especies de hongos en los cuatro sitios de recolección (fruterías), causantes de las enfermedades postcosecha en los frutos de fresas, con diferencias en el número de colonias por hongo (Tabla 1, figura 1).

Las podredumbres causadas por *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* sp. y *Aspergillus niger*, fueron las enfermedades postcosecha de mayor frecuencia en frutos de fresa de los 4 sitios de recolección (Figura 1), lo que concuerda con otros resultados publicados [15], donde se aislaron e identificaron hongos como *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp. encontrándose con mayor frecuencia *Rhizopus stolonifer*.

Entre los hongos fitopatógenos y alteraciones más frecuentes en frutos de fresa se encuentran *Rhizopus* spp. causando podredumbre en el transporte, *Phytophthora* spp. y *Botrytis* spp. causando podredumbre gris y alteraciones esporádicas en fresas causadas por especies de *Cladosporium* spp. y *Sclerotinia* spp. [14]. Entre las enfermedades postcosecha más importantes en fresas están las podredumbres causadas por *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., y *Alternaria* spp. [2].

**Control biológico "in vitro" (Prueba de antagonismo):** Las mediciones del crecimiento de *T. harzianum* y los hongos postcosecha se realizaron hasta las 96 horas de incubación, tiempo en que el desarrollo de los hongos cubrió toda la placa de Petri, como se observa en las figuras 2 y 3.

Tabla 1. Hongos causantes de enfermedades postcosecha encontrados en frutos de fresa (*Fragaria* spp.).

Hongo	Clase	Enfermedad o alteración producida
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Zygomycetes	Podredumbre blanda con micelio aéreo blanco grisáceo
<i>Mucor</i> spp.	Zygomycetes	Podredumbre negra superficialmente algodonosa
<i>Penicillium digitatum</i>	Ascomycetes (Deuteromycetes)	Enmohecimiento gris superficialmente algodonoso
<i>Rhizoctonia solani</i>	Ascomycetes (Deuteromycetes)	Podredumbre blanda
<i>Aspergillus niger</i>	Ascomycetes (Deuteromycetes)	Podredumbre negra
<i>Pythium</i> spp.	Oomycetes	Podredumbre hundida

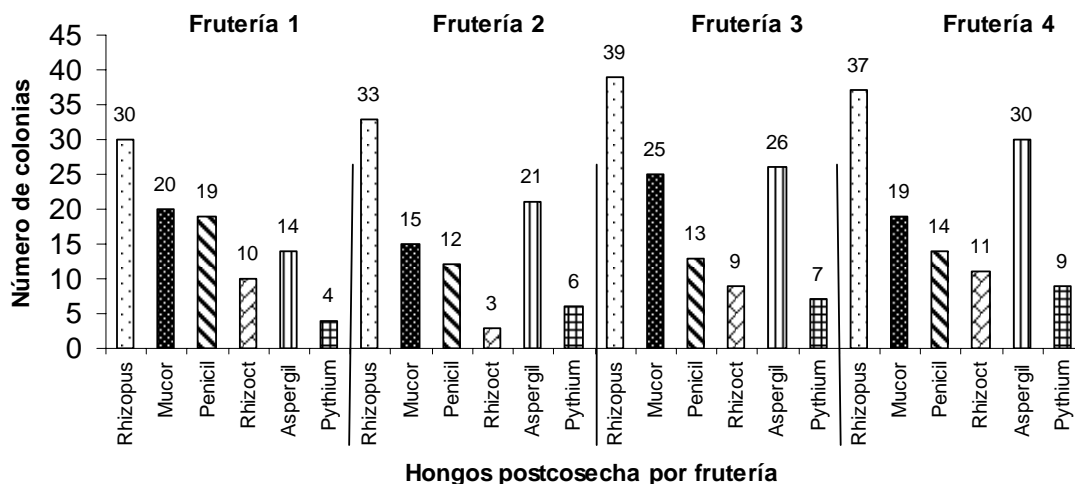


Figura 1. Número de colonias de hongos encontradas en fresas en las diferentes fruterías.

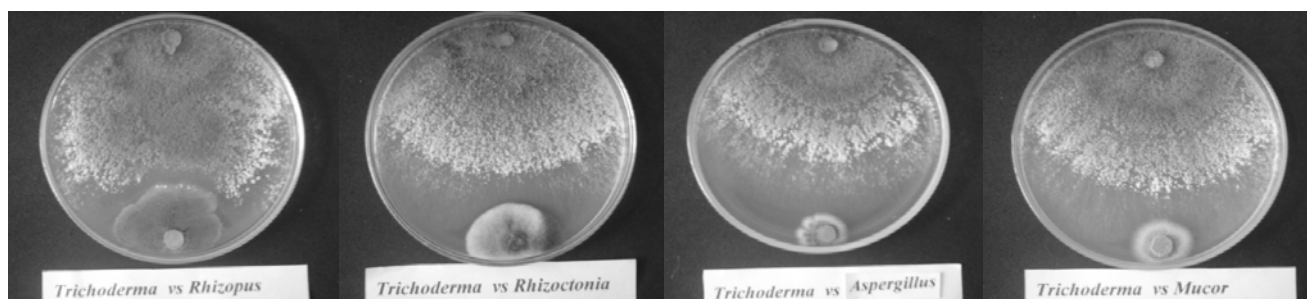


Figura 2. Prueba de antagonismo entre *Trichoderma harzianum* y hongos postcosecha aislados e identificados en frutos de fresa a las 96 horas de incubación.

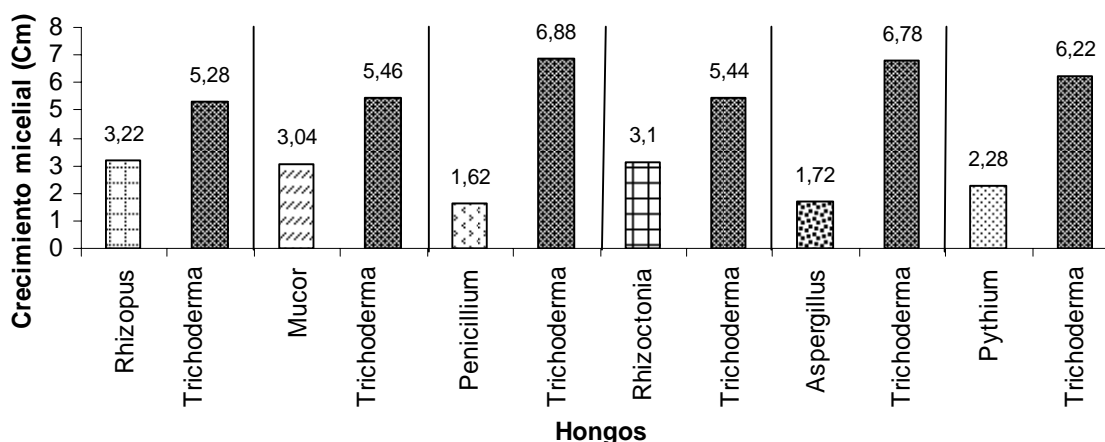


Figura 3. Promedio del crecimiento micelial en la prueba de antagonismo a las 96 horas de incubación.

Al comparar el crecimiento del biocontrolador con cada uno de los hongos patógenos, el análisis de varianza indicó que el crecimiento de *T. harzianum* difirió significativamente ( $p < 0,01$ ) del crecimiento de *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* sp., *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium* spp. Con respecto al control que ejerce *T. harzianum* sobre los hongos no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,01$ ), porque el crecimiento de este hongo fue similar en todas las placas de Petri (Figura 2).

Este resultado demostró que, debido a la rapidez del crecimiento de *T. harzianum* y la capacidad para reducir el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium* spp. en frutos de fresa, este hongo se considera un controlador biológico efectivo en enfermedades postcosecha de la fresa, pudiéndose aplicar antes de la cosecha para disminuir pérdidas durante el transporte y su estadía en las fruterías. Se ha demostrado que las aplicaciones de *T. harzianum* en uvas y manzanas reduce parcialmente la enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinerea* y las protege por más de dos meses, e igualmente protege a las manzanas del moho azul *Penicillium expansum* [10-12]. Así mismo, se ha observado que *T. harzianum* y *T. pseudokoningi* han controlado hongos postcosecha en frutos y

vegetales, tales como *Monilinia laxa* en ciruela de hueso y *Botrytis cinerea* en manzanas [16,17].

Las pruebas de antagonismo reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista y la del otro hongo para resistir el antagonismo, permitiendo la selección preliminar para ser evaluados en condiciones de campo así como para complementar y determinar su capacidad biocontroladora [7]. En esta área de estudio se abren potenciales perspectivas, debido a que los microorganismos antagonistas se han utilizado durante años como agentes de biocontrol para diversas enfermedades postcosecha en fruta fresca, con buenos resultados [6].

**Mecanismo de control de *Trichoderma harzianum* sobre hongos postcosecha en fresas:** Después de las observaciones realizadas al microscopio, se determinó que el mecanismo de acción de *T. harzianum* como biocontrolador sobre los hongos postcosecha aislados e identificados en frutos de fresa fue el de micoparasitismo. Las hifas de *T. harzianum* cubrieron a las hifas del hongo a controlar, alimentándose de esta manera y degradando el micelio del hongo controlado.

El micoparasitismo se da cuando los dos hongos entran en contacto y no antes, como sucede cuando el mecanismo de acción es antibiosis. El mecanismo de acción del

hongo antagonista, que en éste caso es *T. harzianum*, puede ser variable y depende del hongo a controlar y del aislamiento, así como de la especie de *Trichoderma* utilizada [18].

### Conclusiones

El hongo *Trichoderma harzianum* demostró ser, en cultivos duales, un excelente biocontrolador de hongos postcosecha en frutos de fresa a través del parasitismo como mecanismo de acción, por lo tanto debe aplicarse antes de la cosecha para disminuir pérdidas durante el transporte y en los sitios de venta.

Este estudio representa una contribución científica importante para el mercado de las frutas frescas o verduras, debido a que estos mismos hongos atacan a diferentes frutas y verduras postcosecha.

### Recomendaciones

Complementar este estudio realizando aplicaciones de *T. harzianum* en las fresas antes de la cosecha.

### Referencias

- Batta YA. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection*. 2004; 23: 19-26.
- Batta YA. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *Int J Food Microbiol*. 2004; 96: 281-8.
- Barnett, HL, Barry H. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess publishing company. Minnesota. USA. 1972. pp. 241.
- Benhamon N, Chet I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultra structure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*. 1993; 83: 1062-71.
- Droby S, Chalutz E, Wilson CI, Wisniewski ME. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica* 1992; 20: 49-153.
- Elad Y, Boyle P, Henis Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*. 1983; 73: 85-8.
- Fraire-Cordero M, Yáñez M, Nieto D, Vázquez G. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en postcosecha. *Rev Mex Fitopatol*. 2003; 2: 285-91.
- Guizzardi M, Elad Y, Ari M. Treatments against postharvest fruit diseases using trichodex (*Trichoderma harzianum*). *Proceedings of the V International Trichoderma / Gliocladium Workshop* (Belsville, MD, USA). 1995: pp 39.
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velásquez-del Valle MG. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Rev Mex Fitopatol*. 2007; 25: 66-74.
- Latorre BA, Agosin E, San Martín R, Vasquez GS. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot table grape in Chile. *Crop Protection*. 1997; 16: 209-14.
- Lifshits R, Windhan M, Baker R. Mechanism of biological control of pre emergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 1986; 76: 720-5.
- Spotts RA, Cervantes LA. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis*. 1986; 70: 106-8.
- Sholberg P, Conway W. Postharvest Pathology. *Horst Science*. 2001; 27: 94-8.
- Tronsmo A, Raa J. Antagonistic actino of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 1997; 77: 303.
- Umaña G. Control biológico de enfermedades postcosecha de frutas. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. X Congreso Nacional Agronómico/ III Congreso de Fitopatología. 1996: 63-67.
- Velásquez-del Valle MG, Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Guerra-Sánchez MG, Amora-Lazcano E. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (EX FR) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Rev Mex Fitopatol*. 2008; 26: 49-55.
- Wilson Ch, Wisniewski ME. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu Rev Phytopathol*. 1989; 27: 425-41.
- Wilson CL, Pusey P. Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis*. 1995; 69: 375-8.