Actividad *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate

Reynaldo Alonso Reyes[1]
Beatriz Barranco Martínez[1]
Graciela Gracia Rivero[1]
Gilda Jiménez Montejo[1]

RESUMEN. Este estudio se llevó a cabo para comprobar la actividad biocontroladora *in vivo* de la cepa A34 de *Trichoderma harzianum* sobre la enfermedad provocada por *Sclerotium rolfsii*. El trabajo se desarrollo en casa de vegetación,en macetas que contenían suelo ferrítico púrpura,estéril,infestado artificialmente con una concentración de inóculo del patógeno que provocara aproximadamente el 18% de mortalidad en plantas de tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.) de la variedad Placero. Las semillas fueron tratadas antes de la siembra en un caso y, en el otro caso, el tratamiento con el antagonista fue efectuado al suelo a razón de 8 kg/ha. Se comprobó la eficacia de la actividad antagónica a partir de la ausencia de síntomas de la enfermedad en las plantas protegidas, cultivadas hasta los 30 dias posteriores a su germinación.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, *Sclerotium rolfsii*, biocontrol,Agente biocontrolador, tomate.

ABSTRACT. *In vivo* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotium rolfsii* disease in tomato seedlings. This study was carried out to confirm the biocontrolling activity of *Trichoderma harzianum*, strain A34, on the disease caused by *Sclerotium rolfsii*.The study took place in a greenhouse, using pots, with sterilized ferritic purple soil,artificially infested with a pathogen inoculum concentration that was able to cause 18% of mortality in tomato (*Lycopersicon sculentum* Mill.) in the Placero plant variety. Two treatments were used:1) seed treatment prior planting, 2) soil treatment with biocontrol strain to a ratio of 8 kg/ha. The efficacy of the biocontrol agent was confirmed by the absence of symptoms in protected tomato seedlings, which were cultivated up to 30 days after germination.

Key words: *Trichoderma harzianum*, *Sclerotium rolfsii*, biocontrol,biocontrol agent, tomato.

Introducción

Sclerotium rolfsii es un hongo fitopatógeno que infecta plantas cultivadas y silvestres, incluyendo en su rango de hospedantes especies cultivadas como el tomate, pimiento, maní, ñame, zanahoria y otros cultivos de importancia económica. Este hongo causa la pudrición de las posturas (*damping-off*) en semilleros y de las plantas jóvenes en siembras directas;está distribuido en regiones tropicales y subtropicales, y en Cuba la distribución es muy amplia en las regiones Oriental, Central y Occidental. Los síntomas que ocasiona este patógeno en los tejidos afectados son: amarillamientos en las hojas inferiores, lesiones en las bases de los hipocótilos de las plantas, caracterizadas por hundimientos, ablandamientos y decoloraciones de la corteza, justamente debajo de la línea del suelo. A medida que la enfermedad avanza, las hojas de las ramas superiores pueden marchitarse y al final toda la planta cae y se quiebra por la base del tallo. Los esclerocios del hongo aparecen generalmente en grandes cantidades, adheridos a la base de los tallos de las plantas afectadas, junto con masas de micelios de color blanco, característico de esta especie.

[1] Universidad Pedagógica José Martí,Carretera Circunvalación Norte km.5,Camagüey 74670. **Cuba**. rey@reduc.cmw.edu.cu rey@ispcmw.rimed.cu

El uso potencial de agentes biocontroladores de enfermedades de las plantas ha sido recientemente estudiado (Misaggi y Doonndelinger l990), a pesar de investigaciones tempranas, que datan de 1930 (Herr 1995).

Los hongos del genero *Trichoderma*, en particular *T. harzianum*, son usados para el control de enfermedades porque producen metabolitos que inhiben el crecimiento de otros hongos (Lifshitz *et al*. 1985, 1986, Claydon *et al*. 1987, Baker 1991), y el alto nivel de competencia por el sustrato y el parasitismo.

Aunque numerosas investigaciones han sido dedicadas a la ecología de los hongos fitopatógenos en el suelo, el papel de la competencia interespecífica en comunidades fungosas en sustratos naturales es pobremente comprendido (Wardle *et al*. 1993). El control biológico de hongos fitopatógenos requiere de la aplicación practica de la definición de riesgo de la enfermedad de origen telúrico dada por la noción de Unidad de Potencial Infeccioso (UPI) y de Gravedad de la Enfermedad (Louvet 1973) y de la estimación cuantitativa del potencial infeccioso del suelo (Bouhot 1975) para afirmar que el tratamiento biológico que reduzca el numero de UPI/g reduce el riesgo de aparición de la enfermedad, y que las dosis aplicadas son efectivas y económicamente viables.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la relación entre la concentración de inóculo de *S. rolfsii* en el suelo y la gravedad de la enfermedad (densidad de inóculo y tasa de mortalidad) en plantas jóvenes de tomate; y determinar la efectividad de los tratamientos con *T. harzianum* cepa A- 34, para el control biológico de la pudrición de la postura de tomate causada por *S. rolfsii*.

Materiales y métodos

Experimento 1

Preparación del inóculo del patógeno. Tras haber crecido en placas con medio PDA, un aislado de *S. rolfsii*, de tejido de papa (*Solanum tuberosumum*) fue transferido a cáscara de arroz humedecida con una disolución de agua y miel de purga, previa esterilización en autoclave a l,5 atm., l2l grados celsius, durante 50 minutos. Este fue empleado cuando alcanzo 45 esclerocios/g de inóculo.

Suelo. El suelo empleado fue de tipo ferrítico púrpura con pH de 6,l; l,l8 mg/l00 g de P_{205}; 7,90 mg/l00 g de K_20; 2,73% de materia orgánica; 0,l3% de N total y l,50% de carbono, esterilizado en autoclave a l20 grados celsius, l,5 atm., durante 30 minutos.

Determinación del potencial de infección del inóculo. Técnica de Bouhot (l975) modificada. Para conformar la mezcla de inóculo de análisis y suelo estéril, se determinó el volumen de las macetas por utilizar, de 373,91 cm^3. A partir de las densidades de cada uno se calculan las proporciones por mezclar, teniendo en cuenta las concentraciones por estudiar del inóculo de análisis (36;12;1,2;y 0,2 % de inóculo de análisis en el volumen total de la maceta).Para la determinación de las concentraciones de inóculo se tuvo en cuenta los resultados alcanzados por Bouhot (1975) y elementos de carácter práctico a partir del tipo de material que servía de soporte al patógeno y al volumen de la maceta (Cuadro 1).

Por cada concentración se utilizan 5 repeticiones, en un diseño completamente al azar, en condiciones de casa de vegetación, en el periodo de primavera.

Cuadro 1. Concentraciones de inóculos para análisis

	(%) 36	l2	l,2	0,2
Concentración en volumen cm^3 por maceta.				
Inóculo de análisis.	l34,97	44,99	4,49	0,70
Suelo estéril	238,94	328,92	369,4l	373,20
Concentración pesada, g/maceta				
Inóculo para análisis				
d= 0,23 g/cm^3	3l,04	l0,35	l,03	0,l6
Suelo estéril	274,78	378,25	424,82	l29,l8
d= 1,15 g/cm^3				

Luego de conformadas la mezclas del inóculo del patógeno con el suelo y depositadas en las macetas se sembraron las plantas huéspedes.

Plantas huéspedes. Fueron sembradas en cada maceta l5 semillas pre-germinadas de *L. sculentum*, de la variedad Placero, con diagnóstico negativo del patógeno y del biocontrol estudiados. Fueron mantenidas durante 30 días en macetas, con riego a capacidad de campo, previamente determinada en macetas por el método gravimétrico. Se evaluaron los síntomas de la enfermedad por la escala de Sherwood y Hagedorn (l958), donde 0 = plantas sanas y 4 = plantas con síntomas de estrangulamiento (muerte).

Análisis de los datos. El valor de la mortalidad fue transformado en un valor exponencial (e^x). Se realizaron análisis de correlación matriz y regresión lineal simple para determinar la relación entre la concentración de inóculo en el suelo y la gravedad de la enfermedad en las plantas jóvenes de tomate. La ecuación resultante nos permitió determinar la concentración por utilizar en el experimento relacionado con el efecto del tratamiento de *T. harzianum* cepa A- 34, para provocar un 18 % de mortalidad en las plantas jóvenes de tomate, utilizadas en el trabajo experimental.

Experimento 2

Preparación de inoculantes. *S. rolfsii* fue empleado con una concentración de 43 esclerosios/g , y elaborado como aparece descrito anteriormente.

T. harzianum cepa A-34 fue suministrado por el Laboratorio Territorial de Suelos y Fertilizantes de Camagüey, Cuba,siendo aquél sólido, del Lote 62,con una concentración de l,4 X $l0^8$ conidios/ml y l00% de viabilidad.

Trabajo Experimental. Luego de procesar los datos del primer experimento, se montó el presente experimento utilizando como mezcla la concentración de inóculo del patógeno en el suelo que provocara el l8% de mortalidad en las plantas de tomate.

Para ello, se utilizó el mismo suelo, plantas huéspedes, y métodos descritos en el experimento anterior. Fueron estudiados 5 tratamientos en un diseño completamente aleatorizado en casa de vegetación, en el período de primavera,:

- *S. rolfsii* (SR);
- *Trichoderma* (A34), aplicada a razón de 8 Kg/ha (Ts);
- *Trichoderma* (A34), aplicada a tratamiento de semilla (tiempo de remojo: 5 min)(Tr);
- Sr + Ts; y
- Sr + Tr.

Análisis de datos. Luego de transformar el valor de la mortalidad en una función exponencial (e^x), se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y se compararon las medias por el test de Duncan para comparar los resultados de los tratamientos

Resultados y discusión

Experimento l

La relación entre la concentración de inóculos de *S. rolfsii* en el suelo y la gravedad de la enfermedad de las plantas de tomate aparece en la Fig. 1.

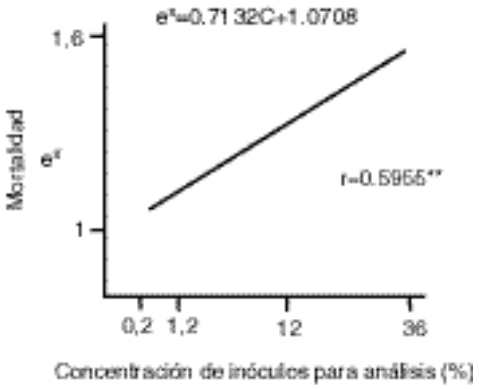

Figura 1. Regresión lineal entre la mortalidad (ex) de las plantas atacadas por *S. rolfsii* y la concentración de inóculos para análisis en suelo estéril.

Nota : c= concentración ; x= mortalidad (%).
La ecuación de la recta de regresión es de la forma ex = 0,7132 C + 1,0708 (r = 0,5955**). Esta curva constituyó una herramienta muy importante para nuestro estudio. Se ha llevado a cabo una aplicación de la ecuación de regresión en el segundo experimento, el principio del cálculo consiste en resolver la recta de regresión para la concentración en la gravedad de la enfermedad que se desee estudiar (l8% de mortalidad).

Experimento 2.

Solamente fueron observados síntomas de la enfermedad en las plantas donde no estaba presente el agente biocontrolador. Todas las plantas enfermas mostraron el mayor valor de la escala de evaluación con estrangulamiento y muerte del l8,2% de la población de plantas en ese tratamiento (Sr).

Hubo diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Fig. 2).

Cuadro 2. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* (A34)

Tratamientos	Número de plantas con estrangulamiento y muerte				
	Repeticiones				
	I	II	III	IV	V
Sr	2	3	3	4	2
Ts	0	0	0	0	0
Tr	0	0	0	0	0
Sr+Ts	0	0	0	0	0
Sr+Tr	0	0	0	0	0

Sr= Sclerotium rolfssi; Ts= aplicación de Trichoderma al suelo (8 kg/ha); Tr= aplicación de Trichoderma remojado de semillas antes de la siembra.

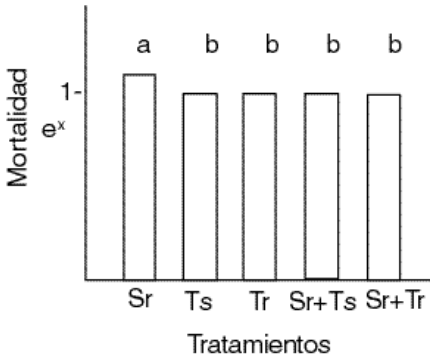

Figura. 2. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* (A34): Sr= *Sclerotium rolfssi*; Ts= aplicación de *Trichoderma* al suelo (8 kg/a); Tr= aplicación de *Trichoderma* remojado de semillas antes de la siembra. Las barras con letras distintas difieren significativamente entre sí para el 1%, según el test de Duncan. c.v. (%)= 3,4916.

Se comprueba así el efecto biocontrolador que posee in vivo la cepa estudiada de *Trichoderma harzianum,* en tratamientos de semilla y al suelo. Otros autores han obtenido resultados similares.La aplicación del biopreparado de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa A- 34) en la lucha contra los hongos *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*, causantes de la pudrición de las posturas (*damping-off*) del tomate, resulto satisfactoria para el control de la enfermedad (Sandoval *et al.* 1993), y los tratamientos a las semillas y al suelo resultaron altamente satisfactorios para el control de *R.solani* y *Phytophthora parasitica* en tomate y *P. capsici* en pimiento (Sandoval *et al.* 1995), y para el control de *P. parasitica* en semilleros de tomate en cultivo hidropónico (Rodríguez y Sandoval 1998).

Conclusiones

La ecuación de regresión que define en el suelo la relación entre la concentración de inóculo de *S. rolfsii* y la gravedad de la enfermedad es $e^x = 0,7l32\ C + l,0708$ (r= 0,5955**).

Las aplicaciones de *T. harzianum* (A34) al suelo y como tratamiento de semilla garantizan la protección de las plántulas de tomate en las condiciones en estudio.

Literatura citada

Baker, R.1991.Diversity in biological control.Crop Protection 10:85- 94.

Bouhot, D. l975. Cuantificación de la técnica de estimación del potencial infeccioso de los suelos, mantillos y sustratos infectados por *Pythium* sp. Ann.Phytopathol.7(2):l47-l50.

Claydon, N.;Allan, M.; Hanson, J. R.; Avent,A. G. 1987.Anti-fungal alkylpyrones of *Trichoderma harzianum*.Trans. BR. Mycol.Soc. 88:503- 513.

Elad, Y.; Chet, I.; Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol.28:719- 725.

Herr, L. J. 1995. Biological control of *Rhizoctonia solani* by binucleate *Rhizoctonia* spp. and hypovirulent *R. Solani* agent.Crop Protection 14 (3):179- 185.

Lifshitz, R.; Windham, M. T.; Baker, R. 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping- off of pea by seed trearment with *Trichoderma spp*. Phytopathology 76: 720- 725.

Louvet, J. 1973. Las perspectivas de lucha biologica contra los hongos parasitos de los organos subterraneos d elas plantas. Presentado en: Simposio Internacional "Perspectivas de lucha biológica contra los hongos parasitos de las plantas cultivadas y de los tejidos leñosos".Lausarme.

Misaghi, I., Donndeliger, L. R. 1990. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. Phytopathology 80:808- 811.

Rodríguez, F.; Sandoval, I. 1998. Efectividad de diferentes productos químicos y del biopreparado de *Trichoderma harzianum Rifai* contra enfermedades fúngicas del tomate de hidropónico. Fitosanidad 2(1- 2):51- 56.

Sandoval- Ramírez, I.; López, M. O.; García, D.; Mendoza, I. 1995. *Trichoderma harzianum* (Cepa A- 34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento. 36 p. (Boletín Técnico CID- INISAV 3).

Sherwood,R.T; Hagedorn, D.J. l958. Determining the common root rot potential of pea fields. Agric. Exp. Stn.Bull.l2 p.

Wardle, D. A.; Parkinson, D.; Waller, J. E. 1993. Interespecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. Oecologia 94:165- 172.