

## Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. contra patógenos en semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz

### Evaluation of strain of *Trichoderma* spp. against pathogens seeds of bean, lettuce, sunflower and rice

Mercedes González Rodríguez<sup>1</sup>, Leónides Castellanos González<sup>2</sup>, María Ramos Fernández<sup>1</sup>, Grisell Pérez González<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal Cienfuegos, Carretera Palmira km 4 ½ Cienfuegos. CP 55100

<sup>2</sup>Centro de Estudios para la Transformación Agraria Sostenible (CETAS). Universidad de Cienfuegos.

<sup>3</sup>Escuela de Capacitación La Colmena. Carretera de Cumanayagua, Cienfuegos.

E-mail: [laprosavcfg@sanvegcfg.co.cu](mailto:laprosavcfg@sanvegcfg.co.cu)

**RESUMEN:** Se evaluó la actividad "in vitro", antagónica e hiperparasítica de *Trichoderma harzianum* (A-34) y *Trichoderma viride* (C-66), sobre los hongos patógenos *Alternaria alternata* Nees, *Macrophomina phaseoli* Tassi, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Alternaria helianthi* (Hansf), *Corynespora cassicola* (Berk. et Curt) Wei, *Sarocladium oryzae* Sawada y *Gerlachia oryzae* (Hashioka et Yokigo) Gams. El ensayo se desarrolló en placas de Petri (x 9 cm) en papa dextrosa agar, sembrando el patógeno y *Trichoderma* en cultivo dual. Se halló la efectividad de los biopreparados de ambas cepas mediante tratamientos a las semillas. Se obtuvo antagonismo por competencia sobre todos los patógenos estudiados con las dos cepas en estudio. La cepa C-66 presentó mayor hiperparasitismo que la A-34, siendo en general mayor por ambas cepas sobre *Sarocladium oryzae*, *Alternaria alternata* y *Macrophomina phaseoli*. Se obtuvo más de un 90 % de efectividad con *Trichoderma* spp. en el tratamiento a la semilla, siendo superior el método de peletización. La efectividad sobre todos los patógenos fue superior a 88 % con la excepción de *Gerlachia oryzae* y *Alternaria alternata* para los cuales ésta no superó el valor de 81 %.

**Palabras clave:** Antagonismo, patógenos en semillas, *Trichoderma*.

**ABSTRACT:** Studies were made with isolates of *Trichoderma harzianum* (A-34) and *Trichoderma viride* (C-66) for evaluating the hyperparasitic and antagonistic activity "in vitro" toward *Alternaria alternata* Nees, *Macrophomina phaseoli* Tassi, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Alternaria helianthi* Hansf, *Corynespora cassicola* Bert et Curt wei, *Sarocladium oryzae* Sawada, and *Gerlachia oryzae* Hashioka et Yokigo Gams isolated of seeds. In dual culture test on PDA it was evaluated the affectivity of *Trichoderma* against seeds fungi disease. Antagonism was obtained by competition on all pathogens with the two isolates in study. The C-66 isolate presented bigger hiperparasitism that the A-34, being it bigger general for both isolates on *Sarocladium oryzae*, *Alternaria alternata* y *Macrophomina phaseoli*. The effectiveness by pelleting seed treatment got 95 %, higher than immersion. The effectiveness on all pathogens was higher that 88% with the exception of *Gerlachia oryzae* and *Alternaria alternata* for which it didn't overcome the value of 81%.

**Key words:** Antagonist, seed pathogens, *Trichoderma*.

## INTRODUCCIÓN

Las semillas constituyen para un gran número de cultivos el punto de partida que marca el futuro de la cosecha por lo que su sanidad es cuestión de primer orden. Las semillas infectadas son la vía principal de diseminación de hongos, virus y bacterias, los que pueden ocasionar pérdidas entre 40-60 % en los rendimientos y sobrevivir desde meses hasta más de 25 años en condiciones de almacenamiento. (Castellanos *et al.*, 1995)

Entre los principales hongos que las afectan se encuentran *Alternaria solani* (Ell. et Mart.), *Alternaria alternata* Nees, *Alternaria* spp., *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium solani* (Mart), *Fusarium* spp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Estos patógenos pueden localizarse en la parte exterior e interior de la semilla, produciendo diferentes síntomas como enanismo, exudaciones y bajo poder germinativo. En ocasiones, la semilla puede estar infectada

y no presentar síntomas.

Existen diferentes métodos para el control de patógenos en semillas y se conoce que la aplicación de *Trichoderma* sp. a las mismas ocasiona la multiplicación del antagonista en el suelo y/o en la zona radical de la planta para inhibir al patógeno por medio de competencia, micoparasitismo y/o antibiosis. La integración de estos métodos de aplicación juega un papel importante en el éxito del control biológico hacia los fitopatógenos. (Papavizas, 1985)

El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones "in vitro" la acción antagónica e hiperparasítica de dos cepas de *Trichoderma* sp. contra hongos patógenos de las semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz, así como determinar la efectividad de las mismas en tratamientos a la semilla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal en Cienfuegos, para lo cual se utilizaron dos cepas de *Trichoderma* spp. con el fin de evaluar su efecto contra los patógenos *Alternaria alternata* Nees, aislado de lechuga; *Rhizoctonia solani* Kühn y *Macrophomina phaseoli* Tassi, aislados de frijol; *Alternaria helianthi* (Hans) y *Corynespora cassiicola* (Berk. et Curt) Wei, aislados de girasol y *Gerlachia oryzae* (Hashioka et Yokigo) Gams, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sarocladium oryzae* Sawada, aislados de arroz.

Para determinar el antagonismo sobre los patógenos se emplearon placas de Petri (9 cm) que contenían medio papa-dextrosa-agar, sembrándose *Trichoderma* y el hongo patógeno en cultivo dual en una misma placa. Se emplearon como variantes las cepas *Trichoderma harzianum* cepa (A-34) y *Trichoderma* sp. (C-66) y el testigo que consistió en sembrar un disco del hongo patógeno en el centro de la placa. Los ensayos se organizaron en un diseño completamente aleatorizado. Se emplearon cinco réplicas por variante (placas), incubándose a  $25 \pm 1$  °C.

Se midió el efecto del antagonismo midiendo el diámetro de la colonia de los hongos patógenos a las 72 horas

de realizada la siembra de los microorganismos en estudio. Para evaluar el hiperparasitismo se continuó con la medición de cada colonia de *Trichoderma* sobre el patógeno hasta los 7 días, midiéndose el radio de solapamiento del antagonista sobre el hongo patógeno. Se realizaron análisis de varianza con la información del crecimiento del diámetro de la colonia de los hongos patógenos y el radio de solapamiento del hiperparasitismo utilizando el paquete estadístico STATIFCF. Las medias fueron comparadas por el test de rangos múltiples de Duncan con 5 % de error.

Se evaluó la efectividad de biopreparados de las dos cepas de *Trichoderma* en estudio contra los patógenos de la semilla utilizando un diseño bifactorial en condiciones de laboratorio con semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz., empleándose dos variantes (C-66 y A-34) y un testigo. Cada variante de *Trichoderma* tuvo dos subtratamientos: inmersión de la semilla con una suspensión de conidios de *Trichoderma* de  $10^8$  conidios/mL (100 gramos de biopreparado sólido en un litro de agua) y peletización de la semilla en una pasta de la suspensión del biopreparado (al 10 %) y como adherente zeolita en polvo en la proporción 1:1 en volumen.

Se utilizaron 4 réplicas para cada variante. Fueron tratadas 50 semillas por réplica las cuales fueron montadas por el método tradicional de cámara húmeda, incubándose a  $25 \pm 1$  °C con alternancia de 8 horas luz y 16 horas oscuridad. Al concluir este período se realizó la evaluación de la presencia o no de los patógenos sobre las semillas.

La efectividad técnica de cada variante sobre los hongos patógenos presentes se determinó por la fórmula modificada de Abbot (Cyba Geigy, 1981) donde:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{semillas enfermas en testigo} - \text{semillas enfermas variante tratada}}{\text{semillas enfermas en testigo}} * 100$$

Los datos de porcentaje de inhibición fueron transformados  $2 \arcsin \sqrt{\frac{O}{n}}$  para su análisis. Los análisis de varianza se realizaron utilizando el paquete estadístico STATIFCF. Las medias fueron comparadas por el test de rangos múltiples de Duncan con 5 % de error.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las dos cepas de *Trichoderma* en estudio manifestaron acción antagonica sobre los patógenos, al diferir siempre el diámetro de las colonias en el cultivo dual con el del testigo (Tabla 1). La mayor acción antagonica se observó sobre *Sarocladium oryza* (45,45 % de inhibición del crecimiento con respecto al testigo para la cepa C-66 y 28,5 para A-34), aunque se presentó diferencia estadística entre ambas cepas. Para el caso de *Rhizoctonia solani* aislada de frijol la cepa A-34 tuvo un efecto mayor que la cepa C-66 pero sólo con un 21 % de reducción de la colonia con respecto al testigo.

Sobre el resto de los hongos patógenos no se observó diferencia en la acción de las dos cepas, no obstante la C-66 manifestó más de 25 % de reducción de la colonia sobre todos los hongos patógenos excepto sobre *R. solani* aislado de frijol, y *A. helianthi* y *C. cassicola* aislados de

girasol, mientras que la cepa A-34 sobrepasó ese valor para todos excepto para *R. solani* aislado de frijol, *C. cassicola* aislado de girasol y *R. solani* y *Gerlachia oryza* aislados de arroz. Es de señalar que ambas cepas manifestaron más 28,5 % de inhibición de la colonia de *Macrophomina phaseoli*, un patógeno importante del suelo que afecta el cultivo del frijol.

Los presentes resultados concuerdan con los de varios investigadores quienes informan actividad antagonica de *Trichoderma* contra hongos patógenos “in vitro”, como González *et al.* (2006) con *Trichoderma harzianum* contra diferentes especies de hongos, incluyendo a *Rhizoctonia solani*. Por otra parte, Sandoval (1995) comprobó “in vitro” en cultivo dual que *T. harzianum* cepa A-34 era buen antagonista de diferentes aislamientos de *Rhizoctonia solani*. Castellanos (1996) obtuvo buena acción antagonica con las cepas *T. harzianum* (A-34) y *Trichoderma viride* (C-66) sobre *Alternaria solani*.

**Tabla 1. Resultados del antagonismo “in vitro” en crecimiento dual de las diferentes cepas de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos**

Variant	CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS (cm)							
	LECH.	FRIJOL			GIRASOL		ARROZ	
	<i>A. alternata</i>	<i>M. phaseol.</i>	<i>R. solani</i>	<i>A. heliant</i>	<i>C. cassiic</i>	<i>S. oryzae</i>	<i>G. oryzae</i>	<i>R. solani</i>
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
A-34	1,17 b	2,50 b	3,95 c	1,02 b	1,27 b	0,55 b	3,0 b	3,75 b
C-66	1,20 b	2,50 b	4,57 b	1,20 b	1,22 b	0,42 c	2,62 c	3,37 b
Testigo	1,60 a	3,50 a	5 a	1,50 a	1,60 a	0,77 a	3,50 a	4,70 a
E.T.*	0,01	0,01	0,03	0,02	0,10	0,10	0,02	0,71
CV (%)	1,0	1,2	8,8	2,0	7,7	3,1	6,0	18,0

Medias con letras desiguales difieren para  $p \leq 0,05$  % según dójimas múltiples de Duncan.

Los presentes resultados apoyan los de Reyes *et al.* (2006) quienes comprobaron la acción in “vitro” de *Trichoderma harzianum* A-34 sobre *R. solani* aislado de arroz, así como los de López y Sandoval (2008) quienes seleccionaron 8 cepas de *Trichoderma* con efecto antagonico “in vitro” contra *Macrophomina phaseoli*.

En la Tabla 2 aparecen las mediciones del hiperparasitismo, observándose en la interacción tratamiento-patógeno de ambas cepas sobre los hongos patógenos a los siete días diferencia altamente significativa entre ellos, siendo en general más

hiperparásita C-66 que A-34, lo cual concuerda con los resultados de Castellanos *et al.* (1996), al evaluar ambas cepas antagonistas contra el hongo *Alternaria solani* Sor. aislado de papa. Se presentó el mayor hiperparasitismo en general sobre *Sarocladium oryzae*, lo que concuerda con el resultado de la acción antagonica. Le siguió en orden descendente *Alternaria alternata*, y en tercer orden los patógenos *Macrophomina phaseoli* y *Gerlachia oryzae*. Es de destacar el bajo nivel de hiperparasitismo que manifestaron ambas cepas antagonistas sobre la cepa de *R. solani* aislada de arroz, situación también señalada por Sandoval *et al.* (1995) con respecto a

la cepa A-34, sin embargo Reyes et al (2006) detectó *R. solani* aislada de ese cultivo. buena acción hiperparasita de la cepa A-34 sobre

**Tabla 2. Resultados del hiperparasitismo “in vitro”. Interacción tratamiento – patógeno**

TRAT.	LECH.	FRIJOL			GIRASOL		ARROZ			ET
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	
	<i>A. alternata</i>	<i>M. phaseoli</i>	<i>R. solani</i>	<i>A. helianthi</i>	<i>C. cassicola</i>	<i>S. oryzae</i>	<i>G. oryzae</i>	<i>R. solani</i>		
A-34	3,50 c	3,22 d	1,22 g	1,22 g	1,00 h	4,95 a	2,50 e	0,42 i	1,99 b	0,023
C-66	2,55 e	2,50 e	1,50 f	1,52 f	1,00 h	4,00 b	2,62 e	0,85 h	2,09 a	
X patóg	3,36 b	2,52 c	1,36 d	1,37 d	1,00 e	4,47 a	2,56 c	0,63 f		0,044
ET*	0,070									0,016
CV	3,4%									0,6%

Medias con letras desiguales difieren para  $p \leq 0,05$  %.

La efectividad de los tratamientos realizados a las semillas se presentó con índices altos entre 90 % y 95 %, aunque fue superior el nivel alcanzado por el método de peletización (Tabla 3). Resultados similares fueron obtenidos por Castellanos *et al.* (1995) en tratamientos realizados a semillas de ají chay y tomate al mostrar la cepa A-34 mayor efectividad sobre los patógenos, por el método de peletización. También Hernández *et al.* (2006) han recomendado la peletización de las semillas de frijol con *Trichoderma viride* para la protección de los

**Tabla 3. Efectividad de dos métodos de tratamientos con *Trichoderma***

TRATAMIENTO	Efectividad Técnica (%)	SIG.
Inmersión	90	b*
Peletización	95	a*
E. Típico	0,06	
CV (%)	2,31	

Medias con letras desiguales difieren para  $p \leq 0,05$  %

En la Tabla 4 aparecen reflejados los porcentajes de efectividad alcanzados en los tratamientos realizados sobre los diferentes patógenos donde se aprecia igual comportamiento en *Rhizoctonia solani* aislado de frijol y arroz con 99 %.

No se observó diferencia entre los hongos patógenos *Corynespora cassicola*, *Sarocladium oryzae*, *Alternaria helianthi*, *Macrophomina phaseoli* y *Gerlachia oryzae*, pero sí difieren del patógeno *Alternaria alternata*. A su vez entre los patógenos *Gerlachia oryzae* y *Alternaria alternata* no existió diferencia, alcanzándose sobre el primero 81 % de efectividad y sobre el segundo 71 %, lo cual es bajo para este tipo de tratamiento.

**Tabla 4. Porcentajes de efectividad de *Trichoderma* spp. contra los diferentes patógenos estudiados en tratamientos a la semilla**

PATÓGENOS	E. Técnica (%)	SIG.
<i>Rhizoctonia solani</i> (frijol)	99	a
<i>Rhizoctonia solani</i> (arroz)	98,3	a
<i>C. cassicola</i> (girasol)	96,4	ab
<i>Sarocladium oryzae</i> (arroz)	94	ab
<i>Alternaria helianthi</i> (girasol)	90	ab
<i>Macrophomina phaseoli</i> (frijol)	88	ab
<i>Gerlachia oryzae</i> (arroz)	81	bc
<i>Alternaria alternata</i> (lechuga)	71	c
E.T.	0,016	
CV (%)	1,64	

Medias con letras desiguales difieren para  $p \leq 0,05$  %

De forma general los tratamientos realizados a las semillas fueron efectivos destacándose el tratamiento por peletización con la utilización de la C-66. Con estos resultados se corrobora la ventaja que ofrece la protección de las semillas con estos biopreparados, lo cual está en correspondencia con resultados de investigaciones realizadas en Argentina con tratamientos a las semillas de acelga, espinaca, rabanito y tomate (Monaco *et al.*, 2006) donde se obtuvo mayor porcentaje de germinación por protección contra los hongos patógenos. Por otra parte respecto a la efectividad técnica, López y Sandoval (2006) obtuvieron una reducción de hasta un 96 % de las patologías causadas por *Phytophthora* ssp. en plantas de *Capsicum annuum* y *Dianthus* sp. con tratamientos de dos cepas de *Trichoderma*.

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvo antagonismo por competencia sobre todos los patógenos estudiados con las cepas *Trichoderma harzianum* A-34 y *Trichoderma viride* C-66.

2. La cepa C-66 presentó mayor hiperparasitismo que la A-34, siendo en general mayor por ambas cepas sobre *Sarocladium oryzae*, *Alternaria alternata* y *Macrophomina phaseoli*.

3. Se obtuvo más de un 90 % de efectividad con *Trichoderma* spp en el tratamiento a la semilla, siendo superior el método de peletización.

4. La efectividad sobre todos los patógenos fue superior a 88 % con la excepción de *Gerlachia oryzae* y *Alternaria alternata* para los cuales ésta no superó el valor de 81 %.

8. PAPAVIDAS, G. C.: “*Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential of biocontrol”, *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54, 1985.

9. REYES T.; G. RODRÍGUEZ; D. PUPO; L. ALARCÓN Y Y. CUTIDO: “Efectividad “in vitro” de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol de *R. solani* Kuhn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)”. *Fitosanidad* 10(2):136, 2006.

10. SANDOVAL, I.; M LÓPEZ; D. GARCÍA E.; MENDOZA: “*Trichoderma harzianum* (cepa A-34). Un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento”, *Fitosanidad. Boletín Técnico* 3:7-14, 1995.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CIBA-GEIGY: *Manual de ensayos de campo*, Basilea, Suiza, pp.11-20, 1981.

2. CASTELLANOS, L.; M GONZÁLEZ.; T. SANTANA E I. IRIMIA: Generalización de la producción y uso de *Trichoderma* spp. para el control de enfermedades. III Encuentro Nacional Científico-Técnico de Bioplaguicidas EXPO-CREE, p.26, La Habana, 1995.

3. CASTELLANOS, L.; M.GONZÁLEZ Y O.BARRUETA: Lucha química y biológica contra el tizón temprano en papa, XI Forum de Ciencia y Técnica, Cienfuegos, p. 5, 1996.

4. GONZÁLEZ, M.; E. RAMOS; A. FERNÁNDEZ Y R. OCHOA: Efecto antagonico de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* frente a aislamientos de *Rhizoctonia solani* obtenidos de semilleros de tabaco con tecnología de bandejas flotante. *Fitosanidad* 10(2): 180, 2006.

5. HERNÁNDEZ, M. A.; ALIUSKA SIERRA PEÑA Y AIDANET CARR: “Evaluación “in vitro” del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan a vitroplantas de piña *Ananas comosus* (L.) Merr”, *Fitosanidad* 10(2):105-108, 2006.

6. LÓPEZ, M. O. E ILEANA SANDOVAL: “Selección de cepas antagonicas del género *Trichoderma* Person. *Fitosanidad* 10(2):132, 2006.

7. MONACO, C. V. ; C MORENO,. BONFIGLIO Y P. A. BOLOTTI: Efecto de *Trichoderma virens* sobre patógenos causantes del damping off en especies hortícolas, en Memorias del Taller Latinoamericano de biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros antagonistas, La Habana, 2006.

Recibido: 24/septiembre/2008

Aceptado: 15/octubre/2007