

## Estudio del Antagonismo de Algunas Especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*<sup>1</sup>

RICARDO ELIAS<sup>2</sup>, OMAR ARCOS<sup>3</sup> y GERMAN ARBELAEZ<sup>4</sup>

**Resumen.** En este trabajo se estudió el antagonismo de algunos aislamientos del hongo *Trichoderma* obtenidos de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. En los ensayos "in vitro" se observó un marcado antagonismo entre las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* sobre *R. solani*, con una reducción apreciable del tamaño de la colonia y un antagonismo menor sobre *F. oxysporum*. En los ensayos de parasitismo a nivel microscópico, se observó una gran interacción entre algunos de los aislamientos de *T. harzianum* y *T. hamatum* y el patógeno *R. solani* manifestado por el enrollamiento, penetración, fragmentación y lisis de las hifas del patógeno. Los aislamientos de *Trichoderma* causaron un retraso en la aparición de los síntomas, una reducción en la severidad de la enfermedad y un menor número de plantas enfermas ocasionadas por *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en pepino cohombro, y su efecto fue superior en todos los casos a la aplicación del fungicida benomil. Los aislamientos del antagonista aumentaron la germinación de las semillas, la emergencia y el tamaño de las plántulas y redujeron la severidad de la enfermedad ocasionada por *R. solani* en frijol.

### ANTAGONISM STUDIES OF *Trichoderma* spp. WITH *Fusarium oxysporum* AND *Rhizoctonia solani*

**Abstract.** Several experiments were conducted to study the antagonism of 17 isolates of *Trichoderma* from Colombian soils with *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. In "in vitro" tests, a high antagonism between colonies was found being greater the antagonism of *Trichoderma* with *R. solani*. At the microscopic level it was observed a great interaction between *T. harzianum* and *T. hamatum* with *R. solani* in such a way that the hyphae of the pathogen showed coiling, penetration, fragmentation and lysis. The *Trichoderma* isolates caused reduction in the disease severity, in the incubation period and a lower number of diseased cucumber plants when they were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and these effects were better than Benomyl application. The same *Trichoderma* isolates increased seed germination, emergence and seedling size of bean plants inoculated with *R. solani*. A reduction of the disease severity was also found.

### INTRODUCCION

El estudio de las relaciones existentes entre los organismos del suelo han permitido modificar algunos factores para controlar la actividad de algunos patógenos, que ocasionan enfermedades de importancia económica en diversos cultivos. La introducción de organismos al suelo que posean actividad antagonista es una de las posibilidades de control biológico de algunos hongos patógenos.

<sup>1</sup> Basado en la tesis de grado de R.E. y O.A. para optar el título de Biólogo, Facultad de Ciencias, Univ. Nacional de Colombia, Bogotá. Recibido para publicación el 19 de junio de 1989.

<sup>2</sup> y <sup>3</sup> Anteriormente, estudiantes de Biología (q.e.p.d.)<sup>2</sup>

<sup>4</sup> Profesor Asociado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. A.A. 14490, Bogotá, D.E.

Dichas actividades pueden comprender varios mecanismos de antagonismo tales como antibiosis, parasitismo y competencia (Baker, 1985).

Diversos investigadores han encontrado que algunas especies de *Trichoderma* tienen una gran actividad antagonista sobre patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum* y *Fusarium oxysporum*, causando una reducción importante de las enfermedades que ocasionan (Elad *et al*, 1980; Sivan y Chet, 1985). Durante los últimos años varios investigadores y algunas empresas han mostrado gran interés en el potencial de *Trichoderma* en el control biológico de patógenos de suelo (Chet, 1987).

El objetivo de este trabajo fue el estudio del antagonismo de diferentes aislamientos del hongo *Trichoderma* obtenidos de algunos suelos colombianos sobre los patógenos *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.

## MATERIALES Y METODOS

Los ensayos se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá. Los aislamientos de *Trichoderma* utilizados se obtuvieron de varias muestras de suelo de la Sabana de Bogotá y de Rionegro (Antioquia), utilizando el medio selectivo para el género *Trichoderma* desarrollado por Elad *et al* (1981) y el medio Papa-dextrosa-agar (PDA).

Para la identificación taxonómica de las especies de *Trichoderma* cada aislamiento se desarrolló en cajas de Petri con el medio de cultivo Agar-avena y se incubó a 24°C durante dos semanas; luego se realizaron mediciones de 100 conidias por cada aislamiento y se identificaron utilizando la clave de Rifai (1969).

Como ayuda en la identificación taxonómica de las especies de *Trichoderma*, se realizaron pruebas de compatibilidad ecológica entre cada uno de los aislamientos utilizando cajas de Petri con el medio Agar-avena. En el centro de la caja se colocaron dos discos de agar de 6 mm de diámetro procedentes de aislamientos de *Trichoderma* separados 3 cm cada uno del otro; las cajas se incuba-

ron a 24°C durante 3 semanas y se replicaron 3 veces.

Como patrón de comparación en los diferentes ensayos se utilizó el aislamiento T-95 de *Trichoderma harzianum*, (identificado inicialmente como *T. hamatum*), el cual ha mostrado un gran poder antagónico contra algunos hongos fitopatógenos. Dicho aislamiento fue obtenido inicialmente por Baker (Chet y Baker, 1981) de un suelo colombiano naturalmente supresivo a *R. solani* y posteriormente mediante mutación química se hizo tolerante a benomil en dosis hasta de 100 ppm.

El aislamiento T-95 de *T. harzianum* y el aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* fueron suministrados por el doctor Ralph Baker de Colorado State University, Fort Collins, Colorado y el aislamiento RS 7-80 de *R. solani* provino del Programa de Fríjol del CIAT en Palmira.

Para determinar la capacidad inhibidora y de colonización de los aislamientos de *Trichoderma* sobre los hongos patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* y *Rhizoctonia solani*, se realizaron pruebas de antagonismo "in vitro". En cajas de Petri con PDA se colocaron 2 discos de agar de 6 mm de diámetro, un disco procedente de un aislamiento de *Trichoderma* y el otro disco procedente de colonias de uno de los patógenos. El diámetro de las colonias de cada uno de los hongos se registró diariamente para evaluar su capacidad invasora.

Para observar el posible parasitismo entre los aislamientos de *Trichoderma* y los dos hongos patógenos, se realizaron pruebas "in vitro" utilizando la técnica de microcultivos de Riddel; sobre el portaobjeto se colocaron dos discos estériles de PDA de 4 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor a una distancia de 10 mm entre ellos. Sobre uno de los discos se colocaron esporas de uno de los aislamientos de *Trichoderma* y en el otro se colocó una porción de micelio de uno de los patógenos, colocando luego sobre los dos discos un cubreobjeto estéril. Las cajas de Petri se incubaron a 24°C y se replicaron 3 veces; posteriormente se hicieron observaciones al microscopio cada ocho horas.

Para evaluar la capacidad antagónica de los 17 aislamientos de *Trichoderma* y su

potenciabilidad para controlar enfermedades de plantas, se hicieron varios ensayos utilizando plántulas de pepino cohombro de la variedad "Straigh Eight" inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* y plántulas de frijol de las variedades "Tundamá" y "Porriño Sintético" inoculadas con *R. solani*.

En estos ensayos los aislamientos de *Trichoderma* se propagaron en cajas de Petri con PDA a 24°C durante 10 días; luego se prepararon suspensiones de conidias con agua destilada estéril a una concentración de 1,5 millones por mililitro.

El inóculo de *F. oxysporum* se preparó añadiendo trozos de micelio a erlenmeyers de 2.000 ml que contenían 600 g de granos enteros de avena estéril y se incubaron a 24°C durante 15 días; luego el inóculo se secó al aire, se trituró en una licuadora y se tamizó utilizando una malla de 1 mm.

El inóculo de *R. solani* se incrementó en un medio compuesto por suelo, papa cortada y agua en proporciones de 4:1:10. El medio se colocó en erlenmeyers de 1.000 ml a la mitad de su capacidad y se esterilizó a 121°C durante 1 hora por 3 días consecutivos; luego se inoculó con trozos de micelio y se incubó a 24°C durante dos semanas.

Para el ensayo con plántulas de pepino cohombro, el hongo *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* se inoculó en proporción de 1% por peso en materos con 300 g de suelo estéril; posteriormente se aplicó al suelo una suspensión de 1,5 millones de conidias por gramo de cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* en materos separados, para un total de 17 tratamientos. Además, se aplicó otro tratamiento consistente en 60 ppm de benomil y también la combinación del aislamiento T-95 de *T. harzianum* + 60 ppm de benomil. Los materos se sembraron con 7 semillas de pepino cohombro y se colocaron bajo luz fluorescente continua a una temperatura de 25°C. Cada tratamiento se replicó 3 veces. Se realizaron observaciones diarias durante un mes, registrando el número de plantas enfermas.

Para el ensayo con plántulas de frijol, el patógeno *R. solani* se inoculó a razón de 1% por peso, simultáneamente con 1,5 millones de esporas por gramo de suelo de los

aislamientos de *Trichoderma*. También se utilizaron dos tratamientos con los fungicidas pentacloronitrobenzoceno (PCNB, Brassicol) a una concentración de 1 ppm y benomil a una concentración de 60 ppm. Se utilizaron materos con 300 g de suelo estéril, los cuales se incubaron después de inoculados a 24°C durante 5 días, y posteriormente se sembraron en cada uno 7 semillas de frijol y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de los ensayos anteriores. Se realizaron observaciones diarias durante 35 días que duró el ensayo, registrando el número de plantas enfermas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Aislamiento del hongo *Trichoderma*.** Los 17 aislamientos obtenidos se identificaron dentro de las especies *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride* y *T. aureoviride*, de acuerdo con el tamaño y forma de las conidias. Los resultados encontrados en las pruebas de compatibilidad ecológica confirmaron la identificación taxonómica realizada. Se observó incompatibilidad entre la mayor parte de los aislamientos con formación de zonas de inhibición que impedían la mezcla entre las colonias, principalmente entre especies diferentes.

**Ensayos de antagonismo "in vitro".** Con estos ensayos se determinó la actividad antagónica de los aislamientos de *Trichoderma* y los dos patógenos. El mayor antagonismo se observó sobre *Rhizoctonia solani* en donde todos los aislamientos del antagonista redujeron en forma apreciable el desarrollo del patógeno y además algunos de ellos esporularon abundantemente sobre la superficie de la colonia. El antagonismo sobre *Fusarium oxysporum* fue menos marcado y solamente cinco aislamientos de *Trichoderma* lograron afectar de una manera importante el desarrollo de la colonia del patógeno; solo dos de estos antagonistas esporularon sobre la superficie de la colonia. El aislamiento T-95 de *T. harzianum* fue uno de los que ocasionaron un menor antagonismo sobre ambos patógenos. Esta variación antagónica coincide con lo observado por Bell *et al* (1982), quienes encontraron una gran variabilidad según el aislamiento utiliza-

do. El antagonismo "in vitro" presentado por los aislamientos de *Trichoderma* se debe en parte a la mayor tasa de crecimiento y a la mayor capacidad de colonización del sustrato, en comparación con los dos patógenos utilizados.

**Ensayos de parasitismo "in vitro".** En las pruebas de parasitismo "in vitro" se observó una gran interacción entre algunos aislamientos de *Trichoderma* y *Rhizoctonia solani*. Once de los 17 aislamientos desarrollaron un parasitismo expresado en diversos grados de enrollamiento de las hifas del patógeno por las hifas del antagonista; también se observó fragmentación y lisis de las hifas, una clara penetración de las hifas del patógeno y formación de divertículos laterales. Esta gran actividad parasítica de *Trichoderma* sobre *R. solani* coincide con lo observado por Hadar *et al* (1978) y Chet *et al* (1981). Los aislamientos de *T. viride* y *T. aureoviride* no presentaron ninguna actividad parasítica contra *R. solani*.

En las pruebas realizadas entre los aislamientos de *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum* no se observó ninguna actividad parasítica importante entre los dos organismos, apreciándose apenas una ligera vacuolación en algunas células del micelio del patógeno.

**Ensayos de antagonismo en plantas de pepino cohombro y de frijol.** Los aislamientos de *Trichoderma* ocasionaron un retardo en la aparición de los síntomas de la enfermedad ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en plántulas de pepino cohombro; también se observó una disminución de la severidad de la enfermedad y un menor número de plántulas enfermas en comparación con el Testigo inoculado únicamente con el patógeno (Cuadro 1). Esto coincide con lo observado por Borda y Arbeláez (1985).

Aunque los resultados de las pruebas de parasitismo "in vitro" no mostraron ninguna actividad antagónica sobre el patógeno, en este ensayo fue evidente observar diversos grados de protección de las plántulas de pepino cohombro por los distintos aislamientos de *Trichoderma* al ataque del patógeno. Esto muestra la poca utilidad de los ensayos de parasitismo "in vitro" cuando se comparan con los ensayos usando plantas vivas.

**Cuadro 1.** Índice de infección en plántulas de pepino cohombro inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, y tratadas con diferentes aislamientos de *Trichoderma* y con el fungicida benomil.

Tratamiento	Aislamiento	Índice de infección*
<i>T. harzianum</i>	T13	1,48 a
<i>T. harzianum</i>	T17	1,76 a
<i>T. harzianum</i>	T3	1,86 a
<i>T. harzianum</i>	T8	1,89 a
<i>T. harzianum</i>	T14	2,07 a
<i>T. hamatum</i>	T16	2,13 a
<i>T. harzianum</i>	T15	2,20 a
<i>T. hamatum</i>	T12	2,51 a
<i>T. viride</i>	T10	2,66 b
<i>T. harzianum</i>	T2	2,71 b
<i>T. aureoviride</i>	T5	2,74 b
<i>T. harzianum</i>	T4	2,85 b
<i>T. harzianum</i>	T7	2,94 b
<i>T. aureoviride</i>	T6	2,97 b
<i>T. harzianum</i> + benomil	T95	3,07 b
<i>T. harzianum</i>	T9	3,23 b
<i>T. harzianum</i>	T1	3,74 c
<i>T. harzianum</i>	T95	3,91 c
Benomil		4,22 c
Testigo		4,38 c

\* Los promedios con letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ( $P = 0,05$ ). Cada cifra corresponde al promedio de 3 replicaciones.

Los aislamientos T13, T15 y T17 de *T. harzianum*, el aislamiento T-16 de *T. hamatum* y el aislamiento T-10 de *T. viride* que presentaron los valores más altos de inhibición "in vitro" sobre la colonia de *F. oxysporum*, también dieron un buen control de la enfermedad en plántulas de pepino cohombro.

La aplicación de benomil solo, o en forma conjunta con el aislamiento T-95 de *T. harzianum*, el cual es tolerante al fungicida, no ocasionó una reducción apreciable de la enfermedad. Todos los aislamientos de *Trichoderma* inoculados redujeron el nivel de la enfermedad y fueron mejores que la aplicación de benomil al suelo (Cuadro 1).

En el ensayo donde se inoculó *R. solani* al suelo y se plantaron semillas de frijol de la variedad "Tundamá", los aislamientos de *Trichoderma* aumentaron la germinación de

las semillas y la emergencia de plántulas, en comparación con el Testigo que presentó los valores más altos de afección; igualmente ocasionaron una disminución en la severidad de la enfermedad y se obtuvo un mayor tamaño de las plántulas.

En el ensayo con la variedad de frijol "Porrillo Sintético" los aislamientos de *Trichoderma* redujeron igualmente el efecto de *R. solani* en el suelo con una mayor germinación de las semillas y emergencia de plántulas en comparación con el Testigo, y además se produjo un menor desarrollo de la enfermedad (Cuadro 2).

El fungicida PCNB redujo la enfermedad en comparación con el Testigo. Sin embargo, tres aislamientos de *T. harzianum* y dos aislamientos de *T. hamatum* fueron más efectivos que el fungicida en la reducción de la enfermedad (Cuadro 2).

Todos los aislamientos de *Trichoderma* utilizados aumentaron el tamaño de las plántulas de frijol en comparación con el Testigo inoculado con *R. solani*, con el Testigo sin inocular y con el tratamiento con el fungicida PCNB. Sin embargo, algunos aislamientos

del antagonista lo hicieron en mayor grado, como fueron los aislamientos T13, T1 y T4 de *T. harzianum* (Cuadro 2). Esto coincide con lo observado por otros investigadores como Baker (1988) y Chang *et al* (1986) en plantas de crisantemo, petunia, rábano y berenjena. Este hecho parece deberse a un menor daño en las raíces de las plantas por el patógeno y a la producción de sustancias reguladoras de crecimiento por parte del antagonista.

Los aislamientos T13 y T17 de *T. harzianum* fueron los aislamientos más efectivos como antagonistas en la reducción de las enfermedades ocasionadas por *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en pepino cohombro y *R. solani* en frijol. Estos aislamientos deberían evaluarse en otros ensayos, principalmente bajo condiciones de campo para determinar su verdadero valor como antagonistas.

## LITERATURA CITADA

1. Baker, R. 1985. Biological control of plant pathogens: definitions. pp:25-39. *En* M.A.

**Cuadro 2.** Efecto de diversos tratamientos sobre la enfermedad ocasionada por *Rhizoctonia solani* en frijol de la variedad "Porrillo Sintético".

Tratamiento	Aislamiento	Pudrición de semillas (n = 15)	Plantas con necrosis (n = 15)	Altura de planta (n = 15) (cm)
Testigo sin inocular		0,00	0,00	5,7
<i>T. harzianum</i>	T17	0,00	0,33	6,8
<i>T. harzianum</i>	T13	0,00	0,33	7,3
<i>T. hamatum</i>	T12	0,00	0,13	7,0
<i>T. hamatum</i>	T16	0,00	0,06	6,9
<i>T. harzianum</i>	T2	0,00	0,40	6,8
PCNB		0,00	0,26	5,5
<i>T. harzianum</i>	T15	0,33	0,06	6,4
<i>T. harzianum</i>	T13	0,33	0,33	7,6
<i>T. harzianum</i>	T1	0,60	0,33	7,9
<i>T. aureoviride</i>	T5	0,60	0,06	7,0
<i>T. harzianum</i>	T95	0,60	0,26	6,4
<i>T. hamatum</i>	T11	0,60	0,13	6,8
<i>T. harzianum</i>	T9	1,00	0,13	5,8
<i>T. harzianum</i>	T8	1,00	0,26	5,4
<i>T. harzianum</i>	T7	1,00	0,26	7,3
<i>T. harzianum</i>	T14	1,33	0,26	7,0
<i>T. aureoviride</i>	T6	1,33	0,33	5,8
<i>T. harzianum</i>	T4	1,66	0,06	8,5
<i>R. solani</i>	RS 7-80	3,30	0,80	4,7

- Hoy y D.C. Herzog, eds. Biological control in agricultural IPM Systems. Academic Press, N. York.
2. Baker, R. 1988. *Trichoderma* spp. as plant-growth stimulants. CRC Critical Reviews in Biotechnology 7 (2): 97-106.
  3. Bell, D.K., H.D. Well y C.R. Markham. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382.
  4. Borda F. y G. Arbeláez. 1985. Control del marchitamiento vascular del pepino ocasionado por *Fusarium oxysporum* Schl. con el aislamiento T-95 de *Trichoderma harzianum* Rifai. Fitopatología Colombiana 11 (2): 10-15.
  5. Chang, Y.C., Y.C. Chang, R. Baker, O. Kleinfeld y I. Chet. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 70: 145-148.
  6. Chet, I. y R. Baker. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71: 286-290.
  7. Chet, I., G. Hartman y R. Baker. 1981. *Trichoderma*, its hyphal interaction with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* sp. Microbial Ecology 7: 29-38.
  8. Chet, I. 1987. *Trichoderma* - Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. pp: 137-160. En I. Chet, ed. Innovative approaches to plant disease control. John Wiley & Sons, New York.
  9. Elad, Y., I. Chet y J. Katan. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70: 119-121.
  10. Elad, Y., I. Chet y Y. Hennis. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica 9(1): 59-67.
  11. Hadar, Y., I. Chet y Y. Hennis. 1978. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum* Phytopathology 69: 64-68.
  12. Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Commonw. Mycol. Pap. 116: 1-56.
  13. Sivan, A. y I. Chet. 1985. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. J. Phytopathology 116: 39-47.