

Efecto antagónico "in vitro" de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre agentes patógenos de semilla y suelo en el cultivo del frijol

Antagonistic effect "in vitro" of different strain of *Trichoderma* spp. on pathogens organism of the seed and the soilborne in bean crop

Mercedes González Rodríguez¹, Leónides Castellanos González¹, María Ramos Fernández¹, Grisell Pérez González².

¹Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal Cienfuegos, Carretera Palmira km 4 ½, Cienfuegos CP 55100

²Estación Experimental La Colmena. La Colmena. Carretera de Cumanayagua, Cienfuegos.

E-mail: laprosavcfg@sanvegcfg.co.cu

RESUMEN. Se realizó un estudio de cinco cepas de *Trichoderma* spp. para evaluar su actividad antagónica e hiperparasítica "in vitro" hacia *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Macrophomina phaseoli* Tassi aislados de semillas y plantas enfermas en el cultivo del frijol. Las pruebas se efectuaron en placas de Petri en sustrato papa-dextrosa-agar en cultivo dual. Todas las cepas de *Trichoderma* spp. estudiadas presentaron antagonismo por competencia e hiperparasitismo sobre los patógenos aislados. Las cepas *Trichoderma harzianum* (A-34) y *Trichoderma viride* (C-66) manifestaron mayor antagonismo e hiperparasitismo sobre el hongo patógeno *Macrophomina phaseoli*. El mayor efecto antagónico sobre *Sclerotium rolfsii* se obtuvo con la C-66, mientras que sobre *Rhizoctonia solani* se obtuvo con las cepas A-61, A-34, y *Trichoderma* sp. *Trichoderma viride* C-66 mostró el mayor hiperparasitismo sobre *Sclerotium rolfsii*, sin embargo contra *Rhizoctonia solani* fue con las cepas C-66 y *Trichoderma viride*.

Palabras clave: Antagonistas, hongos del suelo, *Trichoderma*.

ABSTRACT. Studies were made with five *Trichoderma* isolates for evaluating activity hyperparasitic and antagonist "in vitro" toward *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Rhizoctonia solani* Kühn and *Macrophomina phaseoli* Tassi isolated of beans seeds and diseases plants. In dual culture test on PDA, all the isolates shows antagonist and hyperparasitic against pathogenic fungus *Macrophomina phaseoli*. The best antagonist effect against *Sclerotium rolfsii* was obtained with *Trichoderma viride* C-66, while toward *Rhizoctonia solani* the best was obtained with isolates A-61, A-34, and *Trichoderma* sp. *Trichoderma viride* C-66 showed the highest hyperparasitic action against *Sclerotium rolfsii*, however against *R. solani* this was the best the same as *Trichoderma viride*.

Key words: Antagonist, soilborne, *Trichoderma*.

INTRODUCCIÓN

La distribución mundial de leguminosas incluye un gran número de géneros desde el punto de vista botánico, siendo el más importante el género *Phaseolus* y dentro de este, la especie *Phaseolus vulgaris* L. (frijol). Esta planta es originaria de América y se considera esta zona el centro más probable de diversificación primaria.

El frijol común puede ser cultivado ampliamente en zonas tropicales de América, así como en zonas templadas de los hemisferios Norte y Sur incluyendo Europa y el este de Asia. (Zaumeier y Thomas, 1957)

Sanders y Alvarez.(1978), informan que América Latina es la principal productora de frijol en el mundo, aunque el rendimiento promedio que se obtiene es bajo y no ha mostrado crecimiento en los últimos años.

Los lugares del continente donde se producen las mayores cantidades de frijol seco o común, son América Central y América del Sur, con el 34 % de la producción mundial, el cual se incrementa cada año. (Infante y otros , 1973)

En Cuba, el cultivo del fríjol se ve afectado por diferentes enfermedades las que limitan grandemente los rendimientos. Dentro de estas

se destacan las producidas por hongos patógenos del suelo. De ellas se consideran más importantes las producidas por los géneros *Rhizoctonia solani* Kühn, *Macrophomina phaseoli* Tassi, *Fusarium solani* Mart y *Sclerotium rolfsii* Sacc, entre otras.

Dentro de los medios biológicos de mayor uso para el combate de los hongos patógenos en los diferentes cultivos y países se encuentra *Trichoderma* spp. En Cuba, este biopreparado ha manifestado buena actividad contra hongos patógenos del suelo y la semilla en los cultivos, de tomate, pimiento y tabaco (Stefanova y otros, 1993; Sandoval y otros, 1995; Santana y otros, 1995; Baquero y Devesa, 1995; Castellanos y otros, 1995), pero se desconoce el efecto de este agente de biocontrol en el cultivo del frijol, por tal motivo se realizó este experimento “in vitro” de cepas de *Trichoderma* spp. contra hongos patógenos del suelo y la semilla que afectan al frijol.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Cienfuegos en el período 2001-2002 para conocer el efecto antagónico de varias cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Rhizoctonia solani* Kühn, aislados de plantas enfermas en el cultivo del frijol.

Se utilizaron cinco aislamientos de *Trichoderma* identificados como *Trichoderma harzianum* (cepa A-34); *Trichoderma* sp. (A-61); *Trichoderma viride*; *Trichoderma* sp y *Trichoderma viride* (C-66).

Se utilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro en medio papa-dextrosa-agar donde se sembraron los hongos patógenos en cultivo dual con las diferentes cepas de *Trichoderma*. El testigo consistió en sembrar un disco del hongo patógeno en estudio en el centro de las placas sin colocar disco alguno de *Trichoderma* spp. El experimento se montó sobre un diseño completamente aleatorizado con cinco observaciones (placas). La temperatura de incubación de las placas osciló entre 25 ± 2 °C.

Para conocer la existencia del antagonismo de las cepas en estudio se comenzaron las evaluaciones a las 24 horas hasta las 72 horas de realizarse la siembra

de los microorganismos y las mismas consistieron en medir el diámetro de cada colonia hasta el enfrentamiento; después, con la finalidad de evaluar el hiperparasitismo, se continuó con la medición del crecimiento de cada colonia de *Trichoderma* sobre el hongo hasta los 7 días y de iniciado el ensayo.

Con la confirmación de diámetro de las colonias de los hongos patógenos y la distancia de solapamiento de *Trichoderma* sobre estos se realizó un análisis de varianza. Las medias se compararon por el test de rangos múltiples de Duncan, para lo cual se utilizó el paquete estadístico STATITCF.

Para el aislamiento de los hongos se utilizaron semillas de frijol variedad Serrano, seleccionándose al azar 200 semillas que se colocaron sobre papel de filtro humedecido en placas de Petri de 9 cm de diámetro, en número de 10 por placa. Posteriormente, fueron incubadas a 25 ± 1 °C con ciclos de 8 horas luz y 16 horas de oscuridad durante 8 días. Al terminar este período se realizó la evaluación para confirmar la identidad de las especies. sobre la semilla.

Se utilizó la técnica de cultivos monospóricos para obtener la cepa de cada hongo presente sobre la semilla.

Con el objetivo de determinar el antagonismo e hiperparasitismo de *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseoli* aislados de semillas de frijol se enfrentaron en cultivo dual a *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) y *Trichoderma viride* (cepa-66).

El experimento se condujo sobre un diseño completamente aleatorizado con 4 placas como réplica. Las medias fueron comparadas por el test de rangos múltiples de Duncan con un 5 % de error. Para el procesamiento estadístico se utilizó el paquete STATITCF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas de *Trichoderma* en estudio tuvieron un efecto antagónico marcado sobre *Sclerotium rolfsii* mostrando diferencias significativas con respecto al testigo. El antagonismo a las 72 horas resultó mayor con la cepa 66, seguida en orden descendente por la A-

34, A-61, *T. viride* y, por último, *Trichoderma* sp. que manifestó el menor antagonismo aunque sin diferencia estadística con las tres cepas anteriores (Tabla 1).

Tabla 1. Diámetro de la colonia de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en el enfrentamiento con diferentes cepas de *Trichoderma* spp.

| VARIANTES | CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS A LAS 72 HORAS | |
|-----------|--|------|
| | x(cm) | SIG. |
| A - 61 | 2,56 | bc |
| A - 34 | 2,30 | bc |
| T.V | 2,68 | bc |
| T. sp | 2,90 | b |
| C - 66 | 2,08 | c |
| Testigo | 4,50 | a |
| C.V. (%) | 12,6 % | |
| E.T.* | 0,36 | |

*Letras desiguales difieren para $p \leq 0,05$ según el test de Duncan.

La cepa C-66 demostró una actividad hiperparasítica fuerte sobre *S. rolfsii*. *Trichoderma harzianum* cepa A-34 le siguió en orden de mérito a C-66 con respecto al hiperparasitismo, mientras que las cepas A-61, *Trichoderma viride* y *Trichoderma* sp estuvieron relegadas al último lugar (Tabla 2). Estos resultados sugieren la utilización de las cepas C-66 y A-34 para

Sandoval (1995), encontró hiperparasitismo sobre *S. rolfsii* en menos del 50 % de los aislamientos estudiados, por otra parte, Santana y otros (1995), encontraron que las cepas A-34 y C-66 manifestaron hiperparasitismo evidente sobre *S. rolfsii* aislado de Topinambur siendo mayor con esta última, lo que apoya los resultados del trabajo.

| VARIANTES | DISTANCIA DE SOLAPAMIENTO DE LAS COLONIAS | |
|-----------|---|------|
| | x(cm) | SIG. |
| A - 61 | 0,60 | c |
| A - 34 | 0,90 | c |
| T.V | 0,56 | c |
| T. sp | 0,50 | c |
| C - 66 | 1,20 | a |
| C.V.(%) | 22,4 | |
| E.T.* | 0,17 | |

Tabla 2. Mediciones del hiperparasitismo de las cepas de *Trichoderma* sobre *Sclerotium rolfsii* Sacc.

* Letras desiguales difieren para $p \leq 0,05$ según el test de Duncan.

La actividad antagónica mayor sobre *R. solani* se obtuvo con las cepas A-61, A-34 y *Trichoderma* sp. Las cepas C-66 y *Trichoderma viride* resultaron ser las menos antagónicas. (tabla 3)

Todas las cepas superaron al testigo. A pesar de que la cepa de *Trichoderma* sp. mostró diferencia con respecto al testigo fue la de menor efectividad

en el control de *R. solani*. Resultados similares informan Dennis y Webster (1971), al encontrar actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* cepa A-34 contra diferentes hongos, incluidos *Rhizoctonia solani*, mientras que Sandoval y otros (1995, 1998), comprobaron “ in vitro “ en cultivo dual que *T. harzianum* resultó buen antagonista de diferentes aislamientos de *R. solani*.

Tabla 3. Diámetro de la colonia de *Rhizoctonia solani* en el enfrentamiento con diferentes cepas de *Trichoderma*

| VARIANTES | CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS A LAS 72 HORAS | |
|-----------|--|------|
| | x(cm) | SIG. |
| A – 61 | 2,38 | c |
| A – 34 | 2,38 | c |
| T.V | 3,50 | b |
| T. sp | 2,75 | c |
| C – 66 | 3,28 | b |
| Testigo | 4,63 | a |
| C.V. (%) | 10,4 | |
| E.T.* | 0,33 | |

* Letras desiguales difieren para $p \leq 0,05$ según el test de Duncan

Las cepas *Trichoderma viride* y C-66 manifestaron el mayor hiperparasitismo sobre *R. solani* (Tabla 4). En general pudo observarse que todas las cepas fueron hiperparásitas y lograron reducir el crecimiento micelial del hongo patógeno. Al respecto, Sandoval y otros (1995, 1998),

demonstraron que *T. harzianum*, dentro del grupo de cepas que estudiaron, era buen hiperparásito de diferentes aislados de *R. solani* obtenida en los cultivos tomate, pimiento y clavel.

Tabla 4. Mediciones del hiperparasitismo de cepas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* Kühn

| VARIANTES | DISTANCIA DE SOLAPAMIENTO DE LAS COLONIAS | |
|-----------|---|------|
| | x(cm) | SIG. |
| A – 61 | 1,45 | d |
| A – 34 | 2,50 | c |
| T.V | 3,50 | a |
| T. sp | 3,00 | b |
| C – 66 | 3,50 | a |
| C.V. (%) | 1,6 | |
| E.T.* | 0,04 | |

* Letras desiguales difieren para $p \leq 0,05$ según test de Duncan

De forma general todas las cepas de *Trichoderma* en estudio tuvieron acción antagónica contra *Slerotium rolfisii* y *Rhizoctonia solani*, aunque las cepas C-66 y A-34 tuvieron un comportamiento más estable, la primera con mayor acción antagónica contra *S. rolfisii* y la segunda contra *R. solani*, aunque la C-66 se manifestó con mayor acción hiperparásita contra ambos hongos patógenos.

La acción antagónica “in vitro” de la cepa A-34 fue superior a la cepa C-66, aunque ambas presentaron diferencias con respecto al testigo. La acción antagónica de *T. harzianum* cepa A-34 y la cepa C-66 fue superior sobre el hongo patógeno

Macrophomina phaseoli que sobre *Rhizoctonia solani*, no detectándose diferencia significativa entre ambas cepas sobre *M. phaseoli*, sin embargo hubo diferencias significativas en cuanto a estas cepas con respecto al hongo patógeno *R. solani*, mostrando el mayor antagonismo la cepa A-34 (Tabla 5).

Según Pineda y otros (1998) en estudios realizados en el cultivo de ajonjolí (*Sesamun indicum L.*) encontraron dos especies de *Trichoderma* con capacidad de inhibir el desarrollo y la producción de esclerocios de *Macrophomina phaseoli* las cuales fueron señaladas como antagonistas activos de este hongo patógeno.

Dennis y Webster (1971), encontraron actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* cepa A-34 contra diferentes hongos, incluido *R. solani*. Por otra parte, Sandoval (1995), Stefanova y otros (1996) y

Castellanos (1996), comprobaron “in vitro” en cultivo dual que *T. harzianum* es buen antagonista de diferentes aislamientos de *R. solani*

Tabla 5. Diámetro de las colonias de dos hongos patógenos de la semilla del frijol frente a las cepas de *Trichoderma*

| VARIANTES | HONGOS PATÓGENOS | | | | | | |
|-------------|------------------------------|------|---------------------------|------|------|------|------|
| | <i>Macrophomina phaseoli</i> | | <i>Rhizoctonia solani</i> | | | | |
| | x(cm) | SIG. | x(cm) | SIG. | x | SIG. | E.T. |
| Cepa A – 34 | 3,00 | D | 4,00 | c | 2,66 | c | 0,04 |
| Cepa 66 | 3,00 | D | 4,50 | b | 2,83 | b | - |
| Testigo | 4,00 | C | 5,00 | a | 3,66 | a | - |
| X patógenos | 3,33 | B | 4,50 | a | | | |
| E.T* | 0,1 | | | | 0,03 | | |
| C.V. (%) | 3,2 | | | | | | |

* Letras desiguales difieren para $p \leq 0,05$ según test de Duncan.

Las dos cepas en estudio mostraron hiperparasitismo sobre *M. phaseoli* y *R. solani* no presentándose diferencia estadística en cuanto al nivel de

hiperparasitismo de cada cepa sobre cada hongo patógeno en particular. (Tabla 6)

Tabla 6. Medición del hiperparasitismo “in vitro” de dos cepas de *Trichoderma* contra dos hongos patógenos de la semilla

| VARIANTES | HONGOS PATÓGENOS | | | | | | |
|-------------|------------------------------|------|---------------------------|------|------|------|------|
| | <i>Macrophomina phaseoli</i> | | <i>Rhizoctonia solani</i> | | | | |
| | X | SIG. | x | SIG. | x | SIG. | E.T. |
| Cepa A – 34 | 2,62 | a | 1,00 | B | 1,81 | a | 0,05 |
| Cepa 66 | 2,50 | a | 1,00 | B | 1,75 | a | - |
| X Patógenos | 2,56 | a | 1,00 | B | - | | |
| E.T* | 0,07 | | | | 0,03 | | |
| C.V.(%) | 3,9 | | | | | | |

* Letras desiguales difieren para $p \leq 0,05$ según test de Duncan

En la interacción tratamiento patógeno las cepas de *Trichoderma* empleadas manifestaron un mayor parasitismo sobre *Macrophomina phaseoli* a los 7 días después del enfrentamiento que sobre *R. solani*, sin embargo a los 10 días la totalidad de las colonias de los hongos patógenos estaban hiperparasitadas por ambas cepas. Sandoval y otros (1995), obtuvieron resultados similares de antagonismo e hiperparasitismo con la aplicación de *T. harzianum* contra aislados de *R. solani*.

También *T. harzianum* resultó ser un control efectivo de *R. solani* en el cultivo del clavel (Sandoval y col., 1998) y presentó un buen antagonismo e

hiperparasitismo contra *Alternaria solani* Sor. aislado del cultivo de la papa. (Castellanos y otros, 1996)

CONCLUSIONES

1. Se presentó antagonismo por competencia sobre *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseoli* con todas las cepas de *Trichoderma* spp. estudiadas contra cada uno de ellos.

2. El mayor efecto antagónico sobre *Sclerotium rolfsii* se obtuvo con la cepa C-66, mientras que sobre *R. solani* se obtuvo con las cepas A-61,

A-34 y *Trichoderma* sp.

3. *Trichoderma* cepa C-66 mostró el mayor hiperparasitismo sobre *Sclerotium rolfsii* mientras que contra *Rhizoctonia solani* el mayor hiperparasitismo fue con las cepas C-66 y *Trichoderma viride*.

4. Las cepas A-34 y C-66 manifestaron mayor nivel de antagonismo e hiperparasitismo sobre el hongo patógeno *Macrophomina phaseoli*.

9. ZAUMEYER, W. J. AND H. R. THOMAS: "A monography study of bean diseases and methods for their control", *Techn. Bull. U. S. Department of Agriculture*, p. 868, 1957.

Recibido: 12/Diciembre/2006

Aceptado: 24/Noviembre/2007

BIBLIOGRAFÍA

1. BELL, D. K; H. D. WELL AND C. R. MARKHAN: "In Vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal plant pathogens". *Phytopathology*. 4: 72, 1982.

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

3. DENNIS, L. AND J. WEBSTER: "Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction", *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 363-369, 1971.

4. JUAN, B; P. PINEDA, R. ERCILLA Y E. GONNELLA: "Evaluación del control biológico de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.)" *Agronomía Tropical* 38(4-6): 43-48, 1988.

5. SANDERS, J. AND C. ALVAREZ: Evaluation of beans productions during the last year. CIAT, p. 34, 1978.

6. SANDOVAL, I; M. LÓPEZ; T. BONILLA; Y. TOMAS: "Hongos del suelo que atacan al clavel y antagonismo "in vitro" con *Trichoderma* spp.". *Fitosanidad*. IISV. 3 y 4 (2): 41, 1998.

7. SANTANA, T. Y M. LORENZO: Acción antagónica que ejercen diferentes cepas de *Trichoderma* contra *Sclerotium rolfsii* Sacc. aislado de Topinambur (*Helianthus tuberosum* L.), en Resúmenes III Encuentro Nacional Científico Técnico de Bioplaguicidas EXPO CREE, p. 38, 1995.

8. WEINDLING, R.: "*Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi", *Phytopathology* 22. *Microbial*, 4: 247-260, 1950.