

CONTROL BIOLÓGICO DE TRES HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN COLIFLOR Y PEPINO COHOMBRO

J. Ricardo Galindo P.; Gabriel Hernández A.; Germán Arbeláez T.*

RESUMEN

En los Laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Bogotá se realizaron tres ensayos para determinar el efecto de la aplicación del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* en la incidencia de las enfermedades causadas por *Pythium* sp y *Rhizoctonia solani* en plántulas de coliflor, y la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* en plantas de pepino cohombro. El aislamiento T17 de *T. harzianum* anuló la acción de *Pythium* sp. cuando se aplicó en suspensión a la dosis de 13.2×10 esporas/g de suelo previamente esterilizado con un pH entre 5.0 y 6.8. El aislamiento T15 redujo en un 61% la incidencia de *Pythium* sp. cuando se aplicó a la dosis de 5.7×10 esp./g de suelo, cuando el pH fue de 5.0. El antagonista no controló significativamente los otros patógenos, pero las plantas sobrevivientes presentaron mayor desarrollo foliar con respecto a testigos.

Palabras Claves Adicionales: Control biológico, antagonismo.

ABSTRACT

Control of *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* Kuehn and *Fusarium oxysporum* in Cauliflower and Cucumber by *Trichoderma harzianum*

Three trials were performed at laboratory of the Agronomy Department of the Universidad Nacional, Bogotá, Colombia, to determine the effect of the antagonist fungus *Trichoderma harzianum* on the disease caused by soilborne pathogens *Pythium* sp. and *Rhizoctonia solani* in cauliflower plantlets, and *Fusarium oxysporum* f.sp. *Cucumerinum* in cucumber. The *T. harzianum* T17 isolate avoided the action of *Pythium* sp. when was applied at 13.2×10 spores in suspension/g of soil sterilized previously, with pH's of 5.0, 5.7 and 6.8. The T15 isolate reduced *Pythium* sp. incidence up to 61% related to the pathogen treatment (control) with a pH equalled 5.0. Other pathogens were not controlled significantly by the antagonist. The survivors plants had a larger foliar development in the presence of the antagonist than in its absence.

Additional Index Words: Biological control, suppressiveness.

* Ing. Agr. División de Biometría, ICA-Tibatá, A.A. 151123 El Dorado, Bogotá; Ing. Agr. Comité de Cafeteros de Cundinamarca, Bogotá; Ing. Agr. M.S. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Bogotá.

El control biológico de muchos patógenos ocurre naturalmente en los denominados suelos supresivos. Se realizan esfuerzos enormes por parte de diferentes investigadores para encontrar, aislar e identificar los organismos que ocasionan la supresividad y transmitirlos a suelos conductivos. Sin embargo, dada la complejidad del suelo como medio donde se desarrollan los sistemas bióticos responsables del fenómeno, es lógico que los progresos en este campo sean lentos y a veces contradictorios (1, 8, 10, 11).

Investigaciones anteriores en el control de *Rhizoctonia solani* utilizando *Trichoderma harzianum* como antagonista, han demostrado resultados positivos. Los ensayos iniciales lograron reducir el nivel de incidencia bajo condiciones de laboratorio en plantas de frijol (5, 10, 13, 16), rábano (4, 14), tomate, berenjena (13), alfalfa, remolacha azucarera (4), y otras.

Posteriormente se logró cierto grado de control del patógeno bajo condiciones de campo en cultivos de papa (9), clavel (8), crisantemos, petunia (7), maní, frijol y berenjena (6). También se ha comprobado una reducción en la incidencia de *Pythium* sp. en plantas de arveja (5, 15), y *Sclerotium rolfsii* en plantas de tomate (12), papa (9), maní, frijol y berenjena (6) utilizando el mismo antagonista.

El hongo *Rhizoctonia solani*, junto con *Pythium* spp. son los principales causantes del volcamiento de plántulas en semilleros. La afección se puede presentar antes de la emergencia de la plántula, la cual se pudre o no logra germinar; y también se presenta en post-emergencia, en cuyo caso se pudre la base del tallo y las plántulas se doblan. Estos hongos también pueden producir en diferentes plantas la pudrición basal del tallo, que usualmente abarca toda la sección transversal, y provoca la marchitez de las hojas y eventualmente la muerte de la planta, como sucede con el clavel.

Otro hongo que se desea controlar biológicamente es *Fusarium oxysporum*, debido a las dificultades que ha presentado el control químico por la fácil reinfestación de suelos tratados. Este hongo presenta diversas formas biológicas especializadas en su patogenicidad a determinados hospedantes, en los cuales produce como síntoma característico la marchitez de la planta; afecta el crisantemo, clavel, pepino cohombro,

melón, tomate, y su importancia es cada vez mayor por los daños que provoca. Los intentos de control biológico con *Trichoderma* sp. sólo han logrado un retraso en la aparición de síntomas de marchitez en plantas de pepino (1).

En la presente investigación se utilizaron dos aislamientos seleccionados de *Trichoderma harzianum* para el control de *R. solani* y *Pythium* sp. en plantas de coliflor y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en plantas de pepino cohombro. El objetivo fue determinar el grado de control con diferentes dosis del antagonista bajo tres niveles del suelo. También se evaluó el efecto de la aplicación de *T. harzianum* en el crecimiento de las plantas mencionadas, debido a que las investigaciones anteriores daban referencia de un mayor desarrollo vegetal bajo el tratamiento con el antagonista (1, 2, 3).

MATERIALES Y METODOS

En los Laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Bogotá se realizaron tres ensayos para evaluar la efectividad del hongo *Trichoderma harzianum* como medio de control de enfermedades causadas por patógenos presentes en el suelo. El hongo mencionado se obtuvo de la investigación realizada por Elías y Arcos (10), de la cual se seleccionaron los aislamientos T15 y T17 con base en la efectividad que presentaron en el control biológico de ciertos patógenos.

Cultivos de Microorganismos

Los aislamientos de *Trichoderma* se cultivaron en cajas de petri con PDA, medio en el cual esporularon abundantemente. Para inocularlo en el suelo, se aplicaron 10 ml de agua destilada estéril por caja y se agitó con el objeto de liberar las esporas y obtener una suspensión acuosa. La concentración de esporas de la suspensión se determinó inicialmente con el método de conteo con hemocitómetro. Posteriormente se empleó la función de regresión entre la densidad óptica de la solución y la concentración de esporas.

En cada ensayo se probó la efectividad del control biológico contra un patógeno determinado. Se utilizó *Pythium* sp. y *Fusarium oxysporum* schl f. sp.

cucumerinum, obtenidos por el Dr. Ralph Baker, de Colorado State University, Fort Collins, Colorado, y *Rhizoctonia solani* Kuehn, enviado por el Programa de Frijol del CIAT. Para cultivar *R. solani* y *Pythium* se utilizó el medio de papa rebanada y suelo (CPS) (5), para lo cual se empleó suelo y papa cortada en proporción 4:1 de peso seco/peso fresco, respectivamente, con una humedad del 15% con respecto al peso total. Quinientos gramos de este medio se colocaron en erlenmeyers de 2.000 ml y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante una hora por tres días consecutivos. Posteriormente el medio se inoculó con el hongo que había crecido inicialmente en cajas de PDA (papa-dextrosa-agar), y se incubó durante siete días, tiempo suficiente para una total colonización del medio. Finalmente, se mezcló con suelo esterilizado, en proporciones establecidas de acuerdo con ensayos preliminares en los cuales se determinó la dosis media efectiva, que fue de 10% de CPS en suelo para *Pythium* y 1% para *R. solani*.

Para la propagación de *F. oxysporum*, se utilizaron granos de avena mezclados con agua, de acuerdo con la metodología establecida por Borda (1); este medio se esterilizó en el autoclave a 121°C por una hora durante tres días consecutivos, y luego se incubó a 26°C durante 15 días con el hongo proveniente de cajas petri con PDA. Finalmente se aplicó al suelo esterilizado a razón del 3%.

Una vez realizada la mezcla de inóculo de patógeno y suelo en las proporciones dadas, se distribuyó en los materos como se describe más adelante y se aplicó el mismo día el inóculo de *Trichoderma harzianum* para los tratamientos que así lo requerían.

Características de los ensayos

El hospedante vegetal utilizado fue la coliflor variedad "Gigante de Otoño", la cual resultó susceptible al volcamiento de plántulas causado por *R. solani* y *Pythium*, de acuerdo a pruebas preliminares en las cuales se seleccionó por su buen porcentaje de germinación entre otras hortalizas. El pepino cohombro variedad "Poinsett 76" se utilizó como hospedante susceptible a *F. oxysporum*.

Los experimentos se realizaron con suelo

franco-limoso procedente del Parque Simón Bolívar de Bogotá; el análisis de suelos reveló un contenido de materia orgánica del 10%, fósforo asimilable del 10.9%, potasio de 0.32 me/g de suelo y un pH inicial de 5.0. Para obtener diferentes niveles de pH se aplicó Carbonato de Calcio (CaCO₃) en proporciones de 2, 4, 6, 10 y 16 gramos por kg suelo, luego se hicieron análisis de suelo periódicos hasta obtener una estabilidad en la reacción.

Se montó un diseño completamente al azar para cada experimento; en un arreglo factorial de 2 x 3 x 3, en el cual se consideraron los efectos de la inoculación del patógeno versus un testigo; la aplicación de *T. harzianum* T15, T17 y el testigo; y tres niveles de pH; 5.0, 6.2 y 7.3 para los ensayos con *Pythium*. Se emplearon 5 repeticiones.

Las plantas se cultivaron en materos plásticos de 10 cm de diámetro mayor y 8 cm de altura, a cada uno de los cuales se les agregaron 200 g de suelo. La densidad de siembra fue de 5-8 semillas de coliflor y de 4-5 semillas de pepino por matero, a una profundidad de 0.5 a 1.0 cm. Los materos se colocaron bajo iluminación continua proveniente de lámparas fluorescentes situadas a 1 m de altura de los materos y que proporcionaron 5.000 lux aproximadamente, y una temperatura promedio de 25°C. La humedad relativa se mantuvo alrededor del 70%.

La enfermedad causada por los patógenos se evaluó de acuerdo a la incidencia y la sintomatología presente. Se hicieron registros del porcentaje de germinación y número de plantas enfermas a los 8 y 15 días después de la siembra para el coliflor y a los 15, 30 y 60 días para el pepino. Finalmente se consideró el porcentaje de plantas vivas para el análisis de los resultados.

El efecto de *Trichoderma* y de los patógenos en el crecimiento de las plantas se evaluó mediante mediciones del área foliar por un método no destructivo, que consistió en el uso de una planilla transparente señalada con puntos uniformemente espaciados en cuadro, a 0.5 cm. El conteo de puntos circunscritos a la lámina foliar da un estimativo del área, al dividir el resultado por una constante (en este caso 4, y el dato queda en cms²) según el espaciamiento fijado.

RESULTADOS

Evaluación del efecto de *T. harzianum* sobre *Pythium* sp.

De acuerdo al análisis de varianza de la Tabla 1, se observa el efecto altamente significativo de

la aplicación de *Pythium* sp. sobre el porcentaje de plantas vivas del coliflor y así mismo de la aplicación del antagonista *T. harzianum*. La interacción significativa patógeno x antagonista cuyos promedios se presentan en la Tabla 2, y la prueba de Duncan realizada sobre los mismos, indican que el efecto de la aplicación de *Pythium* fue significativo en el testigo sin *T. harzianum* en el cual

TABLA 1. Cuadrados medios del análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia y área foliar de la coliflor bajo la aplicación de *Pythium* p. y *R. solani* y del porcentaje de sobrevivencia del pepino cohombro bajo la acción de *F. oxysporum*.

Fuente de variación	gl	COLIFLOR				PEPINO C.					
		Sobreviv. a <i>Pythium</i> %	Área foliar con <i>Pythium</i> cm ²	Sobreviv. a <i>R. solani</i> %	Área foliar con <i>R. solani</i>	Sobreviv. a <i>F. oxysporum</i>					
Patógeno (P)	1	2042.3	**	21.4	ns	4766.0	**	0.155	ns	73856.1	**
Antagonista (A)	2	1089.7	**	368.8	**	734.3	ns	0.300	ns	1276.7	**
pH. (S)	2	1158.0	**	73.0	ns	512.8	ns	76.133	ns	1304.4	**
P x A	2	1390.1	**	192.2	**	19.9	ns	0.217	ns	2403.4	**
P x S	2	1479.3	**	85.6	ns	1532.2	*	2.550	*	1307.8	**
A x S	4	359.0	*	109.8	ns	279.2	ns	0.867	ns	457.5	ns
P x A x S	4	139.5	ns	12.6	ns	423.6	ns	0.184	ns	330.0	ns
Error	54	139.9		31.6		365.7		0.722		208.6	
CV		18.2		31.0		30.4		5.5		27.6	

* Significativo al 5% de probabilidad
ns No significativo

** Significativo al 1% de probabilidad

TABLA 2. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* en el control de enfermedades y el desarrollo de la coliflor y pepino cohombro.

Presencia del patógeno	Antagonista	COLIFLOR				PEPINO C.					
		Sobreviv. a <i>Pythium</i> %	Área foliar con <i>Pythium</i> cm ²	Sobreviv. a <i>R. solani</i> %	Área foliar con <i>R. solani</i> cm ²	Sobreviv. a <i>Fusarium</i> %					
NO	0	72.2	a	7.95	b	75.0	a	3.77	a	82.0	a
	T15	68.0	a	10.15	ab	65.5	a	4.02	a	88.8	a
	T17	70.1	a	9.35	b	72.6	a	3.68	a	82.3	a
	\bar{X}	70.1		9.14		71.0		11.47		84.4	
SI	0	45.8	c	4.90	c	58.3	a	4.24	a	38.3	b
	T15	58.3	b	8.22	a	47.6	a	3.91	a	6.0	c
	T17	74.3	a	12.45	b	58.3	a	3.80	a	16.0	c
	\bar{X}	59.5		8.52		54.7		3.98		20.4	

* Prueba de Duncan al nivel del 5% de significancia
Promedios con la misma letra no difieren significativamente

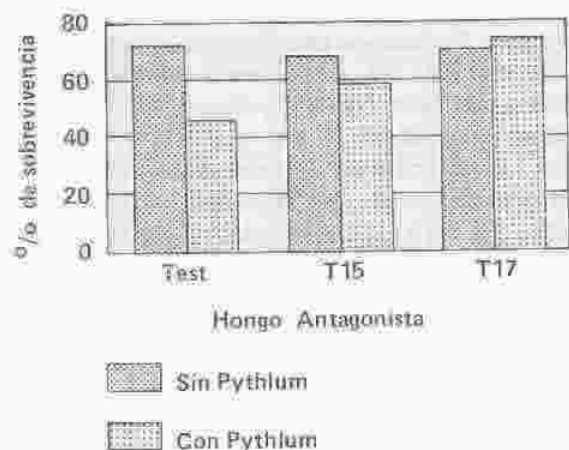


FIGURA 1. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* en el desarrollo de coliflor en suelos con *Pythium* sp.

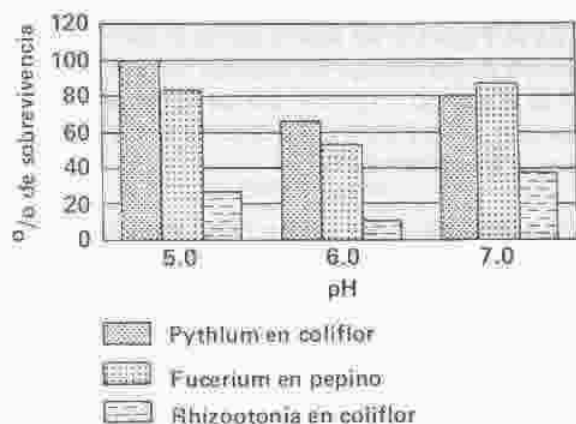


FIGURA 2. Efecto del pH en la sobrevivencia del coliflor y pepino cohombre a patógenos presentes en el suelo.

redujo el porcentaje de plantas vivas en un 26.4%, pero disminuyó su acción en presencia del aislamiento T15 a un 9.7% y finalmente, con la aplicación del aislamiento T17 su efecto patógeno se anuló completamente (Figura 1).

La interacción significativa del patógeno x pH indica que el efecto del patógeno sobre el porcentaje de plantas vivas varía según el nivel de pH presente en el suelo. La Figura 2 muestra que el pH 6.0 disminuyó el porcentaje de sobrevivencia de plantas con respecto al testigo cuando *Pythium* sp. estuvo presente en el suelo, y que en

los suelos con pH 7.0 y 5.0 la sobrevivencia aumentó. La interacción antagonista x pH también resultó significativa, lo cual indica que existen diferencias en el efecto de los aislamientos utilizados de *T. harzianum* sobre la sobrevivencia solo en ciertos niveles de pH. En la Figura 3 se observa que los testigos sin *T. harzianum* no presentaron variaciones significativas en el porcentaje de plantas vivas en los 3 niveles de pH evaluados. Cuando se aplicó el aislamiento T15 se obtuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia si el pH es 5.0. Finalmente, en presencia del aislamiento T17 se obtiene en cualquiera de los pH considerados, un aumento en el porcentaje de plantas vivas con respecto al testigo, indicando que el efecto benéfico de T17 es más estable que el de T15. Solo en el pH 5.0 no hay diferencias entre los dos aislamientos.

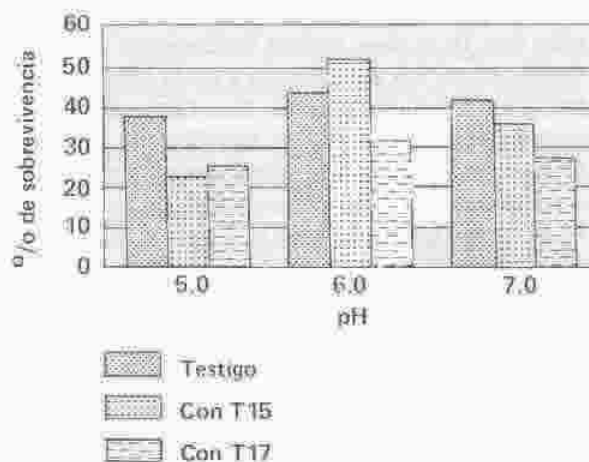


FIGURA 3. Interacción del pH x el antagonista en la sobrevivencia del coliflor a *Pythium* sp.

La interacción de segundo grado: patógeno x antagonista x pH no fue significativa y puede interpretarse de tres formas: que la interacción patógeno por antagonista no varió por efecto del pH del suelo, conservándose las diferencias entre tratamientos, con la ventaja favorable del control biológico; que la interacción patógeno x pH no se efectuó por la presencia del antagonista y/o que el comportamiento del antagonista en los 3 pH's no difirió por efecto de la presencia del patógeno.

El análisis de varianza para la variable área foliar de la coliflor en el ensayo de control de *Py-*

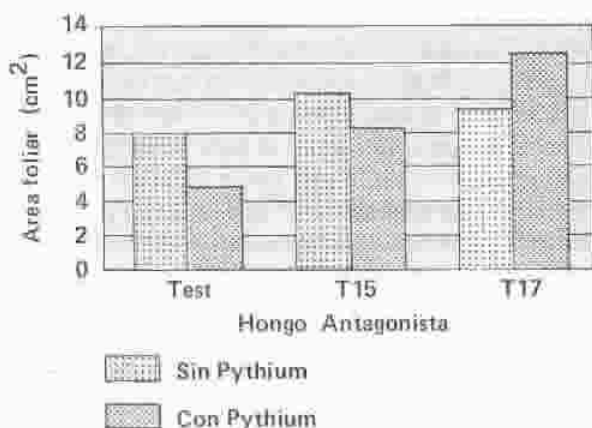


FIGURA 4. Efecto de *T. harzianum* en el área foliar del coliflor en suelos infectados con *Pythium* sp.

hium con *Trichoderma* señala únicamente efectos significativos del antagonista y de la interacción patógeno x antagonista. En este caso, el efecto global del patógeno no es significativo porque existen tratamientos que compensan y superan la pérdida que puede ocasionar *Pythium* en el área foliar. Como se observa en la Figura 4 donde se presenta la interacción patógeno x antagonista,

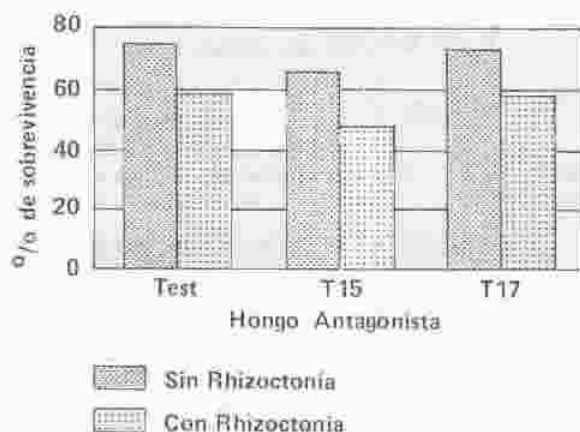


FIGURA 5. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* en el desarrollo de coliflor en suelos con *Rhizoctonia solani*.

aunque el patógeno puede ocasionar en los testigos sin *Trichoderma* una disminución en el área foliar de un 61.6%, en presencia del aislamiento T15 igualan al testigo sin *Pythium* y con T17 lo superan en un 56.6%. Estos resultados confirman que los aislamientos de *Trichoderma* pueden favorecer o estimular el crecimiento vegetal. También, que los 3 pH's evaluados no alteraron esta conclusión.

Efecto de *T. harzianum* en *rhizoctonia solani*

El control de *R. solani* con *T. harzianum* no fue efectivo en el ensayo respectivo, cuyos resultados del análisis de varianza se presentan en la Tabla 1. Se observó el efecto del patógeno en la disminución del porcentaje de plantas vivas y la interacción significativa patógeno x pH del suelo (Figuras 5, 2).

En la Figura 2 se ilustra cómo el pH 6.2 disminuye el porcentaje de plantas vivas con respecto al testigo en presencia de *R. solani*, mientras que los pH's y 5.0 y 7.3 son menos favorables a la enfermedad.

El efecto de *T. harzianum* en el área foliar de la coliflor en este ensayo tampoco fue significativo. Únicamente se obtuvo el efecto del pH y la interacción patógeno x pH significativas, en forma similar al comportamiento de la sobrevivencia.

Efecto de *T. harzianum* en *Fusarium oxysporum*

En este ensayo los resultados obtenidos (Tabla 1) difieren de los anteriores sustancialmente. De acuerdo al ANAVA fueron significativos el efecto de patógeno, del antagonista, la interacción de los dos, y la interacción del patógeno con el pH. La relación patógeno x antagonista tuvo el efecto no deseado de disminuir el porcentaje de plantas vivas por la presencia de los aislamientos de *T. harzianum* más aún que el tratamiento con solo el patógeno. Sin embargo, este resultado se explica únicamente por la disminución en el porcentaje de germinación, lo cual no es un síntoma reconocido por el ataque de *F. oxysporum* en pepino cohombro (Figura 6). Estos resultados indican la necesidad de cambiar la metodología con este hospedante.

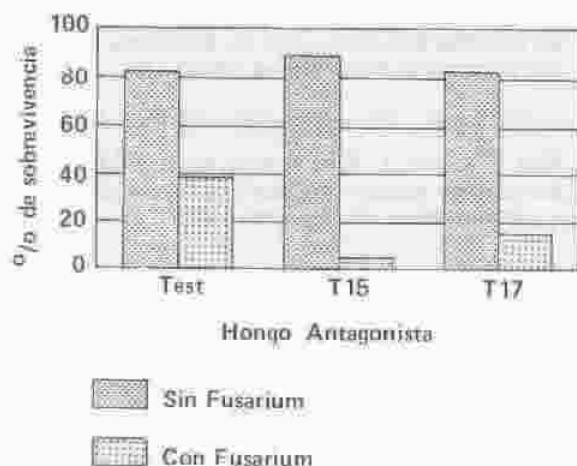


FIGURA 6. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* en el desarrollo de pepino cohombro en suelos con *Fusarium oxysporum*.

La interacción pH x patógeno (Figura 2) ilustra como el pH 6.2 disminuye la sobrevivencia con respecto al testigo no inoculado, comparado con los pH 7.3 y 5.0.

DISCUSION

Trichoderma harzianum demostró poseer la capacidad necesaria para controlar *Pythium sp.* el cual prospera en suelos con alta humedad. En cambio *Rhizoctonia solani* no fue controlado efectivamente, lo cual no evidencia que no haya ocurrido el micoparasitismo natural, tal como se ha observado en trabajos anteriores. La efectividad del antagonista posiblemente se altera por efecto de las condiciones ambientales, como todo organismo vivo. Su versatilidad debería ser bastante amplia si se desea que controle tanto a *Pythium* bajo condiciones de alta humedad, como a *Rhizoctonia solani*, que prospera en suelos con humedad normal, y que soporta bien la sequedad de los mismos. Adicionalmente, su efectividad debe manifestarse en el momento adecuado, es decir, cuando ocurre la germinación de la semilla y su acción debe ser rápida, pues el patógeno que logra su hospedante vegetal, a su vez escapó de su antagonista.

Dadas estas razones, es recomendable pensar en la utilización de aislamientos de *Trichoderma* o de otros hongos antagonistas que cubran

en conjunto una gama de condiciones ambientales lo suficientemente amplia para brindar una protección adecuada a la planta.

El control de *Fusarium oxysporum* con *Trichoderma sp.* no ha prosperado en los ensayos encaminados a detectar medios para combatir el patógeno.

En el presente trabajo se demuestra la necesidad de modificar la metodología para el manejo del inóculo de *F. oxysporum* con el fin de no alterar las propiedades físicas del suelo, los cuales se considera que son responsables de la disminución del porcentaje de germinación del pepino cohombro.

Según las investigaciones en Estados Unidos, se ha sugerido la utilización de bacterias, como *Bacillus subtilis* para el control de *F. oxysporum*. Las consideraciones para el control de *F. oxysporum* pueden ser las mismas que para los anteriores patógenos pero con el agravante de la susceptibilidad continua del hospedante vegetal.

Una demostración clara de la ventaja en la utilización del control biológico lo constituye el mayor desarrollo vegetal, lo cual por si solo puede ser explotado favorablemente. Su uso en la práctica podría hacerse a nivel de semilleros con el fin de ayudar al control del volcamiento de plántulas, aumentar el porcentaje de germinación de las semillas y el vigor de las plantas. Sin embargo, esta posibilidad aun no ha sido evaluada experimentalmente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Borda, F. 1984. Control biológico de *Fusarium oxysporum* causante de marchitamiento vascular en varios tipos de plantas con *Trichoderma harzianum*. Tesis. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
2. Chang, Y. 1982. Biological integrated control for *Rhizoctonia solani* caused disease in some ornamental plants. M.S. Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado.
3. Chang, Y.; Baker, R.; Kleifeld, O.; Chet, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease. 70:145-148.
4. Chet, I.; Baker, R. 1980. Induction of suppressiveness

- to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, 70:994-998.
5. Chet, I.; Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia*. *Phytopathology*, 71:286-290.
 6. Chet, I.; Hadar, Y.; Elad, Y.; Katan, J.; Henis, Y. 1979. Biological control of soil-borne plant pathogens by *Trichoderma harzianum*. In: Schippers, B. and Gams, W. Soilborne plant pathogens. Academic Press, London, pp. 586-591.
 7. Dimond, A.E.; Waggoner, P.E. 1953. The water economy of *Fusarium* wilted tomato plants. *Phytopathology*, 43:619-626.
 8. Elad, Y.; Hadar, Y.; Chet, I.; Henis, Y. 1981. Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in carnation. *Plant Disease*, 65:675-677.
 9. Elad, Y.; Katan, J.; Chet, I. 1980. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne disease in potatoes. *Phytopathology*, 70:418-422.
 10. Elias, R.A.; Arcos, O. 1984. Contribución al estudio del control biológico mediante el uso de diferentes especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional, Bogotá.