

## Utilización Combinada de Técnicas de Pregerminación Controlada de Semillas y del Agente de Control Biológico *Trichoderma* sp. para el Control de Patógenos Radicales

A. M. Cotes. Programa Nacional MIP. Centro de Investigación Tibaitatá - Corpoica. A.A. 240142 Las Palmas. Santafé de Bogotá D.C. Colombia. E-mail: cbiologico@corpoica.org.co

El control biológico es considerado como una de las alternativas más deseables y factibles en el manejo de las plagas en agricultura, pues puede proveer un control adecuado de éstas dentro de los conceptos más recientes de la agricultura sostenible y como respuesta a la crisis ambiental que se vive en la actualidad. Sin embargo, aunque en el país, desde hace por lo menos dos décadas se ha incursionado en este campo de la investigación agrícola, son pocos los ejemplos en los cuales se ha profundizado en la generación de conocimientos científicos y desarrollo de tecnologías propias para el uso de esta alternativa.

En fitopatología, el control biológico se define como «La reducción del inóculo o de la actividad patogénica de un fitopatógeno llevada a cabo por uno o más organismos diferentes del hombre». Esta definición es lo suficientemente amplia para permitir la introducción de las estrategias emergentes de biocontrol. Estas nuevas estrategias incluyen el uso de rizobacterias u otros microorganismos promotores de crecimiento, la resistencia inducida, los sistemas bióticos que excluyen el patógeno y las plantas transgénicas.

El control biológico de fitopatógenos mediante la adición de microorganismos antagonistas al suelo representa una alternativa para el control de enfermedades vegetales. Sin embargo, para que este control sea efectivo se requiere de grandes cantidades de inóculo, además, este control depende de varios factores tales como la temperatura, el pH y las condiciones fisicoquímicas del suelo, el tipo de inóculo usado (en el caso de bacterias: esporas o células vegetativas y en el caso de hongos: micelio, conidios, clamidosporas), la densidad de inóculo del antagonista, la densidad de inóculo del patógeno y el tiempo de introducción del antagonista al suelo en relación con el tiempo de siembra.

Varios géneros de hongos han sido identificados como potenciales agentes de control biológico contra varios fitopatógenos del suelo, sin embargo, son *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. los que mejores resultados han ofrecido en la práctica y que han sido registrados en diferentes países de Europa y América.

*Trichoderma* spp. es un microorganismo cosmopolita que se encuentra en casi todos los suelos y otros hábitats naturales, especialmente en aquellos ricos en materia orgánica. *Trichoderma* spp. es considerado un colonizador secundario, dado su frecuente aislamiento a partir de materia orgánica en descomposición, también es frecuentemente aislado a partir de las superficies de raíces de varias plantas, de madera y parasitando estructuras de diferentes hongos patógenos.

La abundancia de *Trichoderma* spp. en varios suelos, ligada a su habilidad para degradar varios sustratos orgánicos, su versatilidad metabólica y su resistencia a inhibidores microbiales, sugiere que *Trichoderma* spp. posee la habilidad de sobrevivir en muchos hábitats dependiendo de las condiciones medio ambientales y de las especies o cepas involucradas.

Se ha establecido que varias especies del género *Trichoderma* incorporadas al suelo, presentan un buen grado de antagonismo sobre patógenos tales como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., causantes de enfermedades en diversos cultivos de clima frío, medio y cálido. En todos los casos, el mayor éxito ha sido logrado con cepas y especies nativas de *Trichoderma*, ya que están adaptadas a las condiciones locales.

Sin embargo, a pesar de lo promisorio que resulta el uso de *Trichoderma* spp. Para el control de fitopatógenos, su utilización mediante incorporación al suelo resulta costosa, dadas las cantidades que deben ser utilizadas. Como ejemplo de esto se ilustrará la interacción *Rhizoctonia solani* - *Trichoderma* spp. Si se asume que el suelo contiene una cantidad aproximada de  $2 \times 10^2$  propágulos de patógeno por gramo, sería necesario aplicar una cantidad mínima de *Trichoderma* sp. de  $1 \times 10^5$  propágulos por gramo. Si se considera que para garantizar un control efectivo de los fitopatógenos se requiere que los bioplaguicidas se apliquen en los 15 cm de la capa superior del suelo, para controlar  $3 \times 10^{11}$  propágulos de patógeno por hectárea, se requeriría de una cantidad de bioplaguicida correspondiente a  $15 \times 10^{13}$  propágulos por hectárea. Teniendo en cuenta que los bioplaguicidas con base en *Trichoderma* sp. contienen una cantidad máxima de  $10^7$  propágulos por gramo, para lograr la concentración de  $15 \times 10^{13}$  propágulos de *Trichoderma* sp. necesaria por hectárea, sería necesario aplicar 15.000 Kg de bioplaguicida por hectárea, lo cual acarrearía altísimos costos económicos y podría perturbar el delicado balance ecológico del suelo.

Una alternativa viable para reducir las cantidades de bioplaguicida necesarias para su incorporación al suelo, es la aplicación localizada en de éste en la zona del desarrollo radical, lo que significa el tratamiento en las zonas efectivas de producción (rizosfera) y no de la superficie total del suelo.

Otra alternativa para la aplicación de antagonistas es mediante tratamiento de las semillas por simple recubrimiento. Este es un método atractivo para la introducción de agentes de control biológico en los posibles sitios de infección de la planta, pues requiere de bajas cantidades de microorganismo biocontrolador. En este caso, para recubrir semillas con una suspensión que contenga  $10^6$  propágulos de *Trichoderma* sp. por mililitro, en el caso de los 80 kg de semilla de frijol que se requieren por hectárea, dentro de un sistema de monocultivo, o de los 300 g que se requieren de semilla de tomate por hectárea, sería necesario utilizar  $4 \times 10^{10}$  propágulos de *Trichoderma* sp., que equivaldrían sólo a 4 kg del bioplaguicida. Se ha demostrado que el recubrimiento de semillas con el microorganismo biocontrolador unido a tratamientos fisiológicos de éstas, tales como la pregerminación controlada (invigorización), además de requerir bajas cantidades del microorganismo biocontrolador, garantiza su actividad protectora, pues permite que éste pueda establecerse en las semillas en un ambiente controlado, sin ser afectado por las variables medioambientales (temperatura, pH y condiciones fisicoquímicas del suelo etc.).

La pregerminación controlada o invigorización de semillas es un tratamiento de prehidratación en el cual se inicia el proceso fisiológico de la germinación, pero se detiene antes de la emergencia de la radícula. Las semillas son pregerminadas en un ambiente controlado en el que se regulan el potencial de agua, la aireación, la temperatura y la duración del tratamiento.

La pregerminación en matriz sólida es un procedimiento en el cual las semillas se colocan en una matriz sólida tal como lignita, carbón, vermiculita, cascarilla u otro sustrato. Este sustrato es previamente humedecido hasta alcanzar un potencial de agua apropiado para la germinación. La mezcla es incubada durante un tiempo predeterminado a temperatura constante. Las semillas pregerminadas son lavadas, secadas y almacenadas hasta el momento de su uso. Estos tratamientos han demostrado aumentar significativamente la velocidad de germinación de las semillas y el porcentaje de emergencia de las plantas.

El tratamiento de pregerminación controlada en matriz sólida ha mostrado ser compatible con el agente de control biológico *Trichoderma spp.* En este caso, las semillas previamente recubiertas por el microorganismo son colocadas en la matriz sólida humedecida. Durante el proceso de pregerminación, *Trichoderma spp.* germina y prolifera en la superficie de la semilla. Este procedimiento ha sido ensayado de manera experimental en Corpoica, con éxito en semillas de hortalizas y leguminosas.

Las semillas pregerminadas en ausencia de *Trichoderma spp.* germinan sincrónicamente mostrando significativo aumento en la velocidad y en el porcentaje final de emergencia de las plántulas, y cierta tolerancia al ataque de los fitopatógenos. Las semillas pregerminadas en presencia de *Trichoderma spp.*, presentan, igualmente, un significativo aumento en la velocidad y en el porcentaje final de emergencia de las plántulas. Pero además resisten el ataque de los fitopatógenos y estimulan el crecimiento de las plantas, expresado como mayor tamaño y mayor peso seco. Esto demuestra que *Trichoderma spp.*, además de ser eficiente agente de control biológico, actúa como inductor del crecimiento vegetal (fitohormona). Estos resultados abren amplias perspectivas para la producción comercial de semillas invigorizadas y protegidas biológicamente contra el ataque de fitopatógenos.

#### Casos de Estudio:

##### 1. Efecto de la Técnica de Pregerminación Controlada de Semillas en Presencia de *Trichoderma koningii* para el Control de *Pythium splendens* en Fríjol y Pepino

Con el propósito de determinar el efecto de la pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*, se utilizaron semillas de frijol variedad Prélude y de pepino cohombro variedad Délicatesse, de las cuales, un lote fue inmerso durante 10 minutos en una suspensión de *T. koningii* que contenía  $1 \times 10^7$  conidias /ml y el otro fue inmerso en agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en una matriz de vermiculita humedecida al 80% de su capacidad de retención y fueron incubadas a 20°C durante 48 h. Pasado este tiempo, las semillas fueron secadas hasta alcanzar 15% de humedad y fueron almacenadas durante diferentes períodos de tiempo (hasta 6 meses). Un lote de semillas recientemente secadas, fue sembrado en suelo no estéril, inoculado y no inoculado con una cepa virulenta de *Pythium splendens*, al mismo tiempo, bajo las mismas condiciones se sembraron semillas no pregerminadas, tratadas y no tratadas con el antagonista. Adicionalmente, con el propósito de determinar la duración de la protección obtenida con estos tratamientos, mensualmente y durante 6 meses se realizaron siembras de las semillas almacenadas.

Cuando las semillas fueron sembradas inmediatamente después de secadas, se observó que tanto para cohombro como para frijol, el tratamiento con *Trichoderma sp.* de las semillas no pregerminadas, incrementó ligeramente la emergencia de las plántulas (25 % y 30 % para cohombro y frijol respectivamente) con respecto a las semillas no tratadas con el antagonista que presentaron un porcentaje de emergencia de 16% y 22 % respectivamente), mientras que la pregerminación controlada, aumentó significativamente la emergencia de las plántulas (75% y 48% respectivamente). Sin embargo, el tratamiento que más protegió a las semillas y plántulas del ataque de *Pythium splendens*, fue la combinación de la pregerminación y el tratamiento con *Trichoderma koningii*, dado que con este último se obtuvieron porcentajes de emergencia de 90% y 65% respectivamente. La pregerminación de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*, redujo además los síntomas de postemergencia causados por este patógeno y aumentó el vigor de las plantas sembradas tanto en ausencia como en presencia de patógeno. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas cuando las semillas tratadas, fueron sembradas entre uno y seis me-

ses después de su almacenamiento, demostrando que la protección adquirida por éstas persistía a través del tiempo.

## 2. Utilización de Una Técnica de Pregerminación Controlada de Semillas en Presencia del Antagonista *Trichoderma koningii* para el Control de *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersici* y *Rhizoctonia solani* en Tomate

Los hongos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente causal del marchitamiento vascular y *Rhizoctonia solani*, agente causal de enfermedades tales como volcamiento y pudriciones radicales, afectan significativamente al cultivo de tomate tanto en la etapa de semillero, como en la de transplante. En general, para controlar estas enfermedades, se utilizan fungicidas químicos, los cuales muchas veces resultan ineficientes, además de causar un impacto ambiental negativo. Por lo tanto, la utilización de tratamientos fisiológicos de semillas tales como la pregerminación controlada (fitoinvigorización), simultánea con el uso de microorganismos biocontroladores, aparece como una alternativa promisoría para el control de estos patógenos.

El tratamiento de semillas de tomate variedad chonto recubiertas con *Trichoderma koningii* y pregerminadas en cascarilla de arroz humedecida con agua al 80% de su capacidad de retención fue evaluado en suelo estéril, en presencia y en ausencia de cada uno de los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, con el propósito de determinar la protección ofrecida en semillero y en transplante.

En semillero, el tratamiento de pregerminación, tanto en ausencia como en presencia de los patógenos, aceleró y uniformizó la germinación de las semillas y el agente de biocontrol *T. koningii*, en ambos casos, aumentó el vigor de las plántulas, demostrando un efecto estimulante del crecimiento vegetal.

De otra parte, en semillero el tratamiento de pregerminación controlada en presencia de *T. koningii* fue el que mostró, para ambos patógenos, significativamente mayor porcentaje de protección, siendo éste para *F. oxysporum* de 79 % y para *R. solani* de 97 %, en contraste con la protección obtenida con semillas pregerminadas en ausencia del antagonista, cuya protección fue de 25 % y 90 % para *F. oxysporum* y *R. solani* respectivamente, y con la obtenida en semillas no pregerminadas y tratadas con *T. koningii* cuya protección fue de 32 % y 70 % respectivamente.

Estos resultados permitieron concluir que la combinación de la pregerminación controlada de semillas y el agente del control biológico *T. koningii*, además de representar una alternativa viable para el control de fitopatógenos en semillero, sincroniza la germinación de las semillas y estimula el crecimiento de las plántulas.

Después de evaluar el efecto biocontrolador de estos tratamientos de control biológico en semillero, se determinó el efecto en la etapa del transplante, hasta la producción del cultivo. Para evaluar la protección ofrecida por los agentes biocontroladores se dividieron las semillas en dos lotes: pregerminadas en presencia o ausencia de *T. koningii* y no pregerminadas tratadas y no tratadas con *T. koningii*. Estas semillas fueron sembradas en semilleros libres de los patógenos y regados con una suspensión de *T. koningii*. Las plántulas provenientes de semillas sometidas a los diferentes tratamientos durante la etapa de semillero, se transplantaron a suelo infestado con los patógenos *R. solani* y de *F. oxysporum* o a suelo libre de patógenos, encontrándose que los tratamientos que mayores vigor y protección ofrecieron cuando se sembraron en presencia de los patógenos fueron aquellos en los que se utilizaron plántulas provenientes de semillas pregerminadas en presencia de *T. koningii*, cuando se hicieron dos aplicaciones consecutivas al suelo del biocontrolador *T. koningii*. En

éste se observó un porcentaje de protección del 68% contra *R. solani* y del 70% contra *F. oxysporum*. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la combinación de pregerminación controlada de semillas y de control biológico es una alternativa viable para el control de estos patógenos en diferentes etapas del cultivo de tomate.

#### Literatura relacionada con el tema

- Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 59-72.
- Baker, R. 1991. Four horses of biological control. *Biological Control of Plant diseases Proceedings of a Symposium. Miscellaneous publication 72.* Minnesota Agricultural Experiment Station. University of Minnesota.
- Betancourt, J. C.; Cotes, A. M. 1997. Utilización de una técnica de pregerminación controlada en presencia de *Trichoderma koningii* y tratamiento con *Pseudomonas fluorescens* para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate. *Memorias del XXIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias afines.*
- Cárdenas, A.; Cotes, A.M., 2000. Control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en tomate *Lycopersicon esculentum* empleando pregerminación controlada de semillas y los agentes de control biológico *Trichoderma koningii* y *Pseudomonas fluorescens*. *Revista de la Sociedad Colombiana de Fitopatología. En prensa.*
- Cotes, A. M.; Lepoivre, P.; Semal, J. 1992. Effect of precolonization of bean seeds with *Trichoderma*, on symptoms induced by *Pythium*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 57/2b, 355-363.
- Cotes, A. M. 1993. Contribution to the study of bean protection against damping-off by treatment of seeds with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de Doctorado en Ciencias Agronómicas. Facultad de Ciencias Agronómicas de Gembloux. Bélgica.
- Cotes, A. M.; Lepoivre, P.; Semal, J. 1996. Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. *European Journal of Plant Pathology.* 102: 497-506.
- Harman, F. E.; Taylor, A. G.; Stasz, T. E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Disease* 73: 631-637.
- Mezui, J. C.; Cotes, A. M.; Lepoivre, P.; Semal, J. 1994. Evaluation of seed priming and *Trichoderma* treatment for the biological control of damping-off agents. In *Diseases and Insects in Forest Nurseries.* Ed. INRA, Paris (Les Colloques, N° 68). pp.189-196.
- Papavizas, G. C.; Dun, M. T.; Lewis, J. A.; Beagle, R. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology.* 74: 1171-1175.
- Papavizas, G. C. Introduction and augmentation of microbial antagonists for the control of soilborne plant pathogens. *Biological control in crop production. Beltsville Symposium, number 5.* In *Agricultural Research.* Allanheld Osmum. Totowa. 305-322.
- Saldamando, C. I. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* kuhn en Tomate (*Lycopersicon esculentum*), mediante una combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de grado. Universidad de los Andes. P. 95.
- Saldamando, C.; Cotes, A. M. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* en tomate (*Lycopersicum sculentum*) mediante una combinación de tratamientos de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii*. *Memorias del XXII congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias afines.*