

# RESPUESTA IN VITRO DE CEPAS DE *Trichoderma harzianum* FRENTE A $Fe^{3+}$ , SALINIDAD, pH Y TEMPERATURA, CON EL FIN DE SER UTILIZADAS EN CONTROL BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* Y *Fusarium solani* EN TOMATE.

(*In vitro* response of *Trichoderma harzianum* strains to  $Fe^{3+}$ , Salinity, pH and temperature, in order to be used in the biological control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in tomatoe)

Escobar, P.<sup>1</sup>; Montealegre, J.<sup>2</sup> y Herrera, R.<sup>2</sup>

(1) Fac. de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

(2) Fac. de Cs. Agronómicas, Universidad de Chile (3)

email : jmonteal@uchile.cl. (3) Proyecto Fondecyt 1990785-99

**Palabras claves:** *Trichoderma harzianum*, parámetros fisiológicos, control biológico, *Rhizoctonia solani* AG-4 y AG-2, *Fusarium solani*, tomate.

**Key words:** *Trichoderma harzianum*, physiological parameters, biological control, *Rhizoctonia solani* AG-4 and AG-2, *Fusarium solani*, tomatoe.

## RESUMEN

Se investigó el grado de efectividad *in vitro* mediante antagonismo directo, metabolitos volátiles y difusibles, así como la respuesta a  $Fe^{3+}$ , salinidad, pH y temperatura de 4 cepas de *Trichoderma harzianum*, con el fin de utilizarse en el control biológico de *Rhizoctonia solani* y de *Fusarium solani* en tomate. Se determinó que la mejor cepa antagonista correspondió a *T. harzianum* Th 650, la que siempre fue más eficiente en el control de las cepas de *R. solani* que las de *F. solani*. Las cepas de *T. harzianum* evaluadas crecieron mejor a concentraciones bajas de  $Fe^{3+}$  y salinidad y a pH 5,0; sin embargo, estos factores no fueron limitantes para bioantagonizar a *R. solani* y a *F. solani*. Ninguna de las temperaturas fue limitante para el desarrollo de las cepas de *T. harzianum*, siendo 28 °C la más adecuada. Se determinó que la cepa Th 650 actúa mejor como bioantagonista a 28°C y pH5. Si se consideran las características de los suelos a aplicarse, los factores analizados no serían una limitante para su uso como un biocontrolador de los patógenos evaluados

## INTRODUCCION

Dentro de los agentes causales de enfermedades radicales del tomate se encuentra *Rhizoctonia solani*, que

## ABSTRACT

Four *Trichoderma harzianum* strains were examined to detect the degree of "in vitro" effectiveness by means of direct antagonism, volatile and diffusible metabolites as well as their response to  $Fe^{3+}$ , salinity, pH and temperature, in order to use them in the biological control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* in tomatoe. The best antagonist strain proved to be *T. harzianum* Th 650 which had always a better control in *R. solani* strain than in *F. solani*. *T. harzianum* strains grew better, according to evaluation, at low  $Fe^{3+}$  concentrations and salinity and at pH 5; however, these features were not a limiting factor to bioantagonize *R. solani* and *F. solani*. None of the employed temperatures meant a constrain for the development of *T. harzianum* strains, being 28° C the most suitable. Th 650 strain was found to act better as a bioantagonist at 28° C and pH5. Considering characteristics of soils where to be applied, resulting factors would not mean a restriction as to their use as a biocontroller of evaluated pathogens.

es capaz de dañar las raíces, cuello y frutos en contacto o cerca del suelo (Reyes, 1999) y *Fusarium solani*, responsable del "damping-off" en tomate (Alippi & Mónaco, 1994).

En el caso del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), las enfermedades que afectan el sistema radical son usualmente controladas por fumigación del suelo antes de plantar, generalmente con bromuro de metilo. Sin embargo, este tratamiento posee un costo elevado y el bromuro de metilo es considerado como un agente químico cancerígeno y con efectos medioambientales nocivos, ya que es un compuesto que daña la capa de ozono (Bell et al., 1996; Ristaino & Thomas, 1997; Larkin & Fravel, 1998; en Vannacci & Gullino, 2000).

En el caso de otros agroquímicos los microorganismos patógenos son capaces de desarrollar resistencia a ellos, por lo que cada vez se siguen produciendo formulaciones químicas más poderosas, que generalmente resultan ser más tóxicas y dañinas para la salud y el medioambiente (Vasseur et al., 1995).

Considerando los antecedentes señalados anteriormente, es importante buscar alternativas de control de patógenos que impliquen menos riesgo para la salud humana y la estabilidad del medioambiente natural. Una alternativa diferente es el control biológico (Alippi & Mónaco, 1994). Existe una amplia variedad de microorganismos biocontroladores dentro de los cuales están las especies de hongos del género *Trichoderma* (Harman, 2000 y Lewis et al., 1990), de *Gliocladium (Clonostachys)*, de *Fusarium* saprófitos, de *Laetisaria*, etc. (Lewis & Papavizas, 1992; en Vannacci & Gullino, 2000).

Los antagonistas de mayor importancia que se han investigado, pertenecen al género *Trichoderma* (Harman, 2000), los cuales poseen efecto en el control de enfermedades en semillas y plántulas y en la estimulación del crecimiento (Mónaco et al., 1991; Baker et al., 1984; Windham et al., 1986). La capacidad antagonista de las especies del género *Trichoderma*, está dada probablemente por su estilo de vida saprofítico (Vannacci & Gullino, 2000), y han sido usados como "ingrediente activo" de biopesticidas, debido a que se han aplicado exitosamente contra *Phytophthora* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp., así como también contra *Fusarium* spp. en un gran número de cultivos, aplicados a semillas para el control de patógenos presentes en semillas y suelo (Cook, 1993; Vannacci & Gullino, 2000), además de su efecto como promotor o en la estimulación del crecimiento de las plantas (Mónaco et al., 1991; Baker et al., 1984 y Windham et al., 1986).

Según los antecedentes expuestos, el objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro* la capacidad antagonista de cepas de *T. harzianum*, sobre cepas de *R. solani* y *F. solani*, aislados de tomates y su respuesta a factores que podrían afectar su grado de antagonismo en el suelo como son el Fe disponible, salinidad, pH y temperatura.

## MATERIALES Y METODOS

La investigación se efectuó en el Laboratorio de Microbiología de la Fac.de Cs.Agronómicas de la Universidad de Chile.

**Cepas utilizadas:** Se utilizaron dos cepas de *R. solani* correspondientes a los grupos de anastomosis AG-4-HGI (618) y AG2-1 (509 V) y una cepa de *F. solani* (607 V), todas aisladas de tomates enfermos y que presentaron una alta patogenicidad en esta especie.

Como antagonistas se utilizaron 4 cepas de *T. harzianum* aisladas de suelos en que se cultivaban tomates y/o del rizoplaneo de plantas de esta especie, denominadas como Th 642, Th 643, Th 645 y Th 650. Para determinar la capacidad antagonista y la cepa más eficiente de *Trichoderma*, se usó la metodología descrita por Pumarino (1995).

**Antagonismo directo mediante cultivos duales:** Se hizo crecer al patógeno y al antagonista en una placa de Petri con medio agar papa dextrosa (APD). Las distintas cepas se enfrentaron colocando discos de APD de 5 mm de diámetro, provenientes de cultivos puros de cada cepa, a una distancia de aproximadamente 53 mm dentro de la placa (Fig. 1). Los cultivos se incubaron a 22°C hasta observar contacto físico entre los distintos micelios (72 hr para las cepas de *R. solani* y 96 hr para *F. solani*). Luego se evaluaron utilizando un pie de metro para medir la distancia mayor y la distancia menor que recorrió el micelio del patógeno. Con estos dos valores se calculó el porcentaje de inhibición que ejerció el antagonista sobre el patógeno utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(A-B) * 100}{A}$$

Donde: A = Distancia mayor recorrida por el micelio del patógeno, B = Distancia menor recorrida por el micelio del patógeno

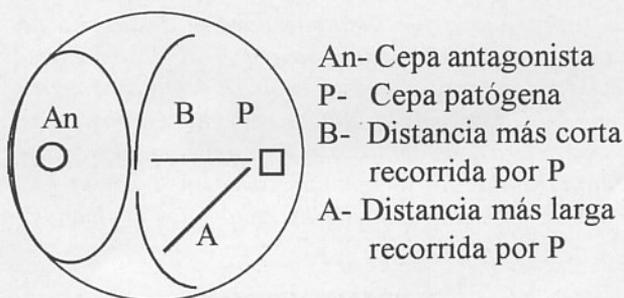


Figura 1.- Diagrama del ensayo de antagonismo directo mediante cultivos duales

**Prueba de Metabolitos difusibles:** Se determinó el efecto de metabolitos difusibles producidos por el antagonista sobre la inhibición del crecimiento del patógeno; para tal efecto se colocó una circunferencia de papel celofán cubriendo el APD de cada placa utilizada. Luego, se depositó en el centro de la placa y sobre el celofán, un disco de APD de 5 mm de diámetro, proveniente de un cultivo puro del antagonista y se incubó a 22°C. Antes que el micelio del hongo antagonista llegara al borde del papel celofán (48 hr), éste se retiró y en el mismo lugar se colocó un disco de APD de 5 mm de diámetro proveniente de un cultivo puro del patógeno y se incubó a 22°C. El control se realizó sometiendo al patógeno sólo a la presencia del celofán en el tratamiento previo (Pumarino, 1995). Finalmente se evaluó midiendo con un pie de metro la distancia alcanzada por el patógeno y se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula descrita anteriormente. Donde: A corresponde a la distancia recorrida por el patógeno en la condición control y B a la distancia recorrida por el patógeno en presencia de metabolitos difusibles. La evaluación se realizó a las 72 hr. para las cepas de *R. solani* y a las 96 hr para la cepa de *F. solani*.

**Prueba de Metabolitos volátiles:** Se evaluó el efecto de metabolitos volátiles producidos por el antagonista, sobre el crecimiento del patógeno. Para tal efecto, se colocó un disco de APD de 5 mm de diámetro, proveniente de un cultivo puro del patógeno en el centro de una placa de Petri con medio APD. Se procedió de igual manera con el antagonista en otra placa de Petri con medio APD. Posteriormente, se retiraron las tapas de cada placa y se unieron los fondos, enfrentando los cultivos y sellando dicha unión con un trozo de parafilm. Los cultivos se incubaron a 22°C manteniendo la posición del patógeno hacia arriba y el antagonista hacia abajo. La condición control, se realizó enfrentando la placa que contenía al patógeno con una que sólo contenía el APD. El ensayo se evaluó utilizando un pie de metro para medir la distancia recorrida por el micelio del patógeno. El porcentaje de inhibición se calculó de la misma forma que en el ensayo de metabolitos difusibles. La evaluación se realizó a las 48 hr para las cepas de *R. solani* y a las 72 hr para *F. solani*.

**Observaciones microscópicas:** Se realizaron microcultivos (Montealegre, 1991), para observar al microscópico óptico la interacción directa entre el micelio de cada patógeno con el micelio de los diferentes antagonistas. Estos se incubaron a 22°C durante 9 días. Al cabo de este tiempo, se realizaron preparaciones microscópicas y se observaron en un microscopio óptico de contraste de fases (marca Leica, modelo MPS60).

**Efecto del  $Fe^{3+}$ , salinidad, pH y temperatura, sobre el crecimiento de los diferentes antagonistas:** El objetivo de determinar el efecto de estos parámetros, fue conocer las limitaciones de desarrollo de los bioantagonistas nativos, en su eventual uso potencial y eficiencia al introducirlos en suelos para el control de enfermedades radicales del tomate en la V Región.

En la Tabla 1 se presentan antecedentes sobre las características de los suelos en cuanto a los parámetros indicados anteriormente.

**Tabla 1. Contenido de Fe disponible, conductividad eléctrica y pH promedio en suelos de cultivo de tomates (V Región de Chile).**

Parámetros medidos	Rangos
Fe disponible	1,8 a 27 ppm
CE (Conductividad eléctrica)	1,07 a 9,52 mmhos/cm
pH (agua)	6,9 a 7,8

**Efecto del  $Fe^{3+}$ :** Las placas de Petri a utilizar se prepararon mediante el protocolo indicado por Pumarino (1995). Como medio de cultivo se utilizó APD y de acuerdo a los contenidos de Fe disponible en los suelos de la V Región (Tabla 1), donde eventualmente se aplicarían estos biocontroladores se usaron las siguientes concentraciones de  $Fe^{3+}$ : 0, 5, 15 y 25 ppm preparadas a partir de  $FeCl_3 \times 6H_2O$ . Sobre estos medios se depositó un disco de APD de 5 mm de diámetro, proveniente de un cultivo puro del antagonista y se incubó a 22°C durante 48 horas. Luego de este lapso de tiempo se evaluó el crecimiento de cada antagonista a las diferentes concentraciones de  $Fe^{3+}$  utilizando un pie de metro.

**Efecto de la salinidad:** Como medio de cultivo se utilizó APD y las concentraciones de NaCl utilizadas fueron: 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mM de NaCl. Sobre estos medios se depositó un disco de APD de 5 mm de diámetro, proveniente de un cultivo puro del antagonista y se incubó a 22°C durante 48 hr. Luego de este lapso de tiempo se evaluó el crecimiento de cada antagonista a las diferentes concentraciones de NaCl utilizando un pie de metro.

**Efecto del pH:** Se utilizó APD como medio de cultivo. Los pH utilizados fueron: 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 y 8. Sobre este medio se depositó un disco de PDA de 5 mm de diámetro, proveniente de un cultivo puro del antagonista y se incubó a 22°C durante 48 hr. Luego de este lapso de tiempo se evaluó el crecimiento de cada antagonista a las diferentes condiciones de pH utilizando un pie de metro.

**Efecto de la temperatura:** Se determinó para los mejores antagonistas, los que se hicieron crecer a: 10, 15, 20, 28 y 37 °C en APD durante 48 horas, momento en que se midió el radio de crecimiento con un pie de metro.

**Efecto del mejor pH y temperatura para el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre la inhibición de los patógenos investigados:** Se determinó el nivel de crecimiento radial en pruebas de antagonismo directo a pH y temperatura óptima para las mejores cepas de *Trichoderma* seleccionadas (pH 5 y temperatura de 28 °C) versus las cepas de los patógenos *R. solani* y *F. solani* y se comparó con el nivel de crecimiento radial logrado a pH 6,5 y temperatura de 22°C.

La metodología utilizada fue la misma a la indicada para el porcentaje de inhibición.

**Diseño estadístico:** Se usó un diseño completamente aleatorizado con estructura factorial. Para cada evaluación se realizaron 4 repeticiones y los datos se analizaron a través de ANDEVA y el test del Rango Múltiple de Duncan.

Para el análisis de los datos del efecto del mejor pH y temperatura sobre el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* antagonistas, se utilizó un sistema factorial triple con dos niveles para cada factor respectivamente, pH (5, 6,5), temperatura (22 y 28°C) y cepas de *Trichoderma* (Th 650 y 642).

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Antagonismo directo mediante cultivos duales:** Los resultados indican que existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento que producen las distintas cepas de *T. harzianum* sobre las cepas de los patógenos.

La cepa antagonista más eficiente para controlar todas las cepas patógenas fue Th 650, inhibiendo el crecimiento entre un 46 y un 52% (Tabla 2), logrando un control más eficiente sobre *R. solani* que sobre *F. solani*.

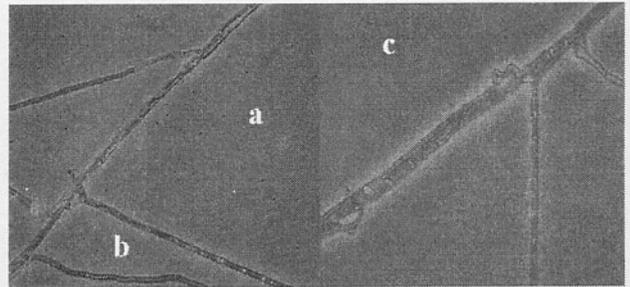
Para la cepa de *R. solani* 618, se observan diferencias significativas entre todas las cepas antagonistas en su capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno; sin embargo, para las cepas patógenas *R. solani* 509 v y *F. solani* 607 v, sólo se aprecian diferencias significativas entre la cepa Th 650 y el resto de las cepas antagonistas, puesto que las cepas de Th 645, Th 643 y Th 642 pertenecen al mismo grupo estadístico, lo que significa que no hay diferencias significativa en los resultados obtenidos con una o con otra cepa.

**Tabla 2. Efecto de antagonismo directo en *R. solani* y *F. solani* por cepas de *T. harzianum*.**

<i>T. harzianum</i> Cepa	% de inhibición		
	<i>R. solani</i> 618	<i>R. solani</i> 509v	<i>F. solani</i> 607v
Th 650	51,6 a	52,1 a	46,6 a
Th 645	38,4 d	32,7 b	31,9 b
Th 643	41,9 c	31,1 b	35,2 b
Th 642	46,4 b	31,7 b	34,3 b

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al Test del Rango Multiple Duncan ( $p \leq 0,05$ ), situación válida para todas las tablas.

Al efectuar preparaciones microscópicas de los microcultivos de antagonismo directo, se pudo observar que la cepa de Th 650 invade penetrando las hifas de *F. solani* 607v, lo que confirmaría que el micoparasitismo sería el mecanismo más común de acción antagonista que ejercería *Trichoderma*, descrito por Harman (2000) y Cook (1993) (Fig. 2).



**Fig 2. Formas de parasitismo de *T. harzianum* sobre *F. solani* (cepa 607V) (a) penetración de hifas, (b) parasitismo directo en forma de puente y (c) enrollamiento de hifas.**

Estos resultados concuerdan con los observados por otros investigadores como Harman (2000), en relación a las diferentes formas de antagonismo que poseen las diferentes especies de *Trichoderma*. Además, reforzarían los resultados de mayor eficiencia mostrada por la cepa 650 para con ambos patógenos.

**Metabolitos difusibles:** Los resultados se presentan en Tabla 3, observándose diferencias notables en las magnitudes de los porcentajes de inhibición entre las cepas de *R. solani* y la de *F. solani*; sin embargo, hay una correlación en el orden creciente de eficiencia de las distintas cepas antagonistas.

Para las dos cepas de *R. solani*, existen diferencias significativas entre todas las cepas antagonistas y la cepa de Th 650, ésta última produce una inhibición del 100% de crecimiento en ambas cepas de *R. solani*. Le sigue en importancia la cepa Th 642, con un alto porcen-

taje de inhibición, mientras que Th 645 y Th 643 muestran valores mucho menores y son más eficientes en *R. solani* 509 v que con la cepa 618.

**Tabla 3. Efecto de metabolitos difusibles en *R. solani* y *F. solani* producidos por diferentes especies de *T. harzianum*.**

<i>T. harzianum</i> Cepas	% de inhibición		
	<i>R. solani</i> 618	<i>R. solani</i> 509v	<i>F. solani</i> 607v
Th 650	100,0a	100,0a	28,4 a
Th 645	17,1c	25,6c	4,4 c
Th 643	15,3d	24,7d	1,1 c
Th 642	90,1b	89,4b	12,1 b

*F. solani* 607 v, es notablemente menos inhibida en su crecimiento que las cepas de *R. solani*, siendo la Th 650, la más eficiente en inhibir su crecimiento con un 28%. Le sigue la Th 642 con un 12 % de inhibición y finalmente no existen diferencias significativas entre las cepas Th 645 y Th 643, las que muestran valores menores al 5% de inhibición.

**Metabolitos Volátiles:** Los resultados se presentan en la Tabla 4, donde se observa que no existen diferencias significativas entre las distintas cepas antagonistas, para ninguno de los patógenos.

**Tabla 4. Efecto de metabolitos volátiles en *R. solani* y *F. solani* producidos por diferentes cepas de *T. harzianum*.**

<i>T. harzianum</i> spp	% de inhibición		
	<i>R. solani</i> 618	<i>R. solani</i> 509v	<i>F. solani</i> 607v
Th 650	20,5 a	30,7 a	8,1 b
Th 645	9,5 b	11,5 bc	12,8 a
Th 643	19,0 a	5,5 c	6,1 b
Th 642	9,2 b	15,3 b	5,3 b

Para la cepa de *R. solani* 618, existen sólo dos grupos diferentes de acuerdo al Test de Duncan, las más eficientes en la inhibición del crecimiento del patógeno fueron Th 650 y Th 643, mientras que las menos eficientes fueron las cepas de Th 645 y Th 642.

Para la cepa de *R. solani* 509 v, la cepa antagonista más eficiente es Th 650 y la segunda más eficiente es Th 642. La cepa menos eficiente en el control por metabolitos volátiles de *R. solani* 509v, es la cepa Th 643.

Para la cepa de *F. Solani* 607 v la cepa antagonista más eficiente fue Th 645 y todas las demás (Th 642, Th 643 y Th 650) se encuentran en el grupo b, con una menor capacidad de inhibición.

Como antecedente a los resultados obtenidos en estos ensayos *in vitro*, en aplicaciones de campo en

cultivos bajo invernadero, Mónaco *et al.* (1991), observaron una reducción significativa en el porcentaje de incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium* spp. y *Sclerotium rolfii*, demostrando la posibilidad de usar estos agentes a nivel de campo como alternativa a los agroquímicos tradicionales.

**Efecto del  $Fe^{3+}$ , salinidad, pH y Temperatura, sobre el crecimiento de las mejores cepas antagonistas de *T. harzianum* (650 y 642).**

**Efecto del  $Fe^{3+}$ :** Los resultados muestran que existen diferencias significativas en el crecimiento de ambas cepas en todas las concentraciones de  $Fe^{3+}$  utilizadas. Se aprecia que ambas cepas crecen en todo el rango de concentraciones utilizado, pero su crecimiento es inversamente proporcional a la concentración de  $Fe^{3+}$  en el medio de cultivo (Tabla 5). También, se puede observar que Th 650 crece mejor que Th 642, tanto a condiciones bajas como altas de  $Fe^{3+}$  aunque esta diferencia no es significativa.

**Tabla 5. Efecto de diferentes concentraciones de  $Fe^{3+}$  sobre el crecimiento de las cepas Th 650 y Th 642.**

Conc. De $Fe^{3+}$ ppm	Crecimiento en mm	
	Th 650	Th 642
0	30,8 a	18,6 a
5	28,8 b	17,9 b
15	27,9 c	16,8 c
25	25,9 d	14,3 d

Estos resultados aplicados a los suelos en que se utilizarían estos biocontroladores (V Región de Chile), significarían que el  $Fe^{3+}$  no es un factor limitante para el desarrollo de estas cepas de *T. harzianum*; pero que, estas se desarrollarían mejor en suelos con bajo contenido de este elemento.

Considerando estos antecedentes, se debe comentar que los niveles de nutrientes del suelo han permitido mostrar el rol de la competencia por nutrientes en los mecanismos de supresión por parte de los antagonistas. Así, Carbono y Hierro, resultan ser nutrientes limitantes en el desarrollo de la microbiota edáfica (Vannacci & Gullino, 2000).

Según Press *et al.* (2001), existiría un efecto de la concentración de Fe sobre la resistencia sistémica inducida (ISR), al observar la variación de ISR, inducida por *Serratia* spp, en pepino, la cual se redujo significativamente cuando la disponibilidad de Fe era aumentada, por lo tanto la ISR sería dependiente de la concentración de Fe.

taje de inhibición, mientras que Th 645 y Th 643 muestran valores mucho menores y son más eficientes en *R. solani* 509 v que con la cepa 618.

**Tabla 3. Efecto de metabolitos difusibles en *R. solani* y *F. solani* producidos por diferentes especies de *T. harzianum*.**

<i>T. harzianum</i> Cepas	% de inhibición		
	<i>R. solani</i> 618	<i>R. solani</i> 509v	<i>F. solani</i> 607v
Th 650	100,0a	100,0a	28,4 a
Th 645	17,1c	25,6c	4,4 c
Th 643	15,3d	24,7d	1,1 c
Th 642	90,1b	89,4b	12,1 b

*F. solani* 607 v, es notablemente menos inhibida en su crecimiento que las cepas de *R. solani*, siendo la Th 650, la más eficiente en inhibir su crecimiento con un 28%. Le sigue la Th 642 con un 12 % de inhibición y finalmente no existen diferencias significativas entre las cepas Th 645 y Th 643, las que muestran valores menores al 5% de inhibición.

**Metabolitos Volátiles:** Los resultados se presentan en la Tabla 4, donde se observa que no existen diferencias significativas entre las distintas cepas antagonistas, para ninguno de los patógenos.

**Tabla 4. Efecto de metabolitos volátiles en *R. solani* y *F. solani* producidos por diferentes cepas de *T. harzianum*.**

<i>T. harzianum</i> spp	% de inhibición		
	<i>R. solani</i> 618	<i>R. solani</i> 509v	<i>F. solani</i> 607v
Th 650	20,5 a	30,7 a	8,1 b
Th 645	9,5 b	11,5 bc	12,8 a
Th 643	19,0 a	5,5 c	6,1 b
Th 642	9,2 b	15,3 b	5,3 b

Para la cepa de *R. solani* 618, existen sólo dos grupos diferentes de acuerdo al Test de Duncan, las más eficientes en la inhibición del crecimiento del patógeno fueron Th 650 y Th 643, mientras que las menos eficientes fueron las cepas de Th 645 y Th 642.

Para la cepa de *R. solani* 509 v, la cepa antagonista más eficiente es Th 650 y la segunda más eficiente es Th 642. La cepa menos eficiente en el control por metabolitos volátiles de *R. solani* 509v, es la cepa Th 643.

Para la cepa de *F. Solani* 607 v la cepa antagonista más eficiente fue Th 645 y todas las demás (Th 642, Th 643 y Th 650) se encuentran en el grupo b, con una menor capacidad de inhibición.

Como antecedente a los resultados obtenidos en estos ensayos *in vitro*, en aplicaciones de campo en

cultivos bajo invernadero, Mónaco *et al.* (1991), observaron una reducción significativa en el porcentaje de incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium* spp. y *Sclerotium rolfsii*, demostrando la posibilidad de usar estos agentes a nivel de campo como alternativa a los agroquímicos tradicionales.

**Efecto del  $Fe^{3+}$ , salinidad, pH y Temperatura, sobre el crecimiento de las mejores cepas antagonistas de *T. harzianum* (650 y 642).**

**Efecto del  $Fe^{3+}$ :** Los resultados muestran que existen diferencias significativas en el crecimiento de ambas cepas en todas las concentraciones de  $Fe^{3+}$  utilizadas. Se aprecia que ambas cepas crecen en todo el rango de concentraciones utilizado, pero su crecimiento es inversamente proporcional a la concentración de  $Fe^{3+}$  en el medio de cultivo (Tabla 5). También, se puede observar que Th 650 crece mejor que Th 642, tanto a condiciones bajas como altas de  $Fe^{3+}$  aunque esta diferencia no es significativa.

**Tabla 5. Efecto de diferentes concentraciones de  $Fe^{3+}$  sobre el crecimiento de las cepas Th 650 y Th 642.**

Conc. De $Fe^{3+}$ ppm	Crecimiento en mm	
	Th 650	Th 642
0	30,8 a	18,6 a
5	28,8 b	17,9 b
15	27,9 c	16,8 c
25	25,9 d	14,3 d

Estos resultados aplicados a los suelos en que se utilizarían estos biocontroladores (V Región de Chile), significarían que el  $Fe^{3+}$  no es un factor limitante para el desarrollo de estas cepas de *T. harzianum*; pero que, estas se desarrollarían mejor en suelos con bajo contenido de este elemento.

Considerando estos antecedentes, se debe comentar que los niveles de nutrientes del suelo han permitido mostrar el rol de la competencia por nutrientes en los mecanismos de supresión por parte de los antagonistas. Así, Carbono y Hierro, resultan ser nutrientes limitantes en el desarrollo de la microbiota edáfica (Vannacci & Gullino, 2000).

Según Press *et al.* (2001), existiría un efecto de la concentración de Fe sobre la resistencia sistémica inducida (ISR), al observar la variación de ISR, inducida por *Serratia* spp, en pepino, la cual se redujo significativamente cuando la disponibilidad de Fe era aumentada, por lo tanto la ISR sería dependiente de la concentración de Fe.

para considerarlo en la producción de biomasa de estas cepas de *T. harzianum* con el fin de preparar formulaciones de las mismas.

### Efecto del mejor pH y temperatura para el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre la inhibición de los patógenos investigados

En el caso de la cepa de *R. solani* 509 v (AG 2-1), Th 650 ejerció una mayor inhibición de crecimiento a 22°C y pH 5 que a 28°C, mientras que a 28°C Th 642 fue el que inhibió mejor a *R. solani* a pH 5 (Fig 3).

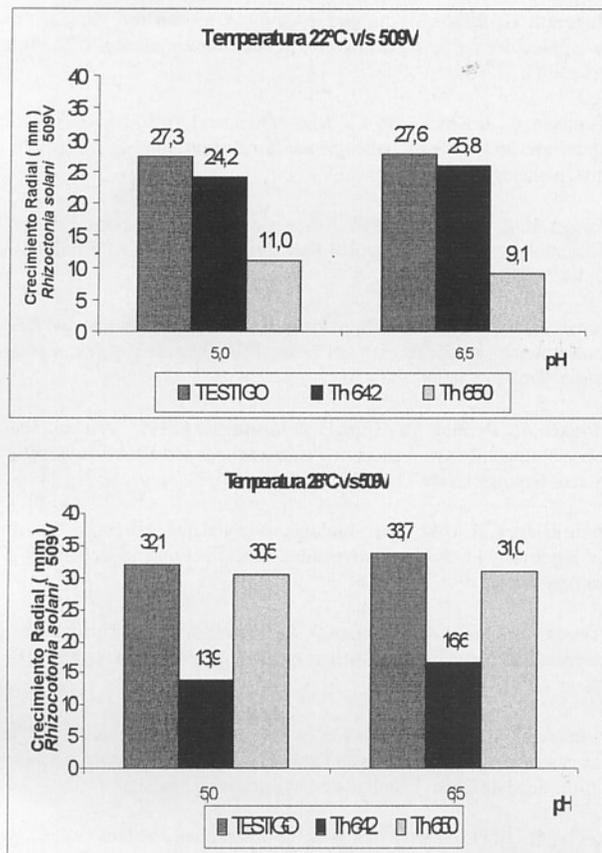


Fig. 3. Crecimiento de *R. solani* 509 v, al ser enfrentada a Th 642 y Th 650 a 22 y 28 °C y pH 5 y 6,5.

En la Fig. 4, se puede observar que la cepa de *Trichoderma* Th650, fue la que inhibió más el crecimiento de *R. solani* 618 (AG 4-HGI) tanto a 22 como a 28°C, siendo mayor la inhibición de crecimiento a pH 5 que a 6,5, es decir al mejor pH en que se desarrollan ambas cepas de *Trichoderma* (Th 650 y Th 642).

En el caso de *F. solani* 607 v (Fig.5), este fue más inhibido en su crecimiento también por Th 650 a temperatura de 28°C y a pH 5.

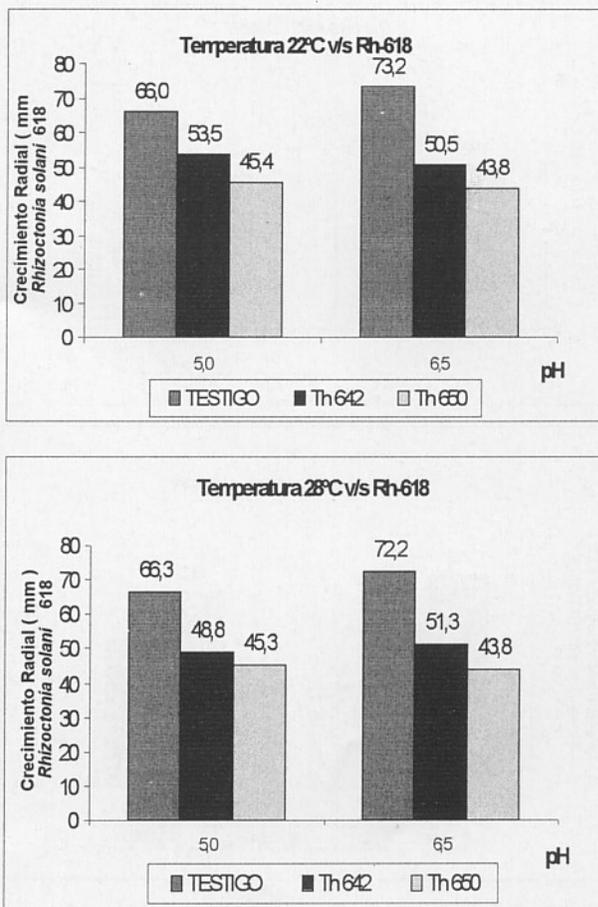


Fig. 4. Crecimiento de *R. solani* 618, al ser enfrentada a Th 642 y Th 650 a 22 y 28 °C y pH 5 y 6,5.

Todos estos resultados comentados, corroboran que la mejor cepa bioantagonista de *Trichoderma* tanto para *R. solani* 618 (AG-4-HGI) *R. solani* 509 v (AG 2-1) y *F. solani* 607 v fue Th 650 a la temperatura y pH óptimo de su desarrollo (28°C y pH 5).

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

De las cepas de *T. harzianum* evaluadas, las más eficientes en el control de las cepas de *R. solani* y *F. solani* fueron Th 650 y Th 642.

Las cepas Th 650 y Th 642 crecieron mejor a las concentraciones más bajas de  $Fe^{3+}$  y de salinidad; sin embargo, las concentraciones mayores investigadas, no fueron limitantes para su desarrollo.

El pH más adecuado para el desarrollo y antagonismo de las cepas de *T. harzianum* 650 y 642 fue 5; sin embargo, el rango de pH entre 5,5 y 8,0 no fue limitante para su desarrollo.

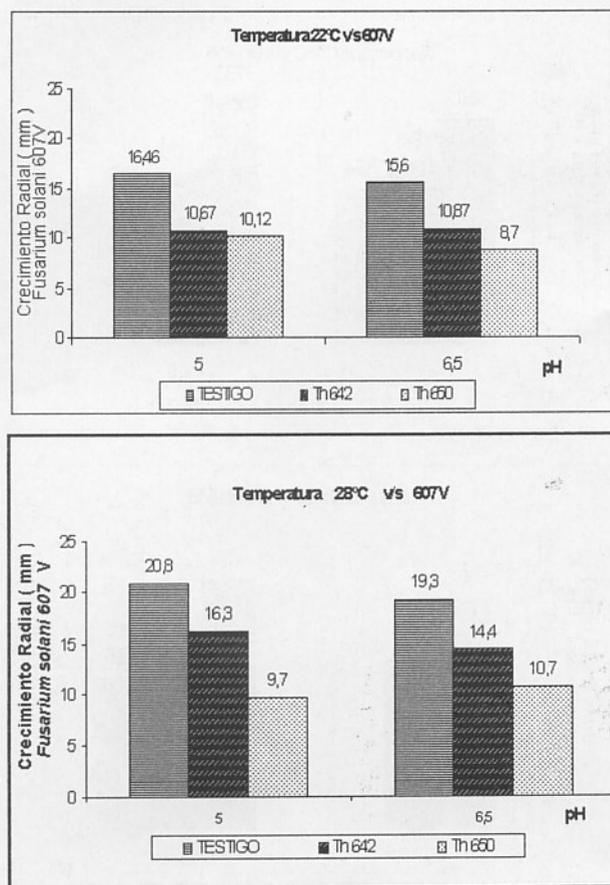


Fig. 5. Crecimiento de *F. solani* 607v, al ser enfrentada a Th 642 y Th 650 a 22 y 28 °C y pH 5 y 6,5.

La temperatura a la que mejor se desarrollaron y antagonizaron las mejores cepas antagonistas de *T. harzianum*, fue a 28 °C, no siendo limitantes para su desarrollo las temperaturas comprendidas entre 10 y 37 °C.

La respuesta de las cepas Th 650 y 642 a los factores edáficos evaluados y que ocurren en la zona donde se aplicarían en el campo estos bioantagonistas, no constituirían un factor adverso ni limitante para ellos.

Los antecedentes recopilados en esta investigación constituyen la base para establecer ensayos de biocontrol de *R. solani* y *F. solani* bajo condiciones de campo en la V Región.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Eduardo Piontelli, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, por la colaboración en la identificación de las cepas de *Trichoderma* empleadas.

#### REFERENCIAS

- Alippi, A. & Mónaco, C. (1994). Antagonismo *in vitro* de especies de *Bacillus* contra *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. 70: 91-95
- Baker, R.; Elad, Y. & Chet, I. (1984). The controlled experiment in the scientific method with special emphasis in biological control. Phytopathology 74: 1019-1021
- Cook, R. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 53-80
- Danielson, R. & Davey, C. 1973. Non nutritional factors affecting the Growth of *Trichoderma* in culture. Soil Biology Biochemistry 5:495-504
- Harman, G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84: 377-393
- Knudsen, G. & Bin, L. 1990. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. Phytopathology 80:724-727
- Larkin, R. & Fravel, D., 1998; Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Disease 82: 1022-1028
- Lewis, J.; Barksdale, T. & Papavizas, G. (1990). Greenhouse and field studies on the biological control of tomato fruit rot caused by *Rhizoctonia solani*. Crop Protection 9:8-14
- Monaco, C.; Perello, A.; Allipi, H. & Pasquare, A. 1991. *Trichoderma* spp: a biological control agent of *Fusarium* spp. and *Sclerotium rolfsii* by seed treatment. Adv. Hort. Sci. 5:92-95
- Montealegre, J. 1991. Microbiología - Manual de Laboratorio. Fac. de Cs. Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. Public. Docente N° 1. Santiago, Chile.
- Press, C.; Loper, J & Klopper, J. 2001. Role of iron in Rhizobacteria mediated induced systemic resistance of cucumber. Phytopathology 91:593-598
- Pumarino, A. 1995; Evaluación *in vitro* del control biológico de la fusariosis del frejol; Memoria de Título Ing. Agrónomo; Santiago, Chile; Universidad de Chile, Facultad de Cs. Agrarias y Forestales.
- Reyes, R. 1999; Control biológico de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Kartsen. mediante el empleo de antagonistas bacterianos; Memoria de Título Ing. Agrónomo; Santiago, Chile; Universidad de Chile; Facultad de Cs. Agronómicas.
- Vasseur, V.; Van Montagu, M. & Goldman, G. 1995; *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. Microbiology, 141: 767-774
- Vannacci, G. & Gullino, M. 2000. Proc. IS. Chemical and non-chemical soil and substrate desinfestation. Eds. M. L. Gullino, J. Katan and A. Matta. Acta Hort. 532.
- Windham, M.; Elad, Y. & Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76:518-521