

# MICROBIOTA DEL SUELO DE ZONAS PRODUCTORAS DE PAPA DEL ESTADO MÉRIDA Y SU RELACIÓN CON *Rhizoctonia solani*

Dilcia Ulacio<sup>1</sup>, José Salas<sup>2</sup>, Pastora Querales<sup>1</sup> y María Elena Sanabria<sup>3</sup>

## RESUMEN

La microbiota del suelo incluye elementos benéficos y/o deletéreos cuyo potencial puede influenciar el desarrollo de las plantas. De dos zonas productoras de papa en Mucuchíes, estado Mérida, fueron examinados tubérculos y suelo contaminados por *Rhizoctonia solani* (M1) y suelo en barbecho durante dos años (M2) para detectar principalmente patógenos y posibles antagonistas. Para el diagnóstico se aislaron los hongos en agar-agua (AA), a partir de diluciones del suelo, siembra de esclerocios de *R. solani* y trozos de tubérculos con restos esclerociales. Desarrolladas las colonias en AA, se aislaron los hongos en papa dextrosa agar (PDA), agar malta (AM) y agar extracto de levadura-Czapec's (CYA). Para comprobar la presencia de *R. solani*, porciones de suelo de ambas zonas fueron colocadas en el medio modificado de Ko y Hora. En la M1 predominó *Penicillium* subgénero *furcatum*, *Penicillium* subgénero *aspergilloide*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium solani*. En M2 *T. harzianum*, *F. solani* y *R. solani*. Igualmente se observaron *Aspergillus flavus*, *Rhizopus sp.*, *Ulocladium sp.* y *Cladosporium sp.*, entre otros hongos no identificados. Al confrontar *R. solani* con algunos de los hongos aislados, a los 7 días se observó 100% de yuxtaposición por *T. harzianum*, aproximadamente 60% por *A. flavus* y ninguna por *Penicillium spp.*, aunque este último, retrasó el crecimiento de *R. solani*. Se concluye que en la zona evaluada existen suelos con una microbiota potencialmente antagonista de *R. solani* para ser aprovechada mediante programas de control biológico, principalmente el hongo *T. harzianum*, reduciendo el uso de fungicidas que van en detrimento de biocontroladores.

**Palabras clave adicionales:** Tubérculos, hongos del suelo, control biológico, fungicida

## ABSTRACT

### Soil mycobiota in potato production areas in Mérida state and its relationship with *Rhizoctonia solani*

Soil mycobiota includes beneficial and deleterious organisms, whose potential may affect plant development. Samples of potato tubers and soil contaminated with *Rhizoctonia solani* (M1) and soil from two year uncultivated lands (M2) were collected from two potato producing areas in Mucuchíes, Mérida state, to determine the presence of pathogenic and antagonistic fungi. These were isolated in water agar (WA) by soil dilution and from sclerotia of *R. solani* and tuber pieces with remaining sclerotium. Later, the isolates were transferred to potato dextrose agar (PDA), malt agar (MA) and yeast extract Czapec's agar (CYA). To detect the presence of *R. solani*, soil samples were placed in Ko and Hora media. *Penicillium* subgenus *furatum*, *Penicillium* subgenus *aspergilloid*, *Trichoderma harzianum* and *Fusarium solani* predominated in M1, while *T. harzianum*, *F. solani* and *R. solani*. *Aspergillus flavus*, *Rhizopus sp.*, *Ulocladium sp.*, *Cladosporium sp.* and other unidentified saprofitic fungi were isolated in M2. Confronting *R. solani* with some of the encountered fungi for 7 days resulted in a 100% overlapping by *T. harzianum*, 60% by *A. flavus*, and none by *Penicillium spp.* There are soils in the area with mycobiota potentially antagonistic to *Rhizoctonia solani*, which should be used in biological control programs, especially *T. harzianum*, to reduce fungicide use that harms biocontrol agents.

Additional key words: Tubers, soil fungi, biological control, fungicide

## INTRODUCCIÓN

La Rhizoctoniosis en papa es una enfermedad que se encuentra en todas las áreas productoras a nivel mundial (Gudmestad, 1999). La zona productora de este rubro en el estado Mérida no

escapa a este problema y la práctica de monocultivo como es costumbre en la mayoría de las zonas productoras de tubérculos y hortalizas en Venezuela, favorece el incremento de inóculo en hongos patógenos habitantes del suelo, siendo este el caso de *Rhizoctonia solani*.

Recibido: Abril 16, 2001

Aceptado: Diciembre 17, 2001

<sup>1</sup> Dpto. de Ciencias Biológicas. Decanato de Agronomía. e-mail: dilciau@altavista.com

<sup>2</sup> INIA-Mérida. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del estado Mérida. Mérida. Venezuela

<sup>3</sup> Posgrado de Fitopatología. Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela.

Existen numerosos biotipos de *R. solani* llamados grupos de anastomosis (GA) que afectan una amplia gama de cultivos (Gudmestad, 1999). Varios de estos grupos han sido señalados como causantes de Rhizoctoniosis en papa, entre los cuales se mencionan los grupos GA<sub>4</sub> y GA<sub>3</sub>, siendo este último el más común (Gutiérrez y Torres, 1990).

El manejo de esta enfermedad debe ser integrado, recurriendo en primer lugar a la rotación de cultivos; sin embargo, esta práctica en las zonas paperas del país se dificulta debido a que la mayoría de rubros cultivados en las mismas son susceptibles a biotipos de *R. solani*. Otras prácticas agronómicas tales como el tratamiento previo de la semilla asexual, riegos mínimos previo a la emergencia para evitar el exceso de humedad, selección y tratamiento químico de la semilla son recomendados por Gudmestad (1999), además de la práctica de barbecho.

El uso del control biológico ha sido señalado por varios investigadores, con el cual se ha demostrado el efecto de hiperparasitismo y la acción fungicida de *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento saprofítico de *R. solani* cuando se ponen en contacto (Thornton y Gilligan, 1999).

Lo anteriormente expuesto evidencia la capacidad de algunos hongos y bacterias para actuar como agentes biocontroladores de *R. solani*, lo que en combinación con prácticas agronómicas conforman el control integrado de la enfermedad, razón por la cual se planteó como objetivo de esta investigación el determinar la microbiota presente en el suelo de una zona productora de papa del estado Mérida y su relación con *R. solani* para determinar posibles antagonistas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Método de aislamiento

Para aislar la microbiota se tomaron muestras de suelo en barbecho, suelo con restos de cosecha, esclerocios de *Rhizoctonia solani* y trozos de tubérculos con restos esclerociales (Fig. 1A). Todos los materiales fueron colectados en el municipio Rangel, sector La

Toma de Mucuchéfes, estado Mérida, siendo trasladadas hasta el laboratorio de Fitopatología del Decanato de Agronomía de la UCLA. Las dos primeras muestras se procesaron por el método de dilución del suelo. Se colocaron 10 g de suelo en recipientes Erlenmeyer de 500 ml que contenían 200 ml de agua destilada estéril los cuales se llevaron a un agitador mecánico por 10 minutos. De cada muestra se hicieron tres repeticiones.

Después de la agitación, cada suspensión fue diluida en agua destilada estéril y a partir de estas se realizaron tres diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ). Posteriormente, sin dejar de agitar, se tomaron alícuotas de las muestras para sembrar en superficie, esparciendo dos gotas en un medio de cultivo de agar-agua (AA). Esto se realizó con cada una de las repeticiones. Las colonias fúngicas que crecieron fueron transferidas a agar papa dextrosa (PDA), para su posterior identificación.

Los esclerocios de *R. solani* y los trozos de tubérculos de papa con restos esclerociales fueron colocados directamente en AA. Una vez iniciado el crecimiento, las colonias fueron subcultivadas en PDA para su posterior identificación. Hongos tales como *Trichoderma sp.*, *Penicillium spp.* y *Aspergillus sp.* fueron aislados en medio agar extracto de levadura-Czapec's (CYA) y agar extracto de malta (AEM) para la identificación de las especies.

De cada muestra de suelo se tomó una pequeña porción que fue esparcida en cajas de Petri con medio Ko y Hora modificado (Sneh et al., 1991), el cual es específico para *R. solani*.

### II. Confrontación de los microorganismos encontrados

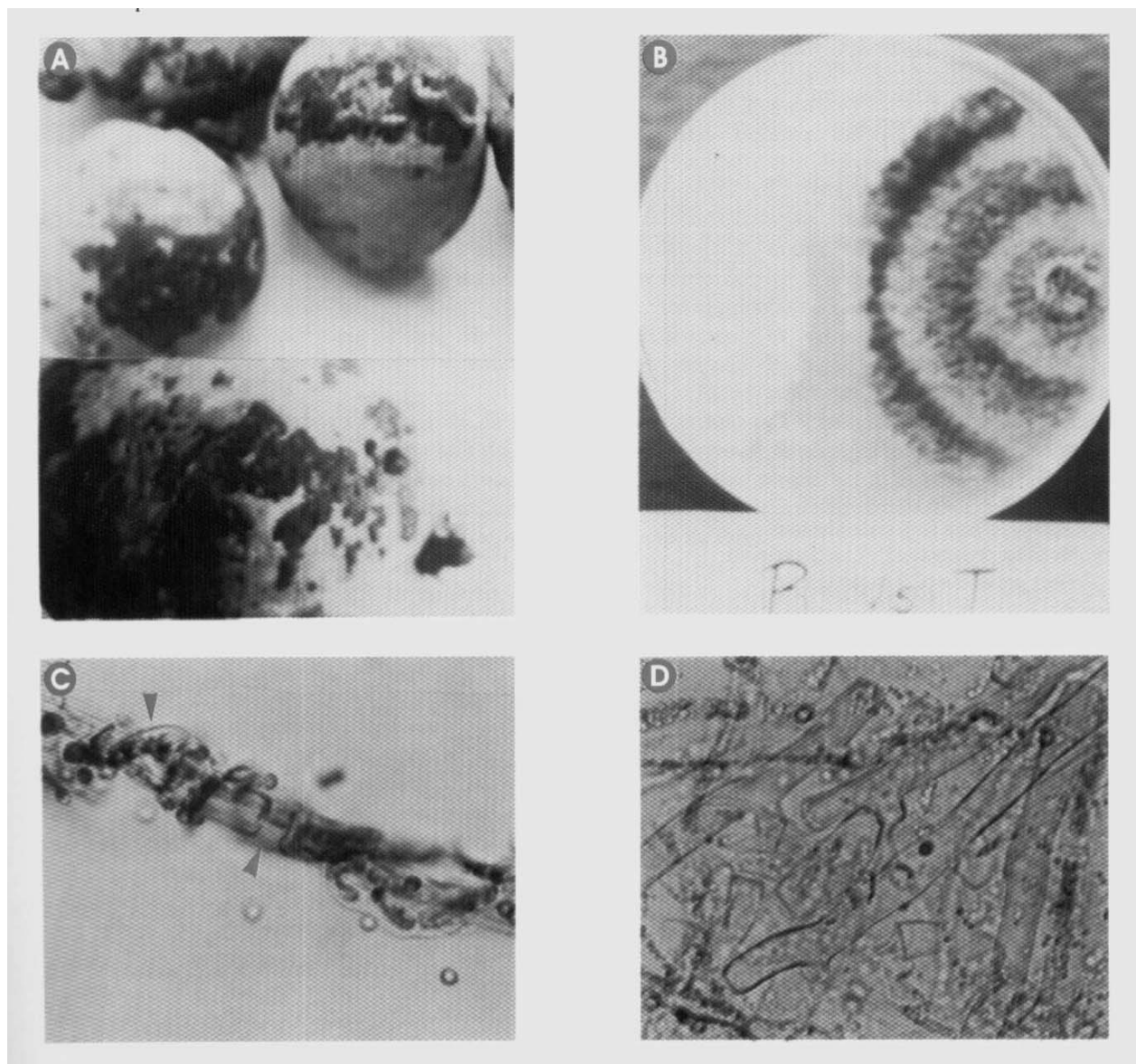
Los aislamientos de *R. solani* fueron confrontados con los antagonistas potenciales obtenidos en cada una de las muestras procesadas. Para ello se utilizó un sacabocado de 5 mm de diámetro y cada disco de agar-micelio fue colocado en los extremos de las cajas de Petri con PDA. Las cápsulas de Petri se incubaron a 25 °C en estufa y las observaciones se realizaron durante 7 días, después de la siembra, mediante un microscopio fotónico. Las mediciones consistieron en evaluar diariamente,

durante el período de incubación, el crecimiento del micelio de cada uno de los aislamientos confrontados; a su vez, se midió el crecimiento de cada uno de los aislamientos individuales para establecer las comparaciones. Además, se tomó parte de agar-micelio de la zona de confrontación entre las dos colonias para hacer los montajes de láminas y observaciones microscópicas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I. Aislamientos de suelo con restos de cosecha, suelo en barbecho durante dos años, esclerocios y trozos de tubérculos con restos esclerociales

En el Cuadro 1 se observan los diferentes géneros encontrados en las muestras provenientes de la Toma de Mucuchíes, estado Mérida, en el



**Figura 1.** (A), Síntoma de la costra negra causada por *R. solani* en tubérculos de papa del cultivar clon Tibisay. (B), Confrontación de *T. harzianum* y *R. solani*. (C), Enrollamiento de hifa de *T. harzianum* alrededor de una hifa de *R. solani* e inicio de la fragmentación. (D), Fragmentación de hifas de *R. solani* creciendo conjuntamente con *T. harzianum*.

cual se destacan principalmente *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus* y dos especies de *Penicillium*, entre otros.

Mediante la técnica de dilución, tanto en la muestra de suelo con restos de cosecha como en la de barbecho, fue común encontrar *A. flavus*, *Penicillium spp.*, *Fusarium solani*, *Rhizopus sp.* y *Cladosporium sp.*, predominando las especies de *Penicillium*, mientras que de los esclerocios de *R. solani* y los trozos de tubérculos con restos esclerociales se aislaron *T. harzianum*, *Penicillium spp.*, *F. solani*, *Rhizopus sp.*, y *Ulocladium sp.*, predominando *T. harzianum* y *Penicillium subg. furcatum*.

En todas las muestras analizadas se detectó la presencia de otros saprófitos, los cuales no mostraron estructuras reproductivas para su identificación.

Por el método de dilución no se pudo aislar *R. solani*, siendo necesario esparcir suelo en medio de cultivo Ko y Hora modificado (Sneh et al., 1991) para comprobar su presencia, observándose mayor cantidad de micelio en la muestra con restos de cosecha. Así mismo, en medio PDA, el micelio producido por esclerocios no produjo nuevos esclerocios; sin embargo, en el medio Ko y Hora el micelio sí desarrolló esclerocios a los 8 días.

**Cuadro 1.** Micobiota aislada de suelos y tubérculos de papa colonizados con *Rhizoctonia solani* provenientes de Mucuchíes, estado Mérida

Hongos aislados	Suelo con restos de cosecha	Suelo en barbecho (2 años)	Esclerocios de <i>R. solani</i>	Trozos de tubérculos con restos esclerociales
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	+++	++
<i>Aspergillus flavus</i>	++	++	-	-
<i>Penicillium subg. furcatum</i>	+++	+++	++	++
<i>Penicillium subg. aspergilloide</i>	+++	+++	++	+
<i>Fusarium solani</i>	+	+	++	+
<i>Rhizopus sp.</i>	++	+	+	+
<i>Ulocladium sp.</i>	-	-	+	+
<i>Cladosporium sp.</i>	+	+	-	-
Otros saprófitos (no identificados)	++	++	+	+

+++ Alta presencia ( $\geq 8$  aislamientos)

++ Mediana presencia (5 - 7 aislamientos)

+ Poca presencia ( $\leq 4$  aislamientos)

Según Papavizas (1970) ciertos aislamientos de *R. solani* pueden depender del parasitismo para su sobrevivencia, aunque existen evidencias que *R. solani* persiste en el suelo primeramente como saprófito en tejidos infectados durante el parasitismo o por colonización saprofítica en tejidos de plantas muertas en la cual puede permanecer en latencia o activo por un largo período. Estos resultados demuestran que este biotipo no identificado de *R. solani* pudiera tener menor sobrevivencia saprofítica en comparación con otros biotipos de la misma especie, como es el caso del biotipo señalado por Ulacio et al. (1998).

Es de hacer notar que la concentración y la diversidad de la micobiota en el suelo fue baja si se compara con estudios similares en otros cultivos. Tal es el caso del estudio realizado en rizósfera de tabaco por Ulacio et al. (1997), donde la presencia de diferentes especies de

*Aspergillus* y *Fusarium* limitaron la acción de otros microorganismos. A este respecto, Alexander (1980) afirma que el espectro de géneros varía según el tipo y la edad de la planta, y con el tipo de suelo, dependiendo de la cantidad de nutrientes y otros materiales que se acumulan alrededor del área radical, originando un gradiente de difusión a medida que la zona de influencia de la raíz se va alejando. En este sentido, la mayor capacidad saprofítica competitiva en las muestras de suelo fue mostrada por *P. subg. furcatum* y *P. subg. aspergilloide*.

Cuando se realizaron aislamientos a partir de esclerocios y trozos de tubérculos con restos esclerociales, el predominio de las especies de *Penicillium* fue compartido por *T. harzianum*, el cual no fue detectado por el método de dilución del suelo. Es de hacer notar que en los aislamientos provenientes de los esclerocios fue

frecuente encontrar a *F. solani*, *R. solani* y *T. harzianum* mezclados, predominando el micelio del último. El hecho de encontrar *T. harzianum* solamente sobre esclerocios y tubérculos infectados pudiera interpretarse como una íntima relación entre estos dos hongos bajo condiciones naturales.

## II. Confrontación de *R. solani* con algunos de los otros microorganismos aislados

La Figura 1B muestra la confrontación realizada entre *R. solani* y *T. harzianum*, observándose el efecto antagonista de este último. A los 3 días después de la siembra se marcó la línea de inhibición, apreciándose posteriormente un solapamiento total por parte del antagonista sobre *R. solani* en los días siguientes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Benhamou y Chet (1993) quienes señalaron que el micelio de *R. solani* fue totalmente rodeado por las hifas de *T. harzianum*, las cuales crecieron rápidamente y colonizaron el agar.

En la Figura 1C se observa una hifa de *T. harzianum* enrollada alrededor de una hifa de *R. solani*, mientras que en la Figura 1D se aprecia la pérdida de turgencia y fragmentación en hifas de *R. solani* cuando se comparan con hifas no afectadas. A este respecto, Benhamou y Chet (1993) sugieren que una vez que se establece el contacto entre ambos microorganismos *T. harzianum* produce sustancias fungicidas. Algunas especies de *Trichoderma* han sido señaladas como controladoras efectivas no sólo de *R. solani* (Benhamou y Chet, 1993; Thorton y Gilligan, 1999) sino también de *Sclerotium rolfsii* (Latieque, 1990, Velásquez, 1996; Well, 1998).

En cuanto al crecimiento en placas de *R. solani* y *A. flavus* confrontados, se observó la línea de inhibición a los 5 días, apreciándose un 60% de solapamiento a los 7 días. Esto indica que *R. solani* compite con cierta eficiencia con este hongo a diferencia de lo que ocurre con *Trichoderma harzianum*. Sin embargo, *A. flavus* retrasó efectivamente el crecimiento del micelio de *R. solani*, si se considera que este último en cultivo puro colonizó completamente el agar en una semana. La capacidad antagónica de *A. flavus* sobre una raza de la misma especie, ha sido reportada por Cooty (1994).

El posible efecto antagonista de *A. flavus* sobre *R. solani* se evidenció por una fuerte adhesión de los conidios del primero sobre las hifas del segundo, lo cual no se observó en la confrontación con otros hongos. Esto pudiera relacionarse con el inicio de un parasitismo de hifas por parte de *A. flavus*; sin embargo, aparentemente la hifa de *R. solani* aún estaba intacta, pero es necesario prolongar el tiempo de observación a los fines de definir mejor el efecto que realmente ocurre.

En la confrontación de *R. solani* con las especies de *Penicillium* no hubo contacto entre las hifas durante los primeros 7 días de observación, a diferencia de las otras confrontaciones realizadas. No obstante, *Penicillium* subg. *furcatum* produjo una fuerte pigmentación amarilla en el agar cuando se confrontó con *R. solani*. Este hecho al parecer inhibió el micelio de este último, a tal punto, que prácticamente el crecimiento se detuvo a los 4 días después de la siembra en las cápsulas de Petri. Este resultado sugiere un posible antagonismo por acción de sustancias difusibles en el medio de cultivo, aunque *Penicillium* subg. *aspergilloide* no pigmentó el medio ni tampoco permitió el crecimiento rápido de *R. solani* en las placas de Petri.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Diferentes microorganismos considerados de alta capacidad saprofitica competitiva, entre ellos *Trichoderma harzianum*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani*, fueron aislados de suelo y tubérculos de papa colonizados por *Rhizoctonia solani* provenientes de Mucuchíes, estado Mérida.

Las confrontaciones demostraron la capacidad antagónica de *T. harzianum*, *Penicillium spp.* y *A. flavus*, pero principalmente de *T. harzianum*, debido a la evidente destrucción del micelio de *R. solani*.

Se requieren estudios más detallados de los mecanismos de control por parte de *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* sobre *R. solani*.

Se recomienda el manejo integrado de la costra negra de la papa causada por *R. solani*, reforzando el control biológico con inoculaciones al suelo de *T. harzianum*.

## LITERATURA CITADA

1. Alexander, M. 1980. Introduction to Soil Microbiology. Second Edition. John Wiley and Sons. New York.
2. Benhamou, N. y I. Chet, 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. Ultrastructure and gold cytochemistry of mycoparasitic process. *Phytopathology* 83: 1062-1071.
3. Cooty, P. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* in cotton seed. *Phytopathology* 84: 1270-1277.
4. Gudmestad, N. 1999. Rhizoctonia canker of potato. Department of Plant Pathology. North Dakota State University. <http://IIIAV.rhizoctext.htm>. (consulta de Octubre, 1999).
5. Gutiérrez, P. y H. Torres. 1990. Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Rhizoctonia binucleada*. *Fitopatología* 25(2): 45-50.
6. Latiegue, A. 1990. *Trichoderma harzianum* Riffai como antagonista de *Sclerotium rolfsii* Sacc. agente causal de la pudrición basal de la caraota. Trabajo de grado. Posgrado de Fitopatología. Decanato de Agronomía. UCLA. Barquisimeto. 61 p.
7. Papavizas, G. 1970. Colonization and growth of *Rhizoctonia solani* in soil. In: J.R. Parameter. (ed.). *Rhizoctonia solani*:
8. Biology and Pathology. University of California, Berkeley. pp. 108-121.
9. Sneh, B., L. Burpee y A. Ogoshi. 1991. Identification of Rhizoctonia Species. APS Press. Minnesota.
10. Thornton, C. R. y C. A. Gilligan. 1999. Quantification of the effect of the hiperparasite *Trichoderma harzianum* on the saprotrophic growth dynamics of *Rhizoctonia solani* in compost using a monoclonal antibody based ELISA. *Mycological Reserch* 103(4): 443-448.
11. Ulacio, D., H. Nass, J. B. Pineda y A. Carrasco. 1998. Variabilidad de *Rhizoctonia solani* Jun AG1-IA bajo condiciones de inundación. I. Micoflora asociada al patógeno en tejido de *Oriza sativa*. *Bioagro* 10(2): 40-47.
12. Ulacio, D., C. Pérez, y J. B. Pineda. 1997. Micoflora asociada a las raíces de las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) provenientes del estado Portuguesa. *Bioagro* 9(1): 3-11.
13. Well, H. 1988. *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: Mukerji y Garq (eds.) Biocontrol of Plant Disease. Vol 2. CRC Press. Boca Ratón, Florida. pp. 71-82.