

CAPACIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE *Trichoderma* spp. FRENTE A *Rhizoctonia solani* Kuhn Y *Fusarium* *verticillioides* Nirenberg

Iraima C. Rodríguez¹ y Joksán Flores¹

RESUMEN

La rizoctoniosis (*Rhizoctonia solani*) y la fusariosis (*Fusarium verticillioides*) son las enfermedades fúngicas de mayor relevancia en el cultivo de maíz, ocasionando pérdidas económicas y deterioro en la calidad de los granos. En este trabajo se determinó la capacidad antagónica *in vitro* de 16 aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani* y *F. verticillioides*, con el objeto de identificar aquellos aislamientos con mayor potencial para el control de los patógenos mencionados. Se realizaron pruebas de cultivo duales, utilizando platos Petri con medio papa dextrosa agar. La evaluación se realizó durante 14 días. Se empleó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Los aislamientos de *Trichoderma* estudiados mostraron diferencias significativas en las variables de porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) y número de esclerocios formados en los enfrentamientos contra *R. solani*, y las variables de PIC y porcentaje de inhibición de la esporulación al enfrentar a *F. verticillioides*. Además, en general, se observaron tendencias a favor de la capacidad antagónica de *Trichoderma* en las variables de porcentaje de reducción de esclerocios, porcentaje de esclerocios parasitados y grado antagónico. Los aislamientos más promisorios frente a *R. solani* fueron Santa Lucía (*F. koningii*) y 06142 (*Trichoderma croseum*), mientras que frente a *F. verticillioides* fueron BAPSOS e I9 (ambos identificados como *T. harzianum*). *Fusarium* mostró una mayor resistencia a ser colonizado, en comparación a *Rhizoctonia*, por las especies evaluadas de *Trichoderma*.

Palabras clave adicionales: Control biológico, fusariosis, porcentaje de inhibición del crecimiento, rizoctoniosis

ABSTRACT

Antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. *in vitro* against *Rhizoctonia solani* Kuhn and *Fusarium verticillioides* Nirenberg

The rizoctoniosis (*Rhizoctonia solani*) and scab (*Fusarium verticillioides*) are the most important fungal diseases in maize, causing economic losses and deterioration in the quality of the grains. In this research, the antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. against *R. solani* and *F. verticillioides* was determined *in vitro*, in order to identify those isolates with the highest potential to control the mentioned pathogens. Dual culture tests were performed during 14 days, using Petri dishes with potato dextrose agar medium. The evaluation was conducted using a completely randomized design with five replicates. *Trichoderma* isolates showed significant differences in the variables of percentage of growth inhibition (PGI) and number of sclerotia formed in its interactions with *R. solani*, and the variables of PGI and percentage of sporulation inhibition in the interaction with *F. verticillioides*. Also, a general trend was observed favoring the antagonistic capacity of *Trichoderma* in the variables of percentage of reduction in the number of sclerotia, percentage of sclerotia parasitized and antagonistic degree. The most promising isolates against *R. solani* were Santa Lucía (*T. koningii*) and 06142 (*T. croseum*), while against *F. verticillioides* they were BAPSOS and I9 (both identified as *T. harzianum*). *Fusarium* showed greater resistance to colonization, when compared to *Rhizoctonia*, by the evaluated *Trichoderma* species.

Additional key words: Biocontrol, percentage of growth inhibition, rizoctoniosis, scab

INTRODUCCIÓN

La mancha bandeada o rizoctoniosis por *Rhizoctonia solani* y la pudrición del tallo y de la mazorca o fusariosis del maíz ocasionada por *Fusarium verticillioides*, son dos enfermedades que afectan a este cultivo en Venezuela. Cada una

de ellas puede disminuir su rendimiento y ocasionar muerte de plantas (Cardona et al., 1999; García et al., 2006).

En Venezuela, el daño ocasionado por *R. solani*, ha venido ocupando lugares preponderantes en áreas maiceras de Portuguesa. Las lesiones causadas por este fitopatógeno se localizan en las

Recibido: Mayo 18, 2017

Aceptado: Diciembre 4, 2017

¹ Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Apdo. 4579. Maracay, Venezuela. e-mail: agronomia@agr.ucv.ve; iraima1408@gmail.com; joksanf@gmail.com

hojas bandera, desde las cuales pueden avanzar hasta alcanzar las mazorcas (Rodríguez et al., 2003). Desde 1995, la presencia de la enfermedad se ha observado afectando tallos, hojas y mazorcas de las plantas con incidencias desde 32 hasta 90 %, caracterizadas por largas zonas decoloradas alternadas con bandas oscuras (Cardona et al., 1999).

En la Colonia Agrícola de Turén del estado Portuguesa, el hongo ha sido identificado por causar daños en maíz y en los últimos seis años ha ocasionado pérdidas en la cosecha por el orden del 75 % (Puentes y Mejías, 2003). Anteriormente esta enfermedad se asociaba en etapas avanzadas, pero desde 2003 se ha observado en etapas tempranas ocasionando pérdidas significativas en el rendimiento debido a la caída y muerte de plantas, además de un alto número de mazorcas enfermas.

Fusarium verticillioides, causante de la pudrición del tallo y de la mazorca, es capaz de colonizar el maíz durante todo el ciclo vegetativo de la planta incluyendo raíz, tallo, mazorca y en granos. En muchos casos, la presencia del hongo, no es perceptible, pues no causa daño visible en la semilla o en la plántula.

La importancia del control de estas enfermedades fúngicas (rizoconiosis y fusariosis) no sólo radica en disminuir las pérdidas en rendimiento que ellas ocasionan, sino también en evitar la producción de fumonisinas sintetizadas por *F. verticillioides*, que tiene implicaciones en la calidad de los granos, en la salud pública y animal gracias a su gran poder toxigénico (Mazzani et al., 1999; García et al., 2006).

Las condiciones tropicales favorecen la incidencia de estos dos patógenos en el cultivo de maíz y en la actualidad su control se realiza con productos químicos, prácticas culturales y control biológico. Dentro de este último se están empleando fórmulas a base del hongo antagonista *Trichoderma* sp., el cual tiene comprobada acción sobre hongos del suelo como *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Fusarium* (Fernandez, 2001; Infante et al., 2009; Guédez et al., 2012).

El uso de estas cepas comerciales no siempre tiene el efecto esperado y pueden presentar problemas con su persistencia en el suelo. Por esta razón se considera importante la obtención de aislamientos nativos del hongo antagonista, los cuales están mejor adaptados a las condiciones

edafoclimáticas de la zona específica donde serán aplicados (González et al., 1999). Para lo cual se recomienda realizar pruebas *in vitro* que reflejen la capacidad y la variabilidad genética del antagonista, y la del fitopatógeno para resistir el antagonismo, permitiendo así la selección preliminar, para luego ser evaluados en condiciones de campo, determinando de esta forma su capacidad de inhibir o controlar el crecimiento del hongo fitopatógeno (Bell et al., 1982). Por tal motivo, se evaluó la capacidad antagónica de 16 aislamientos de *Trichoderma* provenientes de zonas agrícolas de los estados Aragua y Guárico frente a dos de los patógenos más importantes que afectan el cultivo de maíz (*R. solani* y *F. verticillioides*), con la finalidad de seleccionar los mejores y utilizarlos posteriormente en condiciones naturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Se realizaron pruebas de enfrentamiento en cultivos duales entre 16 aislamientos de *Trichoderma* provenientes de algunas zonas agrícolas de los estados Aragua y Guárico y los patógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*.

El aislamiento de *R. solani* se obtuvo mediante el método de siembra directa, a partir de muestras de material vegetal enfermo y esclerocios presentes en plantas de maíz con síntomas de rizoconiosis, en una zona maicera de los Valles de Tucutunemo en el estado Aragua. El hongo aislado, una vez comprobada su patogenicidad en plantas de maíz, fue conservado en tubos de ensayo contentivos del medio papa dextrosa agar (PDA).

El aislamiento de *F. verticillioides* se aisló a partir de granos de maíz recién cosechados por el método de siembra directa en medio de cultivo malta sal agar. De las colonias fúngicas se tomó una muestra la cual fue sembrada en PDA, para su preservación y uso en las pruebas de enfrentamiento.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. utilizados pertenecen a la colección de hongos de la Clínica de Enfermedades de Plantas de la Facultad de Agronomía (UCV), los cuales se

aislaron a partir de muestras de suelo de diferentes zonas agrícolas de los estados Aragua y Guárico (Cuadro 1). El método de siembra utilizado fue el de incorporación en placas y la siembra se realizó en el medio PDA. La incubación de las placas se hizo a 28 °C por un período de 3 a 5 días. Los aislamientos obtenidos se transfirieron a tubos de ensayo contentivos de PDA en cuña, se incubaron por 7 días y luego se conservaron a bajas temperaturas (5-10 °C).

Cuadro 1. Denominación y procedencia* de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

Aislamiento	Cultivo	Procedencia
AB1		Arenales
JCFA05	Frijol	Caicara
BAPSOS	Sorgo	Palo Negro, Caicara
I9	Sorgo	Palo Negro
Santa Lucía	Tomate	Santa Lucía
C5		Valles de Tucutunemo
C1		Valles de Tucutunemo
M2		Valles de Tucutunemo
06153		Valles de Tucutunemo
J10	Tomate	Camatagua
A1	Tomate	El Sombrero
M11	Maíz	Pao de Zárate
06143		Finca Anapiar
06146		Finca Dolores
06142		Tocorón
06141		Arenales

*Todos del estado Aragua a excepción de El Sombrero, que corresponde al estado Guárico

Para evaluar el potencial antagónico de los aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* y *F. verticillioides*, se realizaron pruebas de cultivo dual, para ello se sembraron en la superficie de platos de Petri con PDA, discos de 5 mm de diámetro colonizados con micelio de *Trichoderma* en un lado de la cápsula y otro disco con micelio del patógeno en el otro extremo. El material se incubó por 14 días a temperatura ambiente y se realizaron las observaciones en el momento indicado para cada variable considerada.

Se realizaron 32 pruebas de enfrentamiento (16 aislamientos de *Trichoderma* vs *R. solani* y 16 aislamientos de *Trichoderma* vs *F. verticillioides*) con su testigo correspondiente (5 placas sólo con *R. solani* o *F. verticillioides* según el caso). Se

utilizó un diseño completamente al azar de 34 tratamientos y cada tratamiento constó de cinco repeticiones, donde cada cápsula Petri se consideró una unidad experimental, para un total de 170 de placas.

En las interacciones evaluadas, se determinaron las siguientes variables: porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) y grado de antagonismo (GA). Para el caso de las combinaciones *Trichoderma* vs *R. solani*, se evaluó además de las indicadas, el porcentaje de reducción del número de esclerocios (PRE) y porcentaje de esclerocios parasitados (PEP), mientras que en los enfrentamientos entre *Trichoderma* vs *F. verticillioides* se determinó en adición el porcentaje de inhibición de la esporulación (PIE). Las mismas se midieron y analizaron como se indica a continuación:

Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC): Cada 24 h se midió el radio de la colonia del patógeno tanto en las interacciones como en los testigos, con ello se determinó el PIC mediante la fórmula: $PIC = [(\text{crecimiento del testigo} - \text{crecimiento del tratamiento}) / \text{crecimiento del testigo}] \times 100$. Los datos obtenidos se analizaron mediante Anova y prueba de Tukey.

Número de esclerocios formados (NEF): Culminada cada prueba de enfrentamiento, se contabilizó el número de esclerocios por placa, tanto en las placas testigo de *R. solani* como en las interacciones, y los resultados fueron cotejados con el testigo mediante la prueba de Dunnett.

Porcentaje de reducción de esclerocios (PRE): Para el cálculo de PRE se utilizó la siguiente fórmula: $PRE = [(N^{\circ} \text{ promedio de esclerocios formados en placas testigo de } R. solani - N^{\circ} \text{ promedio de esclerocios formados en la interacción } Trichoderma \text{ vs } R. solani) / N^{\circ} \text{ promedio de esclerocios formados en placas testigo de } R. solani] \times 100$. Los resultados fueron analizados de manera descriptiva.

Parasitismo de esclerocios (PEP): Una vez culminadas las mediciones de crecimiento en las diferentes interacciones (*Trichoderma* vs *R. solani*), se tomó un tercio de los esclerocios formados/tratamiento y se desinfectaron por 30 s con hipoclorito de sodio al 3,5 %, luego se lavaron en agua destilada estéril, se secaron en papel de filtro estéril y se sembraron en PDA. El material se incubó por 5 días a la espera de que se desarrollara *R. solani* o *Trichoderma* a partir de

los esclerocios sembrados. El PEP se obtuvo mediante la fórmula: $PEP = [N^{\circ} \text{ de esclerocios parasitados por } Trichoderma / N^{\circ} \text{ de esclerocios evaluados en cada tratamiento}] \times 100$. Los resultados fueron analizados de manera descriptiva.

Grado de antagonismo (GA): Se midió según la escala utilizada por Bell et al. (1982) y Askew y Laing (1994), descrita a continuación y la cual relaciona el avance del crecimiento de *Trichoderma* frente al del patógeno. Clase 1: *Trichoderma* crece completamente sobre el patógeno y cubre toda la superficie del medio; clase 2: *Trichoderma* crece al menos sobre dos tercios de la superficie del medio; clase 3: *Trichoderma* coloniza el 50 % del medio y ningún organismo aparece dominado por el otro; clase 4: El patógeno coloniza al menos dos tercios de la superficie del medio; clase 5: El patógeno crece completamente sobre la superficie del medio.

Las evaluaciones se realizaron a los 5, 7, 10 y 14 días. Se consideró que un aislamiento era antagonista si presentaba la clase 1 ó 2 y no antagonista si se encontraba en las clases 3, 4 ó 5. El análisis de los resultados se efectuó de forma descriptiva.

Porcentaje de inhibición de la esporulación (PIE): Una vez finalizadas las pruebas de enfrentamiento (*Trichoderma* vs *F. verticillioides*), con el uso de la cámara de Neubauer, se realizó el conteo de conidios del patógeno por mL de solución según la metodología de French y Herbert (1980) y se calculó el PIE de acuerdo a la fórmula: $PIE = [(Esporulación \text{ del testigo} - esporulación \text{ del tratamiento}) / Esporulación \text{ del testigo}] \times 100$.

Se realizaron cinco conteos de conidios/interacción. Los valores de PIE obtenidos de los 16 aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron comparados utilizando Anova y prueba de Tukey.

Se identificaron los aislamientos de *Trichoderma* que resultaron más destacados en cuanto a su capacidad de controlar *in vitro* el crecimiento y producción de estructuras reproductivas tanto para el caso de *F. verticillioides* como de *R. solani*. La identificación se realizó mediante el método convencional, el cual contempló una descripción macroscópica y microscópica, y la comparación con las claves micológicas especializadas de Bissett (1991a; 1991b) y Rifai (1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evidenció la presencia de grupos estadísticamente diferentes, que variaron dependiendo del aspecto evaluado y de su interacción con el patógeno, *F. verticillioides* o *R. solani*. A pesar de las diferentes características de crecimiento y formación de estructuras reproductivas (conidios y esclerocios) que hay entre los patógenos mencionados, todos los aislamientos de *Trichoderma* spp., lograron inhibir significativamente el crecimiento micelial de ambos hongos (Cuadros 2 y 3); sin embargo, se evidenció que el control *in vitro* fue superior en el enfrentamiento contra *Rhizoctonia*.

Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani*. Todos los tratamientos inhibieron significativa-mente el crecimiento de *R. solani*. La mitad de los aislamientos presentó una inhibición superior al 50 %. Se destacan los aislamientos Santa Lucía, 06142, BAPSOS y 06141 con 60,0; 58,23; 54,58 y 53,88 % PIC, respectivamente (Cuadro 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hernández et al. (2006), quienes en condiciones similares obtuvieron un PIC de 53 y 58 % cuando evaluaron a *T. harzianum* A-53 y A-34 contra *R. solani*. En una investigación reciente (Pérez et al., 2018) se encontró que la misma cepa A-34 de *T. harzianum* fue muy efectiva en el control de las enfermedades fúngicas mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz con niveles de eficiencia entre 70 y 90 %.

Reducción de esclerocios. Una vez finalizadas las pruebas de enfrentamiento, se determinó el NEF/interacción y se observaron diferentes niveles de reducción del número de esclerocios en las combinaciones evaluadas (Cuadro 2). Comparando el NEF en las placas testigo de *R. solani* con el obtenido en las pruebas de enfrentamiento, se encontró que todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados, excepto AB1, lograron inhibir apreciablemente la formación de esclerocios. La menor cantidad de esclerocios formados ocurrió en la interacción con los aislamientos C1 y 06142, donde el promedio fue de 1 y 2 esclerocios por placa, respectivamente, muy inferior al promedio de las placas testigo (16 esclerocios por placa), mientras que la mayor formación de esclerocios la permitieron los aislamientos I9 y AB1 con 13 y 14

esclerocios por placa.

Con los resultados obtenidos se calcularon los porcentajes de reducción de esclerocios (PRE) derivados de los enfrentamientos de los 16 aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani*, los cuales oscilaron entre 93,7 y 12,5 % (Cuadro 2). La capacidad de reducir el número de esclerocios es una cualidad particularmente importante en hongos antagonistas, ya que tales estructuras permiten la sobrevivencia de algunos hongos en el suelo, entre ellos *Rhizoctonia*, por

tanto cualquier efecto en disminuir su formación tiene consecuencias positivas en el cultivo susceptible y una reducción significativa en la fuente de inóculo para próximas siembras. Sobre este particular Durman et al. (1999) señalan una disminución en el crecimiento y la supervivencia de esclerocios de *R. solani* al aplicar aislamientos de *Trichoderma* spp., con resultados satisfactorios en el control de este patógeno en tomate bajo condiciones de invernadero.

Cuadro 2. Capacidad antagonica de *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *R. solani* medida a través de las variables porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), número de esclerocios formados (NEF), porcentaje de reducción de esclerocios formados (PRE), porcentaje de esclerocios parasitados (PEP) y grado antagonico (GA). En paréntesis se muestra el día de la medición

Aislamiento	PIC (14d)	NEF	PRE	PEP	GA (5d)	GA (7d)	GA (10d)	GA (14d)
AB1	49,64 def	14	12,50	90	3	3	3	3
JCFA05	51,52 cde	5*	67,18	100	3	2	1	1
BAPSOS	54,58 bc	9*	40,00	100	3	3	1	1
Santa Lucía	60,00 a	5*	67,18	100	2-3	2-1	1	1
C5	46,82 fg	3*	81,25	100	3	3	3	3
J10	50,58 def	5*	67,18	100	3	2	2	1
M2	44,94 gh	10*	37,00	100	3	3	1	1
C1	51,29 cde	1*	93,75	100	3	2	2	2
A1	48,70 def	5*	67,18	0	3	3	3	3
M11	45,64 fgh	6*	63,75	100	3	2	1	1
I9	52,94 bcd	13*	16,25	100	3	2	1-2	1
06143	49,41 def	4*	73,75	100	3-2	2	1	1
06146	47,84 efg	5*	67,18	100	3	3	1	1
06142	58,23 ab	2*	87,50	100	1-2	1	1	1
06153	48,23 def	5*	67,18	100	3	2	1	1
06141	53,88 bcd	7*	55,00	83	3	3	1	1

Letras distintas en la columna de PIC indican diferencias significativas entre aislamientos según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Los asteriscos en la columna de NEF indican diferencias significativas con el testigo según la prueba de Dunnett ($P \leq 0,05$)

Parasitismo de esclerocios. De las interacciones evaluadas, se distinguen tres grupos, el primero de ellos el conformado por AB1 y 06141 con un parasitismo parcial de 90 y 83 %, respectivamente, el segundo por A1 con 0 % de parasitismo y el último grupo formado por los 13 aislamientos restantes, con 100 % de parasitismo (Cuadro 2). Esta capacidad de hiperparasitismo ha sido señalada por Cundom et al. (2000) quienes señalan parasitismo total de esclerocios de *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii* con el uso de *Trichoderma* spp. En las interacciones de *Trichoderma* 06141 y AB1 frente *R. solani* el hiperparasitismo de los esclerocios fue parcial, lo que pudiera ser una señal de una baja

producción de metabolitos secundarios como carboximetilcelulosa y proteasas, responsables de la degradación de la pared celular de los esclerocios de *Rhizoctonia*, como lo afirman Stefanova et al. (1999).

Grado de antagonismo. Para el quinto día no se encontraron diferencias muy notorias entre los tratamientos, aun cuando se destacaron los aislamientos 06142 y Santa Lucía al alcanzar las mejores clases antagonicas, 1-2 y 2-3, respectivamente (Cuadro 2). Sin embargo, Alarcón et al. (2005) señalaron un aislamiento de *T. harzianum* con mayor agresividad frente a *Rhizoctonia solani*, el cual logró la clase antagonica 1 a los 5 días.

A los 7 días el aislamiento 06142 fue el único en alcanzar la clase antagónica 1, lo cual diferencia a 06142 del resto, indicando así que

este aislamiento tiene la mayor capacidad de colonizar a *Rhizoctonia* en comparación a los restantes.

Cuadro 3. Capacidad antagónica de *in vitro* de *Trichoderma* spp, frente a *F. verticillioides*, medida a través de las variables porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), porcentaje de inhibición de la esporulación (PIE) y grado antagónico (GA). En paréntesis se muestra el día de la medición

Aislamiento	PIC (7 d)	PIC (14 d)	PIE (14 d)	GA(5d)	GA(7d)	GA(10d)	GA(14d)
AB1	47,52 ab	46,66 e	79,51 bcde	2	2	2	4
JCFA05	43,06 abc	67,05 abc	95,42 ab	2	2	1	1
BAPSOS	43,56 abc	68,33 abc	93,99 ab	2	2	1	1
Santa Lucía	42,57 abc	67,77 abc	97,33 a	2	2	1	1
C5	44,30 abc	68,74 abc	75,96 cde	2	2	2	2
J10	36,87 abcd	64,58 abcd	93,53 ab	3	2	1	1
M2	34,40 cd	63,19 bcd	86,62 abc	3	3	3	3
C1	46,78 abc	70,13 ab	70,26 de	2	2	2	2
A1	40,52 abcd	66,66 abc	65,59 e	3	3	3	3
M11	40,59 abc	66,66 abc	94,09 ab	2	2	1	1
I9	43,56 abc	68,33 abc	94,40 ab	2	2	1	1
06143	36,63 bcd	64,44 abcd	73,43 cde	2	2	2	2
06146	32,67 d	62,22 cd	71,35 cde	2	2	2	2
06142	43,56 abc	68,33 abc	85,09 abcd	2	2	2	1
06153	28,71 e	59,99 d	92,26 ab	2	2	2	1
06141	48,02 a	70,83 a	68,63 e	2	2	2	2

Letras distintas en las columnas de PIC y PIE indican diferencias significativas entre aislamientos según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

El grado antagónico entre los distintos tratamientos fue homogéneo a los 10 y 14 días; sin embargo, existe heterogeneidad en las clases antagónicas obtenidas en las distintas interacciones (Cuadro 2), las cuales variaron de la clase 3 (no antagónica) a la clase 2 y 1 (clases antagónicas).

Dada la agresividad y consistencia de los aislamientos Santa Lucía y 06142 ante las variables estudiadas, frente a *Rhizoctonia*, se puede asegurar que en condiciones *in vitro* son los aislamientos más antagónicos de los 16 evaluados (Cuadro 2). El hecho de que los aislamientos de *Trichoderma* mencionados, tuvieran contacto rápidamente con *Rhizoctonia* y lo cubrieran en su totalidad en 5 a 7 días, evidencia que crecen pronto y tienen agresividad; en este sentido Michel et al. (2013) señalaron que existe una gran agresividad de *Trichoderma* spp. y susceptibilidad de *S. rolfsii*, cuando se colocan en cultivos apareados, siendo el aislado Tcn-11 el que se desarrolló más rápido (50,80 mm), lo que demuestra mayor agresividad hacia el patógeno; mientras que la cepa Tcn-7 no presentó

agresividad y creció sólo 27,5 mm. Ello confirma, que la velocidad de crecimiento que presentan las especies de *Trichoderma* es una característica de agresividad y competitividad que este microorganismo posee como antagonista para el control de hongos fitopatógenos (Cook y Baker, 1983).

Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) de *F. verticillioides* frente a *Trichoderma* spp. Los valores de PIC obtenidos en las interacciones de *Trichoderma* spp. y *F. verticillioides* a los 7 días demuestran la formación de 5 grupos estadísticamente homogéneos ($P \leq 0,05$), siendo los aislamientos 06141 y AB1 los que mostraron los mayores PIC con 48,02 y 47,52 %, respectivamente, mientras que M2 (34,40 %), 06146 (32,67 %) y 06153 (28,71 %) presentaron los menores valores (Cuadro 3). Hernández et al. (2006) obtuvieron PIC de 48 % sobre *F. subglutinans* con el uso de *T. atroviride* y *T. harzianum* en el día 7 de evaluación, siendo estos valores similares a los conseguidos por 06141 (PIC = 48,02) y AB1 (PIC = 47,52) sobre *F. verticillioides*.

Así mismo, los PIC obtenidos a los 7 y 14 días de enfrentamiento de *Trichoderma* spp. contra *F. verticillioides* (Cuadro 3), parecen indicar que a medida que avanza el tiempo de enfrentamiento, aumenta la capacidad de biocontrol del antagonista frente al patógeno en referencia. Esta tendencia se observó en 15 de los 16 aislamientos ensayados (todos excepto AB1). Altuna et al. (2003) realizaron por separado, pruebas de enfrentamiento *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y dos formas especiales de *F. oxysporum* [*cubense* (musáceas) y *lycopersici* (tomate)], el primero de los autores reportó PIC de 16 a 20 % a los 5 días, mientras los segundos obtuvieron PIC de 49 % a los 8 días. Esto pudiera ser indicativo de que al estudiar un mismo patógeno se pueden obtener diferentes valores de PIC, dependiendo del día que se realice la medición, por lo que resulta conveniente evaluar las interacciones patógeno-antagonista por largos períodos de tiempo, a fin de detectar si el patógeno tiene la capacidad de adaptarse y desarrollar algún mecanismo de defensa que le ayude a resistir y contraatacar a un posible antagonista.

De igual forma, al comparar los aislamientos de *Trichoderma* que lograron los PIC más altos frente a *Fusarium* (06141 y AB1) con los obtenidos con *Rhizoctonia* (Santa Lucía, 06142) se observa que no hubo coincidencia, dando lugar a señalar que existió diferencia en la capacidad antagónica y en la especificidad de acción del antagonista contra el patógeno. Tal como lo indican Carvajal et al. (2008) quienes muestran que el comportamiento micoparasítico de los aislamientos de *Trichoderma* spp. varía según se trate de *Sclerotium rolfsii* o *Rhizoctonia solani*, evidenciando una amplia especificidad del antagonista por su sustrato por lo que recomiendan realizar cuidadosas selecciones del aislamiento de *Trichoderma* que se utilice en programas de control de fitopatógenos.

Porcentaje de inhibición de la esporulación (PIE). Los valores de PIE obtenidos a partir de las diferentes interacciones hongo-antagonista muestran diferencias significativas entre los aislamientos, los cuales fueron agrupados de acuerdo a la prueba de Tukey en 5 categorías (Cuadro 3). Los PIE variaron entre 65,59 a 97,33 %, siendo los aislamientos Santa Lucía y JCFA05, los que mostraron los valores más altos (97,33 y 95,42 %, respectivamente), mientras que

los más bajos lo manifestaron 06141 (68,63 %) y A1 (65,59 %).

Todos los aislamientos de *Trichoderma* lograron reducir significativamente la cantidad de macro y microconidios producidos por *Fusarium* al ser comparado con el testigo. Resultados estos similares a los obtenidos por Altuna et al. (2003) quienes encontraron un PIE de 77 % a los 8 días, cuando evaluaron *in vitro* a *Trichoderma* spp. y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Castillo (2005) (datos no publicados), consiguió un PIE de 72 y 81 % a los 5 días, al enfrentar a *Trichoderma* spp. y *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Cabe señalar, que en algunas interacciones *Fusarium-Trichoderma*, se presentaron relaciones entre las variables evaluadas diferentes a las esperadas, tal es el caso de las observadas con los aislamientos 06141 y C1, quienes a los 14 días de enfrentamiento evidenciaron altos valores de PIC (70,83 y 70,13 %, respectivamente) acompañados de PIE relativamente bajos (68,63 % y 70,26 %) en comparación con el obtenido en otras interacciones (> 90 %). Caso contrario se observó con 06153 quien redujo significativamente la esporulación (PIE=92,26 %), pero fue el que menos inhibió el crecimiento micelial (PIC = 28,71 %).

Grado de antagonismo (GA). Los aislamientos evaluados expresaron diferentes respuestas y clases antagónicas en el tiempo. C5, C1, 06143, 06146, 06141, M2 y A1 mantuvieron constantes sus clases antagónicas del día 5 hasta el 14, mientras que BAPSOS, I9, JCFA05, Santa Lucía y M11 lograron mejores clases antagónicas a medida que transcurría el tiempo, por último AB1 paso de la clase 2 a una no antagónica (clase 4) a los 14 días (Cuadro 3). Estas diferencias en los resultados obtenidos demuestran la alta variabilidad en la actividad antagónica de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sp. Ello pudiera estar relacionado con el origen de las cepas del antagonista, tal como lo señala Agamez (2009), quien menciona que probablemente la naturaleza nativa de los aislados, favorece a la afinidad que determinadas especies de *Trichoderma* puedan tener por un fitopatógeno en especial.

Al evaluar y analizar el comportamiento de *Trichoderma* spp. ante las variables estudiadas (PIC, PIE y GA) (Cuadro 3) se puede señalar que los aislamientos BAPSOS, I9, JCFA05 y Santa Lucía destacaron como los de mayor actividad

antagónica *in vitro* frente a *F. verticillioides*; sin embargo, tomando en consideración que sólo se debían seleccionar dos aislamientos y que presentaban respuestas similares ante las variables señaladas, se tomó como referencia principal el PIC a la hora de escoger dentro de los cuatro indicados, a los que se iban a identificar. Los otros aislamientos fueron preservados para estudios posteriores y forman parte de la colección del laboratorio.

Identificación de los aislamientos de *Trichoderma* spp., con mayor capacidad antagónica *in vitro*. Los dos aislamientos con mayor capacidad antagónica *in vitro* frente a *R. solani* (06142 y Santa Lucía) y *F. verticillioides* (BAPSOS e I9) fueron identificados como *Trichoderma croseum* (06142), *T. koningii* (Santa

Lucía) y *T. harzianum* (BAPSOS e I9), con base a sus características macro y microscópicas y su comparación con las claves micológicas de Bissett (1991; 1991b) y Rifai (1969) (Cuadro 4). Es de resaltar que los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados resultaron diferentes para ambas especies de hongos fitopatógenos evaluados (*R. solani* y *F. verticillioides*) lo cual parece reafirmar que existe especificidad entre el antagonista y el patógeno y que la misma depende del aislamiento de *Trichoderma* en particular y no de la especie a la que pertenece, así como de su capacidad para atacar en forma concreta a cepas determinadas de hongos fitopatógenos (Hoyos et al., 2008). Ello ha sido particularmente observado en hongos formadores de esclerocios (*Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*) (Howell, 2006).

Cuadro 4. Características morfológicas diferenciales de las 4 especies de *Trichoderma* identificadas

Aislamiento/ Especie (*)	Conidióforo	Fialide (µm)	Conidios (µm)	Clamidosporas (µm)
BAPSOS/ <i>T. harzianum</i>	Cerrado, ramificado en pares, 2-5 fialides/verticilo	Ampuliforme: 7,3x2,85 Langeliforme: 13x1,8	Globosa: 3,1 Subglobosa: 3,8x2,58	Escasas, Subglobosas: 9,5, Terminales e intercalares
I9/ <i>T. harzianum</i>	Cerrado, bien ramificado, 4 fialides/verticilo	Ampuliforme: 7,6x2,85 Langeliforme: 11,4x2,85	Subglobosa: 2,85x1,89 Ovoide: 3,8x2,85	Intercalares y terminales
06142/ <i>T. croseum</i>	Abierto, no muy ramificado, con extensiones fértiles e infértiles de aspecto rugoso, 3-6 fialides/verticilo	Langeliforme: 14x1,9 Ampuliforme: 7,6x2,8	Globosa 2,85 Subglobosa: 2,8x1,9 Ovoide: 3,8x1,9	Globosas : 6,6, Subglobosas: 6,6x4,75, Terminales e intercalares
Sta. Lucía/ <i>T. koningii</i>	Abiertos, 3-4 fialides/verticilo	Langeliforme: 14,2x3,5 Ampuliforme: 9,5x2,85	Sub-globosa: 3,8x2,9 Ovoides: 4,7x2,9	Terminales, Globosas: 6,6, Intercalares, Globosas: 5,8

*Claves micológicas usadas en la identificación de las especies de *Trichoderma*: Bissett (1991a; 1991b) y Rifai (1969)

Se conoce que para el manejo de hongos del suelo, tales como *R. solani* y *F. verticillioides*, se deben poner en práctica varias estrategias de control, entre ellas el realizar aplicaciones de biocontroladores de manera preventiva, por lo tanto para que ello sea posible, es necesario no solo el elegir *in vitro* los aislamientos del antagonista que tengan una velocidad mayor de crecimiento que los patógenos a controlar, tal como ocurrió en esta investigación, sino el evaluar

su capacidad antagónica bajo condiciones de umbráculo y de campo, y estudiar la posibilidad de utilizar mezclas de estos aislamientos en búsqueda de una acción combinada o sinérgica que pueda ser traducida a un mayor control.

CONCLUSIONES

Las variables utilizadas de porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) y de esporulación

(PIE), grado antagónico (GA), porcentaje de reducción del número de esclerocios (PRE) y porcentaje de esclerocios parasitados (PEP) para *R. solani* y PIC, PIE y GA para *F. verticillioides* resultaron en conjunto suficientemente potentes para discriminar los aislamientos de *Trichoderma* más promisorios contra los patógenos en estudio; sin embargo, para el caso de los enfrentamientos contra *Rhizoctonia* prevaleció como criterio final de elección la variable GA, mientras que para *Fusarium* lo fue PIC.

Tomando como referencia los criterios mencionados, los aislamientos con mayor capacidad antagónica *in vitro* contra *R. solani* fueron 06142 (*T. croseum*) y Santa Lucía (*T. koningii*); mientras que contra *F. verticillioides* lo fueron I9 y BAPSOS (ambos *T. harzianum*),

De los patógenos estudiados, *F. verticillioides* fue el que mostró mayor resistencia al avance y colonización, frente a los aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados.

AGRADECIMIENTO

A la Unidad de Servicio de Bacteriología de la Facultad de Agronomía (UCV), por facilitar materiales y suministros empleados en los ensayos de laboratorio y al personal técnico del Laboratorio de Microbiología, por colaborar en la preparación de los medios y reactivos utilizados. A Nelly Sanabria del Instituto de Botánica, al suministrar los aislamientos de *R. solani* y *Trichoderma*, y a Claudio Mazzani, del Instituto de Química y Tecnología, por haber facilitado el aislamiento de *F. verticillioides*.

LITERATURA CITADA

1. Agamez, E., J. Barrera y L. Oviedo. 2009. Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* sp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. *Acta Biológica Colombiana* 14(3): 1-9.
2. Alarcón, L., T. Rondón, G. Rodríguez y A. Pupo. 2005. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc) en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad* 9(3): 57-60.
3. Altuna, G., N. Sanabrá, C. Jiménez, y M. Alcano. 2003. Control biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causante de la marchitez en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Fitopatol. Venez.* 16(2): 49 (Resumen).
4. Askew, D. y M. Laing. 1994. The *in vitro* screening of 118 *Trichoderma* isolate for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. *Plant and Soil* 159: 277-181.
5. Bell, D., H. Wells y C. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72(49): 379-380.
6. Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2373-2417.
7. Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2418-2420.
8. Cardona, R., H. Rodríguez y H. Nass. 1999. Manchas bandeadas en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12(2): 32-33.
9. Cook, R. y K. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens: American Society of Phytopathology. Stn Paul, Minnesota. 539 p.
10. Cundom, M., S. Mazza, M. Mazzanti y S. Gutiérrez. 2000. Evaluación de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* *in vitro* e invernáculo. Universidad Nacional del Nordeste. <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/5-Agrarias/A-051.pdf> (consulta del 20/11/2015).
11. Durman S., A. Menéndez y A. Godeas. 1999. Evaluation of *Trichoderma* spp. as antagonistic of *Rhizoctonia solani* *in vitro* and as biocontrol in greenhouse tomato plants. *Revista Argentina de Microbiología* 31: 13-18.
12. Fernandez-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62: 96-100.
13. French, E. y T. Hebert. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Editorial IICA. pp. 176-179.

14. García, R., R. Riera, C. Zambrano y L. Gutiérrez. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de la cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la Región Andina Venezolana. *Fitosanidad* 10(2): 115-121.
15. González, S., A. Puertas, M. Fonseca, E. Suarez y R. Blaya. 1999. Actividad antagónica de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani* Sor. *Revista de la Facultad de Agronomía* 16: 167-173.
16. Guédez, C., L. Cañizalez, C. Castillo y R. Olivar. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 32: 44-49.
17. Hernández, A., A. Sierra y A. Carr. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña *Ananas comosus* (L.) Merr. *Revista de Fitosanidad* 10(2): 105-108.
18. Howell, C. R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathol.* 96(2): 178-180.
19. Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet. y S. Orduz. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana* 26(3): 451-458.
20. Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24(1): 14-21.
21. Mazzani, C., O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos y P. Quijada. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus* *Fusarium verticillioides*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12: 9-13.
22. Michel-Aceves, A., M. Otero-Sánchez, R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala, N. Alarcón-Cruz. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en cacahuete. *Avances en Investigación Agropecuaria* 17(3): 89-107.
23. Pérez-Torres, E., A. Bernal-Cabrera, P. Milanés-Virelles, Y. Sierra-Reyes, M. Leiva-Mora, S. Marín-Guerra et al. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* y sus filtrados de cultivo en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* 30(1): 17-26.
24. Puentes, R. y J. Mejías. 2003. Taspa (propiconazole + difenoconazole) fungicida sistémico como alternativa para el manejo de *Rhizoctonia solani*, en maíz. *Fitopatol. Venez.* 16(29): 52 (resumen).
25. Rifai, C. 1969. A revisión of the *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Survey, England. *Mycological Papers* 116: 1156.
26. Rodríguez, H., L. Rodríguez y G. Zambrano. 2003. Período crítico para la inoculación con esclerocios de *Rhizoctonia solani* en el desarrollo de la lesión de maíz. *Fitopatol. Venez.* 16(1): 22-23.
27. Stefanova, M., A. Leiva, L. Larrinaga y F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)* (16): 509-516.