

**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOBREVIVENCIA DE DOS CEPAS
NATIVAS DEL HONGO BIOCONTROLADOR *TRICHODERMA SPP.* EN EL
SUELO**

MEMORIA DE TÍTULO

CAROLINA ANDREA ACUÑA CATALAN

**TALCA-CHILE
2001**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOBREVIVENCIA DE DOS CEPAS
NATIVAS DEL HONGO BIOCONTROLADOR *TRICHODERMA SPP.* EN EL
SUELO**

Por

CAROLINA ANDREA ACUÑA CATALÁN

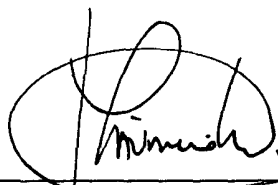
MEMORIA DE TÍTULO

**Presentada a la Universidad de Talca
como parte de los requisitos para optar
al título de**


INGENIERO AGRÓNOMO

**Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Agronomía
2001**

APROBACIÓN



Profesor Guía : Ing. Agr. M.Sc. Mauricio Lolás C.
Profesor Escuela de Agronomía
Universidad de Talca



Profesor Informante : Ing. Agr. Dr. Hernán Pajlán L.
Profesor Escuela de Agronomía
Universidad de Talca

Fecha presentación de Memoria : 23 de Enero de 2001

*Dedicada especialmente a mi Mamá Nené y
a mi sobrinito Cristopher.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi Profesor Guía Ing. Agr. Mauricio Lolas por su constante apoyo, comprensión y buena disposición en todo momento que necesité de su ayuda profesional para lograr la consolidación de mi carrera profesional. También quisiera agradecer a mi Profesor Informante Ing. Agr. Hernán Paillán por su aporte y útiles consejos durante la realización de mi memoria.

Por otra parte, no puedo dejar de mencionar a Cristián Muñoz y Eduardo Donoso, quienes también colaboraron en esta investigación.

En especial a mis padres, hermanas, amigos, quienes estuvieron siempre conmigo cuando necesité de sus consejos y orientación. En especial a mi querido esposo Claudio por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional brindado en todos estos años.

RESUMEN

La sobrevivencia y el establecimiento de dos cepas nativas del hongo biocontrolador *Trichoderma spp.* fueron evaluadas y comparadas con el producto comercial Trichodex. Del mismo modo, el efecto en la sobrevivencia y establecimiento de *Trichoderma* y Trichodex de el fungicida benomilo fueron también determinados. Las cepas nativas, *T. harzianum* cepa Queule fue colectada de un bosque nativo de la VII Región y *T. longibrachiatum* cepa Soto de un cultivo de maravilla de la misma región. Los ensayos se realizaron en celdillas individuales de bandejas speedling que contenían 10 g de suelo con y sin esterilización, cultivado con semillas de tomate cv. Cal Ace e infectado con *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Se utilizaron 3 concentraciones de conidias (0, 10^8 y 10^9) conidias/ml y 2 tratamientos fungicidas (0 y 60 g de Benomilo/100 L), aplicados en la siembra. La evaluación de la sobrevivencia de los antagonistas fue determinada a los 17, 31 y 39 días después de su aplicación al suelo a través de la colección de muestras de los distintos tratamientos y su posterior dilución y siembra en APD acidulado. El número de colonias fue registrado y los distintos tratamientos comparados. El efecto del fungicida Benomilo sobre el establecimiento de la cepa Queule en suelo estéril y sin esterilizar no fue significativo. Las densidades poblacionales de Trichodex en el suelo estéril sin benomilo fueron de 3×10^4 u.f.c/g de suelo y con benomilo fueron de $1,4 \times 10^4$ u.f.c/g de suelo, lo que indicó que el establecimiento de trichodex en el suelo estéril fue disminuido significativamente por benomilo. En suelo estéril, el fungicida afectó el establecimiento de Trichodex. En cambio la cepa Soto no fue afectada obteniendo densidades poblacionales de $3,43 \times 10^4$ u.f.c/g de suelo superiores a las de Trichodex que sólo alcanzaron 1×10^4 u.f.c/g de suelo. Al comparar la cepa Queule con Trichodex, se pudo observar diferencias significativas entre antagonistas a una concentración de 10^8 conidias/ml inoculadas al suelo sin esterilizar. El establecimiento gradual de la cepa Queule en el tiempo fue comparable a la de Trichodex en ambos tipo de suelo. El establecimiento gradual de la cepa Soto comparada con Trichodex en el tiempo, mostró diferencias significativas en suelo estéril, siendo la cepa nativa la que mostró un mejor establecimiento en este tipo de suelo.

ABSTRACT

The surviving and establishment of two native isolates of the biocontrol fungus *Trichoderma* spp. were evaluated and compared with the commercial product, Trichodex. Also, the effect of benomyl on the survival and the establishment of *Trichoderma* and Trichodex was also determined. *T. harzianum* "Queule" isolate was collected from a native forest of the Seventh Region and *T. longibrachiatum* "Soto" isolate from a sunflower crop in the same region. The experiments were made in individual cells of speedling trays that had 10 g of sterile and non sterile soil, which were sowed with tomato seeds cv. Cal Ace and infected with *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Three conidia concentrations (0, 10^8 and 10^9 conidias/ml) of the biocontrol fungí and two fungicide treatments (0 and 60 g of Benomyl/100 L) were used. The evaluation of the antagonist survival was established at the 17, 31 and 39 days later of as application to the soil through a collection of samples from the different treatments. These samples were diluted and cultured in DPA plates. The number of colonies was registered and the different treatments compared. The effect of the benomyl on the establishment of the Queule isolate in the sterile and non sterile was not significant. Population density of Trichodex in the sterile soil without benomyl was significantly higher (3×10^4 c.f.u/g of soil) than that in benomyl treated soil ($1,4 \times 10^4$ c.f.ulg of soil). It was shown that the establishment of Trichodex in sterile soil decreased significantly with benomyl. In sterile soil, the fungicide affected the establishment of Trichodex. On the other hand, the "Soto" isolate was not affected by the fungicide, obtaining a population density of $3,43 \times 10^4$ c.f.ulg of soil , significantly greater than Trichodex, which only obtained 1×10^4 c.f.ulg of soil. When compared Queule isolate with Trichodex, a significant difference was obtained when using a concentration of 10^9 conidias/mi in non sterile soil. The gradual establishment of the Queule isolate was similar to Trichodex in both soils. The gradual establishment of the Soto isolate compared with Trichodex in time, showed a significant difference in sterile soil, being the native isolate the one which showed a better establishment in this soil.

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BOBLIOGRÁFICA	
2.1 El Suelo y los Microorganismos	4
2.1.1 Suelos Supresivos	5
2.1.2 La Rizósfera	5
2.2. <i>Trichoderma</i> spp.	6
2.2.1 Morfología y Taxonomía	6
2.2.2 Control de hongos fitopatógenos con <i>Trichoderma</i> spp.	8
2.2.3 Supervivencia en el suelo	9
2.2.4 Aplicaciones comerciales de <i>Trichoderma</i> spp. como biocontrolador (Trichodex)	10
2.3. <i>Fusarium oxysporum</i>	11
2.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	13
2.4 Benzimidazoles	14
2.4.1 Benomilo	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Ubicación de los ensayos	16
3.2 Preparación del suelo	16
3.3 Obtención del hongo biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp.	16
3.4 Obtención del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	17
3.5 Preparación del inóculo del hongo biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp. y del hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	17

	Página
3.6 Evaluación de la sobrevivencia y establecimiento de las cepas nativas de <i>Trichoderma spp.</i> en el suelo	18
3.7 Análisis de resultados	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Evaluación de la acción del fungicida Benomilo en la sobrevivencia y establecimiento de las cepas nativas de <i>Trichoderma spp.</i> y Trichodex en el suelo	21
4.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule	21
4.1.2 <i>Trichoderma longibrachiatum</i> cepa Soto	22
4.2 Evaluación de la sobrevivencia y establecimiento de las cepas nativas de <i>Trichoderma spp.</i> en el suelo en comparación a la del producto comercial Trichodex	24
4.2.1 <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule	24
4.2.2 <i>Trichoderma longibrachiatum</i> cepa Soto	26
V. CONCLUSIONES	29
VI. BIBLIOGRAFÍA	30
VII. ANEXOS	32

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
CAPÍTULO II	
2.1 <i>Trichoderma longibrachiatum</i> . Conidióforos, fiálidas y conidias	7
2.2 <i>Trichoderma harzianum</i> . Fiálidas y conidias	8
2.3 <i>Fusarium oxysporum</i> . a: Planta exhibiendo fusariosis, b: Esporas del hongo (macroconidia, microconidia y clamidosporas), c: Descoloración vascular	13
CAPÍTULO IV	
4.1 Efecto de dos concentraciones de conidias en la sobrevivencia (u.f.c/g de suelo) del hongo biocontrolador <i>T. harzianum</i> cepa Queule y el producto comercial Trichodex en suelo sin esterilizar y cultivado con tomate cv. Cal Ace e infectado con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> .	25
4.2 Sobrevivencia (u.f.c/g de suelo) de <i>T. longibrachiatum</i> cepa Soto y Trichodex en suelo estéril días después de la aplicación de los antagonistas en el suelo infectado con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> y cultivado con tomate cv. Cal Ace.	27

INDICE DE CUADROS

Página

CAPÍTULO IV

- | | | |
|-----|--|----|
| 4.1 | Efecto del fungicida Benomilo sobre el número de colonias recuperadas del hongo <i>T. harzianum</i> cepa Queule y el producto comercial Trichodex desde suelo esterilizado y cultivado con tomate cv. Cal Ace e infectado con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> | 21 |
| 4.2 | Efecto del fungicida Benomilo sobre el número de colonias recuperadas del hongo <i>T. longibrachiatum</i> cepa Solo y el producto comercial Trichodex desde suelo esterilizado y cultivado con tomate cv. Cal Ace e infectado con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> | 23 |

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas cultivadas son de gran importancia y preocupación para los productores de éstas, ya que ocasionan pérdidas de rendimientos y disminuyen la calidad de los productos vegetales. Consecuentemente este efecto detrimental está relacionado con pérdidas económicas.

Microorganismos benéficos, incluyendo hongos y bacterias antagonistas, aplicados como tratamientos a la semilla o al suelo, proporcionan protección a los cultivos especialmente contra hongos patógenos habitantes del suelo (Mao *et al.*, 1997).

Los hongos del género *Trichoderma* son algunos de los agentes microbiológicos más exitosos e importantes en el mundo para el control biológico de enfermedades fungosas (Cook y Baker, 1989). Este grupo de hongos son antagonistas de otros hongos fitopatógenos, expresándose esta actividad como antibiosis, competencia, parasitismo o depredación (Chet, 1987). Dentro de este género destaca *Trichoderma harzianum*, el cual parasita el micelio de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, e inhibe el crecimiento de otros, tales como *Pythium*, *Fusarium* y *Botrytis* (Agrios, 1996). En Chile, se encuentra disponible un producto botriticida llamado Trichodex, el cual tiene como ingrediente activo a las esporas del hongo *T. harzianum*.

El hongo *Trichoderma spp.* es un habitante común del suelo, y existe abundante evidencia de que es un agente biocontrolador contra muchos fitopatógenos de ocurrencia normal en suelos agrícolas (Bruna, 1990). Su capacidad de sobrevivencia en el suelo dependerá de su habilidad para producir esporas de resistencia (clamidosporas), las cuales le permitiría permanecer en el suelo por largos períodos y sobrevivir a situaciones de stress (Hein *et al.*, 1983, citado por Chet, 1987). Existe abundante evidencia de que no siempre existe una

relación directa entre la actividad del biocontrolador *in vitro e in vivo*. Las causas de lo anterior son variadas, sin embargo, los problemas del establecimiento comercial de agentes biocontroladores de enfermedades a nivel radical o de cuello de la planta se han tornado aún más complejos por el mayor conocimiento acerca de la ecología de microorganismos en general. En los últimos años se ha enfatizado en lo inestable del balance existente entre microorganismos del suelo y los factores climáticos y edáficos que los afectan (Campbell, 1989).

Fusarium spp. es uno de los principales hongos fitopatógenos que producen marchitamientos en un amplio rango de plantas hospederas. Son organismos habitantes del suelo, cuyas enfermedades se encuentran ampliamente distribuidas y son muy destructivas, causando graves pérdidas de producción (Agrios, 1996). Para su control se ha utilizado prácticas culturales, un gran número de compuestos químicos fungicidas y variedades con resistencia genética. Sin embargo, estas prácticas de control, principalmente la de control químico, no han sido del todo satisfactorias debido a problemas tales como la generación de resistencia por parte del patógeno, lo caro de su uso y a su toxicidad para el medio ambiente (de Zeeuw, 1988). Por otra parte, el uso de variedades resistentes ha sido el control más efectivo, sin embargo con el tiempo han aparecido nuevas razas del patógeno, lo cual ha hecho que esta medida resulte ineficiente en algunas situaciones (Sid *et al.*, 1999). Por lo anterior y por el hecho de que cada día los distintos mercados de productos agrícolas dan una mayor preferencia y valorización a aquellos producidos con el menor uso posible de compuestos sintetizados artificialmente es que el control biológico se ha transformado en una atractiva alternativa de manejo fitosanitario.

Basados en lo anterior, el objetivo general para esta investigación es evaluar la sobrevivencia en el suelo de dos cepas nativas de *Trichoderma spp.* efectivas para el control biológico de *Fusarium oxysporum*.

Los resultados de este estudio permitirán conocer si las cepas evaluadas son capaces de permanecer en el suelo y lograr su establecimiento, de manera de ser incorporadas como alternativa de control de esta enfermedad dentro de un manejo integrado del cultivo del tomate.

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

- a) Evaluar la acción de un fungicida (Benomilo) utilizado en el control químico de *Fusarium oxysporum* en la sobrevivencia y establecimiento de dos cepas nativas de *Trichoderma spp.* y Trichodex en el suelo.

- b) Evaluarla sobrevivencia y establecimiento de las dos cepas nativas de *Trichoderma spp.* en el suelo en comparación a la del producto comercial Trichodex.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El suelo y los microorganismos

El mundo biológico es un sistema de interacciones de organismos vivos en su medio ambiente natural (Cook y Baker, 1989). Los microorganismos pueden encontrarse en distintos medio ambientes, siendo el suelo la fuente más rica, en cuanto a número y tipo de microorganismos, es decir el suelo es habitado por una increíble diversidad de microorganismos, siendo algunos de éstos benéficos y otros detrimentales, pero todos forman parte de la comunidad que habita en las partes subterráneas de las plantas (Schumann, 1991). Esto hace que la competencia entre microorganismos en este ambiente sea mucho mayor que la existente en otros ambientes, como por ejemplo que la del aire (Sarasola y Rocca, 1975).

La influencia de factores edáficos sobre el balance de microorganismos en el suelo es de vital importancia, como es el caso de la densidad del suelo, la cual es mucho mayor que la del agua y por ende que la del aire, esta densidad dificulta la dispersión de esporas y otros propágulos (Sarasola y Rocca, 1975). Por otra parte las arcillas del suelo pueden adsorber los organismos o sus productos metabólicos (Campbell, 1989).

La presencia de un organismo en un lugar y por un determinado tiempo está determinado

por:

1. Su desarrollo en ese lugar o su introducción en éste.
2. La presencia de un medio ambiente físico favorable.
3. La presencia de asociaciones de organismos favorables para su desarrollo o de organismos necesarios para su sobrevivencia.
4. La inhibición o la ausencia de organismos detrimentales para causar su extinción. (Cook y Baker, 1989).

2.1.1 Suelos Supresivos

Los suelos "supresivos" representan un equilibrio de la flora microbiana, regulado por la interacción de muchos microorganismos heterógenos y es sin duda uno de los casos más espectaculares del efecto de factores de naturaleza viva sobre la inhibición de enfermedades

(Blanco, 1995). Los mecanismos por medio de los cuales los suelos inhiben el desarrollo de los diferentes microorganismos patógenos no siempre son claros, pero pueden involucrar factores bióticos y/o abióticos. Sin embargo, en la mayoría de los casos al parecer y principalmente gracias a la presencia, en esos suelos, de uno o varios microorganismos antagónicos al patógeno (Agrios, 1996).

La "supresividad" de un suelo está ligada generalmente a la fungistasis, definida como la inhibición de la germinación de las esporas de un hongo, determinado por la presencia de organismos en el suelo, así como por la competencia microbiana por nutrientes disponibles para el crecimiento fúngico en el suelo (Blanco, 1995).

2.1.2 La Rizósfera

La rizósfera es la zona del suelo influenciada por las exudaciones de las raíces de las plantas (Honorato, 1993). Las raíces de las plantas en crecimiento son una fuente de carbono y energía para los microorganismos en la forma de exudados de raíz (Sivan y Chet, 1989). Los exudados de raíces incluyen varios nutrientes como aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y varios factores de crecimiento, los cuales juegan un rol importante en la actividad de los microorganismos cerca de las raíces (Schumann, 1991).

2.2. *Trichoderma* spp

El género *Trichoderma* fue originalmente propuesto por Persoon en 1794 con cuatro especies, de las cuales sólo una, *T. viride*, pertenece ahora al género (Samuels, 1996). Harz en 1871 fue el primero que delimitó claramente este género. En 1902, Oudemans y Koning, reportaron este hongo en el suelo. Posteriormente en el año 1926, Abbott consideró que habían cuatro especies en el género, lo cual fue aceptado por Gilman en 1957. Rifai en 1969 revisó el género *Trichoderma* para incluir nueve especies agregadas, y esto ha sido ahora generalmente aceptado (Cook y Baker, 1989). Sin embargo, muchos aislados encontrados en el suelo no se ajustan exactamente a una de las nueve especies, pero se encuentran sobre "la línea borde" entre dos especies (Chet, 1987).

2.2.1 Morfología y Taxonomía

El género *Trichoderma* reúne a un grupo de hongos saprófitos, siendo habitantes comunes del suelo, cosmopolita y son reconocidos fácilmente por sus esporas verdes.

Pertenece a la Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Familia Moniliaceae. Posee conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos, débilmente o fuertemente verticilados, las fiálidas tienen apariencia de un juego de bolos en racimos o por separadas, desde las cuales son sostenidas las conidias no septadas, subglobosas a elipsoidales y viscosas, a menudo reunidas en forma de pelota a la entrada de las fiálidas. Comúnmente forma clamidosporas, intercaladas o raramente terminales, son globosas a elipsoidales, hialinas y de pared suave. Las colonias en cultivo usualmente son de rápido crecimiento, son flocosas, suaves, blancas a verdes (Rifai, 1969, citado por Cook y Baker, 1989).

Las nueve especies pertenecientes a este género son: *T. piluliferum* Webster & Rifai aggr., *T. polysporum* (Link ex Pers.) Rifai aggr., *T. hamatum* (Bon.) Bainier., *T. koningii* Oud., *T.*

Aureoviride Rifai aggr., *T. longibrachiatum* Rifai aggr.(Figura 2.1), *T. harzianum* Rifai aggr.(Figura 2.2), *T. pseudokoningii* Rifai aggr., *T. viride* Pers. ex S. F. Gray (Rifai, 1969).

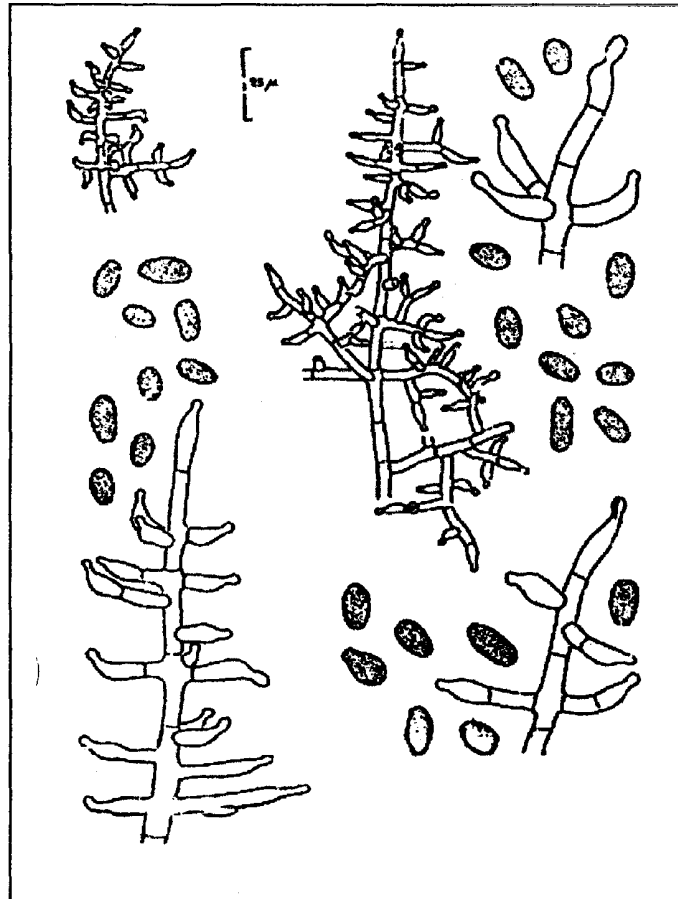


Figura 2.1 *Trichoderma longibrachiatum*. Conidióforos, fiálidas y conidias.
Fuente: Rifai, 1969

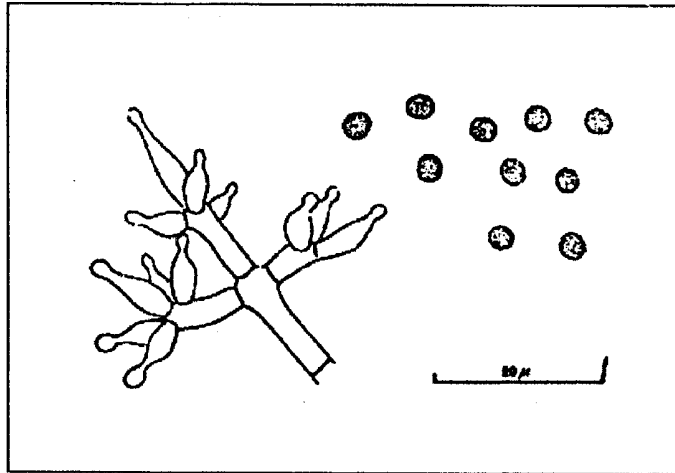


Figura 2.2 *Trichoderma harzianum*. Fiálidas y conidias.
Fuente: Rifai, 1969

2.2.2 Control de hongos fitopatógenos con *Trichoderma spp.*

Especies del género *Trichoderma* han sido evaluadas por muchos investigadores para la eficacia en el biocontrol de hongos patógenos de plantas (Beagle y Papavizas, 1985).

Las habilidades micoparásitas de *Trichoderma spp.* fueron conocidas en 1930, y desde entonces se ha investigado su uso como controlador de enfermedades fungosas (Cook y Baker, 1989). Trabajos posteriores han convertido a *Trichoderma sp.* en el hongo antagonista más estudiado, con publicaciones que demuestran su efecto contra patógenos como *Armillaria mellea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium sp.*, *Verticillium dahliae* y *Gliocladium sp.* entre otros (Wainwright, 1992).

El método en que el hongo *Trichoderma* controla hongos fitopatógenos es principalmente a través de competencia y predación. Los micelios se enrollan alrededor de las hifas del hongo presa, produciendo un estrangulamiento. Además se ha observado que las hifas susceptibles son penetradas, colapsando y finalmente desintegradas. Posterior a esto el micoparásito se alimenta de este substrato. También se sabe que algunas razas de *Trichoderma* son capaces

de producir antibióticos, especialmente a pH bajo. La producción de quitinasas y B-(1-3)-glucanasa se ha observado actuando sobre *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, produciendo una degradación de sus hifas (Cook y Baker, 1989).

Para el control de enfermedades de raíces y semillas, se puede hacer una inoculación directa al suelo o a la semilla con este antagonista (Chao *et al.*, 1986).

Trichoderma ha sido usado contra enfermedades causadas por *Fusarium*. En experimentos controlados, *Trichoderma harzianum* controló del 60 a 83 % de *Fusarium* en suelos infectados naturalmente (Campbell, 1989). Marois, Mitchell y Sonoda (1981) fueron los primeros en demostrar un exitoso control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* con *Trichoderma harzianum*.

2.2.3 Supervivencia en el suelo

La agricultura moderna ha tendido a aplicar larga cantidad de pesticidas para alcanzar el potencial de rendimiento dado por las condiciones climáticas, inputs agronómicos y la genética del cultivo. Muchos fungicidas utilizados son degradados después de un corto tiempo en el suelo, es decir sólo tienen un efecto temporal lo cual requiere de repetidas aplicaciones (Cook y Baker, 1989). Además muchas veces estos productos químicos, influyen sobre los tipos de microorganismos que sobreviven y prosperan en el suelo, y esto en algunas ocasiones produce una disminución del número de organismos antagónicos a los patógenos (Agris, 1996). Sin embargo, *Trichoderma* tiene una mayor permanencia en el tiempo, ya que es capaz de sobrevivir en lugares donde existen varios residuos de pesticidas y además capaz de propagarse (Chet, 1987). *Trichoderma* puede tolerar diversos fungicidas, sin embargo Davet *et al.* (1981), citado por Cook y Baker (1989), encontraron que *Trichoderma harzianum* era deprimido con el uso de Benomilo y estimulado por Thiram.

La capacidad de sobrevivencia en el suelo de aquellos hongos que permanecen en el suelo, depende de la habilidad que tengan para producir estructuras de resistencia de manera de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, como es el caso de estructuras tales como esclerocios y rizomorfos (Sarasola y Rocca, 1975). En el caso de *Trichoderma spp.*, la estructura de sobrevivencia son esporas de resistencia llamadas clamidosporas las cuales se pueden producir en substratos naturales, tanto en suelos naturales como estériles (Chet, 1987).

Liu y Baker (1980), citado por Chet (1987), reportaron que en suelos húmedos *Trichoderma* sobrevivía más tiempo que en suelos secos. Papavizas (1981), informó que *T. harzianum* no sobrevivió bien en la rizósfera de plántulas de haba y chícharo cuando las semillas fueron revestidas con conidias del hongo. Esto igualmente no incrementó en la rizósfera de plántulas de chícharo cuando se aplicó conidia del hongo directamente al suelo 1 día antes de la siembra.

Chet y Baker (1980), en muchos experimentos encontraron que la mínima cantidad efectiva de *Trichoderma es* alrededor de 1×10^6 u.f.c./g de suelo. Este nivel puede ser mantenido en el suelo por varios meses, dependiendo de la alimentación base aplicada con el hongo biocontrolador, tipo de suelo, pH adecuado (5.0), temperatura y condiciones de humedad.

Lo ideal sería que el organismo con potencial biocontrolador se encuentre bien adaptado al ambiente, a la planta y al patógeno, de esta manera podría esencialmente sobrevivir y prosperar por un largo tiempo (Campbell, 1989).

2.2.4 Aplicaciones comerciales de *Trichoderma spp.* como biocontrolador (Trichodex)

Trichodex es un fungicida biológico de Makhteshim-Agan, desarrollado en Chile en conjunto por Abbott Laboratories de Chile Ltda. y AgrEvo de Chile S.A. Se presenta formulado

como polvo mojable al 25%, actúa en forma preventiva y es altamente selectivo (Esterio y Saavedra, 1997).

Trichodex es el producto de procesos de fermentación del hongo *T. harzianum*, cepa T₃₉, y tiene como ingrediente activo a las esporas del hongo. La cepa T₃₉ fue aislada de la microflora natural de frutos de pepino y seleccionada para el control de *Botrytis cinerea*. Su modo de acción consiste en consumir los nutrientes disponibles y secretados por los tejidos de la planta, ejerciendo una acción de competencia por nutrientes y espacio con *B. cinerea* (Esterio y Saavedra, 1997). Además de este modo de acción, se ha detectado también un efecto de mycoparasitismo, en el que estarían involucradas ciertas enzimas como 1,3 glucanasas, lipasas y proteolasas que *Trichoderma* liberaría al medio, provocando la destrucción de componentes estructurales en los patógenos (Elad, Chet y Henis, 1982).

Trichodex es compatible con varios fungicidas, pero también presenta una moderada incompatibilidad e incompatibilidad con unos pocos, lo cual es de gran importancia y se debe tener consideración al momento de aplicarlo en mezclas (Anexo 1). Sus usos están dado preferentemente para *B. cinerea* en diversos cultivos, pero además se puede usar para enfermedades causadas por *Sclerotinia* exclusivamente en cultivos de tomate (Anexo 2) (Esterio y Saavedra, 1997).

2.3. *Fusarium oxysporum*

Fusarium produce marchitamientos vasculares principalmente en flores y hortalizas anuales, plantas herbáceas, perennes de ornato, plantas de cultivo, malezas y en la mimosa (árbol de seda). La mayoría de los hongos de este género que producen marchitamientos vasculares pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum* (Agrios, 1996). Este hongo es causante de marchitamientos característicamente rápidos, al destruir los haces vasculares de

las plantas. Lo anterior se ve altamente favorecido con condiciones ambientales de alta humedad y temperatura, así como por los suelos de invernadero (Latorre, 1992).

Es una de las enfermedades más importantes en tomates, especialmente en climas y suelos cálidos y estos últimos principalmente cuando son arenosos, en zonas templadas (Agrios, 1991; Latorre, 1992).

Fusarium presenta tres tipos de esporas asexuales. Microconidias, uni o bicelulares, las que se producen en mayor cantidad en todas las condiciones y son las únicas que se generan dentro de los vasos conductores de las plantas enfermas (Agrios, 1991). También produce macroconidias, las cuales son las típicas de *Fusarium*, siendo de 3 a 5 células, y se producen en abundancia sobre el tejido de plantas ya muertas por el hongo, formándose comúnmente en esporodoquios (Agrios, 1991). Además forma clamidosporas, las cuales son de 1 ó 2 células de paredes gruesas y de formas redondeadas, formándose terminalmente o insertas en el micelio más viejo, éstas son las estructuras de sobrevivencia del hongo (Agrios, 1991).

Este hongo es capaz de invernar en el suelo como espora o micelio, pero normalmente como clamidospora. La propagación se realiza a cortas distancias por el agua y equipo contaminado y a largas distancias por trasplantes y el suelo que va en estos. Una vez que el suelo se encuentra infectado el hongo es capaz de permanecer en el por varios años (Agrios, 1996).

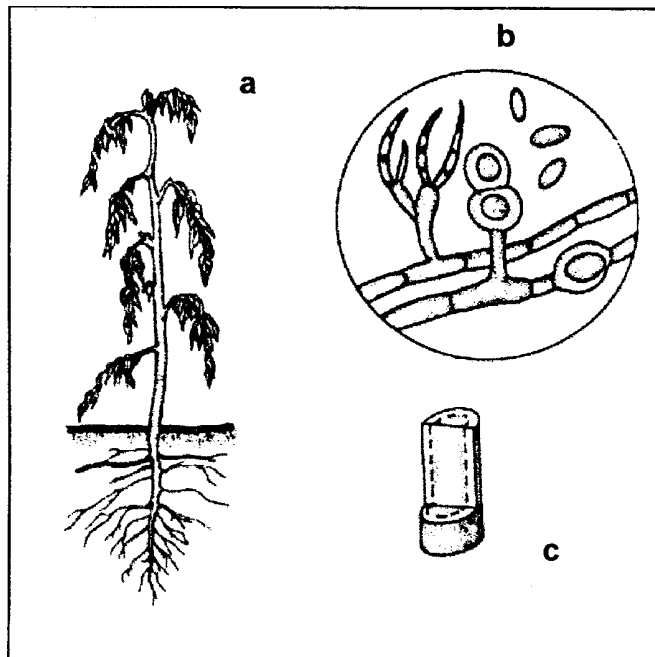


Figura 2.3 *Fusarium oxysporum*. a: Planta exhibiendo fusariosis, b: Esporas del hongo (macroconidia, microconidia y clamidosporas), c: Descoloración vascular

El control de este patógeno en tomate está dado principalmente, por el uso de variedades resistentes, esterilización de suelo, semilla y almácigos sanos. Dado su larga sobrevivencia en el suelo es poco eficiente utilizar la rotación de cultivos (Agrios, 1991; Latorre, 1992). Los tratamientos con aplicaciones de fungicidas sistémicos como benomilo pueden ayudar a reducir la incidencia de *Fusarium* en algunos tipos de hospederos, sin embargo este fungicida activa la aparición de razas resistentes del patógeno lo cual hace que este tipo de control sea poco eficiente (Agrios, 1996).

2.3.1 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

El hongo *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f.sp. *radicis-lycopersici* W. R. Jarvis & Shoemaker es el agente causal de la pudrición de la corona y de la raíz. Macroconidias, microconidias y clamidosporas son producidas durante el ciclo de la enfermedad (Jones, 1991).

Este hongo afecta las raíces y la base de los tallos desarrollando canchales desde la corteza al xilema, en los 10 a 15 cm de la base del tallo o en la raíz principal. Asociado a este síntoma aparece una amarillez foliar, inicialmente en las hojas basales y posteriormente ocurre una marchitez, necrosis y colapso de las plantas severamente afectadas (Latorre, 1992). El hongo entra a la raíz principal y progresa lentamente a las raíces laterales, principalmente por medio de hifas intercelulares a través de la corteza y secundariamente a través del xilema. Se favorece con condiciones ambientales templadas (20-22° C). En ausencia del hospedero sobrevive por largo tiempo en el suelo en forma de clamidospora. Para su control se recomienda eliminar completamente los residuos de cultivos enfermos y establecer una rotación de cultivo. Aún no existen cultivares resistentes a esta Fusariosis (Jones, 1991).

2.4 Benzimidazoles

Estos son fungicidas sistémicos cuyo modo de acción es la inhibición del ensamblaje de los microtúbulos, impidiendo así el proceso de división celular (Besoain, 1989). Los fungicidas benzimidazoles poseen actividad antimicótica sobre un amplio rango de hongos fitopatógenos en su mayoría Ascomycetes, Hongos Imperfectos (Deuteromicetes) o sobre algunos Basidiomicetes (Erwin, 1973, citado por Besoain, 1989).

La movilidad de benomilo en el suelo es relativamente escasa, este se retiene en los primeros 2-5 cm del perfil del suelo, al aplicarlo como riego sobre la superficie (Yarden *et al.*, 1986, citado por Besoain, 1989). Los benzimidazoles son absorbidos y transportados por el xilema y sólo una mínima porción por el floema. Debido a la especificidad del sitio de acción, estos fungicidas se consideran sitio-específicos.

Dentro de este grupo encontramos fungicidas como Tiabendazol (Tecto 60 PM, Mertect 60 PM, Micozol 60 PM), Tiofanato (Cercobin, Topsin o Topsin E.), Metiltiofanato (Cercobin M 70 PM), Carbendazima (Benlate-75 C 75 PM, Bavistin 50 PM, Derosal 50 PM), Fuberidazol

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de los ensayos

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología e invernadero pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca.

Los almácigos fueron ubicados en el invernadero, con el fin de proporcionar las condiciones óptimas que requieren las plántulas de tomate para su desarrollo, además de permitir un adecuado manejo de los ensayos y también para aislarlos del medio externo, con el propósito de evitar la proliferación de otros patógenos.

3.2 Preparación del suelo

El suelo utilizado para los ensayos, consistió en una mezcla de 2 : 1 : 0,5 de tierra de hoja, suelo y arena, respectivamente. Con el objetivo de evaluar el comportamiento de las cepas de *Trichoderma* sin la presencia de otros microorganismos presentes en el suelo, sino que sólo frente a la presencia del hongo patogénico *Fusarium oxysporum*, una parte del suelo experimental fue esterilizado con autoclave a 121° C x 15 minutos.

3.3 Obtención del hongo biocontrolador *Trichoderma spp.*

Cepas nativas del hongo biocontrolador fueron colectadas en siete localidades de la VII Región, durante Agosto de 1998 y Enero de 1999 como parte de un proyecto de investigación conducido por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca. Todas las cepas fueron evaluadas en su efectividad *in vitro* de antagonismo con aislados de *Fusarium oxysporum* patogénico hacia tomate (*Lycopersicon esculentum*) en estudios previos. Las dos

cepas más activas, *T. harzianum* cepa Queule y *T. longibrachiatum* cepa Soto identificadas en la Universidad de Valparaíso por el Dr. Eduardo Piontelli, fueron seleccionadas para estudios *in vivo*. Ambas cepas son mantenidas en Agar Papa Dextrosa (APD) a 4°C en tubos de vidrio.

3.4 Obtención del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

Aislados de *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* pertenecientes a la colección de hongos fitopatógenos del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, fueron seleccionados y cultivados en placas petri con APD (20 g/L). Las placas fueron incubadas por 15 días a 20°C y posteriormente resembradas en APD para mantención de cultivos puros.

Previo a la realización de los ensayos los aislados fueron inoculados en plántulas de tomate y reaislados desde los márgenes de las lesiones originadas para su reactivación y comprobación patogénica. La inoculación se realizó con ayuda de un bisturí, para lo cual trozos de agar con tejido miceliar se introdujeron en sectores del tallo a nivel de cuello y se mantuvieron a 22° C por 10 días. Una vez que aparecieron las lesiones en la zona inoculada, se colectaron pequeños trozos desde la zona de avance de la enfermedad, los cuales fueron esterilizados en alcohol al 70% por un minuto y luego sembrados en placas petri que contenían APD. Las placas fueron incubadas a 25° C por 5 días y trozos de micelio fueron transferidos a placas petri con APD fresco para mantención de cultivos puros.

3.5 Preparación del inóculo del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. y del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

Para la producción de conidias de ambas cepas nativas del hongo antagonista, se cultivaron pequeños trozos de micelio en Agar Extracto de Malta (2%) e incubadas por 7 días a 22° C. Una vez que los hongos produjeron esporulación evidente, se agregó una solución de Tritón (50 .ul/l) a las placas petri, frotándose suavemente la superficie del cultivo con un asa previamente

esterilizada para facilitar el desprendimiento de las conidias. Posteriormente, las conidias fueron colectadas en un vaso precipitado obteniéndose la suspensión de conidias.

Las concentraciones de conidias a utilizar, 10^8 y 10^9 conidias/ml, fueron cuantificadas utilizando una cámara de Neubauer. La fórmula utilizada para la cuantificación, correspondió a:

$$\text{Conidias / } \mu\text{l} = \frac{\text{Partículas contadas (Conidias)}}{0.0025 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}}$$

Fuente: Laboratorios Brand, 1997/1998

En el caso del hongo patogénico *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, se esperó que ocurriera la esporulación del hongo sobre el medio en el que habían sido cultivados para la mantención de cultivos puros y luego se realizó la misma metodología utilizada para el hongo biocontrolador tanto para obtener la suspensión de conidias como para el conteo de éstas. La suspensión de conidias fue ajustada a 1×10^6 macroconidias/ml (de Cal *et al.*, 1995; Larkin y Fravel, 1998).

3.6 Evaluación de la sobrevivencia y establecimiento de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* en el suelo

Para evaluar la sobrevivencia y el establecimiento tanto de *T. harzianum* cepa Queule y de *T. longibrachiatum* cepa Soto en comparación a Trichodex respectivamente, se utilizaron 3 concentraciones de conidias: 0, 10^8 y 10^9 conidias/ml, y 2 tratamientos fungicidas: 0 y 60 g de benomilo/100 L. Por lo tanto, se utilizó un diseño completamente al azar para cada cepa en estudio con 5 repeticiones y con arreglo factorial de $2 \times 3 \times 2$.

Semillas de tomate cv. Cal Ace (Anexo 3), fueron sembradas en celdillas individuales (3.4 x 3.4 x 5 cm) que contenían 10 g de suelo premezclado con y sin esterilización. Este suelo fue 3 días previo a la siembra inoculado con 1 ml de 1×10^6 macroconidias de *F. oxysporum* f.sp.

radicis-lycopersici, siguiendo la metodología propuesta por De Cal et al. (1995) y Larkin y Fravel (1998).

Cada semilla fue sembrada al medio de cada celdilla con el suelo tratado y en ese momento se le adicionó 1 ml de la cepa de *Trichoderma* en estudio a la concentración respectiva (0, 10^8 ó 10^9 conidias/ml) y/o el tratamiento fungicida (0 ó 60 g benomilo/100 L).

Cada repetición fue compuesta de 3 celdillas, desde las cuales se obtuvo una muestra de suelo de 1 g aproximado, siendo colectada durante la emergencia, aparición de hojas verdaderas e inicios de aparición de síntomas de Fusariosis en las plantas testigo (sin tratamiento de *Trichoderma* ni Fungicidas).

El suelo colectado para cada repetición de los tratamientos en estudio, fue sometido a la técnica de Dilución Seriada para la cuantificación de hongos del suelo (FAO, 1985). 0,1 gramo de suelo fue suspendido en 99 ml de agua destilada estéril y 100 μ l del sobrenadante de la suspensión resultante fue sembrado en medio de cultivo AEM (2%) modificado con 0.25% de Ácido Láctico 25% y 0.15 g de amoxicilina. Por lo tanto cada repetición de 3 celdillas originó una placa petri con suelo diluido sembrado, constituyendo las 5 repeticiones en estudio.

Las placas fueron incubadas por 4 días a 25° C, para luego realizar los recuentos de colonias de *Trichoderma* por gramo de suelo que se desarrollaron en las placas. Las cantidades de cada hongo fueron expresadas como u.f.c / g de suelo. El recuento fue realizado visualmente con la ayuda de cuadrantes para facilitar el conteo de las colonias de *Trichoderma*.

3.7 Análisis de resultados

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) con medidas repetidas en el tiempo. Al resultar este análisis significativo ($P < 0.05$) se aplicó el test de Tukey para la separación de medias.

(Furidazol o Voronit) y Benomilo (Benlate 50 PM, Polyben 50 PM, Forlate 50 PM, Benex 50 PM) (Besoain, 1989).

2.4.1 Benomilo

Este producto fue uno de los primeros fungicidas sistémicos conocidos, se introdujo en 1968 por E.I. Dupont de Nemours and Company. Químicamente corresponde a carbamato de metil-1- (butilcarbamoil) -2- benzimidazol y en Chile se conoce con los nombres comerciales de Benlate 50 PM, Benex 50 PM, Forlate 50 PM, Polyben 50 PM o Benotrax 50 PM. Benomilo se degrada a carbendazima bajo condiciones naturales y es este último compuesto el que verdaderamente ejerce la acción antimicótica (Erwin, 1973, citado por Besoain, 1989).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de la acción del fungicida Benomilo en la sobrevivencia y establecimiento de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* y Trichodex en el suelo

4.1.1 *Trichoderma harzianum* cepa Queule

El efecto del fungicida benomilo sobre el establecimiento de la cepa Queule en suelo estéril y sin esterilizar no fue significativo ($P>0.05$). Sin embargo, la interacción de ambos factores sólo en suelo estéril fue altamente significativa ($P=0.007$). El Cuadro 4.1 muestra el efecto de esta interacción.

Al analizar la interacción significativa de ambos factores se pudo observar que no existen diferencias significativas en cuanto al antagonista con o sin el fungicida. En cambio si existen diferencias significativas entre el fungicida con el producto Trichodex

Cuadro 4.1 Efecto del fungicida Benomilo sobre el número de colonias recuperadas del hongo *T. harzianum* cepa Queule y el producto comercial Trichodex desde suelo esterilizado y cultivado con tomate cv. Cal Ace e infectado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

Fungicida	u.f.c x 10 ⁴ / g de suelo	
	<i>T. harzianum</i> cepa Queule	Trichodex
Sin Benomilo	1,86 ab ^y	3,0 b
Con Benomilo	2,60 ab	1,4 a

^yLetras distintas en columnas y filas indican diferencias significativas ($p<0.05$) según el test de Tukey para separación de medias.

La interacción es producida por Trichodex, cuyo establecimiento en suelo estéril es disminuido significativamente por el fungicida benomilo. Lo anterior no ocurre con la cepa Queule, cuya densidad poblacional (u.f.c. x 10⁴/g suelo) recuperada desde el suelo estéril sin la

adición del fungicida Benomilo, no fue diferente estadísticamente a la densidad de población recuperada desde el mismo suelo tratado con el fungicida. Por lo tanto, se puede inferir que el fungicida Benomilo no afecta la sobrevivencia y el establecimiento de la cepa nativa de *T. harzianum* en el suelo estéril. Estos resultados serían comparables a los obtenidos en un estudio realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, en donde se realizaron ensayos *in vitro* con esta cepa y se obtuvo que el fungicida Benomilo no afectó el crecimiento y la actividad de este hongo (E. Donoso¹, Comunicación Personal, Proyecto FIA C98-1-A-072, 2000). Sin embargo se contradicen a lo señalado por Davet *et al.* (1981), quienes encontraron que *T. harzianum* era deprimido con el uso de Benomilo. Lo anterior sería válido para el caso del producto Trichodex (*T. harzianum*) el cual en nuestro estudio fue deprimido por el fungicida Benomilo, lo que sugeriría que la mezcla de Benomilo con Trichodex sería incompatible, tal como lo señala Esterio y Saavedra (1997), debido principalmente a un efecto detrimental del fungicida sobre el producto biocontrolador.

4.1.2 *Trichoderma longibrachiatum* cepa Soto

El ANDEVA nos indicó que existe un efecto significativo del tipo de antagonista utilizado (cepa Soto o Trichodex) ($P=0.028$). En cambio, no hubo un efecto significativo del fungicida benomilo para ambos tipo de suelo. Sin embargo, sí se aprecia una interacción significativa entre ambos factores ($P=0.0007$) en el suelo estéril, lo que no sucede con suelo sin esterilizar.

Al analizar la interacción significativa de ambos factores se pudo observar que no existen diferencias significativas en cuanto al antagonista sin benomilo. En cambio si existen diferencias significativas entre antagonistas con benomilo, apreciándose además diferencias significativas entre el fungicida, con el producto comercial Trichodex (Cuadro 4.2).

¹Ingeniero Agrónomo, Universidad de Talca.

Cuadro 4.2 Efecto del fungicida Benomilo sobre el número de colonias recuperadas del hongo *T. longibrachiatum* cepa Soto y el producto comercial *Trichodex* desde suelo esterilizado y cultivado con tomate cv. Cal Ace e infectado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

Fungicida	u.f.c x 10 ⁴ / g de suelo	
	<i>T. longibrachiatum</i> cepa Soto	Trichodex
Sin Benomilo	2,16 ab ^y	2,37a
Con Benomilo	3,43a	1,0 b

^Y Letras distintas en columnas y filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según el test de Tukey para separación de medias.

Al igual que en lo obtenido para la cepa Queule, las densidades poblacionales de *T. longibrachiatum* cepa Soto recuperada desde el suelo estéril con y sin la adición del fungicida Benomilo no fueron diferentes estadísticamente y la densidad de población del producto Trichodex recuperada desde el suelo estéril tratado con el fungicida fue significativamente menor a la recuperada desde el suelo estéril sin fungicida. Adicionalmente hubo diferencias entre las densidades poblacionales recuperadas desde el suelo estéril con la adición del fungicida de la cepa nativa comparadas con las de Trichodex, donde las poblaciones de *T. longibrachiatum* fueron mayores a las del producto Trichodex. Lo anterior nos demuestra que el fungicida Benomilo no afecta la sobrevivencia y el establecimiento de la cepa nativa de *T. longibrachiatum* en el suelo estéril, como ya se mencionó para la cepa Queule. Estos datos reafirman lo obtenido en los ensayos in vitro realizados en el Laboratorio de la U. de Talca, donde encontraron que Benomilo no afectó el crecimiento y actividad de *T. longibrachiatum* (E. Donoso, Comunicación Personal, Proyecto FIA C98-1-A-072, 2000). En cambio el fungicida Benomilo tiene un efecto detrimental sobre la sobrevivencia y el establecimiento del producto Trichodex en el suelo esterilizado. Además, es interesante notar que el fungicida Benomilo tiene un efecto positivo sobre la sobrevivencia y el establecimiento de la cepa nativa en comparación a la del producto Trichodex. En un estudio de campo realizado por Ahmad y Baker (1987), en donde se realizaron ensayos para determinar la competencia de la rizósfera por *T. harzianum*, obtuvieron que las densidades de poblaciones de un aislado de *T. harzianum* mutante tolerante a Benomilo fueron

más altas en el suelo con el fungicida comparado con el suelo sin fungicida. Por lo tanto, en nuestro estudio, se ha sugerido que la cepa nativa Soto podría corresponder a una cepa tolerante a Benomilo. Los mecanismos involucrados en esto podrían ser especialmente debido al lugar de origen de la cepa Soto, la cual fue aislada desde un cultivo de maravilla, es decir esta cepa nativa pudo estar expuesta a repetidas aplicaciones con este fungicida, lo cual hizo que se produjera una mutación del hongo obteniéndose de esta manera una cepa tolerante a benomilo.

4.2 Evaluación de la sobrevivencia y establecimiento de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* en el suelo en comparación a la del producto comercial *Trichodex*

4.2.1 *Trichoderma harzianum* cepa Queule

No hubo diferencias significativas entre antagonistas en ambos suelos, pero si se observaron diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas ($P=0.02$) en suelo estéril y sin esterilizar. En la interacción entre ambos factores no se observaron diferencias significativas para el caso del suelo estéril, en cambio en el suelo sin esterilizar si se observó un efecto significativo ($P=0.006$)

Al analizar la interacción de ambos factores se puede observar que no existen diferencias significativas en cuanto al antagonista a una concentración de 10^8 conidias/ml. En cambio si existen diferencias significativas entre antagonistas a una concentración de 10^9 conidias/ml (Figura 4.1).

El factor tiempo, analizado a través de medidas repetidas, nos indica que el establecimiento gradual de la cepa Queule en el suelo es comparable a la de Trichodex, no observándose diferencias significativas después de 17, 31 y 39 días de inoculación del suelo.

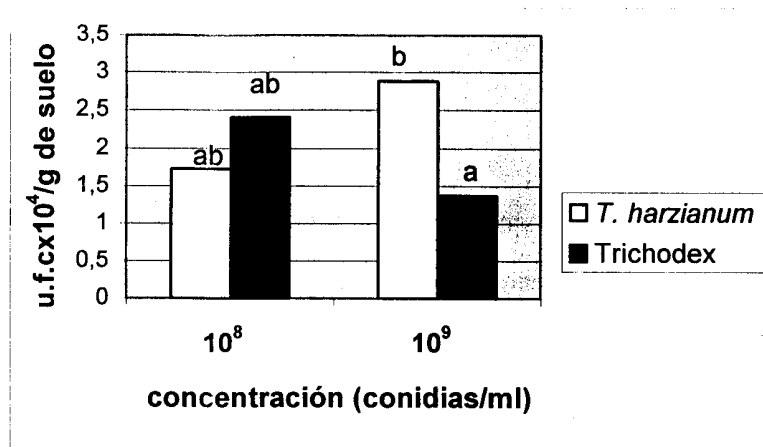


Figura 4.1 Efecto de dos concentraciones de conidias en la sobrevivencia (u.f.c/g de suelo) del hongo biocontrolador *T. harzianum* cepa Queule y el producto comercial Trichodex en suelo sin esterilizar y cultivado con tomate cv. Cal Ace e infectado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según el test de Tukey para separación de medias.

Al comparar la sobrevivencia y el establecimiento de la cepa nativa de *T. harzianum* cepa Queule con la del producto comercial Trichodex en el suelo sin esterilizar, hay que destacar que a una concentración de 0 conidias/ml no se recuperaron colonias de *Trichoderma spp.* en las placas, lo cual nos demuestra que no existían poblaciones naturales del antagonista en el suelo. Por lo tanto, las densidades poblacionales recuperadas de los antagonistas a las otras dos concentraciones se debieron a las inoculaciones realizadas con ellos. Los resultados obtenidos a una concentración de 10⁸ conidias/ml de inóculo de los antagonistas nos indican que no existen diferencias en las poblaciones recuperadas de ambos antagonistas desde el suelo sin esterilizar, pero a una concentración de 10⁹ conidias/ml se produce una diferencia en las u.f.c/g de suelo recuperadas, donde la cepa nativa presenta una mayor capacidad para sobrevivir y establecerse que la del producto comercial Trichodex. La cepa nativa aunque no presentó diferencias significativas entre las densidades de población recuperadas a ambas concentraciones, mostró una mayor sobrevivencia a una concentración de 10⁹ conidias/ml. En un estudio de campo realizado por Papavizas (1981), se obtuvo que el tamaño de las

poblaciones recuperadas desde el suelo y el establecimiento de *T. harziaunum* dependió del número de conidias adicionadas al suelo. Por lo tanto, de nuestro estudio se puede inferir que al aplicar nuestra cepa nativa del hongo biocontrolador a concentraciones de 10^9 conidias/ml, cuya concentración es comparable a la concentración a la cual viene formulado el producto Trichodex y además es una de las concentraciones más utilizadas por investigadores en diversos estudios para que actúe como antagonistas de hongos fitopatógenos (De Cal *et al.*, 1995; Sivan y Chet, 1989), esta cepa nativa de *T. harzianum* comparada con Trichodex sería más adaptada y capaz de competir con otros microorganismos presentes en el suelo para lograr una mejor colonización y establecimiento en el suelo.

4.2.2 *Trichoderma longibrachiatum* cepa Soto

Solamente se observó diferencias significativas ($P=0.003$) entre cepa Soto y Trichodex en suelo estéril, en las concentraciones y en la interacción entre ambos factores no se obtuvo diferencias significativas para ninguno de los dos tipos de suelo.

Al analizar el factor tiempo, a través de medidas repetidas, se pudo observar que existen diferencias significativas entre la cepa Soto y Trichodex solamente en el suelo estéril (Figura 4.2).

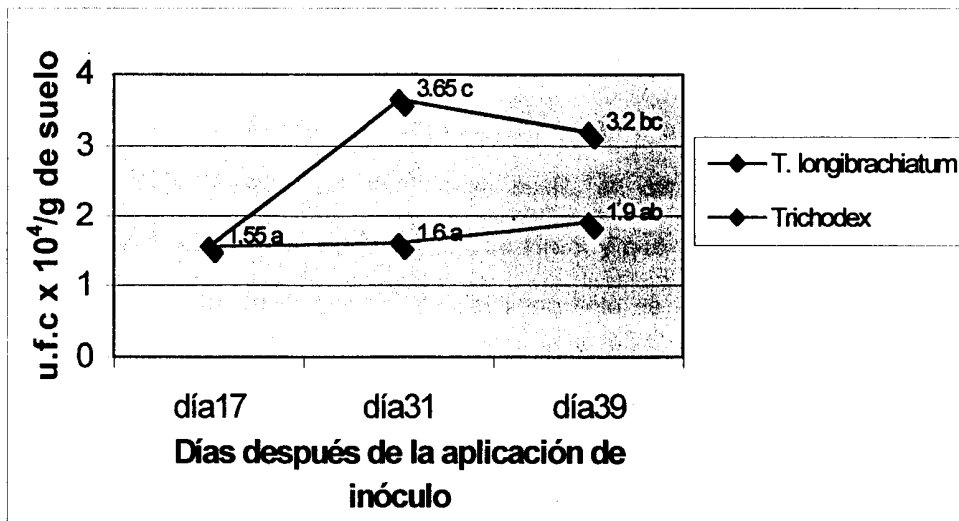


Figura 4.2 Supervivencia (u.f.c/g de suelo) de *T. longibrachiatum* cepa Soto y Trichodex en suelo estéril días después de la aplicación de los antagonistas en el suelo infectado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. y cultivado con tomate cv. Cal Ace. Letras distintas en el valor de las medias indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según el test de Tukey para separación de medias.

En el día 17 después de la inoculación de los antagonistas al suelo no existen diferencias significativas en las densidades poblacionales existentes en el suelo estéril, en el día 31 se aprecia una notable diferencia, siendo la cepa nativa de *T. longibrachiatum* la que presenta mayor densidad de población en el suelo en relación a las del producto Trichodex y finalmente en el día 39 después de la inoculación de los antagonistas al suelo, no se observan diferencias estadísticas significativas entre los antagonistas. Sin embargo, las densidades poblacionales de *T. longibrachiatum* recuperadas en promedio en el tiempo desde el suelo estéril fueron de 2.8×10^4 u.f.c/g de suelo y las de Trichodex fueron de 1.68×10^4 u.f.c/g, a pesar de no existir un aumento de las poblaciones de los antagonistas en el suelo de las aplicadas inicialmente, las densidades de poblaciones de la cepa Soto aumentan en el tiempo en comparación a las de Trichodex, estos resultados son semejantes a los obtenidos en un estudio donde evaluaron la supervivencia y establecimiento de Trichoderma spp. realizado por De Cal *et al.* (1995), entonces se puede inferir que la cepa nativa sobrevivió y se estableció mejor que el producto

comercial Trichodex en el suelo estéril. Estas diferencias entre antagonistas se deben principalmente a que la cepa Soto es una cepa nativa, es decir generada en nuestro medioambiente, además fue aislada desde el suelo, lo cual implica que ésta este mejor adaptada a las condiciones existentes en un suelo, en cambio *T. harzianum* (Trichodex) corresponde a una cepa externa proveniente de Israel y que fue originalmente aislada de la microflora natural de frutos de pepino, es decir, no sólo es importante la especie sino que también el aislado, tal como lo sugiere Cook (1993), que microorganismos aislados desde un cultivo específico o de un ambiente en particular pueden estar mejor adaptados a partes de las plantas o a tales condiciones medioambientales en particular, lo cual les permite que puedan competir mejor que otros para lograr establecerse.

V. CONCLUSIONES

- a) El fungicida benomilo no afectó la sobrevivencia y el establecimiento de las dos cepas nativas de *Trichoderma spp.* en el suelo.
- b) El establecimiento y la sobrevivencia del producto comercial Trichodex en suelo estéril fue afectada por el fungicida benomilo.
- c) La sobrevivencia y el establecimiento de la cepa nativa Queule ($2,88 \times 10^4$ u.f.c/g de suelo) fue superior en un 100% a la del producto Trichodex ($1,37 \times 10^4$ u.f.c/g de suelo) en suelo sin esterilizar a una concentración de 10^9 conidias/ml.
- d) El establecimiento gradual en el suelo de *T. harzianum* cepa Queule fue comparable al de Trichodex tanto para suelo estéril como sin esterilizar, no así la cepa nativa Soto la cual presentó una mejor sobrevivencia y establecimiento que Trichodex en suelo estéril.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agrios, G. 1991.** Fitopatología General. Editorial Limusa, México. 756 p.
2. **Agrios, G. 1996.** Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa, México. 838 p.
3. **Ahmad, J.S. and Baker, R. 1987.** Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.
4. **Beagle, J. and Papavizas, G. 1985.** Survival and Proliferation of Propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in Soil and in Plant Rhizospheres. *Phytopathology* 75: 729-732.
5. **Besoain, X. 1989.** Benzimidazoles. 15-17 p. En Latorre, B., Fungicidas y Nematicidas. Avances y aplicabilidad. Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 215 p.
6. **Blanco, M. 1995.** Micosis Vasculares. 913-933 p. En Liácer, G., López, M., Trapero, A. y Bello, A. 1996. Patología Vegetal Tomo II. Sociedad Española de Fitopatología. España. 1165p.
7. **Bruna, A. 1990.** Producción de frutas y hortalizas para uso agroindustrial. Fundación Chile. 977p.
8. **Campbell, R. 1989.** Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University, Australia. 217 p.
9. **Chet, I. 1987.** Innovative approaches to plant disease control. John Wiley and Sons, New York. 372 p.
10. **Chet, F. and Baker, R. 1980.** Induction of Suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 70: 994-998.
11. **Chao, W., Nelson, E., Harman, G. and Hoch, H. 1986.** Colonization of the Rhizosphere by Biological Control Agents Applied to Seeds. *Phytopathology* 76: 60-65.
12. **Cook, R. and Baker, K. 1989.** The Nature Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Second Edition. USA. 539 p.
13. **Cook, R. 1993.** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathology* 31: 53-80.
14. **De Cal, A., Pascual, S., Larena, I. and Melgarejo, P. 1995.** Biological control of *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. *Plant-Pathology* 44: 909-917.
15. **De Zeeuw, D. 1988.** The limits of agriculture, in *Ecological Bulletin*, N°39, Copenhage. 13-18 P.
16. **Elad, Y., Chet, Y. and Henis, Y. 1982.** Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.
17. **Esterio, M. y Saavedra, J. 1997.** *Botrytis*: Nuevas estrategias de Control Cultural, Biológico y Químico en uva de mesa. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Departamento de Sanidad Vegetal. Santiago de Chile. 82-88 p.

18. **FAO. 1985.** Manual para Patólogos Vegetales. Santiago, Chile.334 p.
19. **Giacconi, V. y Escaff, G. 1995.** Cultivo de hortalizas. Undécima Edición. Santiago. 284-285 P
20. **Honorato, R. 1993.** Manual de Edafología. Primera Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago. 165p.
21. **Jones, J.B. 1991.** Compendium of Tomato Diseases. The American Phytopathological Society. USA. 14 p.
22. **Laboratorios Brand. 1998.** Catálogo 1997/1998. Aparatos en vidrio para el laboratorio. 149 p.
23. **Larkin, R. and Fravel, D. 1998.** Efficacy of Various Fungal and Bacteria) Biocontrol Organisms for Control of *Fusarium* Wilt of Tomato. Plant Disease **82: 1022-1028.**
24. **Latorre, B. 1992.** Enfermedades de las plantas cultivadas. Tercera Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago. 358-362 p.
25. **Mao, W., Lewis, J., Hebbar, P. and Lumsden, R. 1997.** Seed Treatment with a Fungal or a Bacteria) Antagonist for Reducing Corn Damping-off Caused by Species of *Pythium* and *Fusarium*. Plant Disease 81: 450-454.
26. **Marois, J., Mitchell, D. and Sonoda, R. 1981.** Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. Phytopathology 71: 1257-1260.
27. **Papavizas, G. 1981.** Survival of *Trichoderma harzianum* in Soil and in Pea and Bean Rhizospheres. Phytopathology 71: 121-125.
28. **Rifaï, M. 1969.** A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116: 1-56.
29. **Samuels, G. 1996.** *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100 (8): 923-935.
30. **Sarasola, A. y Rocca, M. 1975.** Fitopatología Curso Moderno. Primera Edición. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. 37-41 p.
31. **Schuman, G. 1991.** Plant Diseases : Their Biology and Social Impact. USA. 181-195p.
32. **Sid, A., Pérez-Sánchez, C., Egea, C. and Candela, M. 1999.** Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plaíts. Plant Pathology 48: 58-65.
33. **Sivan, A. and Chet, 1. 1989.** The Possible Role of Competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on Rhizosphere Colonization. Phytopathology 79: 198203.
34. **Wainwright, M. 1992.** An Introduction to Fungal Biotechnology. Department of Molecular Biology and Biotechnology University of Sheffield. 200p.

VII. ANEXOS

ANEXO 1.

Compatibilidad de las mezclas de distintos productos químicos con el producto comercial Trichodex

25% WP

Incompatible	Moderadamente Incompatible	Compatible
Benomyl Carbendazim Chlorothalonil (Bravo) Fenbuconazole (Indar)	Dichlofluanid (Euparen) Phyton (Sulfato de Cu) Folpet	Myclobutanil (Systhane) Triadimefon (Bayleton) Dicloran (Botran) Mancozeb Imazalil Trifonon (Sapro) Diniconazole (Sumi-8) Penconazole (Topas) Quinomethionate Azufre Ac. Giberélico Azinphos methyl Endosulfan (Thiodan) Methomyl (Lannate)

Fuente: Esterio y Saavedra, 1997.

ANEXO 2.

Usos y Dosis de Trichodex 25% WP

Cultivo	Enfermedad	Estado	Dosis
Vides	<i>Botrytis cinerea</i>	Preflor, flor, Cierre de racimo	2-3 Kg/ha
Tomate	Botrytis, Sclerotinia	Todos	2-3 Kg/ha
Otros: Frambuesa, Frutillas, Kiwis	<i>Botrytis cinerea</i>	Todos	2-3 Kg/ha

Fuente: Esterio v Saavedra. 1997.

ANEXO 3.

Características de la variedad Cal Ace

Período Veg.	Frutos/Kilo	Tamaño de la planta	Hábito de crecimiento	Resistencia
80 días	5	Grande	Determinado	<i>Verticillium</i> , <i>Alternaria</i> (Cancro del tallo) y <i>Fusarium</i> raza 1.

Fuente: Giaconi y Escaff, 1995.