

# ***Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.)**

Mohammed Ezziyani, Consuelo Pérez Sánchez, Ahmed Sid Ahmed, María Emilia Requena & María Emilia Candela

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, España.

## **Resumen**

Correspondencia

M. E. Candela

Email: mcandela@um.es

Tel.: +34 968 364943

Fax: +34 968 363963

**Recibido:** 30 Marzo 2004

**Aceptado:** 11 Mayo 2004

En los ensayos de control biológico en pimiento ejercido por *Trichoderma harzianum* (*T.h.*) sobre *Phytophthora capsici* (*P.c.*), agente causal de la podredumbre de pimiento, se ha optimizado la producción de la biomasa del antagonista *T.h.* al comparar su desarrollo en tres diferentes medios y soportes de cultivo. El método de producción de la biomasa de *T.h.* en Agua-Avena-Vermiculita resultó ser el más rentable por su rápido y abundante crecimiento, viabilidad y bajo coste para utilizarlo como inóculo del suelo, al compararlo con los crecidos en Czapek líquido y PDB. El test del antagonismo in vitro de *P.c.* frente a *T.h.* en medio PDA enriquecido con Laminarina-glucosa (3:1, v/v), mostró que *T. h.* aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas  $\beta$ -1,3- glucanasa (lisis enzimática), ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el patógeno (micoparasitismo), todo lo cual juega un papel importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno. El filtrado del medio PDB donde se había cultivado *T.h.* afectó al crecimiento de las radículas de las semillas in vitro. En ensayos in vivo las plantas crecidas a partir de semillas tratadas mostraron un peso seco superior a las testigo. En definitiva, el tratamiento con *T.h.* ha sido capaz de reducir hasta un 65% la «tristeza» causada por el patógeno *P.c.* en plantas de pimiento.

**Palabras clave:** *Trichoderma harzianum*, Biocontrol, *Phytophthora capsici*, *Capsicum annuum*.

## **Abstract**

*Trichoderma harzianum* as biofungicide in the control of *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants.

During experiments in pepper plants using *Trichoderma harzianum* (*T.h.*) to control *Phytophthora capsici* (*P.c.*), the causal agent of root rot in pepper, we have optimised biomass production of the antagonist by comparing its growth in three different culture media and supports. Compared with Czapek liquid and PDB, the most advantageous medium was Water-Oats-Vermiculite, since this provided the most rapid and abundant growth, showed the highest degree of viability and it was cheap for use as a soil inoculum. In vitro antagonism tests involving *P.c.* against *T.h.* in PDA medium enriched with Laminarine: L-glucose (3:1, v/v) showed that *T.h.* increases hydrolytic enzymes levels (enzy-

matic lyses), exercises a greater competition for space and nutrients, and directly interacts with the pathogen (micro-parasitism), all of which play an important part in reducing and destroying the pathogenic colonies. The filtrate of the PDB medium in which *T.h.* had been cultured affected the root growth of seedlings in vitro. In vivo experiments the plants grown from treated seeds showed a greater dry weight than the control plants. Treatment with *T.h.* reduced the wilt caused by *P.c.* in pepper plants by up to 65%.

**Key words:** *Trichoderma harzianum*, Biocontrol, *Phytophthora capsici*, *Capsicum annuum*.

## Introducción

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros. Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa.

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al. 1982). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes (Elad & Baker 1985, Elad & Chet 1987, Chet & Ibar 1994, Belanger et al. 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Chet et al. 1997, Sid Ahmed et al. 2000, Sid Ahmed et al. 2003) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia et al. 1999, Ezziyani et al. 2003).

El objeto de este trabajo es analizar el uso de *Trichoderma harzianum* como agente antagonista de *Phytophthora capsici* para reducir la «tristeza» causada por este patógeno en plantas de pimiento, analizando los mecanismos de biocontrol y optimizando el medio de producción de su biomasa. Para ello trataremos de incrementar los niveles de enzimas hidrolíticas producidas por *T. harzianum* y conseguir bio-preparados más eficaces que los que existen actualmente.

## Material y Métodos

### Material vegetal

La variedad de pimiento (*Capsicum annuum* L.) objeto de estudio fue California Wonder, muy sensible al ataque del hongo *Phytophthora capsici*. La siembra se realizó con semillas desinfectadas en una disolución comercial de hipoclorito sódico al 2% (v/v) durante 5 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y se pusieron a germinar en bandejas alveolares de 48 senos (4x4x14 cm), conteniendo una mezcla de turba, arena y vermiculita (3:1:1/2) esterilizada. Las bandejas fueron instaladas, en un módulo del invernadero de la Estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia (EEA-UMU). Se mantuvieron en estas condiciones hasta que desarrollaron la quinta o sexta hoja verdadera, con lo que ya estaban dispuestos para el trasplante a macetas o al suelo y la posterior inoculación con *P. capsici* (Candela et al. 1995).

### Material fúngico

Como patógeno se usó el Oomiceto *Phytophthora capsici*, aislado 15, cepa extremadamente agresiva procedente de Brasil. La patogenicidad del hongo fue confirmada experimentalmente mediante el postulado de Koch y el hongo se mantuvo en PDA (patata-dextrosa-agar) de Difco.

Para los ensayos de biocontrol el hongo se cultivó también en el medio «vermiculita-PDB (caldo-patata-dextrosa)» que se obtiene de la siguiente manera: adición de 200 ml. de medio PDB a un matraz Erlenmeyer de 1000 ml que contenía 150 g de vermiculita, esterilizada previamente dos veces a 121°C durante 30 min en dos días consecutivos. Esta mezcla se autoclavó, y en ella se agregaron cuatro discos de 5 mm de diámetro que fueron cortados del margen de la colonia miceliana de *P. capsici*, crecida en medio PDA y transferidos asépticamente al matraz.

Éstos fueron incubados en estufa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante tres semanas, tiempo suficiente para la formación de abundante inóculo.

Para conseguir gran cantidad de zoósporas se hizo crecer *P. capsici* en PDB en la oscuridad y con agitación en matraces de 250 ml a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 15 días. Posteriormente se separó y lavó el micelio, se introdujo de nuevo en agua destilada y se mantuvo en agitación durante 5 ó 6 días más en los que se formaron y liberaron las esporas.

Como antagonista se utilizó el hongo *Trichoderma harzianum*, aislado 2413 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) sita en Valencia (España), usado anteriormente por nosotros (Sid Ahmed et al. 2001) y conservado en medios PDA y Avy-3.

### **Confrontación in vitro de *Trichoderma* frente a *Phytophthora***

Las acciones del antagonista se comprobaron, haciéndolo crecer en medios: PDA, Czapek-Agar, (A-A) Agua-Agar al 2% y en medio PDA enriquecido con Laminarina y glucosa (3:1, v/v). Los inóculos se obtuvieron de la colonia miceliana de *P. capsici*, tomando discos de 5 mm de diámetro para las confrontaciones, los discos de *P. capsici* se siembran en placas Petri en los medios de cultivo anteriores, y en puntos equidistantes respecto al antagonista, mediante toques superficiales del medio de cultivo con una asa. Las placas se incuban en estufa a varias temperaturas: 23, 25, 27 y  $30^{\circ}\text{C}$ . La interacción se observó cada tres días.

### **Microscopía electrónica de barrido**

Las muestras analizadas mediante microscopía electrónica de barrido proceden de la zona de interacción de las confrontaciones entre patógeno y antagonista en el medio PDA. El procesamiento de las muestras se hizo según el siguiente método: Se prepararon cortes de agar de 2 x 2 mm de la zona de interacción entre *T. harzianum* y *P. capsici*. Las muestras se sumergieron en una solución acuosa de agar al 1% y se fijaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante dos horas por inmersión en una disolución compuesta por glutaraldehído (25%) al 3% en tampón cacodilato sódico (R 23/25, Prolabo) 0,1M a pH 7,2, seguida de tres lavados con el mismo tampón durante 30 minutos en oscuridad. Se fijaron por inmersión en tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad. La deshidratación se efectuó en etapas de 15 minutos con disoluciones crecientes de etanol de 30, 50, 70, 90 y 100% y se secaron mediante el método del punto crítico

(etanol/ $\text{CO}_2$  líquido). Los cortes se montaron sobre un pedestal con pintura conductiva de grafito y se cubrieron con oro por el método de evaporación en «sputtering». El examen se hizo con un microscopio electrónico de barrido Jeol T- 6.100.

### **Preparación de la suspensión de esporas y del filtrado del antagonista *Trichoderma***

Para el tratamiento de la semillas y el empapado de las raíces de las plantas de pimiento, se preparó una suspensión de esporas del hongo *T. harzianum*. Para ello, cultivos de 5-7 días de edad se cubrieron con agua-peptona al 0,1 %, y agua-sacarosa al 3%, se rasparon con una varilla de vidrio estéril. La suspensión se recogió en tubos estériles a partir de los cuales se prepararon las concentraciones requeridas.

El filtrado se preparó en frascos Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 150 ml de PDB previamente esterilizados a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Dos discos de 5 mm de diámetro se cortaron del margen de la colonia miceliana de *T. harzianum* crecida en medio PDA y se transfirieron asépticamente al frasco. El matraz que contenía el hongo, se dejó a temperatura ambiente en el laboratorio, en agitación permanente en un agitador orbital a 100 rpm, durante dos semanas. El micelio del hongo formado se separó del caldo filtrándolo con una gasa estéril el cual se esterilizó pasándolo por un filtro (Miller, OVDF estéril, Millipore) de 0,45 mm de diámetro. Este filtrado es el que se utilizó para el tratamiento de las semillas y la producción de los metabolitos antifungicos.

### **Preparación del inóculo de *Trichoderma***

El inóculo de *T. harzianum* se preparó: a) en frascos Erlenmeyer de 1000 ml que contenían una mezcla de 8 g de avena molida, 150 g de vermiculita fina y 250 ml de agua destilada (medio Avy-3), b) en frascos conteniendo 300 g de vermiculita y 200 ml de medio PDB y c) en frascos conteniendo 300 g de arena y 150 ml de medio Czapek líquido (Difco). Los frascos se esterilizaron en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos dos veces en dos días consecutivos. Cuatro discos de 5 mm de diámetro cortados del margen de la colonia miceliana crecida en medio PDA se transfirieron asépticamente a los frascos conteniendo la mezcla preparada. Los frascos con avena, PDB y Czapek fueron incubados en una estufa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante, siete, quince días y más de un mes respectivamente.

### Tratamiento de las semillas con la suspensión de *Trichoderma*

Se utilizaron semillas de pimiento esterilizadas en una disolución de hipoclorito sódico (Domestos) al 20% (v/v) durante 20 min, seguidos de tres lavados de cinco min. en agua destilada estéril. Las semillas se introdujeron en la suspensión de *T. harzianum* preparada en agua destilada-sacarosa al 3%, durante diez min, se retiraron y el exceso de agua se absorbió mediante un papel de filtro estéril en una placa de Petri, bajo corriente de aire en la Cámara de flujo laminar. El control consistió en introducir semillas desinfectadas en una solución estéril de agua destilada-sacarosa al 3%.

Para hacer el recuento de la población inicial del antagonista adherida a cada semilla, se separaron 5 semillas tratadas con *T. harzianum* y se molieron añadiendo 9 ml de un disolvente de P-A (pectona-agua) al 0,1% (p/v) en un mortero. A partir de la suspensión obtenida se prepararon una serie de diluciones decimales que se sembraron en medio PDA. Las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad y el recuento se hace por microscopia después de 48 h.

La siembra se realizó en bandejas desinfectadas de 27x17x4 cm conteniendo 60 g de vermiculita esterilizada en autoclave a 121°C durante una hora dos veces en dos días consecutivos. En cada bandeja se sembraron 100 semillas. Las bandejas se instalaron en una cámara de cultivo a 25°C ± 2°C, se regaron con 80 ml de agua destilada por bandeja cada dos días. Después de diez días se abonaron con 5 ml de una solución fertilizante (COMPO) y se mantuvieron en estas condiciones hasta que aparecieron los primeros cotiledones.

### Tratamiento de las semillas con el filtrado de *Trichoderma*

Cinco mililitros del filtrado de *T. harzianum* esterilizado por filtración, se repartieron en placas Petri conteniendo agua-agar al 2% (A-A). Las semillas desinfectadas en una disolución de hipoclorito sódico (Domestos) al 20% (v/v) durante 20 minutos, fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril y secadas mediante papel de filtro estéril bajo corriente de aire en la Cámara de flujo laminar. A continuación se introdujeron diez semillas en cada placa y se incubaron a 25°C en oscuridad. Al cabo de seis días de incubación se calculó el porcentaje de germinación y se midió la longitud de la radícula. Como control se utilizaron diez semillas de pimiento desinfectadas en placas Petri conteniendo agua-agar al 2% sumergidas en 5 ml del filtrado en medio PDB.

### Tratamiento in vivo del patógeno por *Trichoderma* crecido en vermiculita

1- En macetas: el sustrato utilizado para el cultivo en macetas, fue una mezcla de turba, arena y vermiculita esterilizada (3:1:1/2, v/v/v). En todos los ensayos 15 g del patógeno *P. capsici* crecido en vermiculita-PDB se agregó directamente a las macetas con el fin de asegurarnos una buena infección. La población inicial determinada (NMP) oscila entre  $1,2 \times 10^6$  pp/g y  $8,1 \times 10^7$  pp/g.

El inóculo de *T. harzianum* utilizado fue el preparado en vermiculita, avena y agua (Avy3), con las concentraciones siguientes: 5, 10, 15 y 20 g/maceta.

De la mezcla inoculada se recogieron muestras de 100 g para hacer un recuento de la población inicial del antagonista, mediante diluciones decimales usando un detergente no iónico. Las macetas se dispusieron al azar en bloques completos en la estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia (EEA-UMU). Se regaron con agua corriente cada dos o tres días y se enriquecieron con una solución de NPK cada dos semanas. La temperatura osciló entre 25 y 30°C. Diez plantas fueron utilizadas por cada tratamiento y los ensayos se repitieron tres veces.

2- En suelo: se realizaron dos ensayos en suelos del campo de la EEA-UMU para evaluar el potencial de *T. harzianum* en el control del patógeno *P. capsici*. Las plantas se cultivaron como hemos indicado anteriormente.

Se prepararon hoyos distanciados 70 cm por 40 cm, en los que fue mezclada vermiculita inoculada previamente con el antagonista a razón de 15 g/hoyo, y se rehizo el hoyo en el que se colocó la planta. Pasados siete días del transplante se removió el suelo a nivel de la rizosfera, formando un círculo alrededor de la planta, se infectaron las plantas con *P. capsici* y se cubrió con el suelo. El riego se hizo por goteo usando emisores autocompensativos de 4 litro/hora y la fertilización se realizó cada tres semanas con un sistema de inyección de fertilizante (NPK) mediante un tanque de abonado (ATF0040, Novo Ris, Zaragoza, España) conectado a la red de riego. La lectura de los resultados se hizo al final del segundo mes a partir del transplante tanto en macetas como en suelo.

## Resultados y discusión

### Confrontación in vitro de *Trichoderma* frente al patógeno *Phytophthora*

*Trichoderma harzianum* demostró un claro efecto antagónico contra *Phytophthora capsici* en los culti-

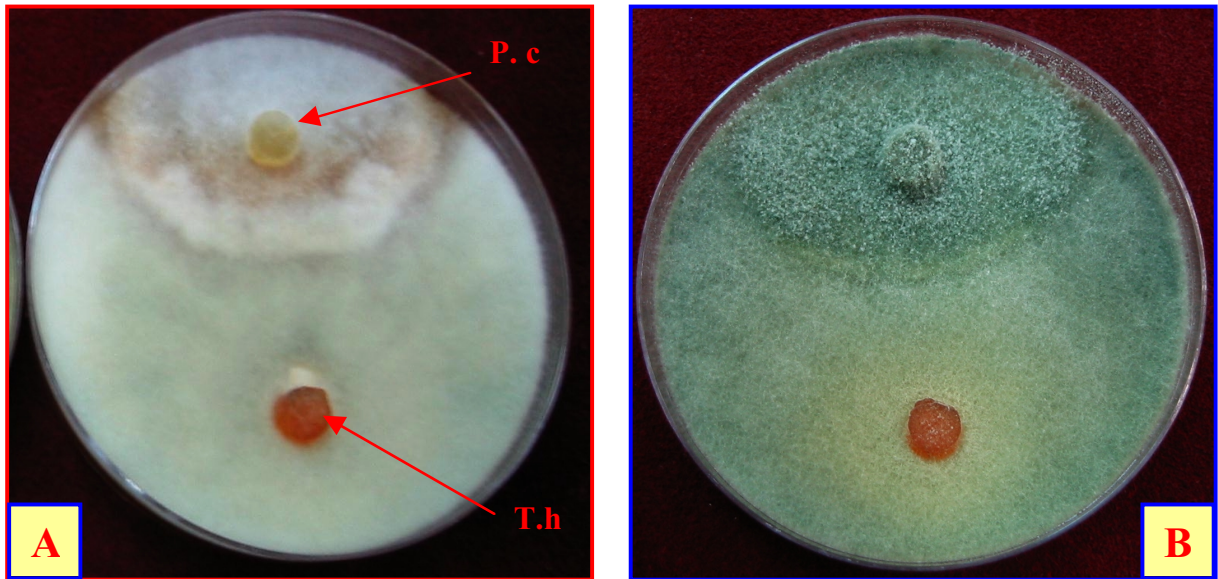


Figura 1. Confrontación de *Phytophthora capsici* (*P.c.*) y *Trichoderma harzianum* (*T.h.*). [A]: Inhibición del crecimiento vegetativo de *P.c.* en presencia de *T.h.* en el medio PDA. [B]: *T.h.* realiza hiperparasitismo, invade totalmente la superficie de la colonia de *P. capsici* y esporula sobre la misma.

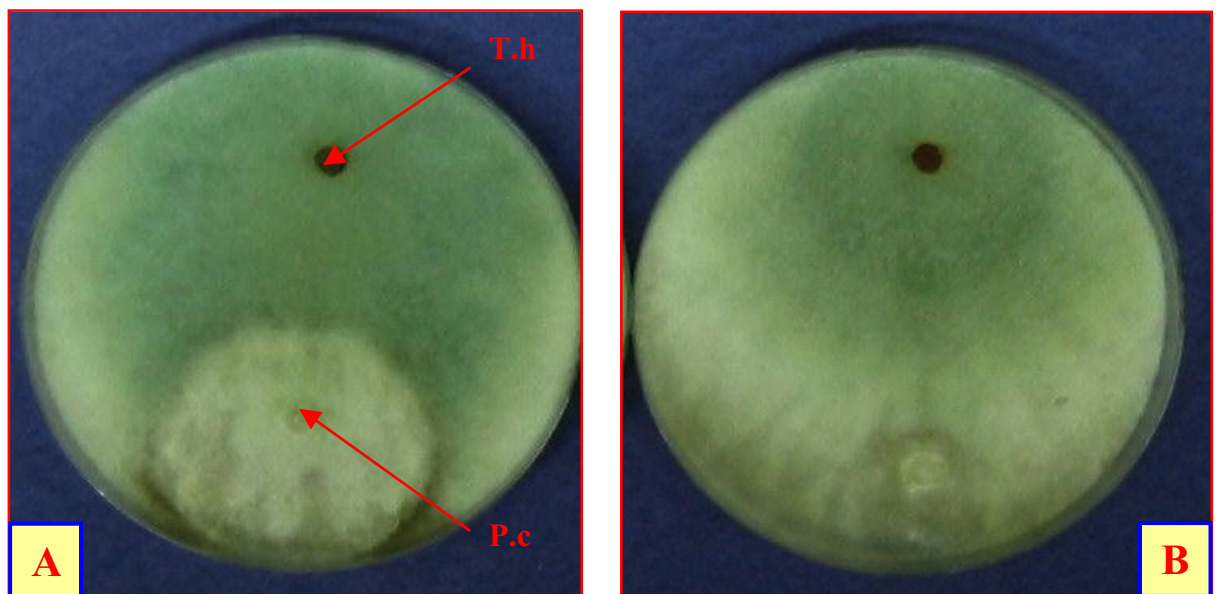


Figura 2. Confrontación de *Phytophthora capsici* (*P.c.*) y *Trichoderma harzianum* (*T.h.*). [A]: Inhibición del crecimiento vegetativo de *P.c.* en presencia de *T.h.* en el medio PDA. [B]: Reducción máxima de la colonia de *P.c.* y expansión de la de *T.h.* al enriquecer el medio de cultivo PDA con laminarina-glucosa (3:1, v/v).

vos duales realizados previamente *in vitro*, sobre todo en medio PDA enriquecido con laminarina-glucosa (3:1, v/v), aumentando su actividad antifúngica mediante la secreción del enzima hidrolítico ( $\beta$ -1,3-glucanasa) (Ezziyani 2004) y posiblemente otros, sobrecreciendo y reduciendo totalmente la colonia del patógeno.

La intensidad de inhibición de *P. capsici*, por *T. harzianum* *in vitro* varió según el medio de cultivo, la temperatura y el pH. La inhibición fue intensa en

PDA (Fig. 1A), mientras que en el medio A-A, las interacciones fueron menos intensas o débiles. La zona de inhibición producida por *T. harzianum*, frente al patógeno, aumenta a medida que transcurre el tiempo, aumento que va acompañado de la destrucción del micelio fúngico desarrollado hasta ese momento.

Lo que se observa en primer lugar es una zona de inhibición progresiva, en parte por la mayor velocidad de crecimiento de *T. harzianum*. Después apare-

ce un marcado efecto hiperparasítico, que se manifiesta por la inhibición del crecimiento micelial no sólo por compartir el mismo sustrato sino también porque *T. harzianum* produce antibióticos y enzimas: ( $\beta$ -1,3- glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) degradadores de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo (Lorito et al. 1993, Papavizas & Lumsden 1980, Herrera et al. 1999, Sid Ahmed et al. 2000).

En la Fig. 2, se muestra el ensayo de antagonismo in vitro de *P. capsici* frente a *T. harzianum* en el medio PDA enriquecido con laminarina, glucosa (3:1, v/v). Se puede observar que *T. harzianum* aumenta la actividad antifúngica por encima del control sobrecreciendo y reduciendo la colonia del patógeno. Es decir *T. harzianum* no sólo inhibe la expansión de *P. capsici* creciendo en su campo de acción, sino que a los cuatro días la colonia del patógeno *P. capsici* se quedó totalmente reducida en comparación con el control. Este efecto se debe al vertido del enzima hidrolítico  $\beta$ -1,3-glucanasa (Ezziyani 2004) lo que nos permite concluir que el aumento del nivel de este enzima y posiblemente otros, juega un papel muy importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno *P. capsici*.

Nuestros resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores (Elad et al. 1982, Bara et al. 2003) que usando laminarina como sustrato, en los medios de cultivos para cepas de *Trichoderma*, obtuvieron un aumento de la actividad  $\beta$ -1,3- glucanasa hasta del 67% y una mayor acción lítica sobre patógenos como *Sclerotinia rolfisii* y *Rhizoctonia solani* respectivamente

En ensayos de antagonismo realizado in vitro, Rey et al. (2002) realizaron transformaciones a partir de protoplastos con dos genes de glucanasas, *bgn* 16.2

y *bgn* 13.1. La cepa transformada con genes de hidrolasas, muestra una capacidad antifúngica sobre el hongo patógeno *Rhizoctonia solani* superior a la de la estirpe silvestre. Otros autores (Lahsen et al. 2001, Sousa et al. 2002, Sáez & Cipriano 2003), han clonado genes en cepas de *T. harzianum* con alta expresión antifúngica a *Phytophthora cinnamomi* y *Rose-llinia necatrix*.

Como se puede observar en las Figs. 1 y 2, la capacidad antagonica del antagonista se mantuvo creciendo hasta el sexto día lo que demuestra que *P. capsici* había dejado de crecer mientras que *T. harzianum* tenía un buen micoparasitismo. En principio era capaz de detener a su hospedante a distancia (Fig. 1A) y posteriormente a la detención, inició la secreción de sustancias antifúngicas (enzimas y antibióticos) para competir eficientemente por espacio y nutrientes. Continuó creciendo hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno e incluso esporulando sobre el mismo (Fig. 1B). Finalmente hay una reducción máxima de la colonia del patógeno al enriquecer el medio de cultivo con laminarina-glucosa (Fig. 2B). El porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno en presencia del antagonista se muestra en la Fig. 3. El micoparasitismo se puede analizar en preparaciones del microscopio electrónico de barrido donde se observan las hifas de *T. harzianum* enrollando a las del patógeno e impidiendo su crecimiento (Fig. 4).

#### Efecto del filtrado de *Trichoderma* sobre la germinación de las semillas

El filtrado de *T. harzianum* en medio PDB afectó negativamente al crecimiento de las radículas de las semillas, frente al desarrollo de las radículas de las

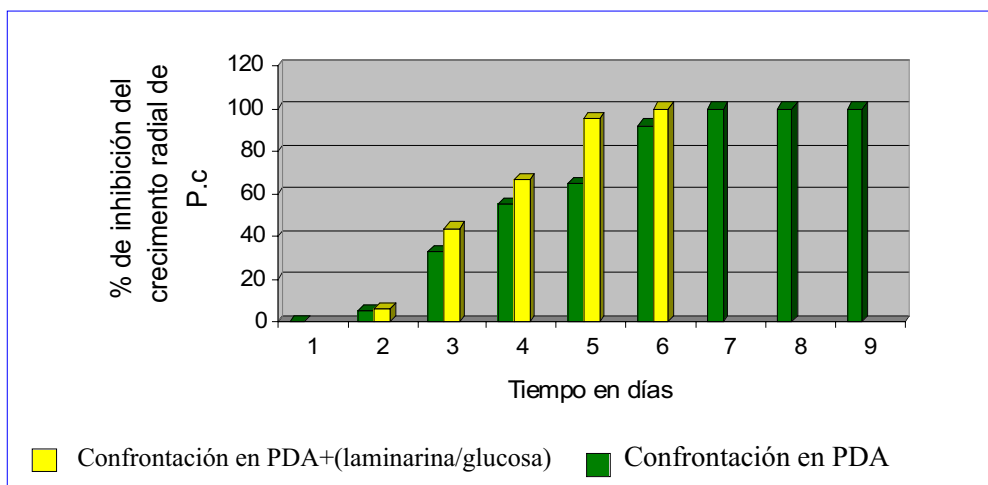


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), de *Phytophthora capsici* en presencia de *Trichoderma harzianum*. pH 5.9 a 27°C. Datos calculados empleando la fórmula de Samaniego, donde  $PICR = (R1-R2)/R1 \times 100$

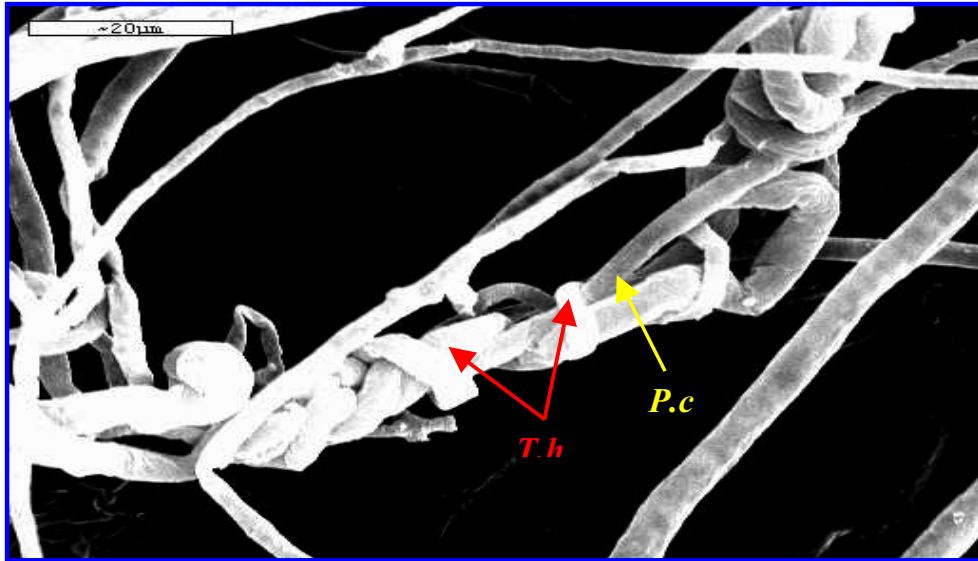


Figura 4. Fotomicrografías de las interacciones entre *Trichoderma harzianum* (*T.h.*) y *Phytophthora capsici* (*P.c.*). Enrollamiento masivo de las hifas de *T.h.* alrededor de las de *P.c.* Aspecto del micoparasitismo ejercido por el antagonista, *T.h.* sobre el patógeno *P.c.* Vistas en microscopía electrónica de barrido.

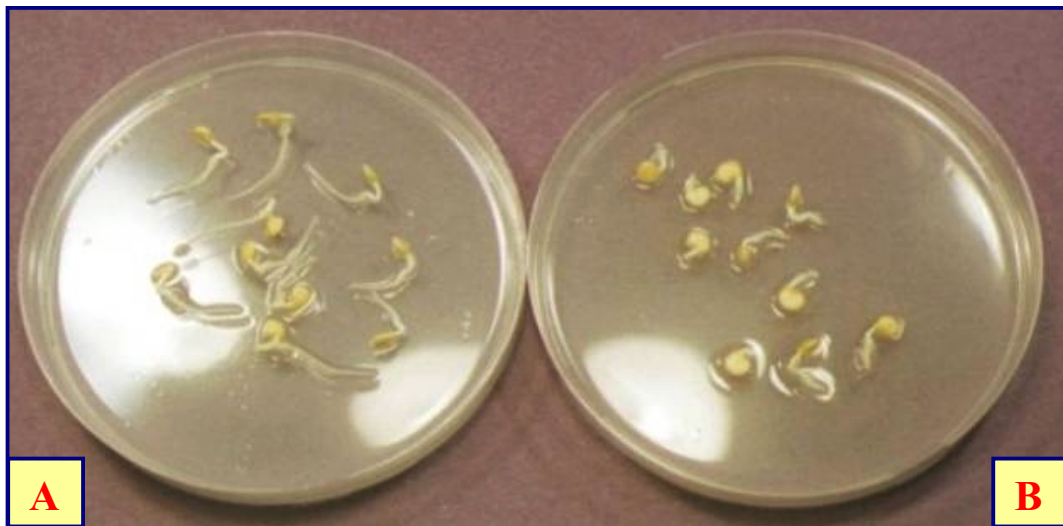


Figura 5. Efecto del filtrado de *Trichoderma harzianum* (*T.h.*). [A]: Semillas crecidas en medio de cultivo PDB (Control). [B]: Semillas crecidas en el filtrado de *T.h.*

semillas control (Fig. 5). El porcentaje de germinación de las semillas en presencia del filtrado de *T. harzianum* no fue distinto de las semillas control, no así el desarrollo de las radículas (Fig. 6). Besnard & Davet (1993) observaron un resultado similar tratando las semillas de tomate y pepino con los filtrados de *Trichoderma* spp. En un estudio preliminar con varias cepas de *Trichoderma*, estos autores observaron que casi todos los filtrados de los cultivos, un 92,9%, no tenían ningún efecto sobre la germinación de las semillas de tomate y pepino, y en algunos casos, habían cepas que ejercieron un efecto negativo.

#### Efecto de *Trichoderma* sobre la germinación y la estimulación del crecimiento de pimiento

En las plántulas crecidas en vermiculita a partir de semillas tratadas con *T. harzianum*, el porcentaje de germinación (Tabla 1 y Fig. 7), el peso seco (Fig. 8), y la longitud de las plántulas fue superior al de las no tratadas, lo que indica mayor absorción de nutrientes (Bellone et al. 1999).

El peso seco de las plántulas crecidas a partir de semillas tratadas con *T. harzianum* se incrementó significativamente y morfológicamente presentaron un

Tiempo (Días)	0	12	14	16	18
Tratamiento con <i>T.h</i>	0	62	78	81	95
Control	0	56	66	69	72

Tabla 1. Efecto de *Trichoderma harzianum* sobre la germinación y la estimulación del crecimiento de pimiento a lo largo del tiempo. Datos referidos al porcentaje de germinación de 100 semillas.

Tratamientos	Podredumbre causada por <i>P. capsici</i>	
Control: (NT&NI)	0,00 a	0%
<i>P. capsici</i> : (NT&I)	5,00 c	100%
<i>T. harzianum</i> + <i>P. capsici</i> : (T&I) "macetas"	3,25 b	65%
<i>T. harzianum</i> + <i>P. capsici</i> : (T&I) "invernadero"	4,00 c	80%
<i>T. harzianum</i> : (T&NI)	0,00 a	0%

Tabla 2. Efecto del tratamiento de *Trichoderma harzianum* sobre la podredumbre causada por *Phytophthora capsici*, en plantas de pimiento cultivadas en suelo. Evaluación realizada usando una escala graduada de 0 (ningún síntoma) a 5 (planta muerta). Los valores de la podredumbre son las medias por planta y tratamiento, obtenidos mediante agrupaciones de los resultados de las tres repeticiones de cada tratamiento en las 48 plantas. Las medias seguidas por las mismas letras no son significativamente diferentes según el test LSD a  $P = 0,05$ .

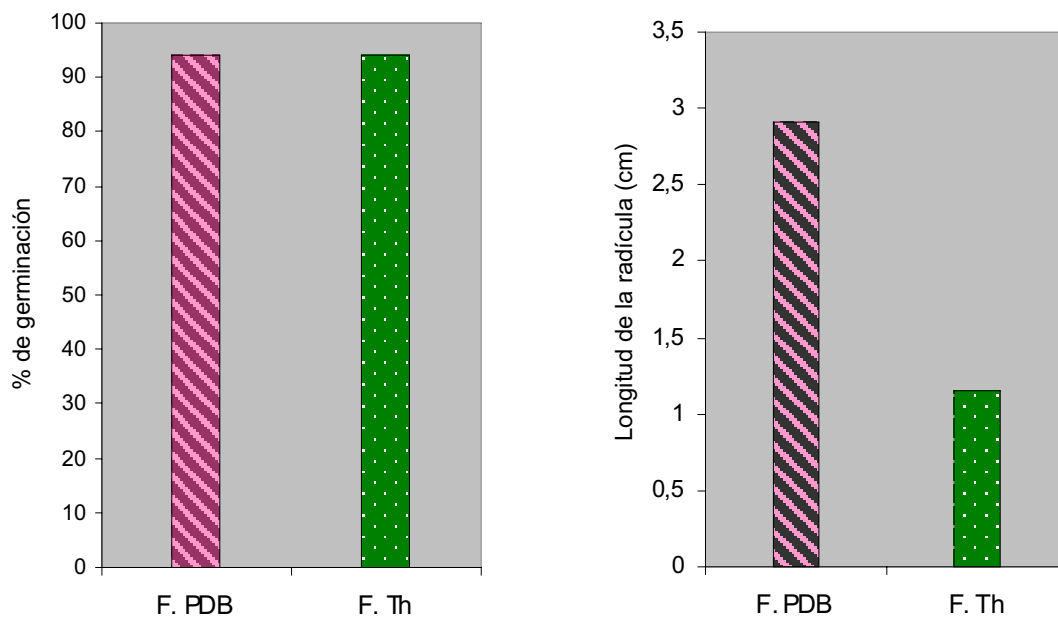


Figura 6. Efecto del filtrado de *Trichoderma harzianum* (F. Th) respecto al control del efecto del medio de cultivo (F. PDB), sobre la germinación de las semillas de pimiento.

color más verde en comparación con el de las semillas no tratadas. Leeman et al. (1995) y Kim et al. (1997), obtuvieron una cosecha superior al tratar las semillas de rábano con *Pseudomonas fluorescens* WCS374 y semillas de trigo tratadas con microorganismos antagónicos, respectivamente.

Este incremento y el cambio fisio-morfológico de las plántulas parece que varían según las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera, la especie

de la plántula, tipo de sustrato y prácticas culturales (Yang & Crowley 2000). A pesar de que los inoculantes ya se empezaron a usar desde hace tiempo, falta mucho por conocer sobre como actúan las diferentes especies en el biocontrol y la absorción y/o producción de nutrientes (Ongena et al. 2000). Los fenómenos en la rizósfera son complejos y esta diferencia entre los tratamientos es difícil de explicar. Sin embargo, es probable que las exudados de las raíces



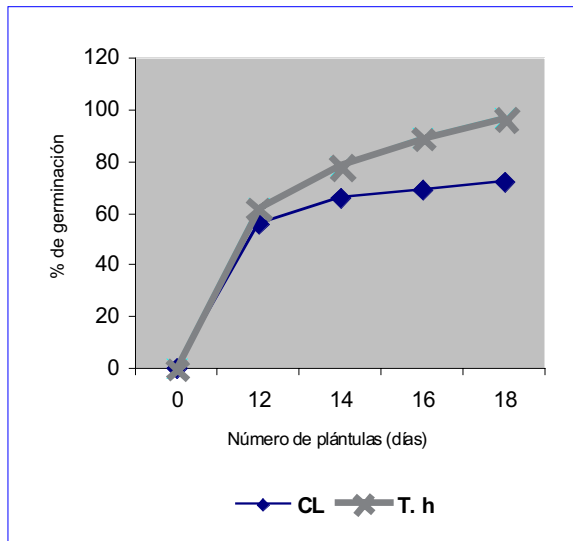


Figura 7. Porcentaje de germinación de semillas tratadas con *Trichoderma harzianum* (T.h.). El control (Cl) consiste en semillas sumergidas en solución de sacarosa al 3%.

varían según el sustrato donde crecen las plantas y esa variación tenga un efecto sobre la fisiología de las PGPR (Plant Growth Promotion Rhizobacteria) o rizobacterias promotoras del crecimiento de la plantas, y como consecuencia una eventual producción por estas de moléculas con función de fitohormonas (Marc Ongena com. pers.), o por su capacidad de solubilizar algunos minerales para la planta.

No sólo los microorganismos ejercen su efecto sobre la planta, sino que ésta también actúa, a través de sus exudados, determinando la composición de la comunidad rizosférica, incluso en las diferentes zonas de las raíces varían las estructuras y las especies de la comunidad rizosférica. Por ejemplo, en las raíces nuevas se ubican preferentemente microorganismos que utilizan azúcares fácilmente degradables y ácidos orgánicos. En cambio, en las raíces antiguas, predominan bacterias y hongos adaptados a condiciones oligotróficas y capaces de degradar compuestos más resistentes como lignina y hemicelulosa (Yang & Crowley 2000).

#### Evaluación del efecto de tratamiento de *T. harzianum* cultivado en vermiculita sobre la «tristeza» causada por *P. capsici*

De los resultados obtenidos con los dos tipos de inoculación con el patógeno, con zoósporas o con vermiculita infectada, la mejor técnica de infección es la desarrollada por nosotros, con *P. capsici* crecido en vermiculita. Ello se debe a que la vermiculita con PDB es un medio en el que el patógeno se encuentra

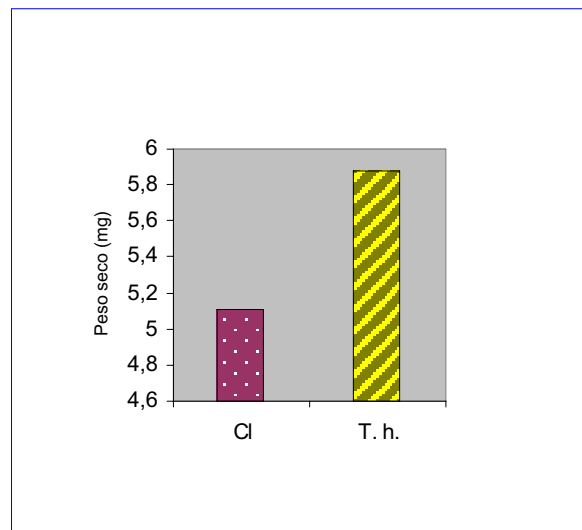


Figura 8. Peso seco, expresado en mg. de plántulas crecidas a partir de semillas tratadas con *Trichoderma harzianum* (T.h.). Cl: control.

en forma micelial y plena actividad virulenta, mientras que las zoósporas de *P. capsici*, aunque se adicionen a la rizosfera de la planta en condiciones fisiológicas óptimas de crecimiento en el laboratorio, el inóculo pierde agresividad, tal vez por factores ambientales o debido al estrés sufrido al pasar las zoósporas de un sustrato reducido al suelo.

El inoculo de *T. harzianum* utilizado para el tratamiento de las plantas fue el preparado en medio Avy3, que resultó más económico, fácil de preparar y usar, así como por su viabilidad, abundancia y rápido crecimiento (una semana). Pero sobre todo, por su alto grado de inhibición contra el desarrollo de la podredumbre causada por *P. capsici* tanto en macetas como en el suelo. El biopreparado Avy3, ha sido el mejor al compararlo con vermiculita-PDB y arena-Czapek líquido.

Como se puede observar en la Tabla 2, el tratamiento de las plantas con *T. harzianum*, creciendo en Avy3, redujo la enfermedad a 4,0 y 3,25, tomando 5 como máximo, lo cual equivale a una reducción porcentual del 22% y 56% en el suelo y en macetas respectivamente. En las plantas no tratadas e inoculadas con *P. capsici*, la podredumbre de la raíz alcanzó 5,0 sobre la escala usada.

El análisis de la varianza de clasificación de rangos múltiples (ANOVA) mostró diferencias significativas para la interacción de dos factores (tiempo de mortalidad y cepa antagonista). Lo más llamativo fue la tardanza de la aparición de los síntomas del marchitamiento en las plantas tratadas e inoculadas con el patógeno (T&I), ya que incluso algunas plantas llegaron a dar flores.

En macetas el tratamiento de las plantas con Avy3, dio un buen resultado en la reducción de la podredumbre, sin embargo los resultados de control del patógeno con el antagonista en plantas inoculadas con vermiculita-PDB y arena-Czapek líquido, en suelo no han sido tan satisfactorios. Hecho que está de acuerdo con Szejnberg et al. (1987), para quienes la incorporación de *T. harzianum* al campo no fue efectiva probablemente por un inadecuada aplicación del antagonista o tal vez, según Herrera López et al. (1999), el establecimiento y la reducción de población de *T. harzianum* en suelo puede deberse a que el antagonista utiliza su energía en la producción de metabolitos secundarios más que en su propia reproducción.

Bajo esas perspectivas se confirma lo observado por otros autores (Sid Ahmed et al. 2000, McLeod et al. 1995, Smith et al. 1990) respecto a que la selección previa del antagonista mediante cultivos duales es útil, pero no garantiza el buen comportamiento de ésta en invernadero. El efecto antagonista se ha visto reducido en nuestro experimento desde, prácticamente un 100% in vitro, a entre 56 y 22% in vivo. Ante estos resultados pensamos que una buena estrategia sería mejorar la producción de los biopreparados.

## Agradecimientos

Al Dr. Alfredo Lacasa y al Ing. Agrónomo Joaquín Costa del IMIDA (La Alberca, Murcia) por la donación de la cepa del hongo *Phytophthora capsici*. El primer firmante ha gozado de una beca MAE durante la realización de este trabajo.

## Referencias

- Bara F, Lima A, Ulhoa L & Cirano J. 2003. Purification and characterization of an exo-?-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* 219: 81-85.
- Belanger R, Dufour N, Caron J & Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science Technology* 5: 41-54.
- Bellone CH, Carrizo de Bellone S & Guerrero O. 1999. Inoculaciones con *Azospirillum brasilense* incrementan el peso seco y la micorrización en frutilla. *Actas II Reunión Científico Técnica- Biología del Suelo- Fijación de Nitrógeno*, pp. 225-257
- Besnard O & Davet P. 1993. Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp. à la fois antagonistes de *Pythium ultimum* et stimulatrices de la croissance des plantes. *Agronomie* 13: 413-421.
- Candela ME, Alcazar MD, Espín A, Egea-Gilabert C & Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- Chet I & Ibar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 48: 37-43.
- Chet I, Ibar J & Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT & Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.
- Elad Y, Chet I & Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.
- Elad Y & Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053.
- Elad Y & Chet I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium damping-off* by bacteria. *Phytopathology* 77: 190-195.
- Ezziyani M, Requena ME, Pérez Sánchez C, Egea Gilabert C & Candela ME. 2003. Mecanismos de biocontrol de la «tristeza» del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. *Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal*.
- Ezziyani M. 2004. Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Murcia: Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Herrera-López J, Pérez-Jiménez M, Llobel A, Monte-Vázquez E & Zea-Bonilla T. 1999. Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 261-265.
- Kim DS, Cook R J & Weller DM. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for Biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
- Lahsen HA, Soler A, Rey M, De la Cruz J, Monte E & Llobel A. 2001. An antifungal Exo- $\alpha$ -glucanase (AGN1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5833-5839
- Leeman M, Van Pelt JA, Den Ouden FM, Heinsbroek M & Bakker AHM. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium* wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 101: 655-664.

- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Transmo A, Woo SL & Di Pietro A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307
- McLeod A, Labuschangne N & Kotzé JM. 1995. Evaluation of *Trichoderma* for biological control of avocado root rot in bark medium artificially infest with *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers Association Yearbook* 18: 32-37
- Ongena M, Daayf F, Jaques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC & Bélanger RR. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology* 49: 523-530.
- Papavizas GC & Lumsden RD. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* 18: 389-413.
- Papavizas GC, Lewis JA & Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- Rey M, González L, Monte E & Llobell A. 2002. Genómica funcional de estirpes antagonistas del género *Trichoderma*. León: Actas del XXV Congreso de la SEBBM, España.
- Sáez D & Cipriano A. 2003. Supervisory predictive control of a combined cycle thermal power plant. In *Thermal Power Plant Simulation and Control* (Flynn D., ed.). New York: Power IEE & Energy, pp 161-178.
- Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C & Candela ME. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817-824.
- Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C, Ezziyyani M & Candela ME. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* treatments on systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* and its relation with capsidiol accumulation. In: *Biocontrol agents: Mode of action and interaction with other means of control* (Elad Y, Stanley F & Monte E, eds.). Sevilla. Publicaciones Universidad de Sevilla, pp. 265-269.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Pérez Sánchez C & Candela ME. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 418-426
- Smith VL, Wilcox WF & Harman GE. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- Sousa S, Rey M, Monte E & Llobell A. 2002. Clonación y análisis de los promotores de dos genes con alta expresión en *Trichoderma harzianum*. León: Actas del XXV Congreso de la SEBBM, España.
- Sztejnberg A, Freeman S, Chet I & Katan J. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 71: 365-369.
- Yang CH & Crowley DE. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 345-351.
- Yedidia I, Benhamou N & Chet I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.

