

EFFECTO DE LA APLICACION DE *Trichoderma harzianum* R. SOBRE LA COMPOSICION CUANTITATIVA DE BACTERIAS, HONGOS Y ACTINOMICETOS DE LA RIZOSFERA DE SOLANACEAS Y SU INFLUENCIA EN EL CRECIMIENTO VEGETATIVO

**C. H. GONZALEZ SALGADO
L. RODRIGUEZ LARRAMENDI
C. ARJONA
A. PUERTAS
M.^A FONSECA**

Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov"
Gaveta Postal 2360. Código postal 85 100. Bayamo. Granma. Cuba

RESUMEN

Se estudió el efecto de *Trichoderma harzianum* R. sobre poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos que viven en la rizosfera de cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y papa (*Solanum tuberosum* Lin.), así como su influencia sobre algunos parámetros del crecimiento vegetativo. En ambos cultivos no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en cuanto al número de bacterias y hongos totales entre la variante tratada y sin tratar con *Trichoderma harzianum* R. Se obtuvieron poblaciones de *Azotobacter* significativamente superiores en la variante tratada, no así para los actinomicetos, donde el número mayor se encontró en la variante sin tratar. En cuanto a la influencia de *T. harzianum* sobre el crecimiento vegetativo, se alcanzaron incrementos significativos para la masa fresca de la planta, la altura y el diámetro del tallo, sólo en el cultivo del tomate.

PALABRAS CLAVE: *Trichoderma harzianum*
Azotobacter
Rizosfera
Lycopersicon esculentum
Solanum tuberosum

INTRODUCCION

La parte del suelo cercana a las raíces y afectada directamente por su actividad se denomina rizosfera, es la zona biológicamente más activa, donde se produce el contacto directo de la planta con el suelo, tienen lugar procesos importantes de la nutrición y actúan todos los factores que ejercen su efecto inmediato sobre las raíces (Mayea, 1989).

Recibido: 9-10-98
Aceptado para su publicación: 20-10-98

Según Fernández y Novo (1988), en la rizosfera habitan microorganismos, tanto beneficiosos, como perjudiciales para la nutrición y la salud de las plantas, por ende, una alteración del equilibrio biológico en esta zona, causada por agentes bióticos o abióticos, debe incidir en su normal desarrollo.

La sustitución de productos químicos en la agricultura por biopreparados para el control de enfermedades producidas por insectos y microorganismos patógenos, es un paso de avance en el establecimiento de una agricultura más ecológica. Sin embargo, se le ha restado importancia al estudio del efecto de los biopreparados, que en su mayoría están constituidos por microorganismos entomopatógenos y antagonistas, sobre la entomo y/o microfauna benéfica de la rizosfera.

El uso de *Trichoderma* spp. para el control de enfermedades fungosas, es hoy día una práctica generalizada en la agricultura cubana. Su empleo se justifica por las relaciones antagonistas que establece fundamentalmente, con los hongos fitopatógenos que viven en el suelo, además de la influencia que ejerce sobre el crecimiento vegetativo de algunas plantas de importancia económica (Windham *et al.*, 1986, Andreú *et al.*, 1992).

Teniendo en cuenta las propiedades antagonistas atribuidas a *Trichoderma harzianum* R. y a la importancia que tiene la comunidad microbiana rizosférica en los procesos nutritivos, bioquímicos y en la resistencia a enfermedades, se estudió el efecto de este biocontrol sobre las poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y papa (*Solanum tuberosum* Lin.), así como su influencia en el crecimiento vegetativo.

MATERIAL Y METODOS

Montaje del experimento

El experimento se realizó en macetas de 25x50 cm, con sustrato procedente del horizonte A de un suelo Fluvisol (cuyas características químicas aparecen en la Tabla 1) perteneciente a la Estación Experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov"; sobre el cual se plantaron tubérculos y posturas de los cultivares Cosmos y Campbell 28 de las especies *Solanum tuberosum* L. y *Lycopersicon esculentum* Mill., respectivamente.

La investigación consistió en el estudio de dos variantes experimentales en cada cultivo. Variante I: tubérculos de papa o posturas de tomate, sumergidos durante 15 min. en una suspensión de título 10^6 conidias de *Trichoderma harzianum* R./ml de agua destilada estéril (INISAV, 1995) y variante II: tubérculos de papa o posturas de tomate tratados durante 15 min. con agua destilada estéril solamente. En cada cultivo se utilizaron nueve macetas por tratamiento; sobre las cuales se plantaron tres plántulas de tomate de 20 días de edad o tres tubérculos de papa, para un total de 27 plantas por tratamiento. Las macetas se distribuyeron mediante un diseño completamente al azar.

TABLA 1
CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL SUELO

Chemical characteristics of the soil

Prof. (cm)	M.O. (%)	O ₂ P ₂ mg/100 g	OK ₂ mg/100 g	PH		Cationes (mEq/100g)				CCB MEq/100 g	CCC MEq/100 g
				H ₂ O	KCL	K	Na	Ca	Mg		
0-15	3,94	33,46	15,33	7,10	6,50	0,24	0,98	20,6	2,58	24,40	24,70

Prof.: Profundidad (*Deep*).

M.O.: Materia orgánica (*Organic material*).

CCB: Capacidad de cambio de bases (*Bases changes capacity*).

CCC: Capacidad de cambio catiónico (*Cationic change capacity*).

Técnica para la cuantificación de los microorganismos

A los 35 días posteriores a la plantación se procedió a la cuantificación de los microorganismos rizosféricos de las especies vegetales estudiadas, para lo cual, se tomaron cinco plantas al azar por tratamiento, se sacudieron cuidadosamente, el suelo superficial se mezcló hasta homogeneizar, se pesaron 10 g de suelo y se trituraron agregándole 20 ml de agua destilada estéril. La solución se vertió en erlermeyers y se le añadieron 70 ml de agua, se agitaron durante 20 min. y se realizaron las diluciones. Se inoculó 1 ml/placa Petri de la dilución 10⁻⁵ sobre los medios de cultivo Ashby, Almidón-Amoniaco, Czapeck y Mandels-Celulosa para determinar el número de colonias de *Azotobacter*, actinomicetos, hongos totales y hongos celulolíticos respectivamente, se vertió 1 ml/placa Petri de la dilución 10⁻⁶ para determinar el número de bacterias totales crecidas sobre Agar-Nutriente. Se incubaron durante 72 h los hongos, 48 h las bacterias y 14 días los actinomicetos a 25 °C.

El número de colonias/placa Petri se multiplicó por la dilución a la cual se inoculó. Se determinó el porcentaje de humedad del suelo (método gravimétrico) y se calculó el número de microorganismos por gramo de suelo seco a través de la siguiente fórmula:

$$\text{N.º de Microorg./g de suelo seco} = \frac{\text{N.º Colonias/trat.} \times \text{1 g de suelo húmedo}}{\text{Cant. de suelo seco en 1 g. de suelo}}$$

Los géneros de hongos se identificaron mediante la clave de Barnett (1960), y se determinó su frecuencia de aparición, considerándose cada placa Petri, como una unidad de estudio. Las diferentes clases de frecuencia fueron: clase 1: incluye los géneros que mostraron 1-20 % de frecuencia; clase 2: 21-40 %; clase 3: 41-60 %; clase 4: 61-80 % y clase 5: 81-100 %.

Evaluaciones fisiológicas

En cada cultivo se evaluó número de hojas, diámetro (mm) y altura (cm) del tallo cada siete días y la masa fresca (g), a los 35 días, de 12 plantas escogidas al azar. El diámetro

del tallo se midió en el punto inferior a la inserción de la primera hoja verdadera, mientras la altura se determinó desde el cuello de la raíz hasta la yema terminal del tallo.

Análisis estadístico

Se utilizó un una prueba de t'Student para analizar estadísticamente las diferencias entre las medias aritméticas de las dos variantes experimentales estudiadas en cada especie vegetal; sobre la base de los indicadores evaluados. Además se realizó una transformación logarítmica (\log_{10}) a los valores procedentes del conteo del número de microorganismos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tanto en la rizosfera de tomate, como en la de papa el número de bacterias no se diferenció significativamente entre las variantes comparadas, aunque la media fue mayor en las variantes tratadas con conidias de *T. harzianum* (Tablas 2 y 3). En la literatura consultada no se reportan efectos antagonicos de *Trichoderma* sp. sobre poblaciones bacterianas.

TABLA 2
NUMERO DE MICROORGANISMOS POR TRATAMIENTO EN TOMATE
Number of microorganisms by treatment in tomato

Organismos	Número de microorganismos por gramo de suelo seco \pm DS	
	Tratadas	Sin tratar
Bacterias	11 800 000 \pm 1 020 000	11 100 000 \pm 3 030 000
<i>Azotobacter</i>	140 000 \pm 14 140	80 000 \pm 14 140*
Actinomicetos	204 000 \pm 16 730	276 100 \pm 32 860*
Hongos	268 000 \pm 15 974	396 000 \pm 11 349
Hongos celulolíticos	252 000 \pm 19 626	440 000 \pm 18 275

* Diferencias significativas para $p \leq 0,05$.
Significative differences for $p \leq 0.05$.

Las poblaciones de *Azotobacter* y *Actinomycetes* en la rizosfera de ambos cultivos se diferenciaron significativamente para las variantes analizadas. Las mayores poblaciones de *Azotobacter* se presentaron en las variantes tratadas (Tablas 2 y 3), donde por el contrario se obtuvieron las menores poblaciones de actinomicetos.

Al parecer *T. harzianum* tuvo un efecto indirecto sobre el aumento de *Azotobacter*, al disminuir significativamente las poblaciones de actinomicetos que tienen un probado efecto antagonico sobre especies azotobacteriáceas. Waksman (1940), Martínez (1986) probaron la acción antibiótica de algunos *Actinomycetes* frente a *Azotobacter* spp. y su acción competitiva por un sustrato común.

TABLA 3
NUMERO DE MICROORGANISMOS POR TRATAMIENTO EN PATATA
Number of microorganisms by treatment in potato

Organismos	Número de microorganismos por gramo de suelo seco \pm DS	
	Tratadas	Sin tratar
Bacterias	10 400 000 \pm 2 029 000	9 200 000 \pm 1 665 000
<i>Azotobacter</i>	184 000 \pm 62 200	148 000 \pm 54 900*
Actinomicetos	220 000 \pm 45 600	330 000 \pm 40 900*
Hongos	270 000 \pm 13 310	420 000 \pm 13 190
Hongos celulolíticos	430 000 \pm 17 460	670 000 \pm 25 980

* Diferencias significativas para $p \leq 0,05$.
Significative differences for $p \leq 0.05$.

Según Martínez (1986) el desarrollo de *Azotobacter* spp. se favorece en suelos donde abundan restos vegetales ricos en celulosa, porque es capaz de asimilar sustancias formadas en el sustrato durante la descomposición de este polisacárido. Por otra parte es conocido el carácter celulolítico atribuido a *Trichoderma* (Shandu, 1985), por lo que puede haber aumentado la disponibilidad de sustancias nutritivas a *Azotobacter* en la variante tratada, incrementando significativamente las azotobacteriáceas.

En ambos cultivos las poblaciones de hongos no reflejaron diferencias significativas en las variantes estudiadas (Tablas 2 y 3); aunque en la variante tratada con el antagonista, disminuyeron las poblaciones fúngicas, lo cual puede estar relacionado con el efecto antagónico demostrado de este microorganismo sobre diferentes géneros fúngicos.

La actividad antagónica de *T. harzianum* como biocontrol de especies de hongos fitopatógenos de importancia agrícola ha sido estudiada extensivamente. Según varios autores (Jeyarajan *et al.*, 1991; Echemendía y Pérez, 1994; Pérez y Echemendía, 1994), *Trichoderma* es un control biológico de algunos hongos fitopatógenos que viven en el suelo y puede ser utilizado en el combate de enfermedades que causan daños a los cultivos económicos de los países tropicales.

En las Tablas 4 y 5, se refleja la frecuencia de aparición de las diferentes especies de hongos que crecieron en los medios de cultivo Czapeck y Mandels-Celulosa. En ambos medios la diversidad de especies fúngicas y su frecuencia de aparición fue mayor en la variante no tratada, lo que puede estar dado por el efecto antagónico menor de *T. harzianum* que debió existir en la variante no tratada donde su frecuencia de aparición no superó el 40 %. Entre las especies determinadas se destacan por su mayor frecuencia de aparición los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Cladosporium* y *Trichoderma*, el cual apareció en ambas variantes.

Al comparar posturas de tomate tratadas con una suspensión de conidias de *T. harzianum* con posturas sin tratar, se obtuvieron incrementos significativos en la altura de las plantas (8-15 %) y el diámetro del tallo (7-12 p. 100) durante todos los muestreos realizados, así como para el número de hojas (11 %) en los últimos muestreos (Fig. 1), siendo los valores; en todos los casos, mayores en las variantes tratadas; lo que se corresponde con los resultados obtenidos por Windham *et al.* (1986) en diversos cultivos; incluyendo el tomate. Similar comportamiento se observó en la masa fresca de las plantas a los 35 días de plantadas (Tabla 6).

TABLA 4

INFLUENCIA DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LAS POBLACIONES FUNGICAS RIZOSFERICAS TOTALES (EN CZAPECK)

Trichoderma harzianum influence on total rhizospheric fungal populations (on Czapeck)

Organismos	Frecuencia			
	Tomate		Patatas	
	Tratado	Sin tratar	Tratado	Sin tratar
Hongo A	20	20	40	0
<i>Aspergillus</i>	40	80	60	60
<i>Fusarium</i>	40	100	40	60
<i>Penicillium</i>	20	80	40	60
<i>Curvularia</i>	20	20	0	40
<i>Cladosporium</i>	20	60	60	60
<i>Stachybotrys</i>	0	40	0	20
<i>Trichoderma</i>	100	20	100	40
Hongo-K	0	40	0	20
Hongo-M	0	0	0	60

Hongos A, K,M: Sin identificar.

Fungi A, K, M: Unidentified.

TABLA 5

INFLUENCIA DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LAS POBLACIONES FUNGICAS RIZOSFERICAS CELULOLITICAS (EN MANDELS-CELULOSA)

Trichoderma harzianum influence on cellulolytic rhizospheric fungal populations (on Mandels-Celulose)

Organismos	Frecuencia			
	Tomate		Patatas	
	Tratado	Sin tratar	Tratado	Sin tratar
Hongo A	60	60	40	20
<i>Aspergillus</i>	40	40	80	20
<i>Fusarium</i>	0	60	0	100
<i>Penicillium</i>	20	80	60	100
<i>Curvularia</i>	0	60	0	80
<i>Cladosporium</i>	20	40	20	0
<i>Trichoderma</i>	100	20	100	20

Hongos A: Sin identificar.

Fungi A: Unidentified.

TABLA 6

MASA FRESCA EN TOMATE A LOS 35 DIAS DE LA PLANTACION

Fresh weight in tomato at 35 days of plantation

Variante	Masa fresca (g) \pm DS	Significación
Tratada	20,10 \pm 3,32	*
Sin tratar	18,62 \pm 2,01	

* Diferencias significativas para $p \leq 0,05$.
Significative differences for $p \leq 0.05$.

El incremento del crecimiento vegetativo en la variante tratada con *T. harzianum* puede haber estado influenciado también, por el aumento de las poblaciones de *Azotobacter*, ya que se ha probado que esta bacteria, además de fijar dinitrógeno atmosférico, es capaz de sintetizar sustancias fisiológicamente activas (Vancura, 1961) que mediante su acción estimulan la germinación de la semilla y aceleran el crecimiento de algunas especies vegetales, siempre que sea adecuada la concentración de *Azotobacter* en la zona de la rizosfera de la planta (Tien *et al.*, 1979, Umail-García *et al.*, 1980). Dibut *et al.* (1990) obtuvieron estimulación del crecimiento de la raíz principal, la altura de la planta, el área foliar e incrementos en la masa seca en plántulas de tomate; mediante *Azotobacter chroococcum*.

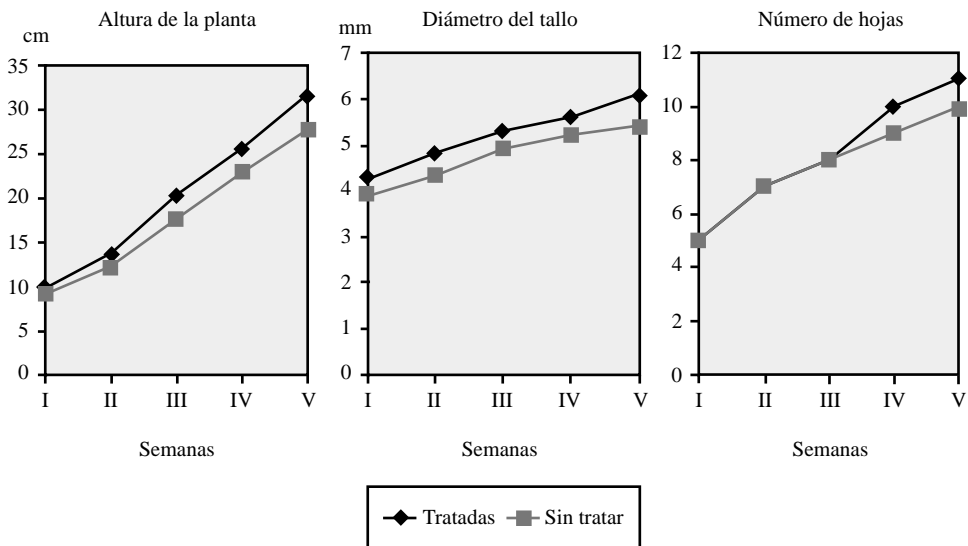


Fig. 1.—Comportamiento de los parámetros del crecimiento en tomate.
Behaviour of growth parameters in tomato.
La longitud de la barra indica el doble del valor de la desviación estándar.
The length of the bar indicates twice the standard deviation.

En el cultivo de la papa, aunque los indicadores del crecimiento evaluados en las plantas tratadas, fueron superiores a las no tratadas (Fig. 2, Tabla 7), no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas, probablemente debido al alto nivel de variabilidad existente en la brotación de las plantas.

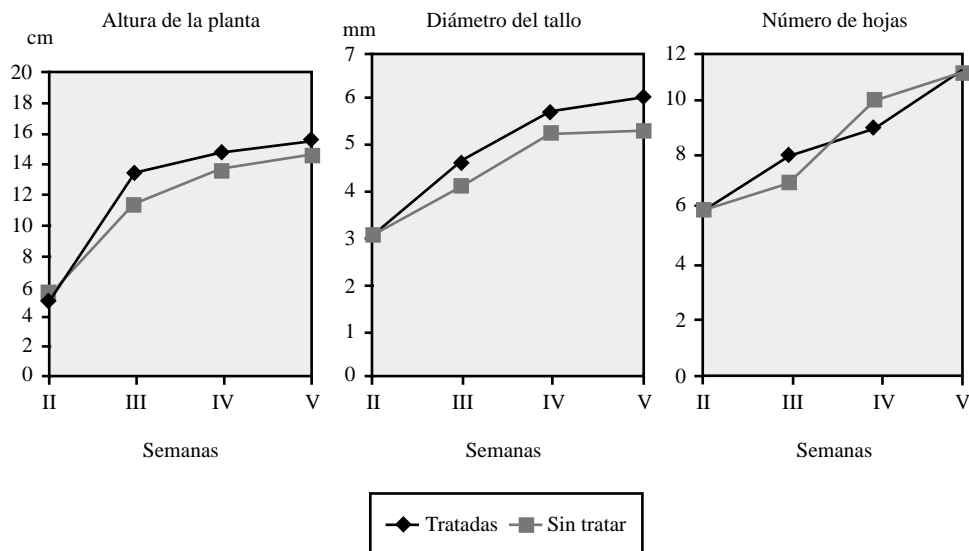


Fig. 2.—Comportamiento de los parámetros del crecimiento en patata.
Behaviour of growth parameters in potato.
La longitud de la barra indica el doble del valor de la desviación estándar.
The length of the bar indicates twice the standard deviation.

TABLA 7
MASA FRESCA EN PATATA A LOS 35 DIAS DE LA PLANTACION
Fresh weight in tomato at 35 days of plantation

Variante	Masa fresca (g) ± DS	Significación
Tratada	12,98 ± 3,17	NS
Sin tratar	12,51 ± 3.51	

* Diferencias significativas para $p \leq 0,05$.
Significative differences for $p \leq 0.05$.

La estimulación del crecimiento observada en las plantas tratadas con suspensiones de conidias de *T. harzianum*, está en correspondencia con lo obtenido por diversos autores (Lindsey y Baker, 1967; Kloepper y Schroth, 1981; Chang *et al.*, 1986), con miembros de

la microflora de la rizosfera del suelo, planteando que tal fenómeno puede atribuirse al control realizado por determinados microorganismos sobre algunos patógenos, a la producción de metabolitos estimuladores del crecimiento vegetativo por parte de éstos, o la acción simultanea de ambos factores.

CONCLUSIONES

La aplicación de *T. harzianum* en la rizosfera de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y papa (*Solanum tuberosum* Lin.) no afectó significativamente ($p \leq 0,05$) la composición cuantitativa de bacterias y hongos rizosféricos, incrementó las poblaciones de *Azotobacter* y disminuyó las de actinomicetos.

T. harzianum influyó significativamente sobre el incremento de la masa fresca, la altura y el diámetro del tallo en plantas de tomate.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis González Núñez y al Lic. Eduardo Velasco Benítez por sus oportunas sugerencias. Al Ing. Alexis Noguera por sus valiosos aportes.

SUMMARY

Effect of *Trichoderma harzianum* R. application on quantitative composition of bacteria, fungi and actinomycetes in the solanaceas rhizosphere and its influence on the vegetative growth

The effect of *Trichoderma harzianum* R. on bacteria, fungi and actinomycetes living in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and potatoes (*Solanum tuberosum* Lin.) crop rhizosphere as well as the influence on some parameters of plant growth were studied. In both crops, not significant differences ($p < 0.05$) in total number of bacteria and fungi between treated and untreated with *T. harzianum* treatment were observed. Significantly, higher populations of *Azotobacter* were observed in the treated variant than in the other one, it was not the same in the actinomycetes, the higher populations were observed in the untreated variant. On the other hand a bio-stimulant effect of *T. harzianum* on plant growth (fresh weight, plant height and stem diameter) only in tomatoes crop was observed.

KEY WORDS: *Trichoderma harzianum*
Azotobacter
Rhizosphere
Lycopersicon esculentum
Solanum tuberosum

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDREU C.M., CUPULL R.S., MAYEA S.S., 1992. Relaciones antagónicas sobre el crecimiento micelial de *Alternaria solani* Soraver, por *Trichoderma* spp. y *Verticillium* spp. Centro Agrícola, 19(2-3):114-116.
BARNETT H.L., 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. Second Edition. Burgess Publishing Company. 225 pp.
CHANG Y.C., BAKER R., KLEIFELD O., CHET I., 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease. 70:145-148.

- DIBUT A.B., MARTINEZ V.R., GONZALEZ P.R., DELGADO J.E., MARTIN R.B., 1990. Evaluación de cepas de *Azotobacter chroococcum* aisladas de suelos de Cuba. I. Actividad estimuladora del crecimiento de plántulas tomate. Ciencias de Agricultura. 40:11-16.
- EHEMENDIA M., PEREZ N., 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* spp. y su posible uso como biocontrol. Programa y Resúmenes IX Seminario Científico. Cultivos Tropicales. INCA. 15(3):53.
- FERNANDEZ C.L., NOVO R.S., 1988. Vida microbiana del suelo. Primera parte. Editorial Pueblo y Educación. 233 pp.
- INSTITUTO NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL (INISAV), 1995. Aspecto sobre la aplicación del bioprepósito *Trichoderma* spp. como biocontrol de hongos fitopatógenos del suelo. Folleto, 4 pp.
- JEYARAJAN R., RAMAKRISHNAN G., RAMAJAMANICKAM B. SANGEETHAS, 1991. Field demonstrations of efficacy of *Trichoderma* as biocontrol agent for root rot diseases of grain legumes and oilseeds. Petria, 1:143.
- KLOEPPER J.W., SCHROTH M.N., 1981. Plant growth promoting. Phytopathology, 71:642-644.
- LINDSEY D.L., BAKER R., 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grows under gnotobiotic conditions. Phytopathology, 57:1262-1263.
- MARTINEZ V.R., 1986. Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Editorial Científico-Técnica. La Habana. 166 pp.
- MAYEA S.S., 1989: Microbiología Agrícola. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 157 pp.
- PEREZ N., EHEMENDIA M., 1994. Efectividad de *Trichoderma* spp. en el control de la mancha púrpura de la cebolla. Programa y resúmenes IX Seminario Científico, Cultivos Tropicales. 15(3):54.
- SHANDU D.K., 1985. Celulose of *Trichoderma longbrachiatum* mutants. Acta Microbiol. Polonica, 34(1-2):33-38.
- TIEN T.M., GASKINGS M.H., HUBBELL M.H., 1979. Plant growth sustances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet. Appl. Environm. Microbiol., 37:1016-1024.
- UMALI-GARCIA M.D., HUBBELL M.H., GASKINGS F.B., DAZZO R.B., 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environm. Microbiol., 39:219-226.
- VANCURA J.R., 1961. Detection of giberellic acid in *Azotobacter* cultures. Nature, 192:89-90.
- WAKSMAN S.A., 1940. *Antagonistic Actinomycetes*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Nueva York. 45:609-614.
- WINDHAM M.T., ELOD Y., BAKER R., 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology. 76:518-521.