

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

Facultad de Agronomía

Área de Hortalizas y Flores

**Control Biológico de *Pyrenochaeta lycopersici* Bajo
Condiciones *in vitro* y de Invernadero Mediante el Uso
de Aislados de *Trichoderma* spp. y Solarización**

Tesis Para Optar al Grado de Licenciado en Agronomía y al Título de
Ingeniero Agrónomo

Por:

Carla Raggi Ansaldo

Profesor Guía: Ximena Besoain Canales

2001

AGRADECIMIENTOS.

A mi profesora guía Sra. Ximena Besoain Canales por sus valiosos consejos y ayuda prestada.

Al personal del Laboratorio de Fitopatología, en especial a la Sra. Gladys Andrade y al Sr. Iván Cortés, quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar aportando con valiosa ayuda en forma desinteresada.

Al Sr. Rodrigo García por su amable colaboración.

A la Sra. Consuelo y Don Carlos, quienes siempre mostraron disposición ante las dudas y problemas expuestos.

A mi familia por su incondicional apoyo.

Al Gobierno Regional y a su programa “Aplicación de Sistema de Financiamiento de Tesis de Interés Regional” por el apoyo dado al presente taller.

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDECYT 1990785.

RESUMEN.

El tomate es una de las hortalizas de cultivo bajo invernadero más importante en Chile, considerando aspectos como superficie de plantación y rentabilidad. Este cultivo, bajo condiciones de invernadero filo se ha visto afectado por la enfermedad raíz corchosa causada por el hongo *Pyrenochaeta lycopersici*, con capacidad de producir grandes pérdidas económicas en este cultivo. No existe un control curativo eficiente para la enfermedad, pero sí un control preventivo que consiste en aplicaciones regulares de bromuro de medio al suelo en preplantación. Dado que este fumigante será prohibido a partir del año 2005 para los países industrializados y 2015 para los países en vías de desarrollo, es necesario buscar otra alternativa de control para esta enfermedad, ante lo cual el control biológico aparece como una alternativa interesante de evaluar. En varios estudios se ha comprobado la acción antagónica que ejerce *Trichoderma* sp. sobre numerosas enfermedades. En el presente ensayo se analizó *in vitro* los rangos óptimos de temperatura, salinidad y pH para distintas cepas de *Trichoderma* sp. y *Pyrenochaeta lycopersici*, la producción de metabolitos volátiles y difusibles de las cepas de *Trichoderma* y el control biológico bajo condiciones controladas de invernadero del efecto de *Trichoderma* (cepa TH 11 y TH 291) sobre la enfermedad raíz corchosa. El desarrollo óptimo bajo condiciones *in vitro* de *Trichoderma* se produjo entre los 25-30°C, pH 5.5-6,0 y 0 mM de Na Cl; *Pyrenochaeta* no se vio afectada significativamente por la variación del pH ni de la salinidad, pero su óptimo de temperatura se ubicó entre los 25-30°C. Todas las cepas de *Trichoderma* produjeron metabolitos volátiles, mientras que sólo dos (TH 291 y T 34) demostraron producir metabolitos difusibles. En invernadero se evaluó el efecto de dos cepas de *Trichoderma*, de la solarización y de la acidificación del suelo en el control de la enfermedad. *Trichoderma* no demostró tener

un efecto significativo sobre el control de la enfermedad, probablemente debido a las bajas temperaturas invernales o fallas en el proceso de inoculación. La acidificación resultó ser excesiva (pH 5,3), por lo que perjudicó las plantas de tomate, la solarización en cambio demostró eficiencia en el control de la enfermedad.

1 INTRODUCCIÓN.

La enfermedad raíz corchosa de tomate (corky root) ocasionada por *Pyrenochaeta lycopersici* (Gerlach & Schneider) ha sido uno de los problemas más graves que afectan a los agricultores de este cultivo, ocasionando severos daños económicos. No existe un control curativo efectivo para la enfermedad, sino más bien un control preventivo, basado en el uso de bromuro de metilo más cloropicrina.

Pese a su alta toxicidad, el bromuro de metilo no es 100% efectivo en el control de enfermedades del tomate como hongos del género *Fusarium*, *Verticillium* y *Pyrenochaeta lycopersici* (ARAYA, 1991), ya sea por fallas en la aplicación (como temperaturas bajas e insuficiente humedad del suelo)¹, por una recolonización del suelo desde las capas más profundas que no han sido afectadas por el fumigante o a través del agua de riego y herramientas de labranza.

Hoy, en Chile, como control preventivo, se fumiga el suelo con bromuro de metilo y cloropicrina en aplicaciones de preplantación. Esto no es 100% efectivo, ya que se produce reinfestación por éste y otros patógenos en un suelo estéril sin bioantagonistas. Por razones medioambientales, el bromuro de metilo será prohibido dentro de los próximos años, en el 2005 para los países desarrollados, y en el 2015 para los países no industrializados (TELLO, 1997) por lo que se hace necesario buscar una alternativa de control efectiva y sustentable en el tiempo.

Actualmente, se cultivan más de 7.300 ha de tomates para consumo fresco, según el último Censo Agropecuario de 1997, cerca de 1.100 há se realizan en invernadero y alrededor del 70% de éstos se cultiva en la provincia de Quillota (INDAP, 1998), abasteciendo gran parte del mercado nacional.

¹ DUIMOVIC, A. 1998. Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Comunicación personal.

El empleo del bromuro de metilo está siendo restringido mundialmente por el daño que provoca a la capa de ozono. El 80% del bromuro de metilo se emplea en la esterilización del suelo y aproximadamente casi la mitad del producto es emitido hacia la atmósfera. Además, debe tenerse en cuenta que ésta es una neurotoxina que puede dañar severamente el sistema nervioso central (CRUZ Y CISTERNA, 1998).

El control biológico aparece como una alternativa para sustituir el bromuro de metilo, ya que presenta mayor selectividad y es menos contaminante. Muchas veces, este sistema es mas caro de usar que un pesticida químico, pero existen instancias en que el control biológico aparece como una alternativa interesante de evaluar, como es el caso de reemplazo de pesticidas prohibidos por normas reguladoras para los cuales no existe sustituto químico adecuado; por ejemplo, el bromuro de metilo; reemplazo o disminución del uso de agroquímicos en ambientes sensibles y aplicaciones orgánicas (HARMAN, 2000).

Se ha observado que *Trichoderma* spp. es un eficiente bioantagonista para el control de raíz corchosa del tomate, causada por *Pyrenochaeta lycopersici*. PARDO (1999) obtuvo resultados promisorios utilizando la cepa TH 11, pero sólo al evaluar peso seco de raíz y parte aérea de la planta.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto, tanto *in vitro* como bajo condiciones controladas de invernadero, de distintos aislados de *Trichoderma* y de la solarización para el control de “raíz corchosa del tomate” causada por *Pyrenochaeta lycopersici*.

Además, se considera la caracterización *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* y *Pyrenochaeta* sobre los factores pH, salinidad y temperatura. En el caso de las cepas de *Trichoderma* evaluar, además, la producción de metabolitos volátiles y difusibles.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 La enfermedad.

El agente causal de la enfermedad es *Pyrenochaeta lycopersici* (Schneider & Gerlach). Es un parásito ecológicamente obligado y pobre competidor saprofítico (SHISHKOFF y CAMPBELL, 1990). Se encuentra asociada a otro patógeno que actúa en forma secundaria, *Colletotrichum coccodes*.

2.2 Distribución de *Pyrenochaeta lycopersici*.

Pyrenochaeta lycopersici fue observada por primera vez en Inglaterra en el año 1929. Según FARR *et al.* (1989), se encuentra distribuida en Estados Unidos, Europa, Nueva Zelanda. También se ha reportado su existencia en Chile (OLAVARRÍA, 1991), España, California (CLERJEAU, 1974). Inglaterra, Canadá, Libano (SHISHKOFF).

2.3 Clasificación.

Pyrenochaeta lycopersici pertenece al orden Sphaeropsidales, clase Deuteromycetes, subdivisión Coelomycetes, y corresponde a los hongos cuya fase sexual no se conoce o no se ha descubierto (SUTTON, 1988). No se ha observado la presencia de estructuras sexuales, se reproduce a través de esporas asexuales que se forman en picnidios. Estos son oscuros, setosos, inmersos en un micelio con un solo ostíolo que presenta una masa de esporas visibles (SHISHKOFF).

2.4 Identificación del patógeno

El agente causal de la raíz corchosa del tomate fue conocido como el hongo gris estéril ((3SF), hasta que, en 1966, se logró su esporulación. siendo clasificado como *Pyrenochaeta lycopersici* (Schneider & Gerlach). Es un hongo de lento crecimiento y difícil de aislar consistentemente, debido a la presencia de hongos saprófitos (GROVE y CAMPBELL, 1987).

Existen dos métodos para la identificación de este hongo:

El método CLERJEAU (1974) o melón - cotiledón que consiste en germinar, bajo condiciones asépticas, semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) o melón (*Cucumis melo* L.) en placas petri sobre un papel filtro, las que son inoculadas con discos de micelio de 5 mm de diámetro provenientes del borde de las colonias que están creciendo en PDA. Las placas se incuban a 18°C. Se produce mayor cantidad de picnidios en melón que en tomate (CAMPBELL, SCHWEERS y HALL, 1982).

El método de McGRATH y CAMPBELL (1983) consiste en colocar micelio en agar agua e incubar durante 3 días a 22°C en oscuridad; luego, el micelio se transfiere a agar jugo V-8 de doble concentración, y se mantiene por 30 días a 18°C con un fotoperíodo de 18 hrs. La identificación se logra basándose en las características de picnidios, conidias y conidióforos.

2.5 Síntomas de la enfermedad.

Las plantas infectadas muestran, poco desarrollo y falta de vigor en una primera etapa. Después de formados los frutos, las plantas comienzan a secarse desde los puntos de crecimiento. La aparición de bandas corchosas alrededor de la raíz representa un síntoma típico de esta enfermedad. La lesión comienza a hincharse formando grietas dándole a la raíz un aspecto corchoso. El cuello y la base del tallo pueden tomar una coloración marrón y podrirse (BLANCARD, 1996).

2.6 Diseminación y sobrevivencia

La enfermedad se disemina por las aguas de riego, las labores de cultivo y al trasladar almácigos infectados y sobrevive por largo tiempo como microesclerocios en el suelo o asociado a hospederos donde no causa enfermedad, sino solamente sobrevive (BLANCARD, 1996). Hospederos alternativos de *Pyrenochaeta lycopersici* son melón, lechuga. Berenjena, judía, pepino y algunas malezas (BLANCARD, 1996). GROVE y CAMPBELL (1987), determinaron, además, calabaza. *Datura stramonium*, espinaca y maravilla.

2.7 Condiciones para el desarrollo de la enfermedad.

Esta enfermedad incrementa su severidad en las áreas donde se cultivan tomates en forma continua. La enfermedad es más severa cuando la temperatura del suelo es fresca y existe una alta humedad en él (BLANCARD, 1996).

Existen varios tipos de razas cuyos óptimos térmicos varían en función de su origen. Las norte-europeas tienen su óptimo alrededor de los 15-20°C, mientras que las razas originarias de la cuenca mediterránea (Túnez, Líbano), son todavía patógenas a temperaturas del orden de 26-30°C (BLANCARD, 1996).

TERMOHLEN (1962) sostiene que la temperatura óptima para el crecimiento del hongo bajo condiciones *in vitro* es de aproximadamente 26°C, la temperatura mínima es de 8°C y la máxima de aproximadamente 32°C. Pero afirma que la temperatura óptima del suelo para la infección se encuentra entre los 15-20°C; sobre los 20°C, la severidad de la enfermedad decrece a medida que aumenta la temperatura.

El mismo autor señala que el punto térmico letal, bajo condiciones *in vitro*, para *Pyrenochaeta* se encuentra entre los 40 y 50°C.

En cuanto al pH, experimentos *in vitro* sugieren que se forma mayor cantidad de microsclerocios a pH neutro o ligeramente alcalino que en condiciones de acidez. Las lesiones también fueron más severas en los pH 7,0 y 9,0 que en los más ácidos (BALL, 1979).

POLLEY (1985) evaluó las pérdidas ocasionadas en tres tipos de suelo, arena, turba y arcilla. Al final de la temporada, el mayor detrimento se presentó en plantas sobre suelo arenoso, seguido por turba y por arcilla donde se produjeron las menores pérdidas.

La enfermedad también es más severa cuando los contenidos de nitrógeno en los tejidos del tomate y en suelo son mayores, y cuando el potencial de mineralización del nitrógeno es bajo (WORKNEH *et al.*, 1993).

POLLEY (1985) determinó que el crecimiento de las plantas de tomate se reduce en 1,4% por cada 1% de aumento de la enfermedad a las ocho semanas después de plantar, mientras que el número de frutos lo hace en 0,2% por cada 1% de incremento de la enfermedad.

2.8 Control de la enfermedad.

No existe, durante el cultivo, método eficaz para eliminar el patógeno presente en las raíces de las plantas sin alterarlas, pero éstas pueden aporcarse para favorecer la emisión de nuevas raíces (BLANCARD, 1996).

2.8.1 Control químico

El método más efectivo hasta ahora es la fumigación del suelo con bromuro de metilo (98%) más cloropicrina (2%) (BLANCARD, 1996).

Sin embargo, DUIMOVIC (1991) determinó que la proporción de bromuro de metilo y cloropicrina en la que las plantas de tomate producen un mayor rendimiento es de 75 y 25%, respectivamente.

LIRA (1989) indica que la mezcla bromuro de metilo cloropicrina, se puede preparar sin problemas hasta con un 75% de cloropicrina.

Estas mezclas deben aplicarse en cantidades que pueden llegar hasta los 1.600 Kg/há en suelos muy arcillosos y de 400 a 600 kg/há en otros tipos de suelos (LIRA, 1989).

Pero en la cuarta reunión del Protocolo de Montreal, celebrada en Copenhague en 1992, el bromuro de metilo fue incluido como una de las sustancias destructoras de la capa de ozono, razón por la cual se determinó su prohibición. Provoca una reducción del Ozono (O_3), produciendo oxígeno (O_2) y óxido de bromo (BrO), el cual se vuelve a combinar originando nuevamente bromuro de metilo ($Br CH_3$), por lo que el compuesto tiene una vida media de dos años en la atmósfera (TELLO, 1997).

Se ha propuesto como posible sustituto químico al bromuro de metilo, el yoduro de metilo como alternativa para la fumigación del suelo. Este fumigante es rápidamente destruido por la luz UV, por lo que no representa una amenaza para la capa de ozono y se ha observado que tiene resultados parecidos al del bromuro de metilo en el control de numerosas enfermedades y malezas (OHR *et al* 1996).

Ensayos con calcionamida demostraron que su acción contra *Pyrenochaeta lycopersici* se ve potenciada cuando se usa junto con la solarización (FIUME y PARISI, 1995).

2.8.2 Uso de variedades o portainjertos resistentes

INRA (1982) sostiene que algunos híbridos obtenidos por establecimientos de mejoramiento privados resistentes a raíz corchosa se han observado en suelos

contaminados por *Pyrenochaeta*. Señala que esta resistencia proviene de *Lycopersico glandulosum* o *Lycopersicon chilense*.

Para el caso de *L. chilense*, el estudio de las relaciones genéticas entre la resistencia monogenética parcial proveniente de “Plovdiv CR1” (introducido por cruza con “Monalbo”) y la resistencia conferida por el gen *pyl* llevan a la conclusión de que las dos resistencias son controladas por el mismo ovario de alelos situados en el locus *pyl*.

DAVET (1976) empleó en sus ensayos distintos híbridos de tomate provenientes de la estación de mejoramiento INRA: *L. esculentum* var. *cerasiforme* (Espalier); mohecer, cruzamiento de *L. esculentum* var. *cerasiforme* por *L. esculentum* Monalbo; *L. hirsutum* var. *grabratum*; Mobohir 1, cruzamiento de *L. hirsutum* var. *glabratum* con *L. esculentum* Monalbo, F1 Pannevis O2126 K, con resistencia procedente de *L. glandulosum*. Obtuvo como resultado que *L. hirsutum* posee un alto grado de resistencia que transfiere a las variedades que origina. Los híbridos provenientes de *L. glandulosum* también presentan una alta tolerancia, pero se caracterizan por un bajo desarrollo del sistema radical.

Hoy en día, el uso de injertos sobre variedades resistentes es otra alternativa vigente, al uso del bromuro de metilo, tales como KNVF o Hires o utilizar híbridos resistentes (BLANCARD, 1996). Esta resistencia es transferida por el gen “*pyl*” transferido desde *Lycopersicon glandulosum* (BLANCARD, 1996)

GRANGES y LEGER (1996) hicieron ensayos con portainjertos de tomates KNVFFr (resistentes a *Pyrenochaeta lycopersici* (K), *Meloidogyne* spp. (N), *Verticillium dahliae* (V), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (F), *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Fr). En suelo fuertemente infestado con *Pyrenochaeta* mejora el rendimiento en un 50%.

Otros portainjertos disponibles en el mercado con resistencia o tolerancia a *Pyrenochaeta lycopersici* son: BSR1677557 Fl, BSR1677674 Fl, Joint, Beaufort, Vigomax, PG 99. He Man, Robusta, RS 1427, Kindia Fl y Energy Fl (L' Informatore Agrario, 1999).

Los portainjertos tipo KNVF son híbridos entre *Lycopersicon hirsutum* y *Lycopersicon esculentum* y presentan una mayor resistencia a *Pyrenochaeta* que las variedades tipo

“tomate”, como lo son Energy y Kyndia, que tienen casi nula resistencia a la enfermedad, casi similar a los testigos (MONA, 1997; MAZOLIER, 1999).

Portainjertos del tipo KNVF son: KNVF, Royal Sluis y Hires. Portainjertos del tipo tomate son Beaufort, Brigeor y He Man (MAZZOLIER, 1999).

2.8.3 Solarización.

En países mediterráneos, se han observado espectaculares resultados utilizando la solarización para el control de *Pyrenochaeta*. Debe recubrirse el suelo, bien preparado y humedecido, con una película de polietileno de 25 a 40 micras de espesor, manteniéndolo durante un mes en un periodo muy soleado del año (BLANCARD, 1996).

FIUME y PARISI (1995) obtuvieron buenos resultados en el control de raíz corchosa cuando complementaron la solarización con calcionamida o dazomet, siendo más eficaz la calcionamida.

En Chile, se han realizado algunos ensayos- de solarización como método de control de esta enfermedad. MONTEALEGRE, FUENTES y HENRÍQUEZ (1996) trabajaron en la localidad de Olmué, donde sometieron a solarización un suelo durante 40 días, alcanzando temperaturas entre 38 y 45°C, logrando una eficacia satisfactoria sólo hasta los 10 cm de profundidad, con un control del 80%, siendo, la solarización, ineficiente a los 30 cm de profundidad, ya que el mayor calentamiento se produce en los primeros 10 cm del suelo, aunque, por otro lado, CASTRO (1991) observó que la mayor densidad de *Pyrenochaeta lycopersici* se encuentra en los primeros 10 cm.

2.8.4 Control biológico

En experimentos de invernadero, se observó que raíz corchosa de tomates es menos severa en huertas orgánicas que en huertas convencionales. Cuando el suelo se esterilizó mediante radiación gamma, la severidad aumentó considerablemente en los suelos bajo producción orgánica, lo que indica que existe una supresión biológica de la enfermedad que puede llegar a ser muy alta (WORKNEH y VAN BRUGGEN, 1994)

OPAZO (1997), en una búsqueda de potenciales biocontroladores para *Pyrenochaeta lycopersici*, recolectó numerosas cepas correspondientes al género *Trichoderma*, entre las cuales se encontraban *T. koningii* Rifai y *T. harzianum*. Determinó que las cepas más promisorias eran las de *T. harzianum*.

2.9 Antecedentes en Chile de la enfermedad

OLAVARRÍA (1991) detectó la enfermedad de raíz corchosa por primera vez en Chile e identificó su agente causal como *Pyrenochaeta lycopersici*.

En Chile, la enfermedad sólo se ha detectado en tomates cultivados en invernaderos fríos de la V Región cercanos a Quillota y La Calera. En nuestro país, esta enfermedad se presenta como endémica (APABLAZA. 2000).

ARAYA (1994) determinó que *Pyrenochaeta lycopersici* está presente en todos los suelos destinados al cultivo de tomate bajo invernadero, hayan sido fumigados o no con bromuro de metilo.

2.10 Antecedentes sobre *Trichoderma*.

2.10.1 Clasificación.

Trichoderma pertenece a la clase Deuteromycetes, Subclase Hyphomycetidae, Orden Moniliales, Familia Moniliaceas (ALEXOPOULUS. 1979).

El género se caracteriza por presentar colonias hialinas con presencia de conidióforos ramificados que terminan en un pequeño penacho divergente con forma de botella, denominado fiálide. Los conidióforos pueden terminar en un apéndice estéril con una única fiálide o como en algunas especies en varias ramificaciones laterales. Las conidias pueden ser hialinas, aunque usualmente son verdes y con paredes rugosas a lisas (DOMSCH, GAMS y ANDERSON, 1980).

En estudios sobre las propiedades antagónicas de *Trichoderma*, se ha observado que su hifa rodea o invade las hifas de algunos hongos, produciéndose un fenómeno de micoparasitismo (DOMSH, GAMS y ANDERSON, 1980).

2.10.2 Condiciones para el desarrollo y crecimiento de *Trichoderma*.

En ensayos de laboratorio, HADAR, HARMAN y TAYLOR (1984) obtuvieron que la temperatura óptima de crecimiento para *Trichoderma*, bajo condiciones *in vitro* resultó ser de entre 25 – 30°C, mientras que el pH óptimo para su desarrollo fue de 4,5, siendo más lento a los pH extremos de 2 y 8.

2.10.3 Antecedentes de *Trichoderma* como controlador biológico.

Numerosos autores han determinado que *Trichoderma* posee grandes propiedades antagónicas contra numerosas enfermedades, como *Rhizoctonia solani* (HADAR, CHET y HENIS. 1979), *Pytium* (HADAR, HARMAN, y TAYLOR, 1984), *Phytophthora* (CRUZ y CISTERNA, 1998), *Botrytis* (ELAD *et al.* 1983) y otras (KRAFT y PAPAVIDAS, 1983).

BELL, WELLS y MARKHARM (1982) observaron que algunos aislados de *Trichoderma* eran altamente efectivos contra un aislado de un patógeno, pero que puede tener un mínimo efecto en otro aislado de la misma especie. Esto fue especialmente evidente en *Rhizoctonia solani*.

2.10.4 Mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum*

Los siguientes son los mecanismos mediante los cuales *Trichoderma harzianum* ejerce su acción de control biológico sobre diversos fitopatógenos.

Micoparasitismo.

Se ha visto que *Trichoderma* es capaz de crecer degradando las paredes de *Rhizoctonia solani* cuando ésta es la única fuente de carbono (HADAR *et al.*, 1999), aunque el ataque es más eficiente en presencia de glucosa en el medio.

Las hifas de *Trichoderma* se unen a las hifas del patógeno y deshacen la pared celular de éste, mediante actividad enzimática. ELAD, CHET, BOYLE y HENIS (1983) observaron que las hifas, tanto de *Trichoderma harzianum* como de *Trichoderma hamotum* se enrollan alrededor de las hifas del hospedero penetrando al interior del micelio de éste, digiriendo la pared, celular formando un orificio; es así como al agregar ciclohexamida se anula el efecto del micoparasitismo por inhibición de la producción de enzimas. Por otro lado, con anterioridad, HADAR, CHET y HENIS (1979) detectaron la producción, en cepas de *Trichoderma harzianum*, de las enzimas β -(1-3) glucanasa y β -(1-3) quitinasa, capaces de degradar la pared celular de *Rhizoctonia solani*.

Está establecido que *Trichoderma* produce, al menos, tres enzimas celulolíticas:

- Endo- β -1, 4-glucanasa, comúnmente llamada CMC-asa: hidroliza las cadenas de celulosa atacando los polímeros internamente.
- Exo- β -1, 4-glucanasa o comúnmente llamada avicelasa: actúa sobre la célula removiendo unidades de glucosa o celobiosa a partir de extremidades no reducidas de la cadena.
- β -1, 4-glucosidasa, comúnmente llamada celobiasa: hidroliza celobiasa y otras cadenas de glucosa (MELO, 1991).

Antibiosis.

Se han identificado 43 sustancias con actividad antibiótica producidas por *Trichoderma spp.* Algunas son alkyl pyronas, isonitrilos, poliketidos, “peptaibols”, diketopiperazinas, sesquiterpenos y esteroides (HARMAN, 2000).

VANACHTER, VAN WAMBAKE y VAN ASSCHE (1988) investigaron la acción de varias especies de *Trichoderma* y observaron que todas ellas producían sustancias antagónicas que reducían el crecimiento del patógeno

SIMON *et al.* (1988) aislaron compuestos pirónicos en ensayos con *Trichoderma*. Se descubrió una sustancia producida por *Trichoderma*, 6-n-pentyl-2H-pyran-2-ona y 6-n-pentenyl-2H-pyran-2-ona, con marcado olor a coco, la cual tiene una eficiente actividad biológica contra varios patógenos (GUISALBERTI y SIVASITHAMPARAM, 1991)

Los mismos autores señalan que las cepas de *Trichoderma harzianum* también producen otros pentaquetidos y octaquetidos.

CLYDON *et al.* (1987) identificaron un nuevo compuesto producido por *T. harzianum*, 5,6-dimetoxi-4-hidroxi-3-(2-metil-1 hexo-4-enyl)-2-piridona, que fue bautizada como harzianopiridona, capaz de inhibir el crecimiento de una serie de hongos fitopatógenos.

Trichoderma también puede producir etanol, acetaldehído, etileno, acetona y CO₂ (MELO, 1991).

Sin embargo, VANACHTER (1988) señala que la producción de sustancias antagónicas varía de una cepa a otra, y también varía la sensibilidad del patógeno a estas sustancias.

Competencia por nutrientes y espacio.

Se considera un mecanismo clásico de acción de *Trichoderma* spp., aunque muchas veces se asume, al no encontrarse evidencia de otro mecanismo de acción como parasitismo o antibiosis (HARMAN, 2000).

BADHAM (1991) señala que en el cultivo comercial del hongo *Lentitus edodes*, *Trichoderma harzianum* representa un enorme problema económico, ya que compete fuertemente con el cultivo disminuyendo en forma significativa su rendimiento.

Tolerancia al stress a través de un mejoramiento radical y del desarrollo de la planta.

Este es un mecanismo que recientemente está ganando creencia. Se trata de una mayor tolerancia al stress por parte de la planta a través de un mejoramiento radical y

desarrollo de la planta, lo que probablemente induce tolerancia a las enfermedades (HARMAN, 2000).

Resistencia inducida.

Se ha observado la habilidad de ciertas sustancias producidas por *Trichoderma*, como xilanasa, para inducir resistencia por parte de la planta (HARMAN, 2000). WINDHAM, ELAD y BAKER (1986) descubrieron que hay un aumento importante en el crecimiento de plantas de tomate y de tabaco creciendo en suelo autoclavado e inoculado con *Trichoderma harzianum*, esto probablemente debido a que la cepa utilizada produce ciertos metabolitos reguladores del crecimiento lo que aumenta la tasa de germinación de las semillas y el peso seco de los brotes y los tallos.

Solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos de las plantas.

En el suelo, muchos nutrientes sufren complejas transformaciones de formas solubles a insolubles, que afectan la absorción por parte de la planta. Los microorganismos pueden influir fuertemente en estas transformaciones. *Pseudomonas* spp. produce compuestos (sideróforos) con alta afinidad por el hierro, formando quelatos de hierro que quedan indisponibles para los patógenos, pero pudiendo ser absorbidos por las plantas. Muchos patógenos pueden también oxidar el manganeso tomándolo insoluble e indisponible para el crecimiento de las plantas y mermando su resistencia a enfermedades.

Se ha visto, entre las habilidades de la cepa de *Trichoderma harzianum* T-22, la habilidad de aumentar la eficiencia de utilización del nitrógeno del suelo, esta cepa puede solubilizar además, roca fosfórica, Zn, Mb^{+4} , Fe^{+3} y Cu^{+2} (HARMAN, 2000).

Inactivación de las enzimas del patógeno.

En algunas cepas de *Trichoderma*, se ha detectado la producción de serina proteasa que es capaz de digerir la pared celular de los patógenos degradando las enzimas de éste (ELAD y KAPAT, 1999).

Es muy probable que existan otros mecanismos de acción que aún no hayan sido descubiertos (HARMAN, 2000).

2.10.5 Productos comerciales elaborados a base de *Trichoderma*.

Trichodex 25% WP.

Fungicida biológico patentado por el Volcani Center, Israel, y posteriormente distribuido en Chile por Abbott Laboratories de Chile Ltda. y Agrevo de Chile SA. Formulado como polvo mojable al 25%, es producto de procesos de fermentación de *Trichoderma harzianum*, cepa T₃₉ y tiene como ingrediente activo las esporas del hongo. Fue formulado para el control de *Batrytis cinerea*, pero *Trichoderma harzianum* controla, además, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Alternaria* y *Chondrostereum purpureum*, entre otros (ABBOTT LABORATORIES DE CHILE LTDA., 1997).

3 MATERIALES Y MÉTODO.

Los ensayos se ubicaron en el Laboratorio e Invernadero de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso. Parte del material de *Pyrenochaeta* y *Trichoderma* se obtuvo de la colección de hongos correspondiente al referido Laboratorio. El suelo naturalmente infestado utilizado en los ensayos se obtuvo de la parcela perteneciente al Sr. Juan Carlos Arancibia, ubicada en la localidad de Santa Olivia, Quillota.

Para evaluar el efecto *in vitro* de *Trichoderma* sobre *Pyrenochaeta*, se trabajó mediante el método de los cultivos duales. Para evaluar la parte *in vivo*, se realizó un ensayo en invernadero, inoculando las plantas con suelo naturalmente infectado con *Pyrenochaeta* e inoculación de *Trichoderma* en forma de pellets.

3.1 Cultivos duales *Trichoderma* - *Pyrenochaeta*.

Se evaluó la inhibición del micelio de *Pyrenochaeta* por parte de *Trichoderma*, bajo condiciones *in vitro*, se hizo mediante el método de los cultivos duales, para lo cual se contrastaron 14 cepas de *Trichoderma*, TH V, TH 11, TH 12, TH 15, TH 16, TH 21, TH 22, TH 23, TH 24, TH 32, T 33, T 34, TH 385 y TH 291 contra 5 cepas de *Pyrenochaeta* (240, 242, 243, 245, 409). La cepa T 33 correspondió a *Trichoderma piluliferum* y la cepa T 34, a *Trichoderma polysporum*, las cuales, junto con TH 32 fueron facilitadas por Prof Jaime Montealegre, de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Chile. El resto de las cepas correspondió a *Trichoderma harzianum* pertenecientes a colecciones del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

La metodología empleada en cultivos duales fue la siguiente:

Con un sacabocado de 5 mm de diámetro, se obtuvieron trozos circulares de micelio de las cepas de ambos microorganismos.

En placas petri con medio PDA, se colocó a un lado de la placa un trozo de micelio de *Pyrenochaeta* y en el lado opuesto, se colocó un trozo de micelio de *Trichoderma*, ambos equidistantes del centro (ver Figura 1). Para cada cepa de *Pyrenochaeta*, se lucieron tres repeticiones cultivándola con cada una de las cepas de *Trichoderma* y consigo misma (testigo). Al cabo de seis días, se evaluó el crecimiento de *Pyrenochaeta* calculando el porcentaje de inhibición obtenido en presencia de las distintas cepas de *Trichoderma* mediante la fórmula:

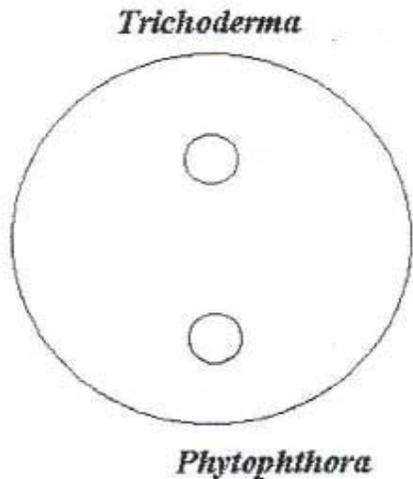
% Inhibición = 100- porcentaje de control

$$\% \text{ de control} = \frac{\text{área de crecimiento colonias}}{\text{área crecimiento testigo}} * 100$$

Para esto, fue necesario calcular la superficie de las colonias de *Pyrenochaeta*, las que se obtuvieron usando la fórmula de una elipse:

$$\text{área colonia} = \pi \frac{\text{diámetro menor} * \text{diámetro mayor}}{4}$$

Figura 1. Esquema de cultivos duales *Trichoderma* - *Pyrenochaeta*



3.2 Evaluación del rango óptimo de salinidad.

El rango óptimo de salinidad se evaluó sembrando las cepas de *Trichoderma* y *Pyrenochaeta* en PDA ajustado a distintas concentraciones de sales, en rangos de 0 a 250 mM de NaCl con intervalos de 50 mM y usando tres repeticiones para cada cepa. Se midió el largo y ancho de cada colonia, y se calculó la superficie usando la fórmula de una elipse. Aquella concentración donde se encontró el mayor crecimiento, correspondió al rango óptimo; aquella concentración inmediatamente anterior a la concentración donde no existió crecimiento correspondió a la tolerancia máxima para la cepa.

3.3 Evaluación del rango óptimo de pH.

Se sembraron las distintas cepas de *Trichoderma* y *Pyrenochaeta* en PDA ajustado a distintos pH con KOH y HCl, después de autoclavar, en rangos de 5,5 a 8,5 con intervalos de 0,5, empleándose tres repeticiones por cada una de las cepas. Se evaluó el pH óptimo (donde se produjo el mayor crecimiento), el pH de tolerancia máximo, que es el inmediatamente inferior a aquél donde no se detecta crecimiento, y el pH de tolerancia mínimo, pH inmediatamente superior a aquél donde no se detecta crecimiento.

3.4 Elaboración de pellets de alginado de sodio.

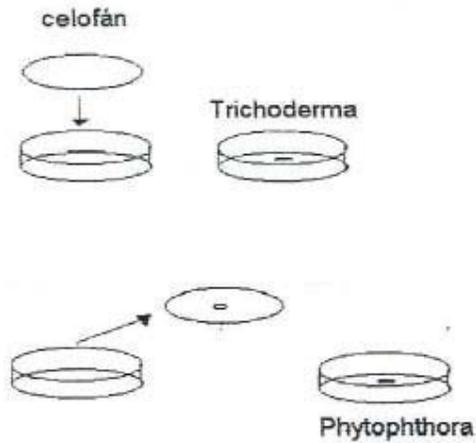
Para la elaboración de los pellets se utilizó la técnica usada por MONTEALEGRE y LARENAS (1995), con algunas modificaciones. En una juguera se mezcló 150 ml de agua destilada, 1 g de alginato de sodio, 98 g de harina de trigo, 20 g de micelio húmedo de *Trichoderma* y 250 ml de cloruro de calcio 3% p/v. Una vez diluido el micelio húmedo, se traspasó gota a gota a una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) mediante el uso de un embudo con su salida modificada para obtener el tamaño de gota adecuado, las que reaccionaron con el cloruro de calcio originando los pellets. Los gránulos se secaron en estufa de aire forzado a 30°C, durante diez horas.

El micelio húmedo se obtuvo cultivando cada cepa de *Trichoderma* en PDA por cinco días a 25°C. Luego, se sacaron 10 trozos de micelio, los que se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con una solución estéril de 250 ml de jugo de 250 g de papas cocidas en 250 ml de agua, 12,5 g de glucosa y 30 g de harina de maíz. El micelio se dejó crecer por 15 días a 30°C.

3.5 Evaluación de metabolitos difusibles.

Para evaluar la presencia de metabolitos difusibles en cepas de *Trichoderma*, se utilizaron discos de papel celofán del mismo diámetro de las placas petri, los que se colocaron sobre PDA. Discos de micelio de 5 mm de diámetro provenientes de cultivos jóvenes de *Trichoderma* que aún no esporulaban, se pusieron al centro de cada placa y se incubaron a 18°C durante 48 hrs, tiempo y temperatura adecuados para evitar la esporulación del micelio y que éste llegara al borde de la placa. Se removió el celofán junto con el micelio de *Trichoderma* y se colocaron discos de *Pyrenochaeta* (Fig. 2) los que se incubaron a 23°C, midiéndose al cabo de 7 días el grado de inhibición del crecimiento micelial del patógeno (VANCHTER, VAN WAMBEKE and VAN ASSCHE, 1988).

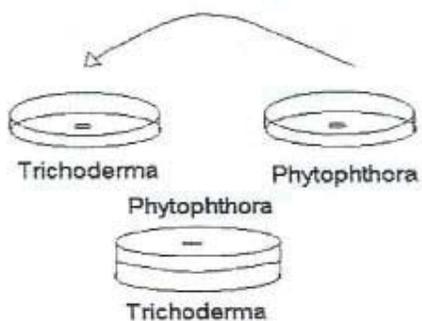
Figura 2. Esquema de la metodología de evaluación de metabolitos difusibles.



3.6 Evaluación de metabolitos volátiles.

Para evaluar la presencia de metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma*, se cultivó en una placa el patógeno poniendo un disco de micelio de 0,5 cm de diámetro y en otra placa paralela, el antagonista (*Trichoderma*); luego, se juntaron las dos placas con cultivo dejando el patógeno arriba (Fig. 3). Al 6° día, se midió la inhibición micelial. El testigo consistió en contrastar dos placas con discos de *Pyrenochaeta*.

Figura 3. Esquema de evaluación de metabolitos volátiles



3.7 Evaluación bajo condiciones de invernadero del efecto de *Trichoderma* sobre *Pyrenochaeta*.

Para evaluar el efecto del antagonismo *in vivo* de *Trichoderma* y *Pyrenochaeta*, primeramente se ubicó una parcela con monocultivo de tomate, cuyas plantas presentarían lesiones radicales por ataque de raíz corchosa y que no se hubieran realizado aplicaciones de bromuro de metilo en el suelo. El predio escogido correspondió a la parcela perteneciente al Sr. Juan Carlos Arancibia, ubicado en la localidad de Santa Olivia, Quillota.

Se tomó suelo procedente de esta parcela y se trasladó a la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso. Se separó una parte de este suelo, el que se dispuso en una mesa de aproximadamente 20 cm de altura; se cubrió con un plástico y se solarizó durante 40 días. La temperatura se monitoreó durante todos los días que duró la solarización, mediante un termómetro de suelo instalado a 15 cm de profundidad tomando lectura de ésta tres veces al día: 9:00, 15:00 y 17:30 hrs. Otra porción del mismo suelo también se dispuso en una mesa y se le aplicó bromuro de metilo. Con estos suelos, más el suelo sin tratar, se montaron los ensayos de invernadero.

El ensayo se montó en un invernadero de estructura metálica con cubierta de policarbonato, con piso de cemento y aire acondicionado tipo ventana de capacidad 24.000 BTU/hora. La temperatura ambiental se ajustó para que se mantuviera dentro del rango de 10 a 20°C. El techo del invernadero se mantuvo cubierto con malla rashell de 50% de sombreado, con el objetivo de disminuir la incidencia solar y evitar alzas excesivas de temperatura. La variedad de tomate a utilizar fue FR593.

Para el riego de las plantas, se contó con un sistema de riego por goteo, con 6 líneas de riego y 25 cm de separación entre goteros.

También se tomaron muestras de suelo al azar, a las que se les realizó análisis de pH, conductividad eléctrica (pasta de saturación), materia orgánica (% de colorimetría y % de calcinación) y hierro (ppm).

El cultivo de las plantas de tomate se mantuvo durante aproximadamente dos meses y medio en macetas dentro del invernadero (Figura 4), desde el 10 de agosto hasta el 24 de octubre de 2000, precedida de un mes de plántulas en almácigo. Previo al trasplante,

en los tratamientos que requerían disminuir el pH se acidificó mediante la incorporación azufre (S_2) al suelo en cantidad equivalente a 10 Kg/há, es decir 20g de azufre por maceta.

Figura 4. Disposición de las plantas de tomate dentro del invernadero durante el ensayo.



Los tratamientos fueron los siguientes:

Testigo: Suelo naturalmente infestado.

T₁: Suelo naturalmente infestado y acidificado.

T₂: Suelo naturalmente infestado inoculado con cepa TH 11.

T₃: Suelo naturalmente infestado inoculado con cepa TH 11 y acidificado.

T₄: Suelo naturalmente infestado inoculado con cepa TH 291.

T₅: Suelo naturalmente infestado inoculado con cepa TH 291 y acidificado.

T₆: Suelo naturalmente infestado, solarizado, inoculado con cepa TH 11.

T₇: Suelo naturalmente infestado, solarizado, inoculado con cepa TH 11 y acidificado.

T₈: Suelo naturalmente infestado, solarizado, inoculado con cepa TH 291

T₉: Suelo naturalmente infestado, solarizado, inoculado con cepa TH 291 y acidificado.

T₁₀: Suelo naturalmente infestado fumigado con bromuro de metilo

T₁₁: Suelo naturalmente infestado y solarizado.

La aplicación de *Trichoderma* en forma de pellets se realizó previo a la plantación del cultivo de tomates. Se incorporó una cantidad, en forma homogénea, de 4 g por planta (aproximadamente 3 l de suelo), aplicados al sustrato en los tratamientos correspondientes.

3.7.1 Daño radical

Para evaluar este ensayo, se midió el daño radical a través de la escala modificada de Campbell (GONZÁLEZ, 1991) estableciendo una nota de 0 a 5 según la apreciación visual, donde cada nota indica un nivel de daño porcentual en relación al volumen radical de la planta. La escala a utilizar fue la siguiente:

- 0: Sin lesiones radicales
- 1: 1 - 5% de lesiones radicales
- 2: 6 - 15% de lesiones radicales
- 3: 16 - 30% de lesiones radicales
- 4: 31 - 60% de lesiones radicales
- 5: 61 - 100% de lesiones radicales

3.7.2 Altura de plantas

Se midió la altura de las plantas desde el cuello hasta el ápice, utilizando una huincha.

3.7.3 Materia seca

Se evaluó materia seca del sistema radical y aéreo. Después de cosechadas las plantas, se procedió a separar las raíces de la parte aérea, se las introdujo en una bolsa de papel y se secaron en estufa a 60°C por aproximadamente 3 días (hasta alcanzar peso constante). Luego se pesaron ambas partes.

3.7.4 Diámetro del tallo

Junto con los demás parámetros, también se midió el diámetro del tallo bajo el primer racimo floral, utilizando un pie de metro.

3.7.5 Análisis estadístico

Todos los ensayos *in vitro* fueron conducidos como un diseño completamente al azar (DCA) con 5 repeticiones cada uno. Cada repetición correspondió a una cepa de *Pyrenochaeta* la que, a su vez, era un promedio de tres unidades. Para cada cepa también se efectuó un análisis estadístico utilizando tres repeticiones.

Para el ensayo en invernadero se condujo como un DCA, es decir las plantas se distribuyeron aleatoriamente dentro del invernadero a través de las seis líneas de riego. Para cada tratamiento, se utilizaron 8 repeticiones. La unidad experimental correspondió a una planta de tomate.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza mediante la prueba F de Fischer Posteriormente, se realizó el test de Duncan con un nivel de significancia del 5%, para determinar cuál de los tratamientos difiere significativamente.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Cultivos duales *Trichoderma* - *Pyrenochaeta*.

Observando los datos del Cuadro 1, podemos determinar que todas las cepas de *Trichoderma* utilizadas en el ensayo, ejercen una inhibición significativa sobre el crecimiento del micelio de *Pyrenochaeta* (Figura 5), reduciéndose el crecimiento de éste en más de la mitad, para el menos efectivo de los tratamientos (TH 16). El tratamiento más efectivo resultó la cepa TH 291, la que logró superar el 75% de inhibición del crecimiento del micelio de *Pyrenochaeta*.

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición del micelio de *Pyrenochaeta* al contrastarse con 14 cepas de *Trichoderma*, según el método de los cultivos duales.

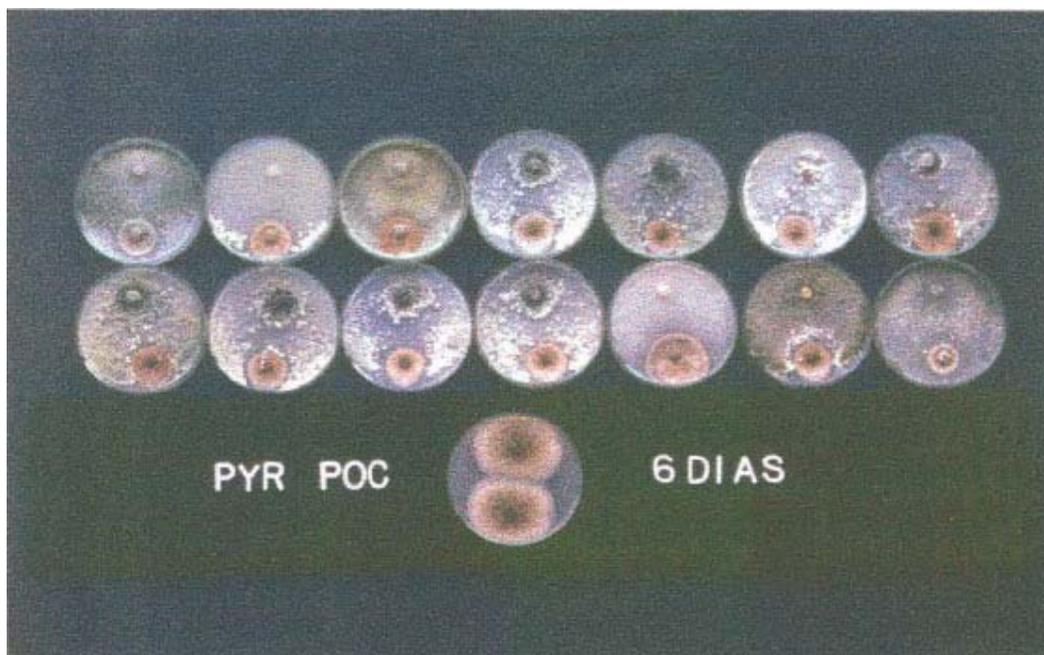
CEPA	% DE INHIBICIÓN	
T0	0,00	a
TH 16	58,52	b
TH 15	63,93	bc
TH V	64,23	bcd
T 33	67,33	bcd
TH 32	67,54	bcd
TH 21	68,14	bcd
TH 11	68,94	bcd
TH 22	69,34	bcd
TH 23	69,94	cd
TH 24	71,34	cd
TH 12	71,54	cd
TH 385	74,15	cd
T 34	74,54	cd
TH 291	76,55	d

* Promedios con letras iguales no presentan deferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

Considerando los resultados obtenidos en los cultivos duales *Trichoderma* - *Pyrenochaeta*, se decidió evaluar *in vitro* las características de salinidad, pH, temperatura óptima y producción de metabolitos volátiles y difusibles para las cepas de *Trichoderma* TH V, TH 11, TH 291, T 33 y T 34 (Figura 5). Las cepas, T 34 y TH 291 se escogieron por la alta inhibición lograda sobre el micelio de *Pyrenochaeta*; T 33 se escogió por tratarse de una especie distinta (*T. piluliferum*) al igual que T 34 (*Trichoderma polysporum*); TE V se seleccionó por alta capacidad de colonización sobre el micelio de *Pyrenochaeta*, característica que puede observarse para varias cepas en la Figura 5, y TH 11 por haber sido utilizada en ensayos anteriores (PARDO, 1999), para usar como referencia

OPAZO (1997) al contrastar *in vitro* 18 cepas de especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. koningii*) contra 5 cepas de *Pyrenochaeta*, obtuvo que las más promisorias resultaron ser las de *Trichoderma harzianum* entre las cuales se destacaron las cepas TH 11, TH 12, TH 15, TH 16 y TH 21, que inhibieron el crecimiento micelial del patógeno en más de un 30%, aunque todas las cepas presentaron algún grado de control sobre *P. lycopersici*. Es importante destacar que este autor utilizó un método distinto al empleado en la presente investigación, ya que dejó crecer a *Pyrenochaeta* durante algunos días y luego colocó a *Trichoderma*.

Figura 5. Inhibición del crecimiento micelial de *Pyrenochaeta* correspondiente a la confrontación de 14 aislados de *Trichoderma* y una cepa de *Pyrenochaeta*.



4.2 Evaluación del rango óptimo de salinidad

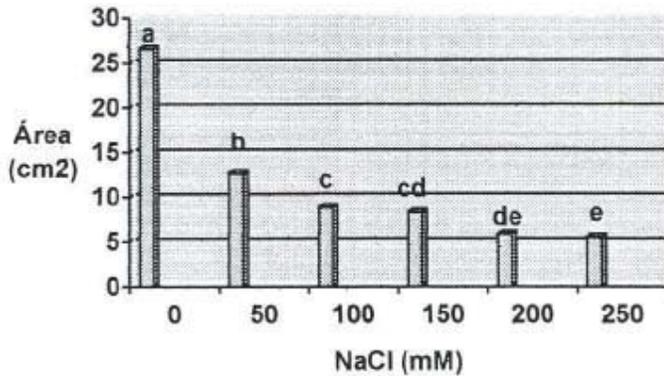
De acuerdo a los resultados obtenidos podemos observar que *Trichoderma* se ve significativamente afectado por la salinidad, reduciéndose su crecimiento aproximadamente a la mitad en una concentración 50 mM de NaCl y a casi un tercio en el valor más extremo de 250 mM de NaCl (Figura 6), con excepción de la cepa T 34, correspondiente a *T. polysoprum* (Cuadro 2), que no muestra una respuesta significativa ante el aumento de la salinidad.

Cuadro 2. Área de de 5 cepas de *Trichoderma* creciendo a distintas concentraciones de NaCl durante 2 días.

Área de crecimiento de colonias de <i>Trichoderma</i> (cm ²)						
NaCl	TH V	TH 11	T 33	T 34	TH 291	Promedio
0 mM	31,18a	24,78A	25,72a	1,93 b	24,08a	26,57a
50 mM	13,09 b	13,41 b	12,26 b	2,44a	14,41 b	12,63 b
100 mM	8,99 c	9,81 c	9,01 c	2,37ab	10,43 c	8,83 c
150 mM	8,89 c	9,36 c	8,41 c	2,50a	9,60 cd	8,28 cd
200 mM	7,14 d	6,60 d	5,77 d	2,08ab	8,73 cd	5,92 de
250 mM	4,45 d	5,89 d	3,90 d	2,18ab	7,10 d	5,51 e

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

Figura 6. Área de crecimiento promedio de las cepas de *Trichoderma* a distintas concentraciones salinas (0 a 250 mM de NaCl).



DANIELSON y DAVEY (1973) obtuvieron una alta inhibición general de *Trichoderma*, en especial de *T. saturnisporum*, *T. polysporum* y de una cepa de *T. hamatum* utilizando una alta concentración salina, 5% NaCl (p/v) (856 mM), pero cepas de *T. harzianum*, *T. viride* y un aislado de *T. koningii* fueron escasamente afectadas por la misma concentración de sales.

Los resultados obtenidos en algunas cepas evaluadas por los autores anteriormente citados, al compararlos con los obtenidos en el presente ensayo, puede deberse a que las cepas se comportan en forma variable dentro de la misma especie, ya que estos autores obtuvieron resultados distintos en cepas de la misma especie.

Observando los resultados obtenidos para *Pyrenochaeta* (Cuadro 3, Figura 7), podemos ver que, en promedio, las cepas no se ven afectadas por la variación de la salinidad en los rangos medidos, pero individualmente algunas sí muestran una respuesta a los cambios de salinidad, como lo es el caso de las cepas 240, 242 y 243, disminuyendo el tamaño de la colonia a medida que aumenta la concentración de NaCl.

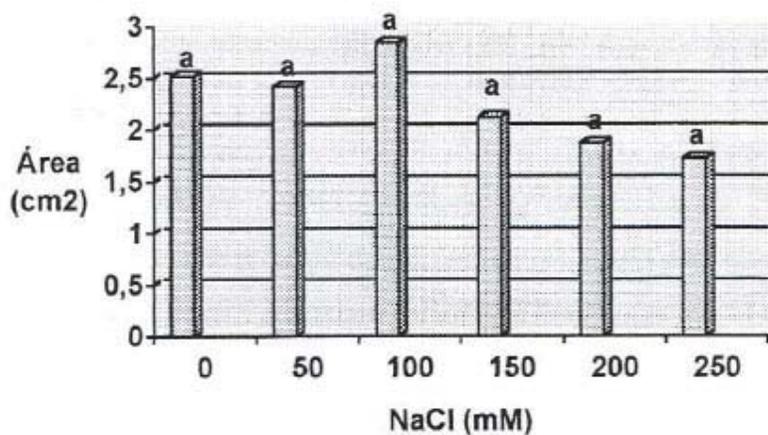
Cabe destacar que la salinidad de todos los suelos se encuentran comprendidas dentro del primer rango de concentración salina (0 a 50 mM de Na Cl) (PÉREZ, 2000)².

Cuadro 3. Área de crecimiento de las 5 cepas de *Pyrenochaeta* creciendo a distintas concentraciones de NaCl durante 7 días.

Área de crecimiento de colonias de <i>Pyrenochaeta</i> (cm ²)						
NaCl	240	242	243	245	409	Promedio
0 mM	2,63a	2,14A	2,01 b	1,93 b	3,88a	2,52a
50 mM	2,31a	2,14A	2,59a	2,44a	2,59 b	2,42a
100 mM	2,15a	1,93ab	1,82 bc	2,37ab	2,14 b	2,84a
150 mM	1,46 b	1,81abc	1,69 bc	2,5a	3,15ab	2,12a
200 mM	1,54 b	1,58 bc	1,44 cd	2,08ab	2,73 b	1,87a
250 mM	1,15 b	1,4 c	1,2 d	2,18ab	2,32 b	1,72a

* Promedios con letras iguales no presentan deferencias significativas al nivel de P=0,05, según Test de Duncan.

Figura 7. Área promedio de crecimiento de las cepas de *Pyrenochaeta* a distintas concentraciones salinas (0 a 250 mM de NaCl).



² PÉREZ, L. M. Dr. Sci 2000. U. Andrés Bello. Esc. de Química y Farmacia y Bioquímica. Comunicación personal.

Estos resultados revelan que la salinidad podría tener cierto efecto en el control biológico de *Trichoderma* sobre *Pyrenochaeta*. Podríamos pensar que una alta concentración salina del suelo interferiría negativamente en la efectividad de *Trichoderma* como antagonista de la enfermedad de raíz corchosa, ya que este microorganismo se ve disminuido por el aumento de ésta, no así el patógeno. Por este motivo, para el caso de suelos salinos, resultaría de gran interés evaluar el comportamiento de cepas resistentes a la salinidad o bien realizar un manejo que permita disminuir los valores de CE para la realización del cultivo.

4.3 Evaluación del rango óptimo de pH.

En relación a la evaluación del rango óptimo de pH para *Trichoderma* los resultados muestran que este microorganismo tiene una importante respuesta ante la variación del mismo (Cuadro 4, Figura 8) produciéndose el mayor crecimiento de las colonias entre los valores de pH más ácidos, 5,5 y 6, reduciéndose a un tercio su crecimiento en el valor 8,5.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por HADAR *et al.* (1984), donde el mayor crecimiento se produjo alrededor del pH 4,5, declinando notablemente en el valor 8,0.

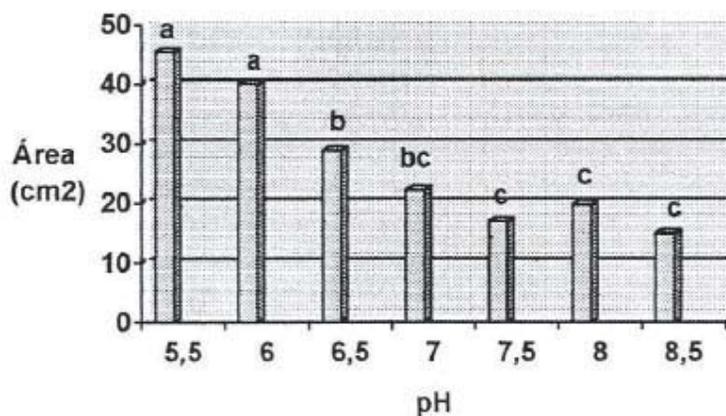
DANIELSON y DAVEY (1973) corroboran la preferencia de *Trichoderma* por pH más ácidos, determinando que el rango de pH óptimo promedio para el crecimiento del micelio de *Trichoderma* es de 3,7 a 4,7, disminuyendo hacia los valores de pH más altos.

Cuadro 4. Área de 5 cepas de *Trichoderma* creciendo a distintos valores pH evaluados a los 2 días.

Área de crecimiento (cm ²)						
pH <i>Trichoderma</i>						
pH	TH V	TH11	TH 291	TH 33	TH 34	Promedio
5,5	50,88 A	54,54 a	52,6 a	27,84 a	51,39 a	45,36 a
6	42,65 B	50,69 b	44,58 b	27,96 a	45,56 b	40,06 a
6,5	36,86 C	33,01 c	30,18 c	26,56 a	26,66 c	28,82 b
7	29,71 D	25,82 d	23,33 d	19,41 ab	19,78 d	22,1 bc
7,5	27,34 D	21,1 e	15,55 e	13,79 bc	12,88 e	16,96 c
8	27,03 D	26,88 d	14,33 e	17,24 bc	14,75 e	19,72 c
8,5	21,28 E	21,51 e	10,85 f	10,37 c	12,67 e	14,87 c

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de P=0,05, según Test de Duncan

Figura 8. Área promedio de las colonias de *Trichoderma* creciendo a distintos pH evaluados a los 2 días.



Por el contrario, los resultados muestran que la variación del pH del medio no ejerce un efecto significativo sobre el crecimiento promedio del micelio de *Pyrenochaeta*, aunque las cepas individualmente si se ven afectadas, siendo mayor el crecimiento en distintos rangos para todas (Cuadro 5).

Sin embargo, BALL (1979) señala que la mayor cantidad de microesclerocios y de lesiones se producen a pH neutro o ligeramente alcalinos. Debe tenerse en cuenta que este autor no consideró crecimiento del micelio entre los parámetros evaluados.

A la luz de lo expuesto, debiera esperarse que el pH ejerciera un efecto sobre el control biológico de *Trichoderma* sobre *Pyrenochaeta*, optimizándose en los pH más ácidos y favoreciendo la enfermedad en los pH más alcalinos.

Cuadro 5. Área de las colonias de *Pyrenochaeta* creciendo a distintos pH, evaluados a los 7 días.

Area de crecimiento (cm ²)							
pH <i>Pyrenochaeta</i>							
	0	240	242	243	245	409	Promedio
pH 5,5		4,28 ab	3,91 c	4,8 b	4,5 c	5,17 c	4,53 a
pH 6,0		4,46 a	4,03 c	5,34 b	4,83 bc	5,52 c	4,84 a
pH 6,5		3,58 ab	6,24 a	5,38 b	4,81 bc	6,53 b	5,24 a
pH 7,0		3,36 bc	5,87 a	6,17 A	6,17 ab	5,87 bc	5,49 a
pH 7,5		2,61 c	5,94 a	6,16 A	6,9 a	7,56 a	5,83 a
pH 8,0		3,92 ab	4,91 b	6,68 A	5,03 bc	5,73 c	5,25 a
pH 8,5		4,27 ab	5,74 a	6,53 A	5,23 bc	5,58 c	5,47 a

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de P=0,05, según Test de Duncan.

4.4 Evaluación del rango de temperatura óptimo.

Del Cuadro 6 y Figura 9 se desprende que el mayor crecimiento de *Trichoderma* se produce entre 25 y 30°C, cayendo bruscamente sobre los 30°C. Cabe destacar que entre los 5 y los 10°C no hubo crecimiento dentro de los 2 primeros días, pero sí a la semana siguiente (Cuadro 4).

HADAR, HARMAN y TAYLOR (1984) obtuvieron los mismos resultados bajo condiciones *in vitro*, estableciendo que la temperatura óptima para *Trichoderma* se encuentra entre los 25 y 30°C.

DANIELSON y DAVEY (1973) determinaron el rango óptimo y máximo de temperatura para varias especies de *Trichoderma* obteniendo una gran variabilidad según la especie, oscilando entre 28 a 42°C la máxima y 22 a 34°C la óptima. Para *Trichoderma harzianum* la temperatura óptima fue de 27°C, mientras que la máxima fue

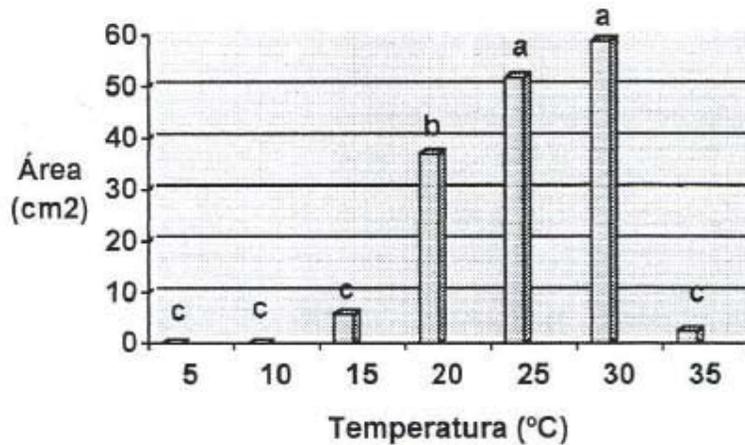
de 32°C. Para *Trichoderma polysporum* la temperatura óptima fue de 24°C, mientras que la máxima fue de 30°C.

Cuadro 6. Área de crecimiento de distintas cepas de *Trichoderma* en distintas temperaturas evaluado a las 48 horas.

Área de crecimiento de colonias de <i>Trichoderma</i> (cm ²)								
	TH V	TH 11	TH 291	T 33	T 34	Promedio		
05°C	0 d	0 d	0 d	0 d	0 e	0 c		
10°C	0 d	0 d	0 d	0 d	0 e	0 c		
15°C	8,51 c	4,03 c	8,05 c	3,21 d	8,55 d	5,7 c		
20°C	43,42 b	49,02 b	41,38 a	32,51 c	32,41 c	36,92 b		
25°C	63,62 a	63,62 a	43,74 a	50,63 b	45,57 b	51,83 a		
30°C	63,62 a	63,62 a	34,8 b	63,62 a	63,62 a	58,82 a		
35°C	9,72 c	1,77 d	0 d	1,54 d	0 e	2,42 c		

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de P=0,05, según Test de Duncan.

Figura 9. Área promedio de las colonias de *Trichoderma* creciendo a distintas temperaturas evaluado a las 48 horas.



La temperatura óptima para el crecimiento de *Pyrenochaeta* se produjo entre los 20 y 25°C, no observándose crecimiento bajo los 10°C, durante el periodo de duración del ensayo (7 días), reduciéndose abruptamente éste a partir de los 35°C (Cuadro 7, Figura 11).

Esto concuerda con lo expresado TERMOHLEN (1962), quien señala que el óptimo de crecimiento bajo condiciones *in vitro* de *Pyrenochaeta* es de 28°C, pero que el ataque mas severo bajo condiciones *in vivo* se produce ente 15 y 20°C, SHISHKOFF y CAMPBELL (1990) señalan una mayor incidencia de la enfermedad a 16°C que a 21 o 27°C.

RODRÍGUEZ, TABARES y MEDINA (1984) establecen que 22°C es la temperatura óptima para el crecimiento vegetativo de *Pyrenochaeta*, pero que a 14°C se produce la mayor virulencia, confirmando lo anteriormente expuesto.

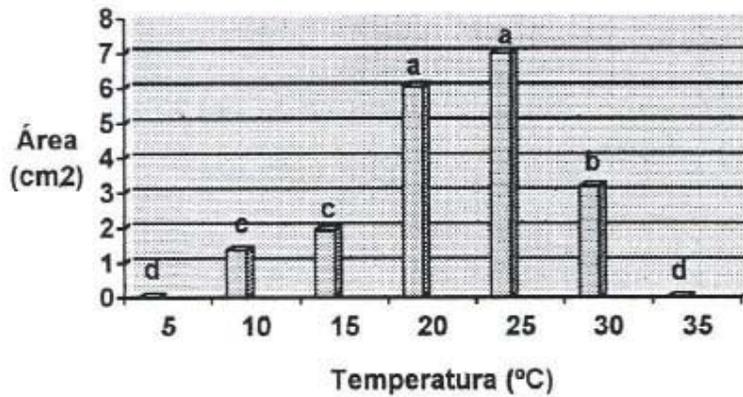
Los rangos óptimos de temperatura para ambas especies, *Trichoderma* y *Pyrenochaeta*, son distintos, también los mínimos de tolerancia, bajo los 15°C el crecimiento de *Trichoderma* se toma más lento que el de *Pyrenochaeta*, por lo que en el periodo de frío, que es cuando se produce el mayor ataque de la enfermedad, el control biológico podría verse mermado.

Cuadro 7. Crecimiento de distintas cepas de *Pyrenochaeta* a distintas temperaturas evaluado a los 7 días.

	Área de crecimiento de colonias de <i>Pyrenochaeta</i> (cm ²)											
	240	242	243	245	409	Promedio						
05°C	0	d	0	e	0	d	0	e	0	F	0	d
10°C	1,14	c	1,26	d	2,14	c	0,98	d	1,29	E	1,36	c
15°C	2,26	b	1,96	c	1,5	c	1,92	c	2	D	1,93	c
20°C	5,01	a	4,87	b	8,97	a	6,05	a	5,31	b	6,04	a
25°C	5,71	a	7,47	a	9,26	a	6,82	a	5,81	a	7,01	a
30°C	3,21	b	1,65	cd	3,06	b	3,28	b	4,72	c	3,18	b
35°C	0	d	0	e	0	d	0	e	0	f	0	d

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de P=0,05, según Test de Duncan.

Figura 10. Área promedio correspondiente a colonias de 5 creciendo a distintas cepas de *Pyrenochaeta* Creciendo a distintas temperaturas evaluado a los 7 días.



4.5 Evaluación de *Trichoderma* como productor de metabolitos difusibles.

Los resultados de la evaluación de metabolitos difusibles (Cuadro 8 y Figura 11) muestran que sólo algunas cepas de *Trichoderma* tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento del micelio del patógeno al producir metabolitos difusibles, por lo que se puede decir que las cepas TH 291 y T 34 son productoras de metabolitos difusibles con acción bioantagónica. Estos productos podrían ser antibióticos o enzimas (MELO, 1991). T 33 logró inhibir sólo una cepa de *Pyrenochaeta*, mientras que TH V, sólo dos, lo que hace pensar que también producen metabolitos difusibles, pero diferentes a los sintetizados por las otras cepas y menos efectivos. Es necesario realizar un aislamiento de los compuestos para su identificación, ya que varían de una cepa a otra (MELO, 1991; VANACHTER, VAN WAMBAKE y VAN ASSCHE, 1988).

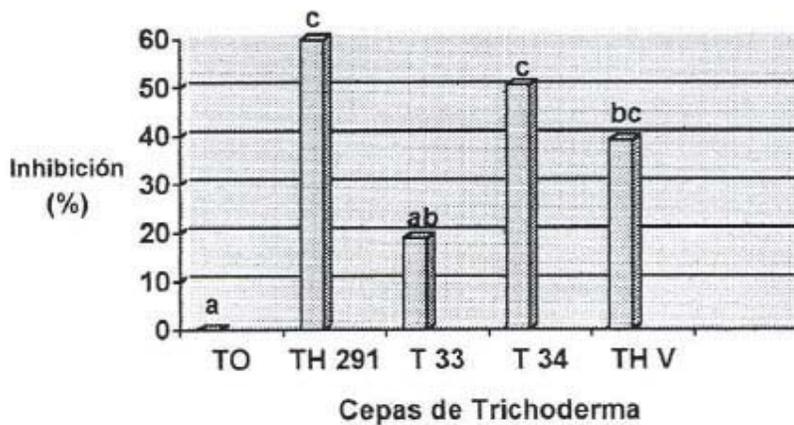
Cabe destacar que en este ensayo no es posible separar del todo el efecto del agotamiento de nutrientes por parte de *Trichoderma*, aunque si es claro que ante una alta capacidad de agotamiento de nutrientes por parte de *Trichoderma* las cepas de *Pyrenochaeta* crecerían siempre diferente al testigo (Figura 12), situación que no se dio en este ensayo.

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de las colonias de *Pyrenochaeta* creciendo en presencia de las distintas cepas de *Trichoderma*, según el método de evaluación de metabolitos difusibles.

	% de inhibición						Promedio
	240	242	243	245	409		
Testigo	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
TH 291	51,36 d	73,24 b	50,16 c	82,88 d	30,64 a	59,95 c	
T 33	17,42 ab	0 a	2,03 a	27,43 b	31,23 a	18,96 ab	
T 34	23,79 bc	48,49 b	55,47 c	65,87 cd	50,88 a	50,55 c	
TH V	41,36 cd	0 b	32,19 bc	48,65 bc	54,74 a	39,18 bc	

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

Figura 11. Grado de inhibición, en porcentaje promedio, de las cepas de *Pyrenochaeta lycopersici* creciendo en presencia de los metabolitos difusibles producidos por *Trichoderma harzianum*.



4.6 Evaluación de *Trichoderma* como productor metabolitos volátiles.

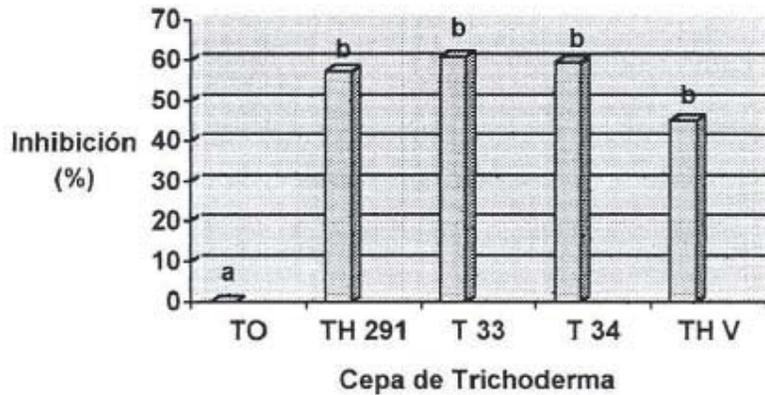
El análisis del Cuadro 9 muestra que todas las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos volátiles que afectan el crecimiento del micelio del patógeno y que no existe ninguna diferencia significativa entre ellas. Esto queda claramente expresado en la Figura 12.

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición de las colonias de *Pyrenochaeta* creciendo en presencia de las distintas cepas de *Trichoderma*, según el método de evaluación de los metabolitos volátiles.

	% de inhibición					
	240	242	243	245	409	Promedio
Testigo	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
TH 291	47,95 a	47,61 b	75,75 c	56,52 c	54,87 b	57,18 b
T 33	0 a	59,31 b	53,25 b	40,58 b	49,64 b	60,77 b
T 34	53,53 a	57,45 b	74,75 bc	71,30 d	40,86 b	59,39 b
TH V	0 a	56,91 b	62,00 bc	44,64 bc	46,32 b	45,03 b

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

Figura 12. Porcentaje de inhibición promedio de las cepas de *Pyrenochaeta* creciendo en presencia de los metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma*.



Si bien en este trabajo no se determinó que metabolitos produce *Trichoderma*, de acuerdo a MELO (1991) éstos pueden ser: etanol, acetaldehído, etileno, acetona o CO_2 .

4.7 Evaluación, bajo condiciones de invernadero del efecto antagónico de *Trichoderma* sobre *Pyrenochaeta*.

4.7.1 Daño radical.

Se evaluó el daño radical en los distintos tratamientos mediante la escala de daño modificada de Campbell (GONZÁLEZ, 1991). Los resultados (Cuadro 10) muestran que la enfermedad estuvo presente en todos los tratamientos, incluso en aquél en que se aplicó bromuro de metilo, aunque con una baja incidencia. Esto concuerda con lo expresado por ARAYA (1991), quien aisló *Pyrenochaeta* incluso en suelos fumigados. PARDO (1999), quien trabajó en ensayos de raíz corchosa bajo condiciones de invernadero, también observó la presencia de *Pyrenochaeta* en todos los tratamientos.

En cuanto a los tratamientos con *Trichoderma* no se observa una diferencia significativa con respecto al testigo, aunque el tratamiento 3 (TH 11 + acidificación) es significativamente distinto al tratamiento 1 (sólo acidificación) y al tratamiento 4 (TH 291).

Cuadro 10. Nivel de daño radical en los distintos tratamientos de invernadero, según la escala modificada de Campbell.

Tratamiento	Daño (promedio)	
T0: Suelo naturalmente infestado (SNI)	3,63	ab
T1: SNI y acidificado	4,13	a
T2: SNI + TH 11	3,88	ab
T3: SNI + TH 11 acidificado	3,00	bc
T4: SNI + TH 291	4,00	a
T5: SNI + TH 291 acidificado	3,63	ab
T6: SNI solarizado + TH 11	2,00	de
T7: SNI solarizado + TH 11 acidificado	2,38	cd
T8: SNI solarizado + TH 291	1,63	def
T9: SNI solarizado + TH 291 acidificado	2,13	de
T10: SNI + bromuro de metilo	0,875	f
T11: SNI solarizado	1,38	ef

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

El escaso efecto de las cepas de *Trichoderma* pudo deberse a que los pellets se homogeneizaron con el sustrato, lo que puede haber diluido su efectividad, ya que CHAO *et al.* (1986) mencionan la baja capacidad de crecimiento radial de *Trichoderma harzianum* desde el punto de aplicación. En ensayos anteriores, PARDO (1999) obtuvo buenos resultados utilizando la cepa TH 11, pero en este caso, los pellets se aplicaron concentrados en un solo lugar, inmediatamente bajo las raíces de las plantas de tomate recién transplantadas, por lo que al homogeneizar con el sustrato debiera aumentarse la dosis de pellets. NELSON y BARMAN (1996) sostienen que a mayor cantidad de inóculo de *Trichoderma* en el suelo hay un mayor control de las enfermedades.

También puede deberse a que los pellets perdieran viabilidad por un excesivo secado ocasionado por la estufa secadora de aire forzado. Los factores ambientales, como pH, salinidad y temperatura, también son parámetros importantes de destacar en el éxito o fracaso del control biológico. Su efecto se discute más adelante.

Los mismos resultados revelan un claro efecto de la solarización, siendo estadísticamente igual al bromuro de metilo en la mayoría de los tratamientos en que se utiliza, aun cuando se usa sola, sin complementar con alguna cepa *Trichoderma*, con excepción de aquellos tratamientos donde se acidificó el sustrato, aunque de todas formas son significativamente distintos del testigo (T7 y T9) y cepa TH 11 (T6) y que, si bien, no difieren estadísticamente del resto de los tratamientos con solarización, si difieren significativamente del tratamiento con bromuro de metilo.

Las temperaturas logradas en el suelo durante la solarización fueron más bien bajas, con una máxima absoluta de 40°C (Anexo 1), lo cual puede deberse a la época del año en que se solarizó (mes de febrero). Tal vez se hubiera obtenido mayores temperaturas solarizando en diciembre o enero, cuando la radiación solar es mayor. De todas formas se obtuvieron resultados en disminuir la incidencia de raíz corchosa con estas temperaturas. Esto concuerda con lo observado por MONTEALEGRE *et al.* (1996) en donde el efecto de la solarización sobre el control de La enfermedad de raíz corchosa resultó ser igual y, en algunos casos, superior al bromuro de metilo, reafirmando que este método resulta ser eficiente para el control de esta enfermedad.

En cuanto a la acidificación ésta no tuvo un efecto favorable en el antagonismo biológico de *Trichoderma* contra *Pyrenochaeta*, probablemente debido a que resultó ser

excesiva (Anexo 2) llegando como promedio al valor de pH de 5,27. Esto, lejos de favorecer la acción de *Trichoderma*, produjo un debilitamiento de las plantas, lo cual se evidencia especialmente en los tratamientos con solarización donde el control sobre la enfermedad tuvo efecto similar al bromuro de metilo, pero al acidificar el sustrato esta efectividad disminuye. GIACONI y ESCAFF (1997) señalan que el cultivo del tomate posee un buen comportamiento en suelos de pH 6 a 7, por lo que lograr acidificar el suelo a un pH no inferior a 6, sería favorable para el cultivo y para el control biológico. Este es un punto interesante de evaluar en ensayos posteriores. Por otro lado, en este ensayo, el suelo sin acidificar tuvo un pH demasiado elevado, 8,17 en promedio al final del tratamiento (Anexo 2) y de 7,65 al inicio del cultivo (Anexo 3), lo cual tampoco es una condición óptima para el cultivo del tomate ni para *Trichoderma*. Además, de acuerdo a lo observado en los ensayos *in vitro* esta condición inhibe significativamente el crecimiento del micelio de *Trichoderma* (Figura 8) reduciéndose a casi un tercio del mayor valor obtenido, no así para *Pyrenochaeta* (Cuadro 5).

4.7.2 Altura de plantas

Después de finalizada la plantación, al cosechar las plantas, se midió la altura de cada una de ellas. Los datos que se encuentran en el Cuadro 11 muestran que ninguno de los tratamientos aplicados tuvo efecto significativo sobre la altura de las plantas (Figura 14). Este resultado puede deberse a que hubo una gran variabilidad dentro de cada tratamiento. Además, los factores ambientales como baja luminosidad y baja temperatura pueden haber alterado este parámetro, ya que bajo estas condiciones hay un aumento de las giberelinas y una menor actividad citoquinínica (PICKEN, 1984) etiolando las plantas y enmascarando las diferencias.

Cuadro 11. Altura de las plantas de tomate al momento de finalizar los tratamientos.

Tratamiento	Altura de plantas (cm)	
T0: Suelo naturalmente infestado (SNI)	68,50	a
T1: SNI acidificado	66,88	a
T2: SNI + TH 11	63,13	a
T3: SNI + TH 11 acidificado	70,50	a
T4: SNI + TH 291	67,88	a
T5: SNI + TH 291 acidificado	62,25	a
T6: SNI solarizado + TH 11	69,88	a
T7: SNI solarizado + TH 11 acidificado	66,00	a
T8: SNI solarizado + TH 291	71,75	a
T9: SNI solarizado + TH 291 acidificado	68,5	a
T10: SNI + bromuro de metilo	70,00	a
T11: SNI solarizado	69,88	a

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

Figura 14. Plantas de tomate de los distintos tratamientos al momento de cosechar (A) T0, T1, T2, T3. (B) T0, T4, T5, T6. (C) T0, T7, T8, T9. (D) T0, T10, T11.



4.7.3 Materia seca

La mayor producción de materia seca de la parte aérea se obtuvo en los tratamientos con bromuro de metilo y en suelo solarizado (T 11) que iguala la efectividad del bromuro de medio (Cuadro 12) en el control de la enfermedad de raíz corchosa, pese a que las temperaturas logradas durante la solarización no fueron muy altas, ya que no superaron los 40°C.

TERMOHLEN (1962) señala que el punto térmico letal de *Pyrenochaeta* se ubica entre 40 y 50°C, por lo que las temperaturas logradas durante la solarización habrían bastado para inhibir significativamente el desarrollo de la enfermedad de raíz corchosa.

Los tratamientos con *Trichoderma* no muestran diferencias significativas con respecto al testigo para este parámetro.

En cuanto a la materia seca producida por las raíces, ninguno de los tratamientos difiere significativamente del testigo.

PARDO (1999), para la variable materia seca de raíz obtuvo sólo un tratamiento significativamente distinto al testigo, aparte del bromuro de metilo, al utilizar la cepa TH 11, para la parte aérea no obtuvo diferencias significativas, excepto al aplicar el bromuro de metilo.

Cuadro 12. Peso seco de las plantas de tomate después de finalizados los tratamientos.

Tratamiento	Parte aérea (g)		Raíces(g)	
T0: Suelo naturalmente infestado (SNI)	7,99	cd	1,53	ab
T1: SNI y acidificado	6,56	d	1,60	ab
T2: SNI + TH 11	7,75	cd	1,40	ab
T3: SNI + TH 11 acidificado	9,09	bcd	1,82	a
T4: SNI + TH 291	7,89	cd	1,96	a
T5: SNI + TH 291 acidificado	6,88	d	1,70	ab
T6: SNI solarizado + TH 11	10,05	bc	1,42	ab
T7: SNI solarizado + TH 11 acidificado	6,36	d	1,03	b
T8: SNI solarizado + TH 291	9,45	bcd	1,55	ab
T9: SNI solarizado + TH 291 acidificado	6,47	d	1,04	b
T10: SNI + bromuro de metilo	13,63	a	1,54	ab
T11: SNI solarizado	11,64	ab	1,66	ab

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

4.7.4 Diámetro del tallo bajo el primer racimo floral

Al momento de cosechar también se midió el diámetro del tallo bajo el primer racimo floral (Cuadro 13), el mayor diámetro se obtuvo en el tratamiento con bromuro de metilo, seguido del suelo solarizado mientras que el menor diámetro lo encontramos en suelo infestado y acidificado (equivalente al testigo + acidificación), aunque no existe una diferencia clara entre tratamientos.

Las condiciones ambientales de temperatura y luminosidad pueden haber afectado el desarrollo de las plantas de la misma forma en que se describe para la variable altura.

Cuadro 13. Diámetro promedio del tallo de las plantas de tomate bajo el primer racimo floral al momento de cosechar.

Tratamiento	Diámetro (cm)	
T0: Suelo naturalmente infestado (SNI)	0,63	abc
T1: SNI y acidificado	0,41	c
T2: SNI + TH 11	0,60	abc
T3: SNI + TH 11 acidificado	0,69	ab
T4: SNI + TH 291	0,71	ab
T5: SNI + TH 291 acidificado	0,48	bc
T6: SNI solarizado + TH 11	0,71	ab
T7: SNI solarizado + TH 11 acidificado	0,51	bc
T8: SNI solarizado + TH 291	0,61	abc
T9: SNI solarizado + TH 291 acidificado	0,59	abc
T10: SNI + bromuro de metilo	0,81	a
T11: SNI solarizado	0,74	ab

* Promedios con letras iguales no presentan diferencias significativas al nivel de $P=0,05$, según Test de Duncan.

La temperatura del suelo es un factor importante en el desarrollo de *Trichoderma* como biocontrolador. Durante el ensayo, las temperaturas del suelo fluctuaron entre los 10 y 16°C, con un promedio de 12°C (Anexo 4). En ensayos *in vitro* (Figuras 10 y 11), se

observó que bajo 15°C el crecimiento del micelio de *Trichoderma* se toma lento, incluso más que el de *Pyrenochaeta*. Por esta razón, es factible que el desarrollo de *Trichoderma* en el suelo se viera inhibido durante el ensayo. Cabe destacar que las condiciones de temperatura del invernadero fueron forzadas para ser más frías, con el objetivo de favorecer la enfermedad. Bajo condiciones normales de cultivo de tomate en invernadero, las temperaturas llegan a ser más altas que las obtenidas en el presente ensayo.

JOHNSON *et al.* (1987) señalan que el éxito de *Trichoderma* como antagonista biológico se ha visto limitado en el control de enfermedades que son más severas a temperaturas frescas. Este autor realizó una búsqueda de especies de *Trichoderma* tolerantes a bajas temperaturas aisladas desde los suelos de Tennessee y Alaska obteniendo algunas cepas de *T. pseudokoningii*, y *Trichoderma harzianum* en Tennessee y *T. viride* de Alaska. Sería interesante realizar un aislamiento de cepas de *Trichoderma* tolerantes a bajas temperaturas desde las zonas más frías de Chile y evaluar su comportamiento como control biológico de enfermedades que presentan mayor severidad durante las bajas temperaturas. Estos autores señalan que es posible obtener cepas de *Trichoderma* spp. tolerantes a bajas temperaturas en zonas de clima templado.

KNUDSEN *et al.* (1991) señalan que una mejor colonización por parte de los pellets de *Trichoderma* se produce a 25°C que a 15°C.

La formulación de los pellets es otro factor que puede haber incidido en la efectividad de *Trichoderma* como control biológico. LEWIS y PAPAVIDAS (1985) compararon pellets elaborados a base de salvado de trigo y caolinita, determinando una mayor densidad poblacional del agente cuando se usaba salvado de trigo. En el presente ensayo, no se utilizó ni caolinita ni salvado de trigo para la elaboración de pellets de alginato de sodio. KNUDSEN y BIN (1990) afirman que los pellets de *Trichoderma* tienen un mayor crecimiento radial cuando son formulados con salvado de trigo que sin éste. BADHAM (1991) señala que *Trichoderma* compete mejor contra el cultivo comercial de *Lentivirus edodes* cuando los niveles de salvado de trigo en el sustrato son mayores.

Por otro lado, es posible que la corta edad a la que se cosecharon las plantas también influyera negativamente en el ensayo, ya que si se hubieran dejado por mayor tiempo

podrían haber aparecido diferencias significativas en algunos de los parámetros evaluados.

El suelo, además, presentaba una alta conductividad eléctrica 3,25 mhos/cm en promedio. Como observamos en los ensayos *in vitro*, ésta resultó ser indiferente para *Pyrenochaeta*, pero no así para *Trichoderma*, que a mayor salinidad disminuye su crecimiento.

MUTTO (1989) tampoco tuvo resultados claros al usar cepas de *Trichoderma* en ensayos de control biológico, lo cual atribuye a la lentitud con que las esporas *Trichoderma* germinan, alrededor de 6 hrs después de inocular, comparado con otros patógenos que se demoran dos horas e infestan rápidamente el tejido de las plantas antes que *Trichoderma* pueda actuar. En este caso, *Pyrenochaeta* es un hongo de lento crecimiento, pero debemos recordar que el suelo estaba infestado desde hacia muchos años, por lo que las cantidad de inóculo probablemente era muy alta, además los ensayos se realizaron en una época en que las condiciones de temperatura son favorables para *Pyrenochaeta*, no así para *Trichoderma*.

Por otro lado, el nulo resultado al utilizar las cepas de *Trichoderma in vivo* puede deberse a que el mecanismo de antagonismo de éstas no sea por micoparasitismo, sino más bien por producción de metabolitos, como antibióticos y enzimas, y competencia. No se ha encontrado evidencia de que los metabolitos producidos por *Trichoderma* puedan llegar al patógeno en el suelo (MUTTO, 1989).

5 CONCLUSIONES

Todas las cepas de *Trichoderma* analizadas ejercen una inhibición micelial significativa sobre *Pyrenochaeta lycopersici*, destacándose especialmente la cepa TH 291, aunque no fue posible demostrar que existiera un antagonismo significativo en ensayo bajo condiciones controladas de invernadero.

Pyrenochaeta no se ve afectado significativamente por la variación del pH ni de la salinidad, su óptimo térmico de crecimiento *in vitro* se encuentra entre 20 y 25°C, sin presentar crecimiento sobre 30°C ni bajo 5°C a las 48 horas. *Trichoderma* es sensible tanto a la variación del pH, salinidad y temperatura; prefiere pH ácidos y se ve inhibido a medida que aumenta la concentración salina. Su óptimo térmico de crecimiento se encuentra entre 25 y 30°C, sin presentar crecimiento bajo los 10°C a las 48 horas, y escaso crecimiento a 35°C. Las cepas TH 291, T 34 y TH V produjeron metabolitos difusibles con acción bioantagónica sobre *Pyrenochaeta*; T 33 produjo metabolitos que sólo afectaron a una cepa. Todos los aislados de *Trichoderma* analizados produjeron metabolitos volátiles de acción bioantagónica.

La solarización ejerce un control significativo sobre la enfermedad raíz corchosa del tomate, semejante a aquél producido por la fumigación del suelo con bromuro de metilo, efecto que se ve disminuido con la disminución del pH.

LITERATURA CITADA.

ABBOTT LABORATORIES DE CHILE LTDA. 1997. TRICHODEX 25% WP: la alternativa biológica. pp 82-88 *In*: Esterio, M. y Auger. J. eds. *Botrytis*: nuevas estrategias de control cultural. Santiago, Universidad de Chile. 125 p.

ALEXOPOULUS. 1979. Introducción a la micología. Buenos Aires. EUDEBA. 615p.

APABLAZA, G. 2000. Patología de cultivos epidemiológicos y control holístico. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile, 347 p.

ARAYA, M. 1991. Prospección de raíz corchosa del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) causada por *Pyrenochaeta lycopersici* (Gerlach & Schneider), en la provincia de

- Quillota y caracterización de las diferentes cepas obtenidas. Taller de Licenciatura Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 81p.
- BADHAM, E. 1991. Growth and competition between *Lentinus edodes* and *Trichoderma harzianum* on sawdust substrates. *Mycologia* 83(4): 455-463.
- BALL, S. 1979. Production of microsclerotia of *Pyrenochaeta lycopersici* in host plant roots. *Trans. Br. mycol. Soc* 73(2): 363-365.
- BLANCARD, D. 1996. Enfermedades del tomate. Madrid. Mundi-Prensa. 212p.
- CAMPBELL, R., SCHWEERS, V. and HALL, D. 1982. Corky root of tomato in California caused by *Pyrenochaeta lycopersici* and control by soil fumigation. *Plant Disease* 66: 657-661.
- CASTRO, E. 1991. Efecto de tres fungicidas sobre la incidencia de *Pyrenochaeta lycopersici* en tomate producido como primor bajo invernadero frío. Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 60 p.
- CLERJEAU, M. 1974. Etude de la fructification de *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider et Gerlach sur racines de tomate et de melon. *Ann. Phytopatol.* 6: 45-54.
- CLYDON, N., ALLAN, M., HANSON, J., AVENT, G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 503-513.
- CRUZ, M y CISTERNA, V. 1998. Control integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento. I. Efecto de hongos antagonistas sobre el crecimiento de las plantas. *Agricultura Técnica* 58: 81-92.
- CHAO, W. L., NELSON, E. B., HARMAN G. E. and HOCH. H. C. 1986. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopatology* 76: 60-65.
- DAVET, P. 1976. Etude des pounitures des racines de la tomate au liban et du complexe parasitaire qui leur est associe. These pour lóbtention du titre du doctor. Nancy, Université de Nancy. 120 p.
- DANIIELSON, R. M. and DAVEY, C. B. 1973. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology Biochemistry* 5: 495-504.
- DOMSCH, K; GAMS, W and ANDERSON, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. London. Academic Press Inc. 859 p.
- DUIMOVIC, A. 1991. Evaluación de fumigantes aplicados al suelo en tomate cultivado bajo plástico. *La Palma* 1: 23-29.

- ELAD, Y and KAPAT, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant. Pato. 1. 105: 177-189.
- _____ CHET, I., BOYLE, P and HENIS, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73: 85-88.
- FARR, D., BILLS, G., CHAMURIS, G. and ROSSMAN, A. 1989. Fungi on plants and plants products in the united states. Minnesota, The American Phytopathological Society. 1252 p.
- FIUME, F. e PARISI, B. 1995. La difesa del pomodoro in coltura protetta contro nematodi galligeni (*Meloidogyne Goeldi*) e *Pyrenochaeta lycopersici* (Schneider et Gerlach) in associazione. L' Informatore Fitopatologico 7: 44-50.
- GIACONI, V. y ESCAFF, G. 1997. Cultivo de hortalizas. Santiago, Ed. Universitaria. 337 p.
- GONZÁLEZ, J.M. 1991. Efecto de la aplicación de Bravo (i. a. clorotalonil), Previcur (i. a. propambocarb) y ácido fosforoso sobre la incidencia de *Pyrenochaeta lycopersici* y *Phytophthora* spp. en tomate cultivado para otoño en invernadero. Taller Lic. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía 80 p.
- GRANGES, A. et LEGER, A. 1996. Essai comparatif de plantes de tomates greffés à une ou deux têtes et de désinfection du sol à la vapeur en serre. Revue Suisse de Viticulture, d' Arboriculture et d' Horticulture 28(6): 389-392.
- GROVE, G. and CAMPBELL, R. 1987. Host range and survival in soil of *Pyrenochaeta lycopersici*. Plant Disease 71: 806-809.
- GUISALBERTI, E., and SIVASITHAMPARAM, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology Biochemistry 23(11): 1011-1020.
- HADAR, Y., CHET, I., and HENIS, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64-68.
- _____HARMAN, G. and TAYLOR, A. 1984. Evaluation of *Trichoderma kongii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot cause by *Pythium* spp. Phytopathology 74: 106-110.
- HARMAN, G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol, changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84: 377-393.
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. 1982. Tomate (extrait du rapport annuel 1981-1982). Avignon, INRA. 10 p

- I PORTINNESTI disponibili sul mercato. 1999. L' Infomatore Agrario 44: 21-25
- INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO. 1998. Precios y mercados para rubros de la pequeña y mediana agricultura. 166 p.
- JOHNSON, L. F. and BERNARD, E. C. 1987. Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperatures from Tennessee and Alaska soils. Plant Disease 71: 137-140.
- KNUDSEN , G.R. and BIN, L. 1990. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran a growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. Phytopatology 80:724-727,
- _____ESCHEN, D. J., DURAN, L. M., and BIN 1991 Potential of biocontrol of *Sclerotinia sclerotium* through colonization by *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 75: 446-470.
- KRAFT, M. and PAPAVIDAS, G. 1983. Use of host resistance. *Trichoderma* and fungicides to control soilborne diseases and increase seed yields of peas. Plant disease 67: 1234-1237.
- LEWIS, J .A and PAPAVIDAS. 1985. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. Plant Patology 34: 571-577.
- LIRA, E. 1989. Fumigación, solarización y vaporización del suelo en cultivos bajo invernadero. In: Curso Internacional: uso del plástico en cultivos forzados de hortalizas y flores. 2-5 de octubre de 1989, Viña del Mar. Chile PP. 1-3.
- MAZZOLIER, C. 1999. Greaffage de la tomate en cultures sous abri. Revue Horticole N°404: 44-48.
- MELO, I. 1991. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. pp 135-156. In: Bettiol, W. ed. Controle biológico de doenças de plantas. Brasilia DF, EMBRAPA. pp 135-156.
- McGRATH, D. and CAMPBELL, R. 1983. Improved methods for inducing sporulation of *Pyrenochaeta lycopersici*. Plant Disease 67: 1245-1248.
- MONA, L., CORREALE, A., BILOTTO, M., RESTAINO, F. 1997. Valutazione di tre portinnesti per il pomodoro in serra. Colture Protette 6: 69-73.
- MONTEALEGRE, J. R. and LARENAS, C. 1995. Uso de *Trichoderma harzianum* en el control biológico de *Sclerotium rolfsii* en frejoles. Fitopatología 30 (3): 160-166.
- _____FUENTES, P. y HENRÍQUEZ, J. 1996 Efecto de la solarización y fumigación en el control de *Pyrenochaeta lycopersici* y su relación con el rendimiento y calidad de un cultivo de tomate. Fitopatología 31(3): 217-229.

- MUTTO, S. 1989. Prova di lotta contro il cancro colorato del platano con l'impiego di *Trichoderma harzianum*. *Informatore Fitopatologico* 11: 49-51.
- OHR, H. D., SIMS J. J., GRECH, N. M., BECKER, J. O., and MCGIFFEN, M. E. 1996. Methyl iodide, an ozone-safe alternative to methyl bromide as soil fumigant. *Plant Disease* 80: 731-735.
- OLAVARRÍA, L. 1991. Caracterización e identificación de agente causal de la enfermedad raíz corchosa en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Taller Ing. Agr. Agronomía. 59p.
- OPAZO, M. 1997. Búsqueda de microorganismos como potenciales biocontroladores de *Pyrenochaeta lycopersici* (GERLACH & SCENEIDER), causante de la raíz corchosa en el cultivo del tomate. Tesis Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 65 p.
- PARDO, G. 1999. Control *in vivo* de *Pyrenochaeta lycopersici* a través del bioantagonista *Trichoderma harzianum*, bajo condiciones controladas de temperatura en invernadero. Taller de licenciatura Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 83 p.
- PICKEN, A. J. 1984. A review of pollination and fruit set in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Horticultural Science* 59: 1-3.
- POLLEY, R. W. 1985. The relationship between brown and corky root caused by *Pyrenochaeta lycopersici* and yield loss in tomatoes established by the use of artificially infested soils. *Plant Pathology* 34: 502-509.
- RODRÍGUEZ. R., TABARES. J., y MEDINA. J. 1984, Cultivo moderno del tomate. Madrid. Mundi-Prensa. 206 p.
- SHISHKOFF, N. and CAMPBELL, R. 1990. Survival of *Pyrenochaeta lycopersici* and the influence of temperature and cultivar resistance on the development of corky root of tomato. *Plant Disease* 74: 889-894.
- _____.s.f. *Pyrenochaeta*, Maryland, USA, USDA, 17 p.
- SUTTON, B. 1988. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew. 696 p.
- TELLO, J. 1997. El bromuro de metilo, trascendencia de una prohibición. *Horticultura* 125: 69-73.
- TERMOHLEN. I. 1962. Onderzoekingen over Kurkwortel bij tomaat en over de Kurkwortel-schiimmel. *Tijdschr. Plantenaiekten* 68: 295-367 (sólo resumen).

VANACHTER 1. 1988. *In vitro* evaluation of the antagonistic properties of *Trichoderma* spp. against *Pyrenochaeta lycopersici* and *Phomopsis sclerotioides*. Bulletin OEPP/EPPO 18: 1-7.

WINDHAM, M., ELAD, Y. and BAKER. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76: 518-521.

WORKNEH, F. and VAN BRUGGEN, A. 1994. Suppression of corky root of tomatoes in soils from organic farms associated with soil microbial activity and nitrogen status of soil and tomato tissue. Phytopathology 84: 688-694.

_____VAN BRUGGEN, A., DRINKWATER. L., SHENNAN,C. 1993. Variables associated with corky rot and *Phytophthora* root of tomatoes in organic and conventional farms. Phytopathology 83: 581-589.

ANEXOS

ANEXO 1 Temperaturas promedio, máxima y mínima logradas en el suelo solarizado durante 40 días en el mes de febrero.

Horario	Temperatura promedio (°C)	Mínima Absoluta (°C)	Máxima absoluta (C)
9:00	27,86	18	31
15:00	32,93	28	40
17:30	33,59	30	40

ANEXO 2. pH promedio final de los suelos acidificados y no acidificados usados en los tratamientos.

SUELO ACIDIFICADO	pH	SUELO SIN ACIDIFICAR	pH
M1	6,02	M1	8,33
M2	4,83	M2	8,54
M3	5,05	M3	8,00
M4	5,82	M4	8,04
M5	5,72	M5	8,14
M6	4,16	M6	7,94
PROMEDIO	5,27	PROMEDIO	8,17

Anexo 3 Resultados promedios obtenidos de los análisis de pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y contenido de fierro del suelo al iniciar el ensayo.

	pH	CE (mMhos/cm)	MO (% de colorimetría)	MO (% de calcinación)	Fierro (ppm)
M1	7,69	1,64	4,08	5,61	3,92
M2	7,62	1,27	3,86	5,30	3,16
M3	7,56	2,88	3,64	5,40	3,12
M4	7,65	2,02	3,34	5,60	4,48
M5	7,72	1,42	3,16	5,30	4,62
M6	7,74	5,82	3,44	5,41	3,14
M7	7,64	4,63	3,25	5,11	2,98
M8	7,62	5,68	4,44	4,89	2,82
M9	7,57	3,93	3,07	5,00	3,18
PROMEDIO	7,65	3,25	3,56	5,29	3,49

ANEXO 4. Temperaturas promedios, máxima y mínima absoluta del suelo dentro de las macetas durante la duración del ensayo

Horario	Temperatura promedio (°C)	Mínima Absoluta	Máxima absoluta
9:00	10,68	9	13
15:00	12,92	11	15
17:30	13,88	12	16