

Trichoderma spp. EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scribb, AGENTE DE LA ANTRACNOSIS DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

Trichoderma spp. in the biological control of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scribb, agent of the bean anthracnose (*Phaseolus vulgaris* L.)

S. T. Barros, N. T. Oliveira y S. T.G. Bastos

Departamento de Micología,
Centro de Ciencias Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco,
50739-470, Recife, PE, (Brasil).

Palabras clave : Control biológico, antracnosis, *Trichoderma* spp, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaseolus vulgaris*.
Key words: Biological control, anthracnose, *Trichoderma* spp, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaseolus vulgaris*.

RESUMEN

Para seleccionar especies de *Trichoderma* con mejor desempeño antagónico sobre razas de *Colletotrichum lindemuthianum* in vitro, fueron utilizadas las técnicas de cultivos pareados y la del papel celofán.

Se utilizaron las especies de *Trichoderma harzianum* (T25), *T. koniingii* (T15), *T. pseudokonigii* (T26), *T. aureoviride* (T10) y *T. viride* (TR2), además de las razas de *Colletotrichum lindemuthianum* Ba2 y Ba10. En el test de apareamiento, se verificó que las 5 especies de *Trichoderma*, causaron alteraciones morfológicas en las hifas de las 2 razas del fitopatógeno, evidenciando un posible antagonismo.

El test del papel celofán, con la raza Ba2, mostró que *T. harzianum* y *T. viride*, causaron una disminución apreciable en el diámetro de las colonias, en relación a las otras especies. Con la raza Ba10, se verificó que *T. koniingii*, *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. viride*, causaron una disminución apreciable en los diámetros de las colonias en orden creciente, siendo *T. viride* la más eficiente.

T. pseudokonigii, no causó reducciones apreciables sobre la raza Ba10.

INTRODUCCION

La antracnosis del frijol común causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, es una de las enfermedades más graves de esta leguminosa en la mayoría de las regiones productoras de frijol del mundo (Peuser, 1931; Mujica, 1952; Mastenbroek, 1960 y Cruickshank, 1966). Es responsable de

SUMMARY

The techniques of paired cultures and cellophane paper were used in order to select species of *Trichoderma* with better antagonistic performance against races of *Colletotrichum lindemuthianum* in vitro. *Trichoderma harzianum* (T25), *T. koniingii* (T15), *T. pseudokonigii* (T26), *T. aureoviride* (T10) and *T. viride* (TR2), were used against the races Ba2 and Ba10 of *Colletotrichum lindemuthianum*.

In the pairing test it was observed that the five *Trichoderma* spp. produced morphological changes on the hypha of the 2 phytopathogenic races, what indicates an antagonistic reaction.

The cellophane paper test showed that *T. harzianum* and *T. viride* produced a noticeable decrease in the diameter of colonies as regards the other species. In the case of races Ba10, it could be seen that *T. koniingii*, *T. harzianum*, *T. aureoviride* and *T. viride* caused a significant fall in the diameter of the colonies, in increasing order, being *T. viride* the most efficient.

T. pseudokonigii caused no remarkable decrease on race Ba10.

la severa caída de la producción y depreciación del producto para su comercialización. Se disemina a través de semillas contaminadas (Issa *et al.*, 1964) y según Vieira (1983), presenta una amplia distribución geográfica en Brasil, pudiendo provocar grandes perjuicios en condiciones climáticas favorables (temperatura entre 17-18°C y alta humedad relativa).

Los métodos de control de esta enfermedad incluyen: el uso de fungicidas químicos que encarecen el costo de

producción con grandes impactos ecológicos y el empleo de variedades resistentes obtenidas por mejoramiento genético (Ciat, 1988).

Las especies del género *Trichoderma* han despertado interés como posibles agentes de control biológico en enfermedades de plantas causadas por patógenos fúngicos (Freeman, 1981; Chet et al., 1981; Elad et al., 1983; Henis et al., 1984; Simon & Sivasithamparam, 1988; Harman et al., 1989 y Turhan & Kutsi, 1989) y se han descrito los efectos de sus especies en la reducción de enfermedades causadas por

agentes fúngicos en cultivos de importancia económica, pudiendo citarse: *Rhizoctonia solani* (Harman et al., 1980; Liu & Baker, 1980; Chet & Baker, 1981 y Hadar et al., 1979), *Pythium* spp. (Papavizas & Lewis, 1983 y Hadar et al., 1984), *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii* (Pessoa et al., 1987 y Aroba & Dwivedi, 1979), *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Silva & Menezes, 1991).

De acuerdo con la literatura, aún no se ha investigado la acción de *Trichoderma* spp. y su posible utilización en el control biológico de la antracnosis del frijol común por

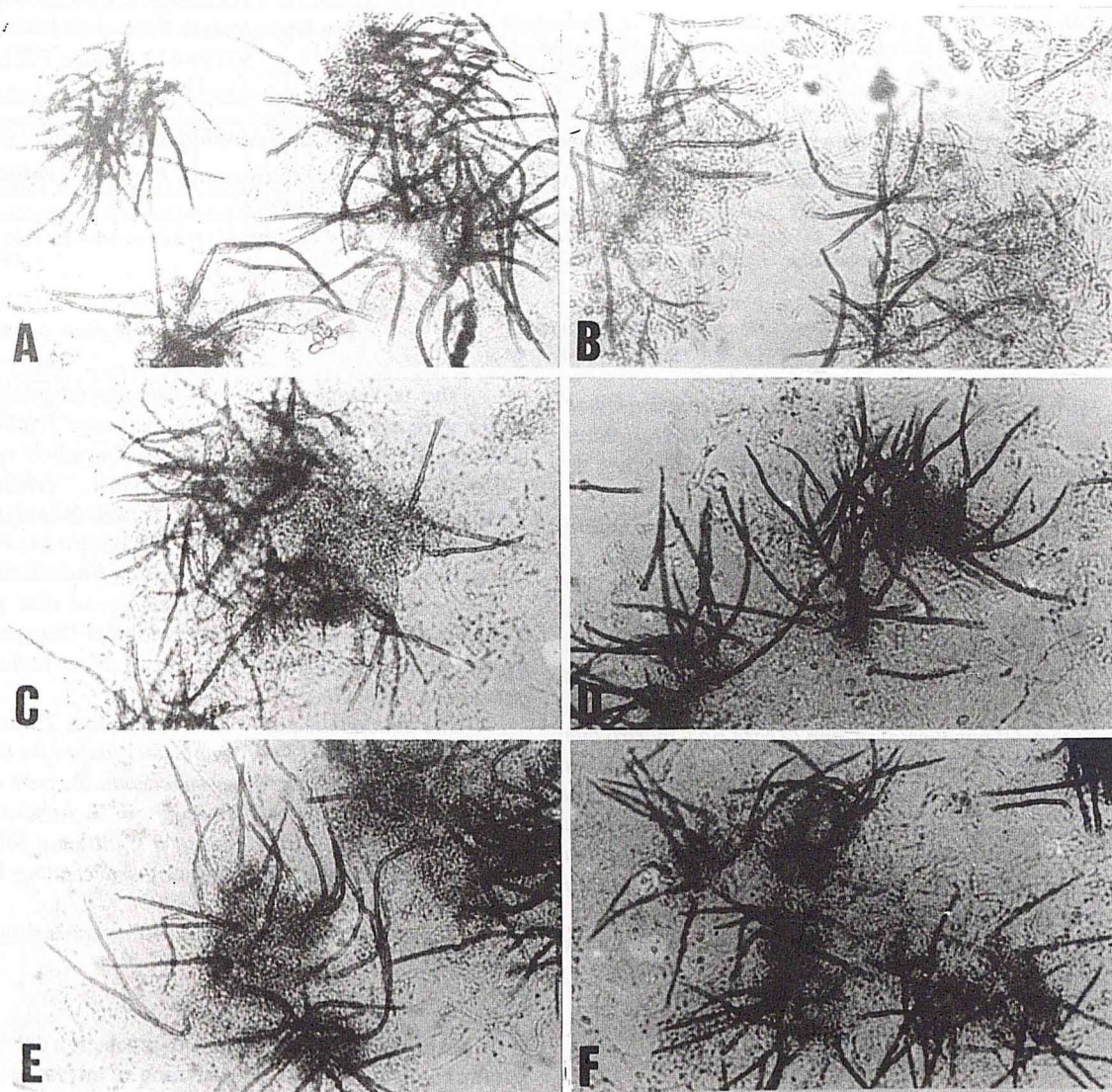


Figura 1. Apareamiento de la raza Ba10 de *Colletotrichum lindemuthianum* con las especies de *Trichoderma*: a. testigo, b. *T. viride* (TR2), c. *T. aureoviride* (T10), d. *T. koningii* (T15), e. *T. harzianum* (T25) y f. *T. pseudokoningii*.

C.lindemuthianum, en cultivos de importancia económica. Este trabajo ha sido realizado con el objetivo de verificar *in vitro* la acción inhibitoria de especies de *Trichoderma* sobre el crecimiento de dos razas(variedades) de *C. lindemuthianum*.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Micología de la Universidad Federal de Pernambuco.

Se utilizaron dos razas (Ba₂ y Ba₁₀) de *C. lindemu-*

thianum cedidas por el sector de fitopatología del Centro de Investigación Agropecuaria del Trópico Semi-Arido/Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (CPTSA/ EMBRAPA) y cinco especies de *Trichoderma*, provenientes de la Micoteca del Departamento de Micología de la Universidad Federal de Pernambuco (*T. aureoviride* (T10), *T. viride* (TR2), *T. harzianum* (T25), *T. koningii* (T15) y *T. pseudokoningii* (T26).

El test de actividad antagonica, mediante el método de apareamiento de los microorganismos (Bell *et al.* , 1982), fue utilizado para evaluar el efecto de las especies de *Trichoderma*

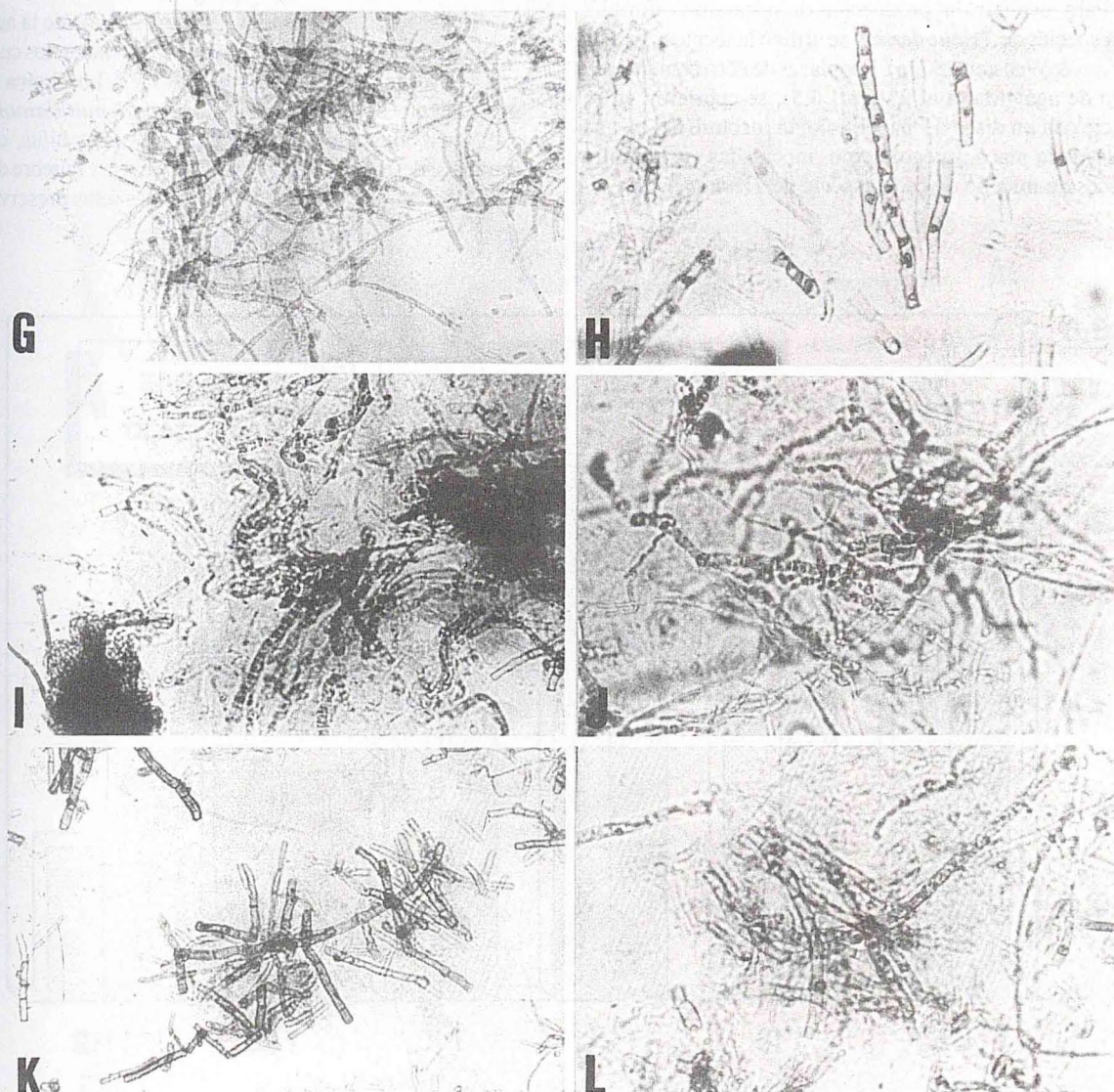


Figura 2. Apareamiento de la raza Ba2 de *Colletotrichum lindemuthianum* con las especies de *Trichoderma*: a. testigo, b. *T. viride* (TR2), c. *T. aureoviride* (T10), d. *T. koningii* (T15), e. *T. harzianum* (T25) y f. *T. pseudokoningii*.

sobre *C. lindemuthianum*. Los hongos fueron cultivados en Papa Dextrosa Agar (PDA) y después de 8 días de incubación, trozos (discos) de 5 mm de diámetro fueron retirados de la periferia de las colonias para servir como inóculo y colocados en placas de Petri con PDA. Debido al crecimiento más lento, los trozos de cada raza de *C. lindemuthianum* fueron colocados en un extremo de las placas con 5 días de anticipación a la siembra de cada especie de *Trichoderma* (individualmente en el otro extremo). La distancia entre los inóculos fue de 7 cm, y las placas se incubaron a 25°C por 8 días más. Todas las siembras se efectuaron en triplicado, además de las placas controles sin *Trichoderma*. La evaluación se realizó mediante la formación entre los inóculos de una zona de demarcación, o bien como, alteraciones en la pigmentación del medio o lisis de las hifas.

Para evaluar la producción de sustancias difusibles por las especies de *Trichoderma*, se utilizó la técnica descrita por Dennis & Webster (1971a). Las placas de Petri conteniendo extracto de agar Malta al 2% (pH 6,5), se cubrieron en su superficie con un disco de papel celofán incoloro del mismo diámetro de la placa. Luego fueron inoculadas en su centro con discos de micelio de cada especie de *Trichoderma* (se-

paradamente). Después de tres días de incubación a 28°C, el papel celofán con el cultivo del hongo, fue retirado e inoculado con un disco de cada raza de *C. lindemuthianum*, separadamente. Las placas fueron incubadas nuevamente a 25°C, por 7 días. La evaluación fue realizada por la medición del crecimiento radial de las razas de *C. lindemuthianum*. Para cada tratamiento, constituido por una especie de *Trichoderma*, se hicieron tres repeticiones. Los resultados obtenidos en este último ensayo fueron sometidos a un análisis estadístico (Test de Tukey) con el fin de verificar la eficiencia de *Trichoderma* spp. en este control biológico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antagonica de las especies de *Trichoderma* en los cultivo apareados se presentan en las Figuras 1 y 2. La Figura 1, en el apareamiento de la raza Ba₁₀ de *C. lindemuthianum*, se puede notar alteraciones morfológicas en las hifas, como plasmólisis, desintegración, desorganización y quiebre de las setas. El testigo, por otro lado, presentó las setas preservadas

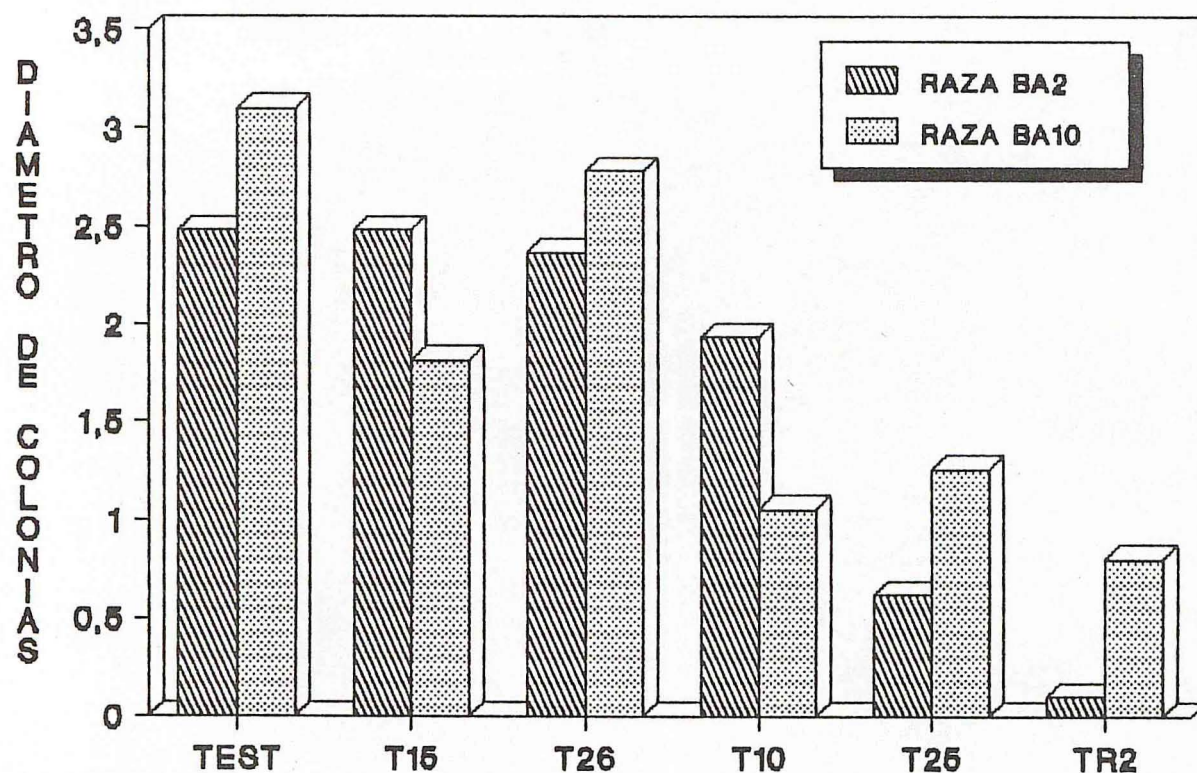


Figura 3. Diámetro de las colonias de *Colletotrichum lindemuthianum* (razas Ba2 y Ba20), en ensayo de papel celofán versus especies de *Trichoderma* (T15, T26, T10, T25 y Tr2)

no hubo formación del sector descolorido y las especies de *Trichoderma* sobre las colonias de las razas ensayadas.

las hifas de *Trichoderma* sobre las colonias de las razas ensayadas.

Aparentemente las dos razas de *C. lindemuthianum*, fueron altamente susceptibles a todas las especies de *Trichoderma*, evidenciándose un posible antagonismo. Silva (1982) trabajando con varias especies del mismo taxa y utilizando el mismo método, observó que en el apareamiento

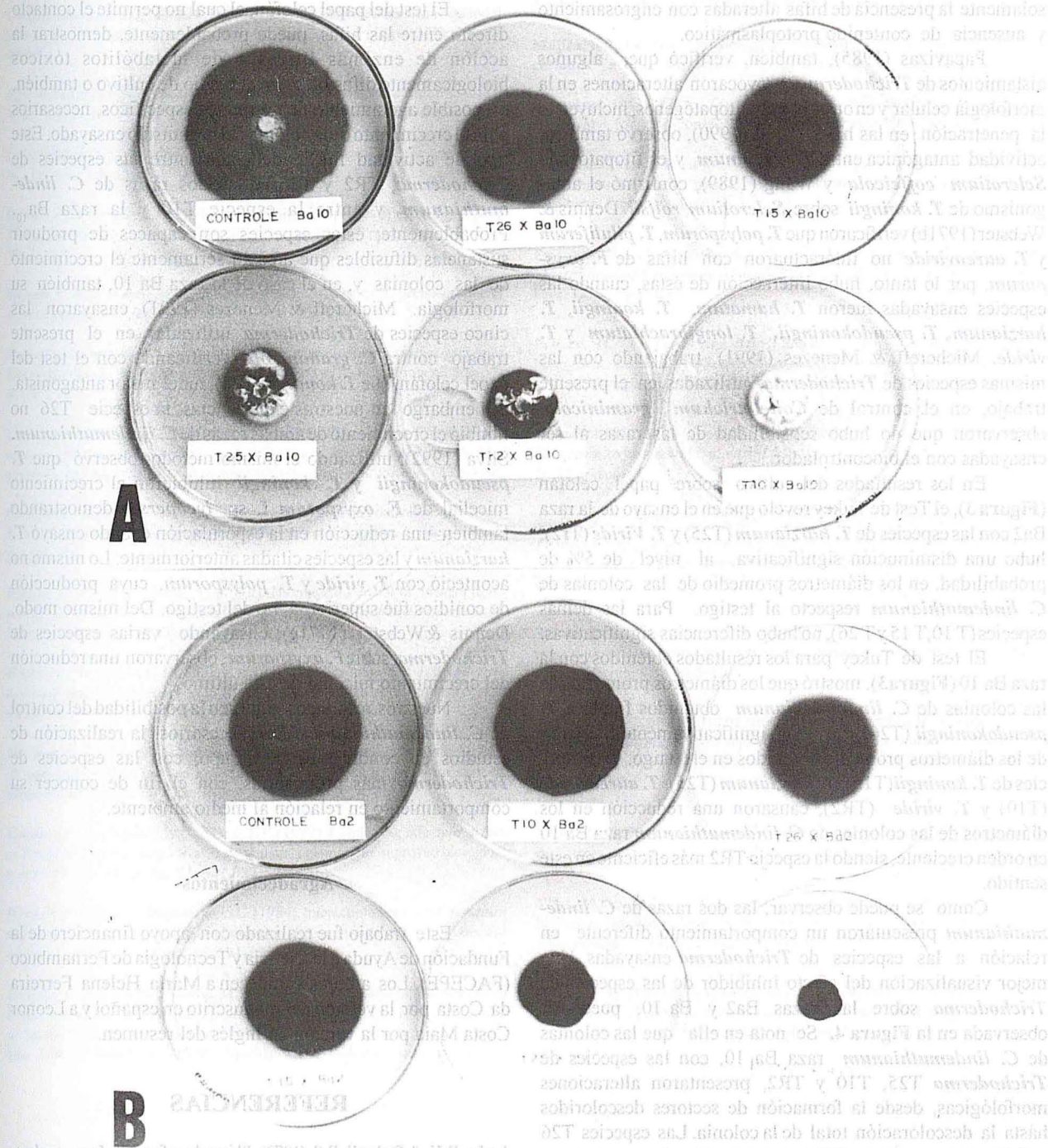


Figura 4. Crecimiento radial de *Colletotrichum lindemuthianum* frente a las especies de *Trichoderma*. A. Raza Ba20 y B. Raza Ba2

de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* con *T. polysporum*, las hifas del fitopatógeno presentaron varias alteraciones, como ausencia de contenido protoplasmático, estrangulamiento y acortamiento celular. Con relación a *T. viride* y *T. harzianum*, el crecimiento sobre el fitopatógeno fue menos acentuado, por lo tanto, las observaciones microscópicas fueron idénticas a las encontradas para *T. polysporum*. Cuando el autor ensayó *T. koningii* y *T. pseudokoningii*, verificó solamente la presencia de hifas alteradas con engrosamiento y ausencia de contenido protoplasmático.

Papavizas (1985), también, verificó que, algunos aislamientos de *Trichoderma*, provocaron alteraciones en la morfología celular y en otros hongos fitopatógenos, incluyendo la penetración en las hifas. Vital (1990), observó también, actividad antagonista entre *T. harzianum* y el fitopatógeno *Sclerotium coffeicola* y Wang (1989), confirmó el antagonismo de *T. koningii* sobre *Sclerotium rolsfii*. Dennis & Webster (1971b) verificaron que *T. polysporum*, *T. piluliferum* y *T. aureoviride* no interactuaron con hifas de *F. oxysporum*, por lo tanto, hubo interacción de éstas, cuando las especies ensayadas fueron *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum* y *T. viride*. Michereff & Menezes (1991), trabajando con las mismas especies de *Trichoderma*, utilizadas en el presente trabajo, en el control de *Colletotrichum graminicola*, observaron que no hubo sensibilidad de las razas al ser ensayadas con el biocontrolador.

En los resultados del cultivo sobre papel celofán (Figura 3), el Test de Tukey reveló que en el ensayo de la raza Ba2 con las especies de *T. harzianum* (T25) y *T. Viride* (Tr2), hubo una disminución significativa, al nivel de 5% de probabilidad, en los diámetros promedio de las colonias de *C. lindemuthianum* respecto al testigo. Para las demás especies (T10, T15 y T26), no hubo diferencias significativas.

El test de Tukey para los resultados obtenidos con la raza Ba 10 (Figura 3), mostró que los diámetros promedios de las colonias de *C. lindemuthianum* obtenidos frente a *T. pseudokoningii* (T26), no fueron significativamente diferentes de los diámetros promedio obtenidos en el testigo. Las especies de *T. koningii* (T15), *T. harzianum* (T25), *T. aureoviride* (T10) y *T. viride* (TR2), causaron una reducción en los diámetros de las colonias de *C. lindemuthianum* raza Ba 10 en orden creciente, siendo la especie TR2 más eficiente en este sentido.

Como se puede observar, las dos razas de *C. lindemuthianum* presentaron un comportamiento diferente en relación a las especies de *Trichoderma* ensayadas. Una mejor visualización del efecto inhibitorio de las especies de *Trichoderma* sobre las razas Ba2 y Ba 10, puede ser observada en la Figura 4. Se nota en ella que las colonias de *C. lindemuthianum* raza Ba 10, con las especies de *Trichoderma* T25, T10 y TR2, presentaron alteraciones morfológicas, desde la formación de sectores descoloridos hasta la descoloración total de la colonia. Las especies T26 y T15 no fueron eficientes en la inhibición del crecimiento en relación al testigo. Mientras, para la raza Ba2 (Figura 4b),

no hubo formación del sector descolorido y las especies de *Trichoderma* T25 y TR2, fueron las que más se destacaron, en comparación con el testigo.

El comportamiento de la especie T10, fue totalmente contrario, cuando esta fue ensayada con la raza Ba 10. Los resultados demostraron que las especies TR2 y T25 son inhibitorias eficientes del crecimiento de las colonias de ambas razas de *C. lindemuthianum* in vitro.

El test del papel celofán, el cual no permite el contacto directo entre las hifas, puede probablemente, demostrar la acción de enzimas líticas o de metabolitos tóxicos biológicamente difusibles en el medio de cultivo o también, un posible agotamiento de nutrientes específicos, necesarios para el crecimiento de la colonia del organismo ensayado. Este tipo de actividad fue evidenciada entre las especies de *Trichoderma*, TR2 y T25, y las dos razas de *C. lindemuthianum*, y entre la especie T10 y la raza Ba₁₀. Probablemente, estas especies son capaces de producir sustancias difusibles que afectan seriamente el crecimiento de las colonias y, en el caso de la raza Ba 10, también su morfología. Michereff & Menezes (1991), ensayaron las cinco especies de *Trichoderma* utilizadas en el presente trabajo contra *C. graminicola*, verificando con el test del papel celofán, que *T. koningii* (T26), fue el mejor antagonista. Sin embargo en nuestras experiencias, la especie T26 no inhibió el crecimiento de ambas razas de *C. lindemuthianum*. Silva (1992), utilizando el mismo método observó que *T. pseudokoningii* y *T. koningii* inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, demostrando también una reducción en la esporulación cuando ensayó *T. harzianum* y las especies citadas anteriormente. Lo mismo no aconteció con *T. viride* y *T. polysporum*, cuya producción de conidios fué superior a la del testigo. Del mismo modo, Dennis & Webster (1971c), ensayando varias especies de *Trichoderma*, sobre *F. oxysporum*, observaron una reducción del crecimiento micelial de este último.

Nuestros resultados, sugieren la posibilidad del control de *C. lindemuthianum*. Son necesarios la realización de estudios en condiciones de campo, con las especies de *Trichoderma* más promisorias, con el fin de conocer su comportamiento en relación al medio ambiente.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con apoyo financiero de la Fundación de Ayuda a la Ciencia y Tecnología de Pernambuco (FACEPE). Los autores agradecen a María Helena Ferreira da Costa por la versión del manuscrito en español y a Leonor Costa Maia por la versión en inglés del resumen.

REFERENCIAS

- Aroba, D.K. & Dwivedi, R.S. (1979). Rhizosphere fungi of *Lens esculenta* Moench, antagonistic to *Sclerotium rolsfii* Sacc. Soil. Biol. Biochem. II; 563-566.

- Bell, D.K., Wells, H.D., Markham, C.R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.
- Chet, I. & Baker, R. (1981) Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290.
- Chet, I., Harman, G.E., Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*. Its hyfal interaction with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology* 7: 29-38
- Ciat - Centro Internacional de Agricultura Tropical (1988) Informe Anual 1987. Programa de frijol. Cali, 383 p. Documento de trabajo 47.
- Cruickshank, I.A.M. (1966). Strains of *C.lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) In Eastern Australia. *J.Aust. Inst. Agric. Soc.* 32: 134-135.
- Dennis, C. & Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non volatile antibiotics. *Trans. Br. mycol. Soc.* 57: 25-39.
- Dennis, C. & Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal Interaction. *Trans. Br. mycol. Soc.* 57: 363-369.
- Dennis, C & Webster, J. (1971c). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. mycol. Soc.* 57: 41-48.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., Hennis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microcopy. *Phytopathology* 73: 85-88.
- Freeman, T.E. (1981) Use of conidial fungi in biological control. In: G.T. Cole & B. Kendrick (eds.). *Biology of conidial fungi*. Vol.2. London, Academic Press. pp. 143-165.
- Hadar, Y., Chet, I., Henis, Y. (1979). Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69: 64-68.
- Hadar, Y., Harman, G.E., Taylor, A.G. (1984) Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* sp. *Phytopathology* 74: 106 -110.
- Harman, G.E., Chet, I. & Baker, R. (1980). *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. on *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:1167-1172.
- Harman, G.E., Taylor, A.G., Stasz, T.F. (1989). Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improved biological seed treatments. *Plant Dis.* 73: 631-637.
- Henis, Y., Lewis, J.A., Papavizas, G.C. (1984). Interactions between *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* spp. Relationship between antagonism and disease control. *Soil. Biol. Biochem.* 16: 391-395.
- Issa, E., Regis, J.N.M., Vieira, M.L., Araujo, J.T., Miyasakas, S. (1984). Primeiros estudos para a produção de sementes sadias de feijão em regiões áridas do Nordeste Brasileiro. *Arq. Inst. Biol.* 31: 21-25.
- Liu, S.D. & Baker, R. (1980). Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 404-412.
- Masterbroek, C. (1980). A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. *Euphytica* 9:177-184.
- Michereff, S.J & Menezes, M. (1991) Influencia de metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. no antagonismo a *Colletotrichum gramincicola* in vitro. Anais da IV Reuniao Brasileira sobre Controle Biológico de Doencas de plantas. EMBRAPA-CNPDA, Campinas, Sp. p. 5 (resumo).
- Mujica, B.F. (1952). Razas fisiológicas y susceptibilidad varietal de los frijoles chilenos a la antracnosis. *Agricultura Tecnica* 12: 31-45.
- Papavizas, G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium* ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathology* 23: 23-54.
- Papavizas, G.C. & Lewis, J.A. (1983). Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MCB fungicides. *Phytopathology* 73: 407-411.
- Pessoa, M.N.G., Pio-Ribeiro, G., Menezes, M. (1987). Controle biológico de *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão *Phaseolus vulgaris*. *Fitopatol. Bras.* 12: 137 (resumo).
- Peuser, H. (1931). Fortgesetzte untersuchungen iiber das vorkommen biologischer rassen von *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav. *Phytopatologische Zeitschrift* 4: 83-112.
- Silva, D.M.W. & Menezes, M. (1991). Efeito de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in vitro e in vivo. *Fitopatol. Bras.* 16:42. (resumo).
- Silva, F.A.G. (1992). Espécies de *Trichoderma* Pers. ex Fr. no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, agente da fusariose do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Dissertacao de Tese de Mestrado em Fitossanidade - UFRPE, Recife, PE. 11 p.
- Simon, A. & Sivasithamparam, K. (1988). The soil environment and the supression of saprophytic growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Can. J. Microbiol.* 34: 865-870.
- Turhan, G. & Kutsi, T. (1989). Suppression of damping-off on pepper caused by *Pythium ultimum* Trow and *Rhizoctonia solani* khun by some new antagonist in comparison with *Trichoderma harzianum* Rifal. *J. Phytopathol.* 126: 175-182.
- Vieira, C. (1983). Doencas e pragas do feijoeiro. Vicosa, Universidade Federal de Viscosa. 231 p.
- Vital, M.J.S. (1990). *Sclerotium coffeicola* Bull.: crescimento, controle biológico, químico e alguns hospedeiros. Dissertacao de Tese de Mestrado em Fitossanidade - UFRPE, Recife, PE. 104 p.
- Wang, S. L. (1989). Caracterizacao cultural, morfológica e patogénica de *Sclerotium rolfsii* Sacc. e seu biocontrole por *Trichoderma* spp. in vitro e in vivo. Dissertacao de Tese de Mestrado em Fitossanidade - UFRPE, Recife, PE. 139p.