

Efecto biocontrolador de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium* spp. en *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (leucaena), *Cedrela odorata* L. (cedro) y *Phitecellobium saman* (Jacq.) Merr.

Biocontroller effect of *Trichoderma harzianum* rifai on *Fusarium* spp. in the seedling production of three forest species.

Tarsicio Santana Díaz¹, Leónides Castellanos González^{2*}

Resumen

El objetivo de la investigación fue determinar el efecto biocontrolador de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium* spp. en la producción de plántulas *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (leucaena), *Cedrela odorata* L. (cedro) y *Phitecellobium saman* (Jacq.) Merr. (samán). Para ello se condujo un experimento para cada especie en condiciones semi-controladas (en bolsas), en el Área Administrativa del Medio Ambiente del municipio Muñoz, del Estado Apure, Venezuela. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y cuatro replicas (parcelas de 20 bolsas). En cada experimento los tratamientos fueron: *T. harzianum* a razón de 20 y 40 gL⁻¹; tratamiento químico con mancozeba razón de 24 gi.a.L⁻¹, y un testigo sin tratamiento alguno, a los que se evaluó el porcentaje de plantas enfermas a los 30 y 90 días después de la siembra. Se determinó efecto biocontrolador de *T. harzianum* sobre *Fusarium* spp. en *L. leucocephala*, no así sobre las enfermedades del suelo de *C. odorata* y *P. saman*. Se puso en evidencia que para *L. leucocephala*, el tratamiento del antagonista biológico puede constituir una alternativa de control de la enfermedad cuando se aplica en siembra y cada 15 días durante el desarrollo de las plántulas, a la dosis de 40 gL⁻¹.

Palabras clave: Especies forestales, antagonista, hongos del suelo

Abstract

The objective of the present work was to determine the biocontroller effect of *Trichoderma harzianum* Rifai on *Fusarium* spp. in the seedling production of three forest species, viz, *Leucaena leucocephala* (Lam.) of Wit. (leucaena), *Cedrela odorata* L. (cedar) and *Phitecellobium saman* (Jacq.) Merr. (saman). For that an

¹Unidad de Medio Ambiente. Mantecal Estado Apure. Venezuela.

²Centro de Estudios para la Transformación Agraria Sostenible (CETAS). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Cienfuegos. Cuba. * Autor para la correspondencia. Email: lcastellanos@ucf.edu.cu

experiment was conducted for each species under semi-controlled conditions (nursery in bags), in the Administrative Area of the Environment of the Municipality Muñoz, of the Apure State. A completely randomized design was used with four treatments and four replications (plots of 16 bags). In each experiment the treatments were: *T.harzianum* at 20 and 40 gL⁻¹; chemical treatment with Fungithan 200 PM (ingredient active) at 30 gL⁻¹ and a control without treatment, the percentage of diseased plants was measured at 30 and 90 days after sowing. Biocontroller effect of *T. Harzianum* on *Fusarium* sp in *L. Leucocephala* was determined, but it hadn't effect on the soil borne disease in *C. odorata* and in *P. saman*. It put on in evidence that the treatment with *T. harzianum* could constitute an control alternative of the disease in *L. Leucocephala* when it is applied at sowing and every 15 days during the seedling development, at 40 gL⁻¹.

Key word: Forest species, *Trichoderma harzianum*, seedlingsver

Introducción.

Los bosques tropicales son cada vez más un recurso crítico para el desarrollo sostenible de los países tropicales por la creciente presión ejercida por la sociedad y la contribución de los servicios ecosistémicos del bosque a la sostenibilidad de varios sectores socioeconómicos. Es por ello que la Convención Marco de las Naciones Unidas para el Cambio Climático, a través del Protocolo de Kyoto, establece la importancia de los bosques como sumideros de carbono (Karousakis, 2007).

En los últimos tiempos, la reforestación en el municipio Muñoz, Estado Apure ocupa un lugar preponderante debido a las estrategias que ha establecido el gobierno venezolano con tres objetivos fundamentales: la defensa, la protección del ambiente y la comercialización de madera y carbón. Entre las especies más cultivadas con estos fines se encuentran: *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (leucaena), *Cedrela odorata* L. (cedro) y *Phytocellobium saman* (Jacq.) Merr.(saman), las cuales poseen alto valor económico, por su fácil adaptabilidad a los suelos del mismo (INIA, 2007).

Entre los problemas fitosanitarios en especies forestales se informan diferentes hongos patógenos; siendo los de mayor incidencia *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Nigrospora* sp. y *Curvularia* sp. con un 35% y *Ascochyta* sp. y *Phomopsis* spp., son reportados en menos proporción (12%). Los patógenos que más atacan al *P.saman* son *Aspergillus* spp., y *Penicillium* sp. en la semilla y *Colletotrichum* sp. en el follaje. Además todas las plántulas de especies forestales en vivero pueden afectarse por *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp. y *Phytophthoras* pp. que forman parte del complejo fungoso causante del damping off (Arguedas, 2007).

El desarrollo y aplicación de agentes de control biológico de plagas, adquiere una importancia relevante como una alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible, que preserve los recursos naturales y el medio ambiente para las futuras generaciones (Gómez et al., 2002).

En los últimos años se ha comprobado el efecto biocontrolador y estimulador del crecimiento del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* Rifai (Donoso et al., 2008).

No se han encontrado antecedentes de investigación en la efectividad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* en la producción de plántulas de forestales como cedro, saman y Leucaena en el Estado Apureño se conoce si el empleo del biopreparado de *T.harzianum* puede ejercer un efecto biocontrolador de enfermedades causadas por hongos del suelo en leucaena, cedro y samán. La investigación tuvo por objetivo determinar el efecto del biocontrolador de *T.harzianum* Rifai sobre *Fusarium* spp en la producción de plántulas de tres especies forestales.

Materiales y métodos.

La presente investigación se realizó en el período comprendido entre abril del 2012 y agosto del 2012 en el vivero forestal del área Administrativa N°2 del municipio Muñoz y Rómulo Gallegos del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente (MPPPAMB) ubicado en la Población de Mantecal del Estado Apure, en las especies Leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit), Cedro (*Cedrela odorata* L.) y Samán (*Phithecellobium saman* (Jacq.) Merr.).

Se usaron bolsas de polietileno de 2 kg, las cuales se llenaron con una mezcla de suelo del lugar y materia orgánica (MO) en proporción: 90% de suelo y 10% de MO, siguiendo los criterios de Álvarez (2006). Como material de siembra se utilizaron semillas recolectadas en distintos sectores del municipio, las cuales poseían un 95% de germinación previa. Se depositaron dos semillas por bolsa y se les realizó todas las prácticas culturales hasta el trasplante, previstas en el manual para viveros forestales (Grass, 2003).

Se condujeron tres experimentos, una para cada especie forestal sobre la base de un diseño en bloque al azar, con cuatro tratamientos consistentes en las variantes con plaguicidas biológicos y químicos, así como un testigo sin tratamiento, con cuatro replicas. Cada replica estuvo constituida por 20 bolsas.

Las tres especies forestales fueron: *L.leucocephala*, *C.odorata* y *P.saman* y se realizaron los siguientes tratamientos: *T. harzianum* 20g L⁻¹, *T. harzianum* a razón de 40 gL⁻¹, mancozeb 24 gi.a. L⁻¹ Testigo.

El bioproducto de *T.harzianum* se obtuvo en el Laboratorio de Biocontroladores “El Rescate Campesino”, municipio Biruaca del Estado Apure, certificado con una concentración entre 1-3x10⁹ conidios/g sobre sustrato (arroz) con 25 días de cosechado.

Los tratamientos con *T.harzianum* se efectuaron primeramente tratándose las semillas por inmersión durante 10 minutos, se secaron 30 minutos y se sembraron. Posteriormente se realizaron los tratamientos con el antagonista a las dosis previstas cada 15 días a partir de la siembra con una solución final de 300Lha⁻¹.

El tratamiento químico se realizó con el fungicida mancozeb al 2,4% (24 gi.a. L⁻¹), aplicado al suelo y al follaje. Los tratamientos químicos se realizaron también cada 15 días. En total se realizaron seis aplicaciones con biológicos o químicos durante el ciclo de las plántulas hasta los 75 días de edad.

Durante el período de desarrollo de las plántulas, se realizaron las prácticas culturales de manejo respectivas como riego y aplicación de insecticidas, siguiendo las normas técnicas establecidas (Grass, 2003).

Se hicieron observaciones de las plántulas para ver la incidencia de enfermedades y se evaluó el porcentaje de plantas enfermas identificándose también el agente causal a los 30 y 90 días de iniciado el ensayo a partir de muestras enviadas al Laboratorio de diagnóstico “El Rescate Campesino”, municipio Biruaca del Estado Apure.

Los datos fueron analizados estadísticamente utilizándose la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al comprobarse la no normalidad de los datos por la prueba de Komodorov Smirnov. Se empleó el paquete estadístico Statistix para Windows versión 6.

Resultados y discusión.

Leucaena (*L.leucocephala*)

Para la especie *L.leucocephala* se presentaron plantas enfermas por hongos de suelo en todas las variantes en estudio a los treinta días de instalado el ensayo. Las plántulas enfermas presentaban menor tamaño, síntomas de marchitez y lesiones en la base del tallo. En ocasiones se podía observar un micelio blanquecino casi imperceptible y finalmente morían. El análisis del laboratorio diagnosticó la presencia de *Fusarium* sp., y aunque se dispone de poca información de los agentes causales de la pudrición de las raíces de *Leucaena leucocephala* en vivero, se conoce que varios investigadores como Lescano et al. (2009), han informado a *Fusarium* sp como patógeno de las semillas de esta especie.

El porcentaje de plantas enfermas a los 30 días (Tabla 1) varió entre 2,07% en *T.harzianum* a 40 gL⁻¹ y 38,15% para el testigo, sin diferencia estadística entre estos valores ($P > 0,01$). A los 90 días el testigo alcanzó 44,75% de posturas enfermas con diferencia significativa ($p \leq 0,01$) con el tratamiento de *T. harzianum* 40 gL⁻¹. No defirieron del testigo, el tratamiento químico y en el que se aplicó *T.harzianum* 20 gL⁻¹

Tabla 1. Porcentaje de plantas de *Leucaena leucocephala* enfermas a los 30 y 90 días después de la siembra en la población de Mantecal, estado Apure, Venezuela.

Tratamientos Dosis	Plantas enfermas a los 30 días		Plantas enfermas a los 90 días	
	Porcentaje	Rangos medios	Porcentaje	Rangos medios
<i>T. harzianum</i> 20 gL ⁻¹	4,15	4,8 ns	6,22	6,25 ab
<i>T. harzianum</i> 40 gL ⁻¹	2,07	6,5 ns	2,07	3,75 b
Mancozeb a 24 gL ⁻¹	8,30	10,0 ns	12,40	10,00 ab
Testigo	38,15	12,8 ns	44,75	14,00 a
P valor *		0,036ns		0,009 *

* Significativo ($p \leq 0,01$) y ns: No significativo ($p > 0,01$)

Rangos seguidos de letras distintas en las columnas difieren entre si por Kruskal Wallis ($P \leq 0,01$)

La efectividad de varias cepas de *T. harzianum* contra diferentes especies de *Fusarium* ha sido demostrada en Mexico por Michel-Aceves et al. (2009), quienes demostraron antagonismo por espacio, por nutrientes y el efecto de antibiosis al inhibir el crecimiento; así como el de hiperparasitismo del antagonista sobre el hongo patógeno.

Se puso en evidencia que para *L. leucocephala*, el tratamiento del antagonista biológico puede constituir una alternativa de control de la enfermedad, cuando se aplica en siembra y cada 15 días durante el desarrollo de las plántulas en dosis de 40 gL⁻¹ al disminuir en más de 36% las plantas enfermas. No ocurrió así, para los tratamientos con el fungicida químico y con *T. harzianum* 20 gL⁻¹, que aunque presentaron valores relativos menores que el testigo no difieren estadísticamente de éste.

Cedro (*C. odorata*)

En *C. odorata* también se detectaron plantas enfermas por hongos del suelo en todos los tratamientos. Dentro de los agentes de caída de plántulas en esta especie se determinó la presencia de *Fusarium* spp., este patógeno ha sido informado como causante de daño en raíces del cedro rojo en Costa Rica (Arguedas, 2007).

A los 30 días de instalado el ensayo, aunque el porcentaje de plantas enfermas varió entre 4,1% y 22,8% no hubo diferencias estadísticas, (Tabla 2). El porcentaje de plantas enfermas para los tratamientos con *T. harzianum* 20 gL⁻¹ y 40gL⁻¹, mostraron valores que aunque relativamente más bajos que el testigo sin tratamiento, no se evidenció diferencias estadísticas por ($P < 0,05$). Similar situación ocurría los 90 días.

Tabla 2. Porcentaje de plantas de *Cedrela odorata* enfermas a los 30 y 90 días después de la siembra en la población de Mantecal, estado Apure, Venezuela.

Tratamientos	Plantas enfermas a los 30 días		Plantas enfermas a los 90 días	
	Porcentaje	Rangos medios	Porcentaje	Rangos medios
<i>T. harzianum</i> a 20 gL ⁻¹	4,13	6,0 ns	4,13	7,3 ns
<i>T. harzianum</i> a 40 gL ⁻¹	4,10	6,3 ns	2,08	6,5 ns
Mancozeb a 24gL ⁻¹	8,25	6,8 ns	2,08	7,0 ns
Testigo	22,88	13,0 ns	10,38	11,0 ns
P valor *		0,08 ns		0,35 ns

* Significativo ($p \leq 0,01$) y ns: No significativo ($p > 0,01$)

Samán (*Phithecellobium saman*)

En el caso de *P. saman* no se presentaron plantas enfermas a los 30 días para el tratamiento con *T. harzianum* a 40gL⁻¹ (Tabla 3), sin embargo en el resto de los tratamientos el porcentaje de plantas enfermas fue bajo y aunque en el testigo sin tratamiento se presentó un 18,8% de plántulas enfermas, no evidenciándose diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$). A los 90 días las variantes tratadas no presentaron plantas enfermas y el testigo sin tratamiento solo 8,3%.

Tabla 3. Porcentaje de plantas de *Pithecellobium saman* enfermas a los 30 y 90 días después de la siembra en la población de Mantecal, estado Apure, Venezuela.

Tratamientos	Plantas enfermas a los 30 días		Plantas enfermas a los 90 días	
	Porcentaje	Rangos medios	Porcentaje	Rangos medios
<i>T. harzianum</i> a 20 gL ⁻¹	2,08	7,3 ns	0,00	8,0 ns
<i>T. harzianum</i> a 40 gL ⁻¹	0,00	5,5 ns	0,00	8,0 ns
Mancozeb a 24 gL ⁻¹	6,25	7,9 ns	0,00	8,0 ns
Testigo	18,80	4,89 ns	8,30	10,0 ns
P valor *		0,04 ns		0,42 ns

* Significativo ($p \leq 0,01$) y ns: No significativo ($p > 0,01$)

Los patógenos presentes en este ensayo fueron *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. aunque los niveles de las enfermedades para esta especie fueron bajos, lo que demuestra un nivel determinado de resistencia o tolerancia.

En la literatura revisada (Arguedas, 2007) no se encuentran las especies de *Fusarium* como causantes de enfermedades en *P. saman*, (solo *Aspergillus* sp.,

Colletotrichum sp. y *Penicillium* sp). No obstante este patógeno fue encontrado en las demás especies forestales estudiadas, por lo que es presumible que sea un organismo común en esos suelos y también afecte al Samán, por ser *Fusarium* un género bastante polífago como fitopatógeno. Los síntomas, concordaban con los producidos por este tipo de patógeno en la parte basal y en ocasiones causando marchitez de las plántulas.

Con respecto a *Colletotrichum* spp. puede decirse que solo se manifestaron síntomas muy iniciales de la enfermedad, aunque existen reportes de Arguedas y Cots (2012) que señalan que hongos de este género causando diferentes sintomatologías en plántulas de vivero y plantación, incluyendo entre sus hospedantes al poner *P. saman*. A pesar de observarse dos tipos de patógenos, esta especie forestal presentó en general buena situación fitosanitaria, incluso en el testigo, poniéndose en evidencia la adaptabilidad del mismo a las condiciones edafoclimáticas de la zona donde se desarrolló el ensayo corroborando lo planteado por INIA (2007).

Por otra parte aunque no se evidenció diferencias estadísticas entre los tratamientos con *T. harzianum* y el testigo, no obstante se sabe que este antagonista sería efectivo en el control de *Colletotrichum* y *Loeosporioides* (antracnosis) en un amplio rango de cultivos como: arveja, papa, tomate, frijol, fresa, mora, flores, tomate de árbol. Por lo mismo, el hecho que en este ensayo no se haya detectado pudo que la explicación al no haber efecto en el presente ensayo puede deberse al bajo nivel observado de las dos enfermedades (Fundación para la Innovación Agraria, 2008).

Conclusiones.

1. Se determinó efecto biocontrolador de *T. harzianum* sobre *Fusarium* sp. en *L. leucocephala* no así sobre las enfermedades del suelo de *C. odorata* y *P. saman*.
2. Se puso en evidencia que para *L. leucocephala*, el tratamiento del antagonista biológico puede constituir una alternativa de control de la enfermedad cuando se aplica en siembra y cada 15 días durante el desarrollo de las plántulas en dosis de 40 gL⁻¹.

Referencias bibliográficas.

Álvarez, P. A. (2006). Manual de viveros forestales. p. 23-35.

Lezcano, J.C., Martínez, B. y Alonso, O. (2009). Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Revista Pastos y Forrajes*, Vol. 32, No. 3: 1-14

Arguedas, M. (2007). Plagas y enfermedades forestales en Costa Rica. *Revista Forestal* 4 (11 y 12 especial). San José de Costa Rica. Corporación Garrony Moya. 69 p.

Arguedas, M. y Cots Ibiza, J.(2012). La antracnosis *Colletotrichum* sp en viveros forestales.*Revista Forestal Mesoamericana Kurú9* (22): 60-62.

Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Solano-Pascacio, L.Y., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A. y Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subg Lutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 27 (1): 18-26.

Donoso, E., Lobos, G. y Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero.*Bosque* 29(1): 52-57.

Fundación para la Innovación Agraria.(2008). Biocontrol de enfermedades fungosas con *Trichoderma* spp.Ministerio de Agricultura. Chile. Serie experiencias de innovación 62 para el emprendimiento agrario. 28p.

Gras, H. (2003). Manual de viveros forestales. –p 18-26.

Gómez, E., Alvares R. M; María de los A. Z., Hernández J.L.,Lemes T.,Croche G y Cruz X. (2002). Nematicida a partir del hongo *Verticillium lecanii*.Rev. Terralia No. 24.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). (2007). Caracterización Socioeconómica del Sector Agrícola, Eje Norte Llanero, estado Apure. Informe Técnico de Resultados del Subproyecto “Desarrollo de la Sala Prospectiva del INIA”. Primera Versión. Maracay, Venezuela. 53 p.

Karousakis, K. (2007). Incentives to reduce GHG emissions from deforestation: lessons learned from Costa Rica and Mexico. Organization for Economic Co-operation and Development –OECD/IEA-, Paris, FR. 51 p.

Fecha recibido: 28/06/2013
Fecha de aprobación: 11/11/2013