

Caracterización y sensibilidad *in vitro* a los fungicidas benomilo y procloraz de aislados de *Trichoderma* procedentes del cultivo de champiñón

F.J. GEA, C. LAINEZ, M.J. NAVARRO

Se han caracterizado nueve aislados de *Trichoderma* procedentes del cultivo de champiñón, en base a sus características culturales y microscópicas. Seis de ellos se han identificado como *T. atroviride*, otros dos como *T. harzianum* biotipo Th2, y uno como *T. viride*. Cabe destacar la presencia de *T. harzianum* Th2 dada la agresividad que presenta en los cultivos europeos de champiñón. Por otro lado, se ha valorado la eficacia *in vitro* de los fungicidas benomilo y procloraz a la hora de controlar estos aislados de *Trichoderma*. Los resultados obtenidos indican que el procloraz (valor medio de ED₅₀ = 0,10 mg l⁻¹) es más eficaz que el benomilo (valor medio de ED₅₀ = 0,35 mg l⁻¹).

F.J. GEA, M.J. NAVARRO: Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón. Apdo. 8, 16220 Quintanar del Rey (Cuenca). Correo electrónico: fjgea.cies@dipucuenca.es

C. LAINEZ: I.E.S. Diego Torrente Pérez. 16600 San Clemente (Cuenca).

Palabras clave: *Agaricus bisporus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* Th2, *Trichoderma viride*, benomilo, procloraz.

INTRODUCCIÓN

Generalmente las especies de *Trichoderma* Pers. han sido consideradas como competidoras del champiñón o como indicadoras de un compost deficiente. Su presencia se asociaba a situaciones con residuos de azúcares solubles o con pH ácido. Dos especies, *T. viride* Pers. ex S.F. Gray y *T. koningii* Oud., eran prácticamente las únicas citadas como ligeramente peligrosas (SINDEN, 1971). En otras ocasiones también se podían encontrar como contaminantes ocasionales de la semilla o micelio de champiñón (SEABY, 1987; GEA *et al.*, 1995).

A mediados de los años 80, *Trichoderma harzianum* Rifai empezó a manifestarse como una enfermedad altamente destructiva de los cultivos de champiñón. Las primeras observaciones se realizaron en explotaciones de Irlanda del Norte en 1985, y posterior-

mente en Inglaterra y Escocia en 1987 (SEABY, 1987; 1989), y en Holanda en 1994 (GEELS, 1997). En Francia se detectó en 1997 (MAMOUN *et al.*, 2000) mientras que en España se citó en 1998, tanto en instalaciones de producción de compost como en cultivos de champiñón (HERMOSA *et al.*, 1999). A principios de los años 90, se encontraron formas similares de *T. harzianum* en explotaciones situadas en América del Norte, donde las pérdidas económicas ocasionadas en la última década superaron los 30 millones de dólares (OSPINA-GIRALDO *et al.*, 1999).

Se han encontrado cuatro biotipos (Th1, Th2, Th3 y Th4) de *T. harzianum* asociados con el compost de cultivo de champiñón, clasificados en base a su idiosincrasia genética (MUTHUMEENAKSHI *et al.*, 1994; RINKER, 1994), a su morfología y comportamiento cultural (SEABY, 1996), o a la pro-

ducción de metabolitos volátiles (MUMPUNI *et al.*, 1998). Tres de estos biotipos (Th1, Th2, Th3) se detectaron en Irlanda y resto de Europa, siendo el biotipo Th2 el agente causal de la enfermedad (SEABY, 1989). Por el contrario, en Norteamérica es el biotipo Th4 el que ocasiona mayores pérdidas (QI *et al.*, 1996). Recientemente se ha pasado a considerar al biotipo Th3 como un *T. atroviride* y no como un *T. harzianum* (CASTLE *et al.*, 1998; OSPINA-GIRALDO *et al.*, 1998).

En este trabajo se caracterizan morfológica y culturalmente varios aislados de *Trichoderma* recogidos en la comarca de cultivo de champiñón de Castilla-La Mancha, al tiempo que se realizan bioensayos con dos fungicidas autorizados en este cultivo, como son el benomilo y el procloraz, con la finalidad de obtener información sobre su eficacia a la hora de prevenir o luchar contra esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Los aislados se recogieron de explotaciones de cultivo de champiñón situadas en la comarca de La Manchuela (provincia de Cuenca), y se mantuvieron a 22 °C en medio de cultivo PDA. La tabla 1 muestra algunos datos sobre la procedencia de los aislados.

Identificación de aislados

Se ha seguido la metodología propuesta por SEABY (1996), basada en el estudio de

aspectos morfológicos y culturales. Este método utiliza entre otros caracteres identificativos la tasa de crecimiento a la temperatura de 27 °C, y la ratio entre los crecimientos diametrales manifestados a las temperaturas de 27 °C y 17 °C. Se han realizado cuatro repeticiones por cada aislado.

Para la caracterización morfológica se ha tenido en cuenta el efecto de la luz en la esporulación y el olor de la colonia una vez crecida. Entre las características microscópicas se ha estudiado el tipo de fiálides y la pared, forma y tamaño de al menos 50 conidios por cada uno de los aislados considerados.

Sensibilidad *in vitro* frente a dos fungicidas

Se utilizaron como materias activas el procloraz 46% WP (en complejo manganeso), y el benomilo 50% WP. Se ensayaron las concentraciones de 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 y 100 mg l⁻¹ de materia activa, a razón de cuatro placas por cada combinación concentración/fungicida/aislado, que fueron inoculadas con pastillas de 5 mm de diámetro del aislado en cuestión e incubadas a 22 °C durante 48 h.

La sensibilidad de cada aislado a los fungicidas ensayados se estimó mediante el cálculo de la ED₅₀ (mg l⁻¹ de materia activa que inhiben el 50% del crecimiento micelial). Los datos se procesaron mediante un análisis Probit (FINNEY, 1971) utilizando el programa informático POLO-PC (RUSSELL *et al.*, 1977). Con los valores de ED₅₀ obtenidos

Tabla 1.- Algunas características de los aislados de *Trichoderma*.

AISLADO	LOCALIDAD	FECHA	OBSERVACIONES
313/XII	Quintanar del Rey	30/12/1998	Sobre tierra de cobertura
TR2	Villalpardo	24/2/1998	Sobre compost, en 6ª flor
TR6	Quintanar del Rey	3/3/1998	Sobre carpóforo
TR50	Iniesta	16/10/1998	Sobre compost, en fase de inducción
TR54	Iniesta	16/10/1998	Sobre carpóforo, en 6ª flor
TR200	Quintanar del Rey	22/3/1999	Sobre tierra de cobertura, en 1ª flor
TR400	Quintanar del Rey	22/4/1999	Sobre carpóforo, en 5ª flor
TR500	Minglanilla	18/6/1999	Sobre tierra de cobertura, en 1ª flor
I300	Iniesta	29/3/1999	Sobre carpóforo

para cada fungicida se realizó un ANOVA, separando las medias mediante el test de Tukey-HSD ($p < 0,05$). Previamente, se valoró la homocedasticidad de los datos mediante el test de Cochran. Se ha utilizado el programa Statgraphics, Plus v. 4.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de aislados de *Trichoderma*

En la tabla 2 se presentan las principales características de tipo cultural y microscópico utilizadas para la identificación de los aislados de *Trichoderma*, así como el nombre de los taxones a que ha dado lugar esta identificación.

De los nueve aislados estudiados, seis de ellos (313/XII, TR2, TR6, TR54, TR400, I300) han sido identificados como *T. atroviride*. Este nombre ha sido recientemente propuesto en lugar de la denominación *T. harzianum* biotipo Th3 (CASTLE *et al.*, 1998; OSPINA-GIRALDO *et al.*, 1998). En opinión de

SEABY (1996) este taxón se caracteriza por la presencia de fiálides cortas y cerradas, pared conidial lisa, conidios ovoides (3,6 x 3,4 μm), esporulación de color verde azulado, con olor a coco, tasa de crecimiento a 27 °C de 0,6-1,0 mm h^{-1} y ratio de las tasas de crecimiento a 27/17° C cercana a 1,712. Entre nuestros aislados sólo hemos apreciado olor a coco en el codificado como TR2, mientras que en el resto el olor no ha sido un carácter válido para la identificación. Al mismo tiempo, este aislado ha presentado una ratio de las tasas de crecimiento (1,47) algo alejada de la que propone SEABY (1996). Los caracteres estudiados en los otros cinco aislados identificados como *T. atroviride* han encajado perfectamente con los descritos por este autor.

T. atroviride puede causar severos ataques en compost sembrado con micelio de champiñón, sobre todo cuando el manejo en la planta de compostaje no es el adecuado. Se puede manifestar en compost húmedo mal pasteurizado.

Tabla 2.- Principales características culturales y microscópicas de los aislados de *Trichoderma* estudiados.

AISLADO	TAXÓN	FIÁLIDES	CONIDIOS (pared, forma, tamaño)	COLOR COLONIA	OLOR CULTIVO	TASA CRECIMIENTO 27 °C (mm h^{-1})	RATIO TASAS CRECIMIENTO A 27 °C/17 °C
313/XII	<i>T. atroviride</i>	Cortas y cerradas	Lisa, ovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	—	0,84	1,69
TR2	<i>T. atroviride</i>	Cortas cerradas	Lisa, ovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	Coco	0,81	1,47
TR6	<i>T. atroviride</i>	Cortas y cerradas	Lisa, subovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	—	0,95	1,69
TR50	<i>T. harzianum</i> Th2	Cortas cerradas	Lisa, ovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	—	1,00	1,69
TR54	<i>T. atroviride</i>	Cortas y cerradas	Lisa, ovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	—	0,86	1,66
TR200	<i>T. viride</i>	Cortas cerradas	Lisa, ovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	Coco	0,67	1,42
TR400	<i>T. atroviride</i>	Cortas y cerradas	Lisa, subovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	—	0,88	1,72
TR500	<i>T. harzianum</i> Th2	Cortas cerradas	Lisa, ovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	—	0,96	2,07
I300	<i>T. atroviride</i>	Cortas cerradas	Lisa, ovoide, 3 x 3,5 μm	Verde azulado	—	0,85	1,72

Los aislados codificados como TR50 y TR500 han sido identificados como *T. harzianum* Th2. SEABY (1996) describe este taxón con fiálides cortas y cerradas, pared conidial lisa, conidios ovoides (3,5 x 3,3 µm), esporulación inicial de color blanco para terminar verde, con olor a malta, tasa de crecimiento a 27°C de 0,9-1,2 mm h⁻¹ y ratio de las tasas de crecimiento a 27/17 °C cercana a 2,054. El aislado TR50 presentaba una ratio algo más baja (1,69), si bien el resto de caracteres se encontraban entre los valores recomendados para su identificación. En el caso de TR500 todos los caracteres encajaban con la descripción proporcionada por SEABY (1996).

T. harzianum Th2 es el biotipo más agresivo, ya que ocasiona manchas en el compost que llegan a alcanzar los 30 cm de diámetro, colonizando a veces el paquete de compost por completo. El compost de champiñón y/o la tierra de cobertura infectada no llegan a producir champiñones, por lo que las pérdidas del cultivo son proporcionales al área afectada. En nuestro caso, el aislado TR50 se recolectó en un local de cultivo con un gran número de paquetes de compost totalmente invadidos por este hongo durante la etapa de inducción, lo que ocasionó graves pérdidas en la cosecha. Los métodos de control se basan fundamentalmente en la observancia de estrictas medidas higiénicas de tipo preventivo (SEABY, 1989; GARCÍA-MORRÁS y OLIVÁN, 1999).

Por último, el aislado TR200 ha sido identificado como *T. viride*, coincidiendo todos los caracteres con la descripción de SEABY (1996), excepto el referido a la tasa de crecimiento a 27/17 °C, que en nuestro caso era superior (1,42). *T. viride* ocasiona problemas menores en champiñón, ya que se manifiesta sobre la tierra de cobertura. Puede aparecer en cualquier momento de la producción, sobre todo a partir de la tercera florada cuando la tierra de cobertura tiene un pH inferior a 7, o cuando la semilla está contaminada. También puede ocasionar lesiones en los carpóforos.

Sensibilidad *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* frente a dos fungicidas

En la tabla 3 se exponen los valores de ED₅₀ obtenidos tras efectuar el análisis pro-bit. *T. atroviride* presenta valores de ED₅₀ superiores a los registrados por *T. harzianum* Th2, para los dos fungicidas utilizados. Estos resultados indican que *T. harzianum* Th2 es más sensible a los fungicidas que *T. atroviride*. También se puede ver que los valores de ED₅₀ son superiores para el benomilo en todos los casos, excepto para el aislado de *T. viride*.

Por otro lado, en la tabla 4 queda reflejado el resultado del ANOVA realizado con los datos de la tabla 3. Se observa la existencia de diferencias significativas entre ambos fungicidas a la hora de controlar el crecimiento *in vitro* de los aislados de *Trichoderma*.

Tabla 3.- Valores de ED₅₀ (mg l⁻¹) de los aislados de *Trichoderma* frente a los fungicidas benomilo y procloraz.

AISLADO	TAXÓN	BENOMILO		PROCLORAZ	
		ED ₅₀	RANGO	ED ₅₀	RANGO
313/XII	<i>T. atroviride</i>	0,42	0,40-0,43	0,32	0,29-0,35
TR2	<i>T. atroviride</i>	0,37	0,36-0,39	0,18	0,14-0,22
TR6	<i>T. atroviride</i>	0,22	0,21-0,24	0,02	0,01-0,03
TR50	<i>T. harzianum</i> Th2	0,27	0,26-0,28	0,01	0,01-0,02
TR54	<i>T. atroviride</i>	0,23	0,22-0,24	0,03	0,02-0,04
TR200	<i>T. viride</i>	0,17	0,16-0,19	0,20	0,17-0,23
TR400	<i>T. atroviride</i>	0,73	0,53-0,96	0,01	0,00-0,01
TR500	<i>T. harzianum</i> Th2	0,11	0,09-0,13	0,01	0,06-0,16
I300	<i>T. atroviride</i>	0,62	0,46-0,82	0,09	-

Tabla 4.- Valor medio y desviación estándar de los valores de ED₅₀ (mg l⁻¹) obtenidos para 9 aislados de *Trichoderma* frente a los fungicidas benomilo y procloraz.

FUNGICIDA	OBSERVACIONES	MEDIA ¹	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	RANGO
Benomilo	9	0,35 a	0,209	0,11-0,73
Procloraz	9	0,10 b	0,112	0,01-0,32

Test de Cochran: 0,78; $p > 0,05$

¹Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas al nivel del 95% ($p < 0,05$), de acuerdo con el test de Tukey-HSD.

ma. En líneas generales, el procloraz (valor medio de ED₅₀ = 0,10 mg l⁻¹) se muestra más eficaz que el benomilo (valor medio de ED₅₀ = 0,35 mg l⁻¹).

En la literatura especializada hay muy pocas menciones sobre la utilización con éxito de fungicidas para combatir los ataques de *T. harzianum*, debido fundamentalmente a la dificultad que supone el mezclado íntimo y eficaz del fungicida por toda la masa de sustrato. En este sentido, RINKER & ALM (1998a) realizaron ensayos con benomilo, tiabendazol y clorotalonil añadidos a la superficie del compost para controlar infecciones superficiales y profundas (10 cm de profundidad) de *T. harzianum* Th4. El resultado obtenido indicaba que los fungicidas eran más efectivos reduciendo el daño de la infección superficial, ya que el tamaño de la colonia del hongo era notablemente más pequeño sobre el compost y la tierra de cobertura en las infecciones superficiales que en las más profundas. Las aplicaciones de benomilo y clorotalonil sobre tierra de cobertura no dieron resultados positivos.

No obstante, si resulta efectivo realizar un tratamiento protector de los granos de micelio de champiñón con benomilo y yeso antes de la siembra, ya que protege frente a *T. harzianum* Th2 y Th4, respectivamente (GROGAN *et al.*, 1997; RINKER & ALM, 1998b).

No obstante, la aplicación de fungicidas como medida curativa ante ataques importantes no soluciona el problema, ya que *Trichoderma harzianum* (Th2 y Th4) invaden el sustrato por completo, tanto en superficie como en profundidad. Por tanto, la clave para lograr un buen control de estos patógenos es la prevención de la infección del compost y la tierra de cobertura. Es imprescindible llevar a cabo un buen programa de higiene tanto en las plantas de elaboración de sustrato, como en las explotaciones (RINKER, 1994). En lo referente a los fungicidas se hace necesario progresar en la investigación para elucidar la influencia de los fungicidas sobre las infecciones de *Trichoderma*. Se recomienda la inclusión del procloraz en estos estudios, ya que se ha mostrado eficaz en los ensayos realizados.

ABSTRACT

GEA F.J., C. LAINEZ, M.J. NAVARRO. Characterisation and *in vitro* sensitivity of *Trichoderma* isolates obtained from mushroom cultivation to the fungicides, benomyl and prochloraz. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 143-148.

Nine isolates of *Trichoderma* from mushroom growing crops were characterised by culture and microscopic morphological features. Six were identified as *T. atroviride*, two as *T. harzianum* biotype Th2 and one as *T. viride*. Of particular interest is the presence of *T. harzianum* Th2, given the aggressive nature it shows in European mushroom farms. We also evaluated the *in vitro* effectiveness of the fungicides, benomyl and prochloraz, in controlling the above mentioned *Trichoderma* isolates. The results pointed to the greater efficacy of prochloraz (mean ED₅₀ value of 0.10 mg l⁻¹) over benomyl (mean ED₅₀ value of 0.35 mg l⁻¹).

Key words: *Agaricus bisporus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* Th2, *Trichoderma viride*, benomyl, prochloraz.

REFERENCIAS

- CASTLE, A., D. SPERANZINI, N. RGHEI, G. ALM, D. RINKER and J. BISSETT. 1998: Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North America mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 133-137.
- FINNEY, D.J. 1971: *Probit analysis*. Cambridge University Press. Third edition. 333 pp.
- GARCÍA-MORRÁS, J.A. y R. OLIVÁN. 1999: Problemática actual de *Trichoderma* Pers. En: *Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados*. Patronato de Promoción Económica. Diputación Provincial de Cuenca (ed.). pp. 131-140.
- GEA, F.J., A. PARDO, M.J. NAVARRO and J. PARDO. 1995: Mycoflora related to the mushroom spawn. En: *Science and cultivation of edible fungi*, T.J. Elliott (ed.). A.A. Balkema. Rotterdam. pp. 557-562.
- GEELS, F.P. 1997: Rondetafel – bijeenkomst over *Trichoderma*. *Champignoncultuur*, **41**: 13.
- GROGAN, H.M., R. NOBLE, R.H. GAZE and J.T. FLETCHER. 1997: Compost inoculation and control of *Trichoderma harzianum* a weed mold of mushroom cultivation. *Mushroom News*, **45** (4): 29-36.
- HERMOSA, M.R., I. GRONDONA and E. MONTE. 1999: Isolation of *Trichoderma harzianum* Th2 from commercial mushroom compost in Spain. *Plant Dis.*, **83**: 591.
- MAMOUN, M.L., J-M. SAVOIE and J-M. OLIVIER. 2000: Interactions between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. *Mycologia*, **92** (2): 233-240.
- MUMPUNI, A., H.S.S. SHARMA and A.E. BROWN. 1998: Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (12): 5053-5056.
- MUTHUMEENAKSHI, S., P.R. MILLS, A.E. BROWN and D.A. SEABY. 1994: Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*, **140**:769-777.
- OSPINA-GIRALDO, M.D., D.J. ROYSE, M.R. THON, X. CHEN and C.P. ROMAINE. 1998: Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from world-wide sources. *Mycologia*, **90**:76-81.
- OSPINA-GIRALDO, M.D., D.J. ROYSE, X. CHEN and C.P. ROMAINE. 1999: Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology*, **89**: 308-313.
- QI, T., M. OSPINA-GIRALDO, C.P. ROMAINE, B. SCHLAGNHAUFER, C. XI, D.R. HUFF and D.J. ROYSE. 1996: Genetic analysis of the *Trichoderma* spp. associated with the green mold epidemic in the button mushroom. *Phytopathology*, **86** (11): S89.
- RINKER, D.L. 1994: *Trichoderma* green mold: A seminar by Dr. Donald Betterley, Monterey Labs. *Mushroom News*, **42** (4): 28-32.
- RINKER, D.L. and G. ALM. 1998a: Will fungicides stop an established green mould infection?. *Mushroom World*, **9** (6): 40-42.
- RINKER, D.L. and G. ALM. 1998b: Effectiveness of benomyl-coated spawn against green mould disease. *Mushroom World*, **9** (1): 15-20.
- RUSSELL, R.N., J.L. RORERTON and M.E. SAVIN. 1977: Polo: new computer program for probit analysis. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, **23**: 209-215.
- SEABY, D.A. 1987: Infection of mushroom compost by *Trichoderma* species. *Mushroom Journal*, **179**: 355-361.
- SEABY, D.A. 1989: Further observations on *Trichoderma*. *Mushroom Journal*, **197**: 147-151.
- SEABY, D.A. 1996: Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology*, **45**: 905-912.
- SINDEN, J.W. 1971: Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Ann. Rev. Phytopathology*, **9**: 411-432.

(Recepción: 29 abril 2002)

(Aceptación: 20 mayo 2002)