

Actividad antagónica de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. frente a fitopatógenos de suelo

Yohana Gato Cárdenas, Yamilka Pérez Bocourt, Bertha Carreras Solís, Yamilé Baró Robaina, Yuramis Quesada Mola y Rebeca Ramírez Ochoa

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, La Habana, Cuba, C. P. 11600, ygato@inisav.cu.

RESUMEN

Se determinó el efecto antagónico *in vitro* de dos cepas autóctonas de *Trichoderma* T-916 y T-801 frente a cepas de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotianae* y *Sclerotium rolfsii*. La capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. ensayadas se determinó mediante cultivo dual con los cuatro fitopatógenos de suelo. Como indicadores se evaluaron los cambios en los caracteres culturales de las especies involucradas, la formación de estructuras de reproducción, la difusión de pigmentos al medio de cultivo y la morfología de las especies en la zona de interacción. Se corroboró la capacidad del antagonista de enrollar o modificar el micelio del patógeno. Las cepas T-801 y T-916 de *Trichoderma* spp. mostraron capacidad antagónica frente a los patógenos evaluados al igual que las cepas empleadas como control positivo.

Palabras claves: control biológico, *Trichoderma*, capacidad antagónica, fitopatógenos de suelo

ABSTRACT

The antagonistic effect of two *Trichoderma* autochthonous strains, T-916 and T-801, was determined *in vitro* against strains of *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Phytophthora nicotianae*. The antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. tested was determined by dual culture of the four soil-borne plant pathogens. Changes in cultural characters of involved species, formation of reproduction structures, pigment diffusion into the culture medium and morphology of the species in the interaction zone were evaluated as indicators. Antagonist capacity of rolling up or modifying the pathogenic mycelium was corroborated. Strains T-801 and T-916 of *Trichoderma* spp. showed antagonistic capacity against pathogens evaluated as well as strains used as positive controls.

Key words: biological control, *Trichoderma*, antagonistic capacity, soil pathogens

El control de enfermedades con bioproductos a base de *Trichoderma* es una práctica que se ha generalizado a nivel mundial. Este es uno de los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos de suelo, debido a su capacidad de colonizar varios sustratos, velocidad de crecimiento y la variedad de mecanismos de acción [Benítez *et al.*, 2004; Junaid *et al.*, 2013].

En Cuba se aplican estos productos en los sistemas de cultivo abierto, protegido y semiprotegido; además se utilizan para activar respuestas de defensa de las plantas [Joshi *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2011]. Las cepas cubanas *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 y A-53 y *Trichoderma viride* Persoon TS-3, con efecto sobre hongos y nematodos, son las más empleadas dentro de los programas nacionales de Manejo Integrado de Plagas (MIP)

en cultivos de importancia económica [Stefanova y Vázquez, 2011]. Estas cepas se utilizan para el control de fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, con una disminución importante de los niveles de infectación [Stefanova, 2007].

En la actualidad es necesario la obtención de nuevos aislados de *Trichoderma* promisorios para el control de fitopatógenos de suelo. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antagónico *in vitro* de dos cepas autóctonas de *Trichoderma* frente a cepas de *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Rhizoctonia solani* Khün, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan y *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Se utilizaron las cepas T-916 de *Trichoderma* spp., T-801 de *T. harzianum* y los fitopatógenos *F. oxysporum* F-27, *R. solani* RF, *P. nicotianae* PT1 y *S.*

rolfsii Sr. Se emplearon como control positivo las cepas A-34 y A-53 de *T. harzianum* y la cepa TS-3 de *T. viride*, que se producen actualmente en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) en Cuba. Todo el material biológico empleado en este trabajo está conservado en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y pertenecen a la Colección de Cultivos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

La capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a los fitopatógenos en estudio se determinó mediante cultivo dual (Tabla 1), según metodología descrita por Martínez y Solano (1995). Como indicadores se observaron los cambios en los caracteres culturales de las especies involucradas, la formación de estructuras de reproducción y los cambios en la difusión de pigmentos al medio de cultivo en la zona de interacción (observaciones macroscópicas).

Tabla 1. Cultivos duales para la determinación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* ante fitopatógenos

No.	Cultivos duales	
	<i>Trichoderma</i>	Fitopatógenos
1	<i>T. harzianum</i> T-801	<i>P. nicotianae</i> PT1
2		<i>R. solani</i> RF
3		<i>S. rolfsii</i> Sr.
4		<i>F. oxysporum</i> F-27
5	<i>Trichoderma</i> spp. T-916	<i>P. nicotianae</i> PT1
6		<i>R. solani</i> RF
7		<i>S. rolfsii</i> Sr.
8		<i>F. oxysporum</i> F-27
9	<i>T. harzianum</i> A-34 (Control)	<i>P. nicotianae</i> PT1
10		<i>R. solani</i> RF
11		<i>S. rolfsii</i> Sr.
12		<i>F. oxysporum</i> F-27
13	<i>T. harzianum</i> A-53 (Control)	<i>P. nicotianae</i> PT1
14		<i>R. solani</i> RF
15		<i>S. rolfsii</i> Sr.
16		<i>F. oxysporum</i> F-27
17	<i>T. viride</i> TS-3 (Control)	<i>P. nicotianae</i> PT1
18		<i>R. solani</i> RF
19		<i>S. rolfsii</i> Sr.
20		<i>F. oxysporum</i> F-27

Para evaluar la interacción entre *Trichoderma* y los fitopatógenos se ubicó una tira de papel celofán previamente esterilizado (6 cm x 2 cm) en el punto de enfrentamiento de ambos micelios, que se retiró 72 h después que las colonias hicieran contacto; se colocó sobre un portaobjeto con una gota de lactofenol azul, y se hicieron observaciones al microscopio óptico con contraste de fase para determinar el tipo de interacción.

Se apreció un comportamiento diferenciado de las cepas y sus mecanismos de acción ante los patógenos en estudio. Las cepas T-801 y T-916, al establecer contacto físico con el micelio de *R. solani*, continuaron su avance sobre este último, y al tiempo las cepas de *Trichoderma* cubrieron en su totalidad la colonia del patógeno. Los resultados evidencian la capacidad hiperparasítica de las cepas de *Trichoderma*, lo cual ha

sido descrito ampliamente por Benítez *et al.* (2004), González y Pérez (2011), Junaid *et al.* (2013).

En el enfrentamiento de la cepa T-916 con la cepa F-27 se pudo observar la difusión de un pigmento al medio de color amarillo oscuro en la zona de la interacción, lo que evidencia una reacción de incompatibilidad y una posible producción de metabolitos por parte del antagonista; además, en este caso también se pudo constatar la capacidad hiperparasítica de la T-916 sobre F-27. Las características culturales de la cepa de *Trichoderma* permanecieron invariables, con un buen desarrollo de la colonia y gran producción de conidios, que fue más notable en la zona de interacción. Este resultado está en correspondencia con lo descrito por Howell (2003), quien observó una respuesta similar en la interacción de *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) y *Rhizoctonia solani*, donde describe el mico-

parasitismo de esta especie de *Trichoderma* sobre este patógeno como el principal mecanismo para ejercer un efectivo control biológico. Referente a la cepa T-801 frente a *F. oxysporum*, la reacción fue similar al caso anteriormente descrito; se pudo apreciar una notable producción de conidios por parte del antagonista.

En los enfrentamientos de las cepas T-801 y T-916 con las cepas PT1 y Sr., respectivamente, se observó una banda de color carmelita oscura o clara en la zona de interacción (Fig. 1), lo cual ocurrió de manera similar a las cepas de *Trichoderma* empleadas como control.

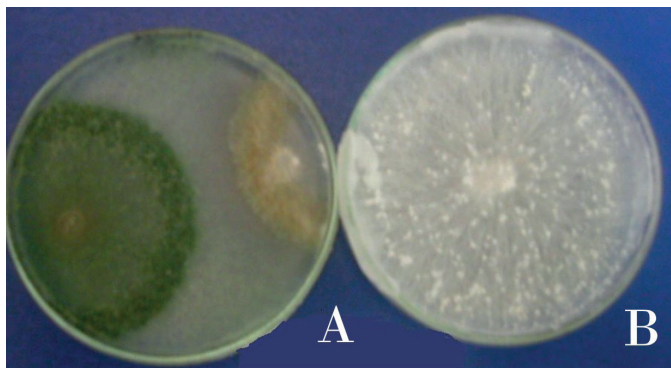


Figura 1. Cultivo dual de *Trichoderma* spp. T-916 con *S. rolfsii* Sr. A: Interacción T-916 con el fitopatógeno. B: *S. rolfsii* Sr.

En las observaciones al microscopio óptico de los puntos de interacción entre los micelios de ambas cepas de *Trichoderma* y los patógenos se encontraron tres tipos de respuestas: enrollamiento, fragmentación y penetración de la hifas del patógeno.

La cepa T-801 pudo fragmentar (Fig. 2), enrollar y penetrar las hifas de *R. solani*. Estos efectos del antagonista sobre los patógenos han sido ampliamente documentados en la literatura [Harman, 2006; Guigón *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013]. La fragmentación se debe a la excreción de enzimas líticas por parte del antagonista [Larral de Corona *et al.*, 2008]. Las mismas interacciones hifales fueron descritas por Sandoval y López (2002) con la cepa utilizada como patrón A-34 frente a este patógeno, y frente a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich. Los cambios morfológicos ocurridos son atribuidos al micoparasitismo que ejerce *Trichoderma* frente a los patógenos, y está en correspondencia con lo descrito por Harman *et al.* (2004) y Guigón *et al.* (2010), quienes observaron respuestas similares en la interacción de las hifas de *R. solani* y *Trichoderma* sp.



Figura 2. Interacción entre hifas de *T. harzianum* T-801 y *R. solani*. Nótese fragmentación de hifas del patógeno a nivel de septo. Aumento 400x.

Estos resultados constituyen la base primaria para la obtención de aislados antagonistas promisorios contra patógenos de suelo, además de enriquecer el cepario de hongos antagonistas del INISAV, y refuerzan la necesidad de seleccionar cepas autóctonas procedentes de diferentes localidades, sin introducir organismos o cepas de otra procedencia; sin embargo, otros bioensayos *in vivo* e *in situ* deben realizarse para demostrar las verdaderas potencialidades de las cepas en estudio como agentes de control biológico.

REFERENCIAS

- Benítez, T.; A. M. Rincón; M. C. Limón; A. A. Codón: «Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains», *International Microbiology* 7: 249-260, 2004.
- González, M.; Y. Pérez: «Nutrición orgánica del cultivo y manejo de plagas». Manual para la Adopción del Manejo Agroecológico de Plagas en Fincas de la Agricultura Suburbana. Ed. ACTAF. La Habana, pp. 271-283, 2011.
- Guigón, C.; V. Guerrero; F. Vargas; E. Carvajal; G. D. Ávila; L. Bravo; M. Ruocco; S. Lanzuise, S. Woo, M. Lorito: «Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos», *Revista Mexicana de Fitopatología* 28 (2): 87-96, México, 2010.
- Harman, G. E: «Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp.», *Phytopathology* 96: 190-194, 2006.
- Harman, G.; C. Howell; A. Viterbo; I. Chet; M. Lorito: «*Trichoderma* Species- opportunistic, Avirulent Plant Symbionts», *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56, Inglaterra, 2004.
- Howell, C. R: «Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The history and evolution of Current Concepts», *Plant disease* 87 (1): 4-10, 2003.
- Joshi, B. B.; R. P. Bhatt; D. Bahukhandi: «Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas», *Journal Environmental Biology* 31 (6): 921-928. 2010.

- Junaid, J. M.; N. A. Dar; T. A. Bhat; A. H. Baht; M. A Baht: «Commercial Biocontrol Agents and their Mechanism of Action in the Management of Plants Pathogens», *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences* 1 (2): 39-57. 2013.
- Laral de Corona, C.; M. Santiago; A. Sifuentes; I. Rodríguez; K. Shirai; J. Narváez: «Control potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strain against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean», *Appl Microbiol Biotechnol.* 80: 167-177. 2008.
- Martínez, B.; T. Solano: «Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout» *Rev. Protección Vegetal* 10: 221-225, Cuba, 1995.
- Martínez, B.; D. Infante; Y. Reyes: «*Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos 0187, *Rev. Protección Vegetal* 28 (1): 1-11, Cuba, 2013.
- Mishra, B. K; R. K. Mishra; R. C. Mishra; A. K. Tiwari; R. S. Yadav; A. Dikshit: «Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L.», *Archives of Applied Science Research* 3 (2): 361-369. 2011.
- Sandoval, I.; M. O. López: «Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseoli* y otros patógenos fúngicos del frijol», *Fitosanidad* 4 (3-4): 69-72, Cuba, 2002.
- Stefanova, M.; L. Vázquez: «Características y uso de bioplaguicidas contra plagas del suelo» *Manual para la Adopción del Manejo Agroecológico de Plagas en Fincas de la Agricultura Suburbana* Ed. ACTAF. La Habana. pp. 245-265, 2011.
- Stefanova, M.: «Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba», *Fitosanidad* 11 (3): 75, Cuba, 2007.