

EFFECTIVIDAD *IN VITRO* DE *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI PARA EL BIOCONTROL DE *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN Y *PYRICULARIA GRISEA* SACC. AISLADOS EN EL CULTIVO DEL ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.)

Teresa Reyes Rondón, Giselle Rodríguez Gutiérrez, Ana D. Pupo Zayas, Luciano Alarcón Pérez y Yenny Limonta Cutiño

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Genaro Rojas 86 e/ Marcelino Diéguez y Antonio Barrera, Las Tunas, Cuba, CP 75200, lapsavlt@enet.cu.

RESUMEN

A partir de plantas de arroz de la variedad J-104 con síntomas de *Pyricularia grisea* y *Rhizoctonia solani* se realizaron siembras *in vitro* de partes de tallos, hojas y raíces dañadas en agua-agar y agar-peptona-dextrosa por los métodos tradicionales. Se realizaron las identificaciones y descripciones de los hongos aislados según claves correspondientes con el objetivo de comprobar la efectividad antagónica e hiperparasítica de *Trichoderma harzianum* contra ambos patógenos. Para los ensayos de biocontrol se realizaron pruebas *in vitro* en cultivo dual de agar-peptona-dextrosa entre los patógenos y dos aislamientos de *T. harzianum*, procedentes del cepario de mantenimiento del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Las Tunas (cepas A-53 y A-34), generalizadas en la producción para el biocontrol de diferentes patógenos del suelo. Diariamente se midió el diámetro de las colonias, así como el nivel de competencia por el sustrato y el hiperparasitismo del patógeno, según el nivel de crecimiento y esporulación sobre las colonias. Se demostró la elevada actividad hiperparasítica y competitiva de las cepas A-34 y A-53 de *T. harzianum*, que exhibieron buenas potencialidades para el control de estos patógenos. Estadísticamente se encontraron diferencias altamente significativas a las 96 h, con un crecimiento promedio lineal en 7,37 cm en la cepa A-53, y 7,10 cm en la cepa A-34. En el caso de los patógenos el crecimiento promedio fue de 3,63 cm en *P. grisea* y 2,62 cm en *R. solani*.

Palabras claves: *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, antagonista, hongos del suelo

ABSTRACT

Stems, leaves and roots pieces of rice plants of variety J-104 with *Pyricularia grisea* (Sacc.) and *Rhizoctonia solani* Kühn symptoms were plated *in vitro* in agar-water and agar-peptone-dextrose by traditional methods. Observed symptoms were identified and described by suitable keys for verifying antagonist and hyperparasitic effectivity of *Trichoderma harzianum* against both pathogens. Bioassays of dual cultures agar-peptone-dextrose were realized for biocontrol tests between pathogens and two *T. harzianum* strains (A-34 and A-53) from the strain storage of biological control in Pant Health Provincial Laboratory of Las Tunas, generalized in mass production against different soil pathogens. Diameter of colonies was measured daily and so was the competence level by the substrate and the hyperparasitism of the pathogen, according to the growing level and sporulation over colonies. Results demonstrated high hyperparasitic and competitive activity of strains A-34 and A-53 of *T. harzianum*, which exhibit good potentialities for the control of these pathogens. Highly significant differences to 96 hours were found in statistic tests with a lineal rate growing of 7.37 cm in A-34 strain and 7.10 cm in A-53 strain. Rate growing was 3.63 cm *P. grisea* and 2.62 cm *R. solani* in the case of pathogens

Key words: *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, antagonist, soil fungi

INTRODUCCIÓN

El arroz está considerado, junto al trigo y el maíz, como el cereal que ocupa la preferencia en el consumo mundial, superado únicamente por el trigo [FAO, 1981]. Su cultivo ha mantenido una evolución positiva, con una tendencia ascendente en áreas sembradas y rendimientos, desde la década de los sesenta del pasado siglo. Aparejado al incremento de las siembras se han presentado problemas fitosanitarios, donde las enferme-

dades fungosas, insectos, virus y ácaros son los que han hecho peligrar la cosecha.

Las plagas del arroz destruyen el 35% de la producción mundial, y corresponde a los patógenos el 12% [Pantoja *et al.*, 1997].

Durante los últimos 15 años la producción arrocería en Cuba se ha sustentado en la variedad J-04, la cual ha

ocupado más de 70% del área sembrada en este período, por la alta adaptabilidad y potencial de rendimiento agrícola que presenta [IIA, 2001].

La piriculariosis causada por *Pyricularia grisea* Sacc. constituye la más difundida y destructiva entre las enfermedades del arroz a escala mundial. Se ha reportado en más de setenta países altamente productores de este cereal [Cordero y Rivero, 2001]. El hongo afecta todas las partes aéreas de la planta de arroz, la hoja, los nudos del tallo, el cuello de la panícula y la panícula misma. Las temperaturas de 22-29°C y humedad relativa superior a 90% son responsables de pérdidas considerables. Si su ataque ocurre en la fase de plántulas o de macollamiento quedan totalmente destruidas [Correa-Victoria y Guimarães, 1995].

El añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* Kühn está considerado actualmente como una de las principales enfermedades del cultivo en las regiones tropicales y subtropicales. Se califica de alto riesgo en varios países de América Latina, y su incidencia causó una disminución de los rendimientos de hasta 40% en la variedad Orizica 1 en Colombia. Los síntomas se observan inicialmente sobre las vainas y luego en las hojas de la base del tallo. La enfermedad progresa rápidamente desde el inicio, y se extiende desde la vaina hacia la hoja y en ataques severos destruye el tallo. El patógeno está presente en todas las zonas arroceras, y la disminución del rendimiento, en condiciones de humedad y temperaturas altas, se ha estimado de varias maneras. En la hoja bandera pueden llegar hasta 20%, y cuando todas las vainas y láminas foliares están totalmente infectadas, esa pérdida logra alcanzar hasta 40% [Correa-Victoria, 1992].

A partir de 1990 se realizaron diversos estudios de prospección de cepas promisorias, mecanismos de acción, compatibilidad con agroquímicos, parámetros de reproducción y aplicación que permitieron la incorporación del hongo antagonista *T. harzianum* a las medidas para combatir los patógenos fúngicos del suelo en diversos cultivos [Stefanova y Sandoval, 1995; Stefanova, 1997, citados por Stefanova *et al.*, 2004].

Actualmente se emplean formulados a base del hongo antagonista *Trichoderma* sp. para el control biológico de hongos del suelo como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, etc., así como de enfermedades foliares como mildiu y alternaria, que afectan un amplio rango de cultivos. *T. harzianum* se encuentra en el suelo en diversos sistemas de producción de arroz y despliega

mayor actividad bajo condiciones de secano. Tiene la habilidad de descomponer los residuos de cosecha y de parasitar a *R. solani*. Poco se sabe sobre su manejo y su eficiencia en el campo [Correa-Victoria y Guimarães, 1995].

Sobre la base de los resultados con el antagonista *Trichoderma* sp. en el control de enfermedades fungosas en otros cultivos, se trazó como objetivo comprobar la efectividad antagonista e hiperparasítica de *Trichoderma harzianum* Rifai contra los patógenos *P. grisea* y *R. solani* en la variedad de arroz J-104.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) con síntomas de *P. oryzae* y *R. solani* se realizaron siembras de la partes del tallo, hojas y raíces afectadas. Las muestras se procesaron según los métodos tradicionales de siembra en agar-agar y en agar-papa-dextrosa, y las identificaciones y descripciones de los patógenos se realizaron de acuerdo con las claves correspondientes [CMI, 1983].

Para los ensayos del biocontrol se realizaron pruebas *in vitro* en cultivo dual agar-dextrosa-peptona entre los patógenos *P. grisea* y *R. solani*, procedentes de la colección de la sección de micología del laboratorio y dos aislamientos de *T. harzianum* (cepas A-34 y A-53) de la sección de lucha biológica, utilizados como antagonistas de diferentes patógenos del suelo.

Por cada aislamiento se establecieron seis réplicas. La incubación se realizó a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Se midió diariamente el diámetro de las colonias hasta su enfrentamiento. Se determinó el nivel de competencia por el sustrato, así como el hiperparasitismo por el antagonista de acuerdo con el nivel de crecimiento y esporulación sobre la colonia.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis réplicas y cuatro tratamientos. Los datos se procesaron mediante la prueba de Student para muestras pareadas mediante el programa Statistica, para el crecimiento de las colonias de los fitopatógenos y la interacción entre estos y el antagonista. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Newman-Keuls de ANALEST V.2.0 [Instituto de Ciencia Animal, 1998].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre el comportamiento del crecimiento de las colonias de la cepa A-53 y A-34 de *T. harzianum* y los pa-

tógenos *P. grisea* y *R. solani* se produjeron diferencias significativas entre el desarrollo del antagonista y los patógenos a las 24, 48, 72 y 96 h. El crecimiento promedio lineal fue de 7,375 cm en la cepa A-53 y 7,125 cm en la cepa A-34, y de 3,633 y 2,620 cm en *P. grisea* y *R. solani* respectivamente (Tabla 1).

Los resultados en la prueba *in vitro* demostraron que *T. harzianum* presentó una elevada actividad antagónica e hiperparasítica contra los patógenos *R. solani* y *P. grisea*, al mostrar una colonización total sobre ambos patógenos. Se observó que ambos aislados del antagonista mostraron una actividad parasítica elevada y buenas potencialidades contra los hongos en estudio.

Existió una alta significación entre las medias del crecimiento y la desviación estándar del antagonista con los patógenos (Tabla 2), con valores de *t* de 8,15 y 10,44 alcanzados para la cepa A-53 en ambos patógenos, y la cepa A-34 con valores de *t* de 8,35 y 10,53. Se evidenció que la cepa A-34 frente a estos patógenos mostró una capacidad parasítica superior a la cepa A-53. Los resultados concuerdan con los estudios realizados por Sandoval *et al.* (1993, 1995 y 1997), quienes plantearon que la cepa estándar (A-34) de *T. harzianum* es la más efectiva y de mayor espectro de acción, lo que demostró buenas potencialidades en el control de *R. solani*, así como su efectividad contra el patógeno en su competencia por el sustrato y el hiperparasitismo mostrado.

Tabla 1. Crecimiento lineal promedio (cm) de las colonias de las cepas A-53 y A-34 de *T. harzianum* y de los patógenos *R. solani* y *P. grisea*

Cepas	Crecimiento lineal (cm)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>T. harzianum</i> (A-53)	1,625 a	2,575 a	4,975 a	7,375 a
<i>T. harzianum</i> (A-34)	0,425 b	2,300 b	4,750 b	7,125 b
<i>R. solani</i>	0,000 c	0,180 c	0,800 c	2,620 c
<i>P. grisea</i>	0,000 c	0,633 d	1,700 d	3,633 d

Valores con letras desiguales difieren para $p < 0,05$.

Tabla 2. Actividad antagónica e hiperparasítica de diferentes aislamientos de *T. harzianum* hacia los patógenos del arroz

Cepas	Actividad antagónica		t	Actividad antagónica		t
	<i>Trichoderma</i>	<i>R. solani</i>		<i>Trichoderma</i>	<i>P. grisea</i>	
<i>T. harzianum</i> (A-53)	3,358 a	0,542 b	8,15	3,860 a	0,390 b	10,44
<i>T. harzianum</i> (A-34)	3,267 a	0,546 b	8,35	3,515 a	0,245 b	10,53

Valores con letras desiguales difieren para $p < 0,05$.

Resultados similares obtuvo González (2004) en ensayos *in vitro* con *T. harzianum* (cepa A-34), con el mayor efecto antagónico sobre *R. solani*, así como el más alto hiperparasitismo con la cepa C-66 y *T. viride* en frijol. Srivastava *et al.* (2002) trataron semillas de garbanzo afectadas por *R. solani* con *T. viride* (cepa PDBCTV 23 y 32) o *T. harzianum* (cepa PDBCRH 10). La cepa PDBCTV 32 de *T. viride* resultó ser la de mayor composición proteínica en la raíz (378 µg/mL) y la de más baja incidencia de la enfermedad en el cultivo (10,6%). Varón y Ramírez (2004) obtuvieron buenos resultados con un producto comercial de *T. lignorum* en Colombia

contra *R. solani* en la desinfección de semillas de arroz con dosis de 400, 300 y 200 g/kg de semilla, con título de 10^{10} esporas/g, con incidencias superiores a 55% en el testigo e inferiores a 13% de infestación en plantación, así como un índice de 0,62 en los tratamientos y de 3 en el testigo.

Quarles (1993), Lorito *et al.* (1993), Ghisalberti y Sivasithamparan (1991), Sivan y Chet (1989) [citados por Stefanova *et al.*, 2004] informaron la eficacia de *T. harzianum* contra los hongos del suelo, y su actividad como antagonista se atribuye al micoparasitismo, producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas.

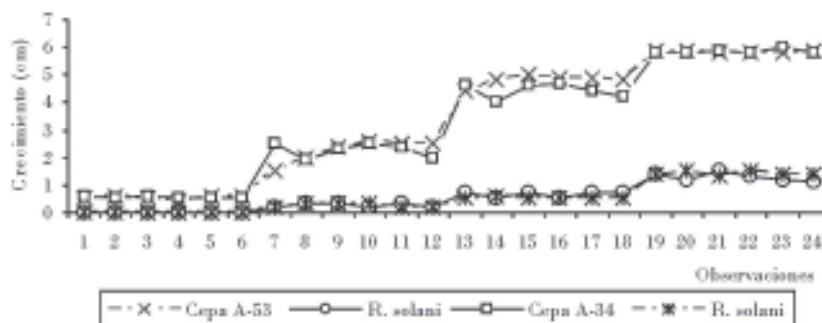


Figura 1. Resultados del enfrentamiento de las cepas A-53 y A-34 de *Trichoderma harzianum* con *Rhizoctonia solani*.

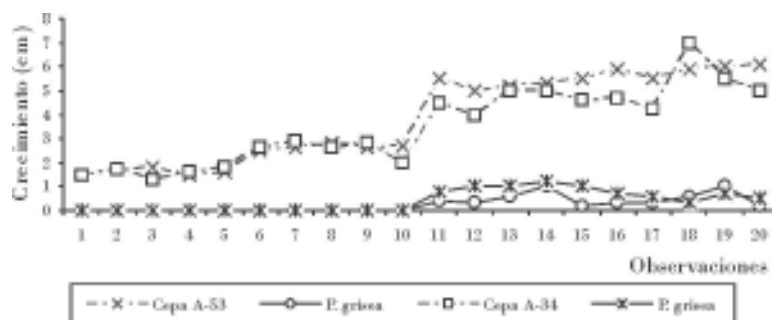


Figura 2. Resultados del enfrentamiento de las cepas A-53 y A-34 de *T. harzianum* frente a *Pyricularia grisea* en arroz variedad J-104.

En el caso de *P. grisea* no se ha tenido conocimiento sobre estudios realizados con este hongo. Investigadores del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal señalaron la efectividad de *Trichoderma* sobre hongos del orden Deuteromycetes, al cual pertenece este patógeno, y donde han habido resultados satisfactorios [INISAV, 1992]. Borda y Arbeláez (1993) señalaron como efectivo el empleo de *T. harzianum* como biocontrol de hongos del suelo en diversos cultivos, incluido el pepino.

Los estudios relativos a su uso como biopreparado foliar son relativamente nuevos. En Cuba Pérez y Echemendía (1994), en condiciones de campo bajo infección natural de *Alternaria porri*, informaron 20% de disminución del patógeno con la aplicación de *T. harzianum* en plantas de cebolla.

Rodríguez *et al.* (1998) mostraron igualmente el efecto foliar de *T. harzianum* contra mildiu velludo y mildiu polvoriento en pepino, con reducciones de la incidencia

en 35 y 23,2% respectivamente, así como estimulación del desarrollo de las plantas, incrementos en la longitud del tallo, frutos y su peso.

El crecimiento del antagonista *Trichoderma* (cepas A-53 y A-34) frente a los patógenos *R. solani* y *P. oryzae* ocurrió a las 24 h después de sembrado. El patógeno *R. solani* comenzó su crecimiento a las 48 h, y *P. oryzae* a las 72 h (Figs. 1 y 2). Esto demostró la capacidad de *Trichoderma* para establecerse y competir con la obtención de diferencias altamente significativas en el crecimiento de las colonias de las cepas A-53 y A-34. Los patógenos presentaron diferencias altamente significativas en el crecimiento negativo de sus colonias.

CONCLUSIONES

- Trichoderma harzianum* mostró ser buen hiperparásito y antagonista de los hongos *Pyricularia grisea* Sacc. y *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*.

- La cepa A-34 (*T. harzianum*) fue la más efectiva y de mayor espectro de acción sobre los aislados de *P. grisea* y *R. solani*.

REFERENCIAS

- Borda, F.; G. Arbeláez: «Determinación del antagonismo del aislamiento T-95 de *T. harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en plantas de pepino Cohombro», *Agronomía Colombiana* 10(1):45-51, 1993.
- CMI: *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra, 1983, pp. 169-409.
- Cordero, V.; L. Rivero: «Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del arroz en Cuba», *Boletín Técnico del Arroz*, IIA, Minagri, octubre del 2001, pp. 3-7.
- Correa-Victoria, F. J.: «Alternativas para el manejo del añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solana*», *Arroz* 41(378):32-37, 1992.
- Correa-Victoria, F. J.; E. P. Guimarães: «Utilización del concepto de linaje genético de *Pyricularia grisea* en un programa de selección recurrente», Primer Taller Internacional de Selección Recurrente en Arroz, Goiania, Brasil, marzo de 1995, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 1995, p. 19.
- FAO: *Production yearbook*, vol. 34, 1981.
- González, M.: «Utilización de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y del suelo en el cultivo del frijol», *Fitosanidad* 8(1):61, 2004.
- ICA: *ANALEST (v2.0): Programa. Sistema automatizado de análisis estadístico*, Instituto de Ciencia Animal (ICA), La Habana, 1998.
- : «Calidad del grano», Boletín no. 1, Instituto de Investigaciones del Arroz, Minagri, La Habana, octubre del 2001, pp. 1-12.
- INISAV: «Información preliminar sobre los estudios de *Trichoderma* sp. como biocontrol de patógenos en cultivos de importancia económica», División Microbiología, INISAV, La Habana, 1992 (inédito).
- Pantoja, A.; A. Ramírez; L. R. Sanint: «Producción de arroz en América Latina: área sembrada y costos», *MIP en arroz. Manejo integrado de plagas (artrópodos, enfermedades y malezas)*, CIAT no. 292, septiembre de 1997.
- Pérez, N.; M. Echemendía: «Efectividad de *Trichoderma* spp. en el control de la mancha púrpura en cebolla», Resúmenes IX Forum de Ciencia y Técnica, II Encuentro Nacional de Bioplaguicidas, II EXPOCREE, 25-27 de octubre, La Habana, 1994, p. 25.
- Rodríguez, F.; Marusia Stefanova; U. Gómez: «Efecto del biopreparado de *Trichoderma harzianum* (Rifai) contra *Pseudoperonospora cubensis* (Bert. & Curt.) Rostov y *Erisiphe cichoracearum* D. C. en pepino (*Cucumis sativus* L.)», *Fitosanidad* 2(1-2):41-43, 1998.
- Sandoval, Ileana; M. Neyra; D. García; María O. López; I. Mendoza: «*Trichoderma*: biocontrol de hongos fitopatógenos en el cultivo del tomate en hidropónico», Resúmenes. I Interamericano de de Micología, La Habana, 22-26 de junio del 1993, p. 61.
- Sandoval, Ileana; María O. López; D. García; I. Mendoza: «*Trichoderma harzianum* (A-34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento», CID-Inisav, Boletín Técnico, 1995, pp. 4-36.
- Sandoval, Ileana; Marusia Stefanova; María O. López; D. García; Blanca Bernal; M. Neyra; F. Rodríguez: «Una alternativa ecológica y efectiva para el biocontrol de enfermedades fúngicas con la utilización de *Trichoderma harzianum* (A-34)», Resúmenes. II Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, 23-27 de junio, La Habana, 1997, pp. 127 y 128.
- Srivastava R. K.; R. D. Prasad; R. Rangeshwaran; P. Kannan: «Detection and Quantification of Proteins Induced by *Trichoderma* in Chickpea-Rhizoctonia System», *Plant Disease Research* 17(2):252-255, 2002.
- Stefanova, Marusia; Ileana Sandoval; María L. Martínez; Irma Heredia; María D. Ariosa; Raquel Arévalo: «Control de hongos fitopatógenos del suelo en semilleros de tabaco con *Trichoderma harzianum*», *Fitosanidad* 8(2):35-38, 2004.
- Varón, R. U.; S. I. Ramírez: «Evaluación del antagonista *Trichoderma lignorum* al tratar la semilla de arroz (*Oryza sativa* L.) contra el hongo *Rhizoctonia solani*, agente causal del añublo de la vaina», Memorias V Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, La Habana, 24-28 de mayo del 2004.