PAJA DE ARROZ, UN SUSTRATO NATURAL PARA AISLAMIENTOS DE ESPECIES DE *TRICHODERMA* EN SUELOS DE LA EMPRESA DE PIÑA EN CIEGO DE ÁVILA, CUBA

Aliuska Sierra Peña,[1] Alexis A. Hernández Mansilla[2] y Aidanet Carr Pérez[3]

[1] *Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón Km 9½, Ciego de Ávila, Cuba, pfa_aliuska@agronomia.unica.cu*

[2] *Grupo Científico. Centro Meteorológico Provincial. Marcial Gómez 401 esq. Estrada, Ciego de Ávila, Cuba, ahmansilla@yahoo.es; agro@meteoro.fica.inf.cu*

[3] *Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600*

RESUMEN

Se ejecutó un trabajo en el Centro Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila con el objetivo de seleccionar un medio de cultivo para el aislamiento de Trichoderma *spp. que permitiera procesar un alto volumen de muestras, así como conocer las especies presentes en los suelos de la Empresa de Piña, en Ciego de Ávila. Se tomaron muestras de la parte bioactiva del suelo, se trasladaron al laboratorio para procesarlas hasta obtener diluciones que se depositaron en placas que contenían los medios de cultivo agar-agua, agar-papa-dextrosa, paja de arroz, aserrín de casuarina y bagazo de caña. Las placas se incubaron durante 72 h a 25ºC y total oscuridad, para su posterior aislamiento e identificación a nivel de género y especie, además de realizar la correspondiente prueba de patogenicidad. Se comprobó que el sustrato natural de paja de arroz resultó el mejor entre los medios probados para el aislamiento de* Trichoderma *spp., con poca contaminación y buen nivel de colonización. Se determinó que en las áreas dedicadas a la producción de esta fruta se encuentran presentes las especies* Trichoderma viride *Pers.:Fr.,* Trichoderm atroviride *Bissett,* Trichoderma aureoviride *Rifai, las cuales no son patógenas al cultivo. Este trabajo constituye el primer informe de la presencia de* T. atroviride *y* T. aureoviride *en el país.*

Palabras clave: *medios de cultivo, método de aislamiento, Trichoderma viride, Trichoderma atroviride, Trichoderma aureoviride*

ABSTRACT

With the objective of selecting a culture media for the isolation of Trichoderma *spp., that allow the processing a high volume of samples, as well as to know the species present in the soils of Pineapple Enterprise in Ciego de Ávila, was carried up a work at Bioplants Center in Ciego de Ávila University. Samples from the bioactive part of the soil were taken to laboratory and processed to obtain dilutions; they were then placed on Petri dishes that contained culture media water-agar, potato-agar-dextrose, rice straw, casuarina sawdust and sugar cane bagasse. The plates were incubating for 72 h to 25°C and a complete darkness, for its next isolation and identification to a genus and species level, and also to do the corresponding pathogenic test. It was proved that the natural substratum of rice straw was the best among all the tested media for the isolation of* Trichoderma *spp., with a slight contamination and a good colonization level. It was determined that* Trichoderma viride*, Pers. Fr,* Trichoderma atroviride *Bissett and* Trichoderma aureoviride *Rifai are present in areas dedicated to pineapple production, which are not pathogens to this fruit plants. This work is the first information about* T. atroviride *and* T. aureoviride *in the country.*

Key words: *cultura media, isolation method, Trichoderma viride, Trichoderma atroviride, Trichoderma aureoviride*

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) constituye uno de los cultivos de mayor importancia para la provincia de Ciego de Ávila, primer productor de esta fruta en el país. Esta región realiza grandes esfuerzos por lograr un desarrollo sostenible en este cultivo, por lo que se trabaja en la búsqueda de estrategias más sanas para enfrentar y resolver la problemática del control de enfermedades causadas por patógenos fúngicos, donde el biocontrol, mediante la utilización de hongos antagonistas, crea una oportunidad favorable y confiable.

El género *Trichoderma* se caracteriza por agrupar especies de gran eficiencia como antagonista de hongos del suelo de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pytium*, *Phytophthora* y *Fusarium* [Stefanova *et al.*, 1999]. Dentro de ellos se encuentran especies fitopatógenas muy dañinas para este cultivo, tales como *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium subglutinans* (Wollen & Reinking) Nelson, Toussonn & Marasas [Hernández *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2002].

Es por ello que la introducción de especies de *Trichoderma* en el manejo integrado de enfermedades de la piña puede satisfacer en gran medida la solución de los problemas actuales. Los objetivos de este trabajo radican en la búsqueda de un medio de cultivo idóneo que permita la realización de aislamientos de estas especies e identificar aquellas que se encuentren presentes en los suelos dedicados a este cultivo en la Empresa de Piña de Ciego de Ávila.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se ejecutó en los laboratorios de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila y el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal –ambos de esta provincia–, el Laboratorio de Micología del Instituto de Ecología y Sistemática (IES) del CITMA, en Ciudad de La Habana, así como en la Empresa de Piña del territorio avileño.

Se realizaron siete muestreos de suelo a diferentes áreas de producción del cultivo con suelo ferralítico rojo. Se tomaron 24 muestras de la parte bioactiva –primeros 10 cm– y distribuidas de forma representativa según cuatro puntos del campo y una zona central. La porción de suelo se colocó en bolsas de polietileno que se trasladaron al laboratorio para su posterior procesamiento, y para su conservación se humedecieron ligeramente a fin de mantener viables los microorganismos presentes.

Luego de su homogenización, las muestras se trituraron finamente con las manos y se tamizaron por una malla de 1 mm, con el objetivo de eliminar restos vegetales y demás elementos. Posteriormente se tomaron 10 g de suelo y se añadieron a 100 mL de agua destilada estéril, de donde se obtuvo una solución madre, de la cual se realizaron tres diluciones de 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}, de acuerdo con las metodologías para el aislamiento de hongos fitopatógenos del suelo de Fernández (1998). A partir de las diluciones se tomaron 2 mL de cada una de las concentraciones, se vertieron sobre diferentes medios de cultivo y sustratos naturales como agar-papa-dextrosa (PDA), agar-agua (WA), aserrín de casuarina, paja de arroz y bagazo de caña, con el objetivo de determinar el medio óptimo y más sencillo para aislar este hongo.

Cada medio y sustrato se replicó de forma independiente tres veces para un total de 12 placas por muestreo. Estas se incubaron a 25ºC y se revisaron a los tres, cinco y siete días, en los que se contabilizó el total de las colonias de especies de *Trichoderma*. Luego se realizó su transferencia a cuñas de agar-papa-dextrosa, luego de una confirmación de la presencia del género mediante preparaciones fijas observadas bajo microscopio óptico con un objetivo de 40X, para confrontar y definir las características morfológicas a este nivel, según los clasificadores de Barnett y Barry (1972) y Alexopoulos y Mimms (1979). Se realizó además un conteo de colonias no pertenecientes al género en cuestión, y se estableció un rango de contaminación mediante una escala donde se calificó de *bajo* (contaminación < 5 colonias), *medio* (contaminación entre 6-10 colonias) y *alta* (contaminación > 11 colonias).

Los datos de los conteos de número de aislados y el rango de colonias contaminantes observados por placas se procesaron mediante análisis estadístico, a través de la prueba de U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas, según Sydney (1987), con el objetivo de conocer las diferencias estadísticas entre los medios y sustratos naturales empleados en los aislamientos, y determinar el mejor con sus correspondiente prueba de significación.

En la determinación de las especies se emplearon las claves taxonómicas de Rifai (1969) y Bissett (1991) mediante el procedimiento tradicional que se sigue en estos casos. Esta parte del trabajo se ejecutó en el Laboratorio de Micología del Instituto de Ecología y Sistemática (IES) del CITMA, en Ciudad de La Habana.

Los aislamientos de las especies de *Trichoderma* se sometieron a una prueba de patogenicidad sobre las vitroplantas de piña (grupo Cayena lisa, híbrido MD_2), para la cual se tomaron 40 en total, 10 para tratarlas según especies aisladas y un testigo sin tratamiento como comparación. Las plántulas por tratar se inocularon mediante inmersión en una suspensión de esporas a concentración de 10^8 durante 3 min, luego de punzarlas con una aguja estéril en su parte basal. Posteriormente se incubaron en cámara húmeda a 25ºC con un régimen de luz/oscuridad de 8-16 h durante 25 días. Se revisaron mediante un microscopio estereoscopio cada 72 h para detectar la existencia o no de síntomas de afectación, tales como clorosis, pudriciones y decoloraciones, y verificar la acción patogénica de estas especies sobre las vitroplantas de piña.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* se observa que el medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA) es un medio que ofrece niveles aceptables para el crecimiento y desarrollo de los hon-

gos, pero que muestra inconvenientes para realizar aislamientos por su fácil contaminación con bacterias y otros microorganismos saprofitos de no emplearse antibióticos. En este medio se logró obtener un número total de 64 aislamientos, pero en su gran mayoría altamente contaminados con bacterias y otros hongos de los géneros *Aspergillus* spp. y *Penicilium* spp. La contaminación en este medio se clasificó según la escala establecida en una categoría de nivel alto (mayor de 11 colonias por placa). En agar-agua no se observaron crecimientos de *Trichoderma,* pero al igual que en PDA, sí se observó un alto nivel de contaminación; sin embargo, en paja de arroz se obtuvo un número de 228 aislamientos del total de muestras analizadas, con niveles de contaminación entre 0 y 2 colonias por placa. Se observó además un rápido crecimiento para estas especies, las cuales ejercen una acción antagónica y proporcionan la inhibición de los contaminantes, lo que permite en tiempo breve –de tres a cinco días– realizar el aislamiento de estas colonias y transferirlas a tubos. Los restantes sustratos como bagazo de caña y aserrín de casuarina no presentaron crecimiento de ningún microorganismo durante el período evaluado.

Tabla 1. Número de aislamientos de especies de *Trichoderma* y rango de colonias contaminantes presentes en los diferentes medios de cultivos y sustratos empleados

Muestreo	Muestra	Medios de cultivos									
		PDA		Agar		Paja de arroz		Aserrín		Bagazo	
		No. cont.	No. aisl.	No. cont.	No. aisl.	No. cont.	No. aisl.	No. cont.	No. aisl.	No. cont.	No. aisl.
1	M_1	alto	0	alto	0	bajo	3	–	–	–	–
	M_2	alto	0	alto	0	bajo	2	–	–	–	–
	M_3	alto	0	alto	0	bajo	3	–	–	–	–
	M_4	alto	0	alto	0	bajo	3	–	–	–	–
	M_5	alto	0	alto	0	bajo	3	–	–	–	–
2	M_1	alto	1	alto	0	bajo	6	–	–	–	–
	M_2	alto	1	alto	0	bajo	8	–	–	–	–
	M_3	alto	1	alto	0	0	12	–	–	–	–
3	M_1	alto	2	alto	0	bajo	6	–	–	–	–
	M_2	alto	2	alto	0	bajo	6	–	–	–	–
	M_3	alto	1	alto	0	bajo	9	–	–	–	–
4	M_1	alto	2	alto	0	0	11	–	–	–	–
	M_2	alto	0	alto	0	bajo	6	–	–	–	–
	M_3	alto	2	alto	0	bajo	6	–	–	–	–
	M_4	alto	1	alto	0	bajo	8	–	–	–	–
	M_5	alto	2	alto	0	bajo	6	–	–	–	–
5	M_1	alto	1	alto	0	0	12	–	–	–	–
	M_2	alto	0	alto	0	Bajo	6	–	–	–	–
	M_3	0	10	alto	0	0	10	–	–	–	–
6	M_1	alto	1	alto	0	0	11	–	–	–	–
	M_2	0	9	alto	0	0	12	–	–	–	–
7	M_1	alto	2	alto	0	bajo	31	–	–	–	–
	M_2	alto	5	alto	0	bajo	30	–	–	–	–
	M_3	bajo	21	alto	0	bajo	18	–	–	–	–

El anterior comportamiento de las especies de *Trichoderma* tiene explicación por la alta capacidad celulolítica. Estos hongos contienen cuatro grandes celulasas (1,4 β-D glucan celobiohidrolasas CBHI y CBHII, endo-1,4-β D-glucanasa EGI y EGII) [Seibotht *et al*., 1997]. También se plantea que las especies de este género producen, de forma eficiente, muchas enzimas extracelulares, con buena capacidad celulolítica y de conjunto con otras que degradan polisacáridos complejos [Harman, 2003], aspectos que justifican los resultados en paja de arroz; sin embargo, el comportamiento de estas especies en bagazo de caña y aserrín de casuarina difieren del anterior sustrato, a pesar de la capacidad de degradación de la celulosa que tienen estas especies, aunque en el caso del aserrín de casuarina puede tener relación con la existencia de sustancias resinosas de efecto antifúngico, como ocurre con las especies de *Pinus caribea* Morelet, cuyas cortezas poseen diferentes compuestos biológicamente activos que en ocasiones constituyen modelos para la formulación de fármacos, venenos e insecticidas [Delle, 1997, citado por Vargas, 2002], así como el contener flavan-3-ols, que le proporciona acción antifúngica, aspecto pocas veces demostrado, pero asociado a la oxidación fenólica [Feutch & Treutter, 1999; citado por Vargas, 2002].

La *Tabla 2* muestra el resultado estadístico de la comparación de los medios de cultivo: agar-papa-dextrosa (V1), paja de arroz (V2), agar-agua (V3); no se incluyen los sustratos aserrín de casuarina y bagazo de caña porque no presentaron crecimiento de colonias de *Trichoderma*. Se encontró que existen diferencias significativas entre V1 y V2, lo que demuestra un mayor número de aislamientos con un bajo nivel de contaminación en comparación con agar-papa-dextrosa.

Tabla 2. Análisis comparativo del número de aislamientos y rango de contaminación en los diferentes medios de cultivo y sustratos empleados mediante prueba de contraste

Estadígrafo	V1 y V2	V1y V3	V2 y V3
U de Mann Whitney	32,000	264,000	000
W de Wilcoxon	332,000	564,000	300,000
Z	–5,832	–1,429	–6,629
Sig. asintót. (bilateral)	000	153	000

Además de los resultados anteriores, los cuales demuestran las ventajas de la utilización de la paja de arroz como sustrato por la buena germinación para las especies de *Trichoderma* y la poca contaminación de otros microorganismos que favorecen la no utilización de antibióticos, se justifica la propuesta de este sustrato por el aporte económico, ya que es un subproducto de desecho de la industria arrocera, de muy bajo costo.

Desde el punto de vista práctico las observaciones realizadas a las siembras en este sustrato demuestran factibilidad para realizar los aislamientos, pues a partir de los tres días comienza la aparición de colonias puntuales de *Trichoderma* que se distinguen por su coloración de verde musgo intenso –tonalidad que puede variar en dependencia de las especies presentes–, y que mediante la ayuda de un microscopio estereoscopio pueden transferirse a los tubos con agar-papa-dextrosa.

Se comprobó que los aislamientos obtenidos mediante el procedimiento anterior se corresponden con especies pertenecientes al género *Trichoderma*, las cuales se caracterizaron por presentar conidióforos hialinos, braqueados, no verticilados en fiálides simples o en grupos, con la presencia de fialosporas hialinas, unicelulares, ovoides. Todas estas características coinciden con las descritas para este género por Barnett y Barry (1972) y Alexopoulus y Mimms (1979).

Del presente género se determinaron las especies *Trichoderma viride* Pers.:Fr., *Trichoderma atroviride* Bissett, *Trichoderma aureoviride* Rifai, las cuales presentaron las siguientes características:

T. viride. En medio de cultivo agar-papa-dextrosa presentó colonias difusas y en forma de agregados que llegaron a cubrir la superficie del medio como una masa compacta. Se observó un rápido crecimiento al cuarto día, con un micelio flocoso de tipo aracnoide, que al reverso se distingue de color amarillo a pardo pálido. Al microscopio óptico se distinguen hifas delgadas, de paredes finas hialinas, septadas, con conidióforos estrechos, erectos o flexuosos ramificados, septados, fialídicos, con fiálides dispuestas en verticilos lageniformes a subuladas no muy ramificadas de 2-3 clamidosporas presentes en metarrizos hasta –5 mm

de diámetro, de abundante esporulación, conidios unicelulares, globosos a elipsoidales u oblongos, de paredes delgadas hialinas, ornamentadas, que coinciden con las descritas por Rifai (1969).

T. atroviride. En medio agar-papa-dextrosa las colonias mostraron un rápido crecimiento. En la observación microscópica (con objetivo de 40X) se apreciaron clamidosporas de hasta 12 mm de diámetro, conidios subglobosos y lisos y mayormente de 2,5-4,2 x 2,2-3,6 mm, que coinciden con los descripciones de Bissett (1991). Los conidióforos son similares a *T. viride*, ramificados, flexuosos, con forma langeniforme y subulados, fiálides en verticilos. También este hongo se semeja mucho a *T. harzianum* y se confunde fácilmente, pero los conidios del último son significativamente más pequeños y las fiálides diametralmente un poco más cortas e infladas. El micelio es blanquecino, conidióforos ramificados frecuentemente en pares, terminados en fiálides de hasta cinco verticilos y color reverso amarillo verdoso más intenso.

T. aureoviride. Las características de esta especie en agar-papa-dextrosa presentó colonias de abundante micelio y al microscopio óptico (objetivo de 40X) se observaron conidios lisos, obovoides, no ornamentos, fiálides ligeramente ramificadas (3-5) y más cortas de base ligera y truncada, conidióforos ligeramente más estrechos que *T. viride* y flexuosos. Esta descripción coincide con los criterios de Bissett (1991) para esta especie.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad comprobaron que *T. viride*, *T. atroviride* y *T.aureoviride* no son fitopatógenas pasadas las 72 h en las evaluaciones realizadas. No se detectaron pudriciones en las vitroplantas 96 h después de la inoculación, así como ningún síntoma de amarillamiento; luego de transcurrir 10 días se logró observar las colonias de *Trichoderma* spp. en cada una de las punteaduras u orificios realizados en el momento de la inoculación. Esto puede resultar ventajoso, pues garantiza la capacidad de protección ante cualquier otro fitopatógeno que pueda penetrar por esta vía. Se destaca que por más de un mes las vitroplantas se mantuvieron en condiciones de alta humedad y temperaturas de 27ºC sin observar daño alguno, lo que demuestra que estas especies no son patogénas para las vitroplantas de piña.

CONCLUSIONES

- El sustrato natural paja de arroz como medio de cultivo permitió obtener 228 aislamientos de especies de *Trichoderma*, con bajo nivel de contaminación, lo que demuestra que constituye un sustrato promisorio para estos fines.
- Las especies *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aeuroviride* se encuentran presentes en los suelos de la Empresa de Piña de Ciego de Ávila, las cuales no resultan patógenas para el cultivo.

REFERENCIAS

Alexopoulos, C. J.; C. E. Mimms: *Introductory Mycology*, 3rd ed., John Wiley and Sons, New York/ Londres, 1979.

Barnett, H. L.; B. Barry: *Sacardo System of Classification*, preface to 3rd. ed., January 1972.

Bissett, J.: «A Revision of the Genus *Trichoderma*. II. Infrageneric Classification», *Can. J. Bot.* (69):2357-2372, 1991.

Fernández, A.: «Biología, epifitiología, nocividad y control de *Phytophthora nicotianae (Phytophthora parasítica)* en tabaco». Informe técnico, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, 1998.

Harman, G. E.: «*Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningli*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales)» Corneli University, Geneva, NY 14456 [en línea] 2003 [fecha de acceso 25 de mayo 2003]. URL Disponible en http://www.InfoSanimet.com.

Hernández, A.; B. L Muiño; C. Roson, C. Casola: «Determinación, epifitiología,control y manejo integrado de patógenos fúngicos en la fase de viveros del cultivo de la piña», XIII Forum de Ciencia y Técnica, Empresa de Piña, Ciego de Ávila, Cuba, 2000.

Hernández, A.; C. Roson; A. Sierra; O. Concepción; D. Escalante; N. Pérez: «Incidence, Estimate of Losses and Management in the Control of Fungi Pathogens in Systems of Propagation of Pineapple Crops *in vitro* (*Ananas escamosus* (L.))», Fourth International Pineapple Symposium. Veracruz City, México, April 16-19, 2002.

Rifai, M. A.: «A Revision of the Genus *Trichoderma*», *Mycol.* (116):1-56, 1969.

Seiboth, B.; S. Hakola; R. l. March; P. l. Suominen; C. Kubicek: Role de Four Major Cellulases in Triggering of Cellulase Gene Expression by Celloluse in *Trichoderma reesei*», *J. Bacteriol.*, sept., 179:17, 5318-20, 1997.

Stefanova, M.; A. Leiva; L. Larrinaga; M. F. Coronado: «Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo», *Rev. Fac. Agronomía (LUZ)* (16):509-516, 1999.

Sydney, S. Diseño experimental no paramétrico. Edición revolucionaria, La Habana 1987.

Vargas, J.: «Comportamiento de algunos extractos de la corteza del *Pinus caribaea* (Morelet) var. Hondurensis Barret & Golfari sobre el crecimiento de hongos xilófagos y su acción antioxidante». Tesis de Doctorado, Facultad de Forestal y Agronomía, Universidad de Pinar del Río, Cuba, 2002.