

EFECTO DE TRES HERBICIDAS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ESPORULACIÓN DE *Trichoderma asperellum* SAMUELS

Yusimy Reyes*, B. Martínez, Danay Infante** y J. García-Borrego*****

*Dpto. Biología y Sanidad Vegetal, Universidad Agraria de La Habana (UNAH). Autopista Nacional km 23½. Apartado 10, San José de las Laja, La Habana, Cuba. **Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Laja, La Habana, Cuba. ***Jefe de producción Arrocero. CPA “Gilberto León” Municipio. San Antonio de los baños. Cuba, Correo electrónico: yusimy@isch.edu.cu

INTRODUCCIÓN

La potencialidad de *Trichoderma* para el control de patógenos del suelo ha sido estudiada por muchos autores (Muñiz *et al.*, 1997; Harman, 2003; Mathivanan *et al.*, 2005; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008); así como los mecanismos de acción por los cuales actúa sobre ellos (Michel, 2001; Rivero, 2007; Pino, 2007; Martínez y Reyes, 2008).

Sin embargo no ocurre igual con los estudios encaminados a conocer la compatibilidad que se establece entre *Trichoderma* y los productos químicos más aplicados en los cultivos donde se utiliza. Este es el caso de tres cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels que se pretenden recomendar para el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L), para el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kuhn (Reyes, 2009).

Para el empleo en los cultivos de productos biológicos y químicos es necesario conocer la compatibilidad entre ellos con el fin de lograr resultados satisfactorios en el control de las plagas (González *et al.*, 2005). El cultivo del arroz, tanto en secano, como en diques, se ve afectado además, por un grupo de malezas (*Echinocloa colona* (L) Link, *Echinocloa crusgalli* (L) Beauv, *Cyperus rotundus* L, *Hetherantera limosa* (SW) Willd, entre otras), que limitan la disponibilidad de nutrientes para la planta. Su combate se lleva a cabo fundamentalmente con el uso de herbicidas sintéticos (Ministerio de la Agricultura, 2005; Carbonell *et al.*, 2008).

Harman (2001) plantea que *Trichoderma* posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos, incluyendo a los fungicidas. Sin embargo, el nivel de resistencia difiere entre cepas.

Por esta razón el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la compatibilidad de tres herbicidas usados en el cultivo del arroz para el control de las arves, con tres cepas de *T. asperellum* promisorias para el biocontrol del tizón de la vaina en arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sensibilidad de *T. asperellum* frente a algunos herbicidas.

Efecto de los herbicidas sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *T. asperellum*.

Para el montaje del experimento se emplearon cultivos puros de *T. asperellum* cepas T.17, T.75 y T.78. A partir de las mismas se realizaron pases a placas Petri contentivas medio Agar Malta (AM) para disponer de colonias de 72 horas.

Se realizó el ensayo con tres herbicidas [(fenoxaprop-p-etilo), Furore IEC 4,5; (bispiribac-Sodio), Nomineé SC 40, (2,4D sal de amina), Aminex CS 72], frecuentemente utilizados en el cultivo del Arroz, a tres concentraciones calculadas a partir de las dosis de campo [0.1D (10 veces por debajo de la dosis), D= dosis recomendada y 10D (10 veces por encima de la dosis)] como muestra la tabla 1.

Tabla 1. Plaguicidas y concentraciones utilizadas en los ensayos

Ingrediente activo	Dosis (%)		
	0,1D	D	10D
Fenoxaprop-p-etilo	0,04	0,40	4,00
Bispiribac-Sodio	0,004	0,04	0,40
2,4D Sal de Amina	0,025	0,25	2,50

Para la evaluación del efecto sobre el crecimiento micelial y la esporulación se utilizó la metodología de crecimiento del hongo en un medio agarizado, al cual se le incorporó el plaguicida en la concentración deseada [Saito y Yabuta, Kikuchi y Satoh y Poprawski *et al.* citados por Del Pozo, (1987)]. Se utilizaron placas Petri (70 mm) contentivas en medio AM envenenado, y se colocó un disco de 5 mm de diámetro tomados de la zona de crecimiento activo, incubándose en oscuridad a $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las evaluaciones del crecimiento micelial y la esporulación se realizaron a las 72 horas y 7 días, respectivamente. El primer caso consistió en medir el diámetro de las colonias, los datos se registraron descontándose el disco sembrado, a partir del cual se determinó el efecto sobre el crecimiento micelial con relación al testigo (AM no envenenado), para las 3 cepas. A los 7 días se preparó una suspensión de esporas por el método de barido de la colonia, la suspensión obtenida (por repetición) se echó en tubos de 160 x 20 de capacidad, a los que se le agregó 30 mL de agua destilada estéril, posteriormente la suspensión obtenida se agitó durante 30 segundos en agitador de tubos Vortex. La concentración de esporas se contó en Cámara de Thomas y finalmente el resultado se expresó como conidios por mm^{-2} .

El montaje se realizó en un diseño completamente aleatorizado, con arreglo bifactorial (factor-1: producto; factor-2: dosis), y cinco repeticiones. En todos los casos los tratamientos fueron los plaguicidas con las 3 dosis de cada producto, montados con las cepas y un testigo de estas, en medio no envenenado. Con los datos obtenidos del crecimiento micelial, germinación y efecto biocida, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial con la fórmula de Samaniego *et al.* (1989), los datos para su análisis fueron transformados a través de la expresión $2 \text{ arc sen } \sqrt{p}$, la esporulación mediante la expresión $\text{Log}_{10}(x+10)$ según Lerch (1977).

Se aplicó un análisis univariante y a posteriori se realizó la prueba de Tukey, al 5% de probabilidad. Se empleó el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows.

Para clasificar a los plaguicidas evaluados de acuerdo al efecto tóxico provocado sobre el crecimiento micelial de los hongos antagonistas se utilizó la escala en la que se consideran tres niveles de toxicidad, esta se aplicó a la dosis de campo (D):

- Grado 1. Compatible, menos del 10% de afectación del crecimiento micelial (ACM)
- Grado 2. Moderadamente compatible, 30% ACM
- Grado 3. No compatible, más del 30% AC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensibilidad de *T. asperellum* a algunos herbicidas

Efecto de los herbicidas sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *T. asperellum*

El efecto de los herbicidas sobre el crecimiento micelial de *T. asperellum* de las cepas 17, 75 y 78 “*in vitro*” se muestran en la figura 1. Los productos que más afectaron el crecimiento micelial, de forma general, correspondieron a fenoxaprop-p-etilo y 2,4D sal de amina, con un 100% de inhibición del crecimiento radial. Es de destacar que en las tres cepas las concentraciones de 10D de los productos antes mencionados inhibieron completamente el crecimiento micelial del hongo, además de forma general se puede decir que el herbicida fenoxaprop-p-etilo es el que más afectó el crecimiento en las tres cepas a las dosis evaluadas, aunque se muestran

diferencias significativas entre las dosis en cuanto a los porcentajes de inhibición para cada cepa por separado.

Para el herbicida bispiribac-Sodio la dosis superior (10D) mostró inhibición del crecimiento micelial (6,15%) con diferencias significativas respecto a la dosis inferior e intermedia, la misma difiere significativamente de los productos antes mencionados y de sus dosis, los que muestran valores superiores de inhibición. La dosis inferior (0,1D) del 2,4D sal de amina, no mostró afectación del crecimiento micelial para la cepa T. 17 al igual que las dosis más bajas del herbicida anterior, con un 0% de inhibición. Similar comportamiento presenta la cepa T. 75, pero en este caso la dosis 10D (bispiribac-sodio) ejerce un mayor efecto de inhibición (28,3%) sobre el crecimiento micelial de esta cepa.

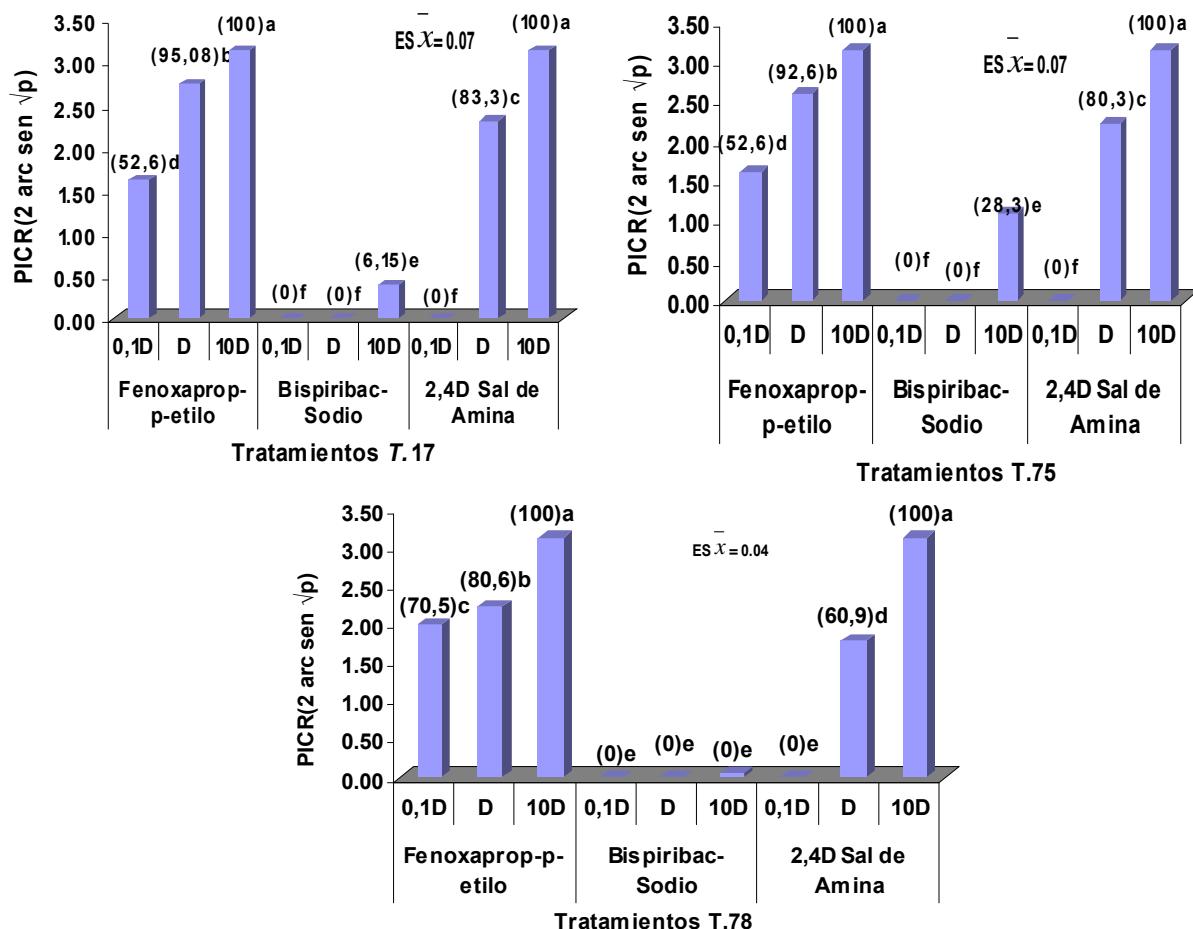


Figura 1. Inhibición del crecimiento radial de tres herbicidas sobre las cepas (T.17, T.75 y T. 78) de *T. asperellum* a las 72 horas.

La cepa T. 78 presentó resultados muy similares a las cepas anteriores de forma general. En este caso ninguna de las dosis evaluadas en el herbicida bispiribac-sodio afectó el crecimiento micelial, con un 0% de inhibición, así como para la dosis inferior del 2,4D Sal de Amina la que tampoco afectó el crecimiento micelial de la cepa.

De forma general se puede plantear que los herbicidas fenoxaprop-p-ethyl y 2,4D sal de amina afectaron el crecimiento micelial de las cepas del antagonista, acentuándose este efecto a medida que se incrementó la concentración del producto evaluado a partir de la dosis de campo. No ocurriendo así para el bispiribac-Sodio, el que se puede decir según, la escala de compatibilidad, que es compatible con las tres cepas de *T. asperellum* evaluadas (Tabla 2).

En la literatura consultada no se encontró artículos que hicieran referencia a estudios de compatibilidad de *T. asperellum* con herbicidas, probablemente por la diferencia en el elemento diana sobre el que actúan. Solo se pudo encontrar algunas referencias en páginas de formulaciones de *Trichoderma* spp. Los resultados obtenidos en este trabajo no coinciden con los obtenidos por Solano (2009) y BioNativa (2007), quienes plantean que *Trichoderma* spp. es compatible con fungicidas, insecticidas, herbicidas y fertilizantes foliares químicos. Estos autores no mencionan los productos, ni especifican si afecta el crecimiento, la esporulación o la germinación del antagonista y en estos resultados se evidencia que todos los herbicidas no tiene el mismo efecto, ni todas las cepas manifiestan el mismo nivel de resistencia.

Tabla 2. Compatibilidad de los herbicidas con tres cepas de *T. asperellum*

Producto	<i>T. 17</i>	<i>T. 75</i>	<i>T. 78</i>
	Grado	Grado	Grado
Fenoxaprop-p-etilo	3.00	3.00	3.00
Bispiribac-Sodio	1.00	1.00	1.00
2,4D Sal de Amina	3.00	3.00	3.00

1-Compatible;2- Moderadamente compatible;3- No compatible

El efecto de los plaguicidas sobre la esporulación de las cepas de *T. asperellum* sp. se muestran en la tabla 3, donde la dosis de 10D de los productos fenoxaprop-p-etilo y 2,4D sal de amina mostraron una inhibición total del crecimiento y por ende de la esporulación en todas las cepas, incluso sobre el disco de origen.

La esporulación de la cepa *T. 17* a la dosis inferior e intermedia de los herbicidas fenoxaprop-p-etilo, bispiribac-Sodio y la de 0,1D de 2,4D sal de amina no fue afectó el proceso de esporulación, aún cuando hubo afectación del crecimiento micelial, como es el caso del fenoxaprop-p-etilo que inhibió el crecimiento en todos los casos en más de un 50%. La dosis de 10D de bispiribac-Sodio mostró menor esporulación respecto al testigo, al igual que la dosis intermedia de 2,4D sal de amina.

Para la cepa *T. 75* el efecto sobre la esporulación estuvo dado por la dosis máxima en los productos fenoxaprop-p-etilo y 2,4D sal de amina, los que la inhibieron completamente como consecuencia de la inhibición total del crecimiento micelial. Se debe destacar el hecho de que el resto de los tratamientos no afectaran la esporulación a pesar que si hubo afectación sobre el crecimiento micelial superior al 50%.

Tabla 3. Efecto de tres herbicidas a diferentes concentraciones sobre la esporulación de las cepas (17,75 y 78) de *T. asperellum* sp.

Producto	Dosis	T. 17		T. 75		T. 78	
		\bar{x} orig.	\bar{x} trasf.	\bar{x} orig.	\bar{x} trasf.	\bar{x} orig.	\bar{x} trasf.
Fenoxaprop-p-etilo	0,1D	$3,2 \times 10^4$	4,50	a	$3,2 \times 10^4$	4,48	a
	D	$2,9 \times 10^4$	4,46	ab	$4,0 \times 10^4$	4,56	a
	10D	0,00	1,00	d	0,00	1,00	b
Bispiribac-Sodio	0,1D	$3,6 \times 10^4$	4,56	a	$6,0 \times 10^4$	4,76	a
	D	$2,2 \times 10^4$	4,32	abc	$6,0 \times 10^4$	4,75	a
	10D	$9,5 \times 10^3$	3,92	bc	$2,0 \times 10^4$	4,23	a
2,4D Sal de Amina	0,1D	$1,5 \times 10^4$	4,07	abc	$3,2 \times 10^4$	4,49	a
	D	$8,2 \times 10^3$	3,87	c	$3,3 \times 10^4$	4,48	a
	10D	0,00	1,00	d	0,00	1,00	b
Testigo		$4,0 \times 10^4$	4,60	a	$2,3 \times 10^4$	4,34	a
Medias de tratamientos con diferentes letras (columna) difieren significativamente según Prueba de Tukey							

En la cepa *T.78* se observó para la dosis de 0,1D en el producto fenoxaprop-p-etilo y el bispiribac-Sodio una ligera estimulación de la esporulación, probablemente influenciada por la inhibición del crecimiento, que el hongo por efecto de conservación haya esporulado más por unidad de superficie de crecimiento o por alguna sustancia del producto que a baja dosis pueda estimular este proceso, ambas justificaciones deben ser estudiadas a profundidad en futuros trabajos, ya que la presente investigación no responde esta interrogante. El resto de los tratamientos a excepción de la dosis de 10D en fenoxaprop-p-etilo y 2,4D sal de amina, y la dosis intermedia en este último, no difieren del testigo, por lo que los tratamientos antes mencionados fueron los únicos que afectaron la esporulación, los primeros completamente y la segunda dosis con disminución de la esporulación por unidad de superficie.

En la literatura consultada no se hace referencia a estudios relacionados con el efecto que pueden tener los herbicidas sobre la esporulación de *Trichoderma*. La información más amplia sobre el tema se encuentra en los dossier de los productos y la misma es muy escueta y va dirigida a la forma de aplicación, dosis y la compatibilidad no se especifica.

Las características culturales de las colonias variaron respecto al testigo en los tratamientos en cuanto a la forma de los bordes, la textura del micelio y la coloración. Estos cambios se manifestaron de forma similar en todos los tratamientos para los tres cepas de *T. asperellum* estudiadas (Figura 2).

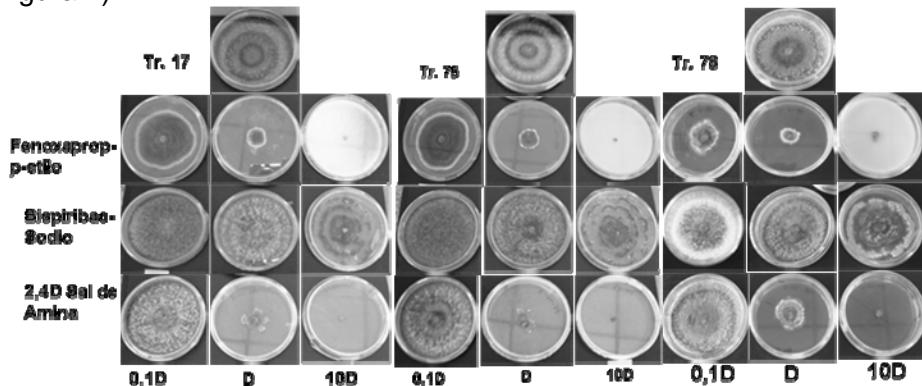


Figura 2. Efecto de los herbicidas probados sobre el crecimiento micelial de las cepas *T. 17*, *T. 75* y *T. 78*

De forma general podemos plantear que el efecto de los tratamientos sobre la esporulación de las cepas es menor, respecto al efecto que algunos causaron sobre el crecimiento micelial.

Según los resultados se puede plantear que las concentraciones inferiores a la dosis recomendada estimularon ligeramente la esporulación del antagonista para las cepas *T. 75* y *T. 78*

Los resultados confirman lo referido por Harman (2001), cuando plantea que la resistencia a agroquímicos difiere entre cepas; por lo que hay que hacer una selección de los controles biológicos respecto a estos. Teniendo en cuenta la dirección del desarrollo de la agricultura a nivel mundial, con las perspectivas de obtener productos más sanos y menores afectaciones del ambiente, sería necesario privilegiar no al producto químico haciendo selección, tomándolo como base, sino de encontrar el espacio y el tiempo para la aplicación correcta de ambos en caso necesario, por ello las pruebas de compatibilidad son de gran importancia para el manejo eficaz de un cultivo.

Como se aprecia en los resultados de este trabajo los herbicidas fenoxaprop-p-etilo y 2,4D sal de amina afectan el crecimiento micelial de las tres cepas de *T. asperellum* y la esporulación para la cepa *T.17*, por lo que no son compatibles con las cepas estudiadas.

REFERENCIAS

1. BioNativa. Bio Insumos Nativa. *Trichonativa* ®. Consultada: 29 Abr 2008. Disponible en:http://www.anasac.cl/app/Catalogo/Frontend/producto.asp?cod_doc=707&volver=2. 2007.
2. Carbonell, M. R.; Gutiérrez, Y. A.; García, R. A.; Antigua, P. G.; Gómez, S., J.; Correa, V. F.; Calvert, L.; Hernández, C. J. Editores. Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz. 5^a Edición Cuba. Instituto de Investigaciones del Arroz; 2008.
3. Del Pozo, E. M. Aspectos biológicos y sensibilidad a plaguicidas de tres biorreguladores de Homópteros de cítricos y cafeto. [Tesis doctoral]. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Cuba; 1987.
4. González, M.; Castellanos, L.; Ramos, M.; Pérez, G. Efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol. Fitosanidad. 9(1): 15-20. 2005.
5. Harman, G. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales) Consultada: 7 feb 2008. Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>. 2003.
6. Harman, G. *Trichoderma* spp., Including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningil*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system) Consultada: 7 feb 2008. Disponible en: <http://www.birdhybrids.com/t-22.htm>. 2001.
7. Hoyos-Carvajal, L; Chaparro, P; Abramsky, M; Chet, I.; Orduz, S. Evaluation of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* under *in vitro* and greenhouse conditions. Agronomía Colombiana 26(3):15. 2008.
8. Lerch, G. La experimentación Agrícola en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. La Habana. Editorial Científico- Técnico; 1977.
9. Martínez, B.; Reyes, Y. Selección de aislamientos de *Trichoderma* candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Protección Vegetal 23(2):118-125. 2008.
10. Mathivanan, N., Prabavathy, V. R., Vijayanandraj, V. R. Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. J. Phytopathology (153):697–701. 2005.
11. Michel, A. Cepas nativas de *Trichoderma* spp., su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* (HYPHOMYCETES: HYPHALES). [Tesis doctoral]. Universidad de Colima, Tecoman, Colima, México; 2001.
12. Ministerio de la Agricultura.. Instructivo Técnico del Arroz. 2005. Ediciones Instituto de Investigaciones del Arroz. Unión. C.A. Cuba; 2005.

13. Muñiz, Y.; Martínez, B.; Paula, S. Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium heterosporum* BOEDIJN y *Curvularia lunata* (WAKKER) BOED., aislados de vitroplántulas de caña de azúcar. *Protección Vegetal* 12 (3):145-149. 1997.
14. Pino, M, S. Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* provenientes de colón provincia Matanzas, para su reproducción en diferentes sustratos. [Tesis de Maestría]. Universidad Agraria de la Habana, La Habana, Cuba; 2008.
15. Reyes, Y. Selección de aislamientos de *Trichoderma* promisorios para el biocontrol del tizón de la vaina (*Rhizoctonia* sp.) kuhn. en arroz. *Protección Vegetal* 24(1): 68. 2009.
16. Rivero, G. D. Identificación y control *in vitro* con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). [Tesis de Maestría]. Universidad Agraria de La Habana, La Habana, Cuba; 2007.
17. Samaniego, G. J. A.; Ulloa, S. M.; Herrera, S. T. 1989. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. *Rev. Mex. Fitopatología* (8):86-95. 1989.
18. Solano, L. FITHAN. *Trichoderma* spp. BioSafe, S.A. de C.V Culiacán, Sinaloa. México. Consultada: 19 mar 2009. Disponible en: www.bactiva.com. 2009.