

ANTAGONISMO *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS DE *TRICHODERMA* spp. FRENTE AL HONGO *SAROCLADIUM ORYZAE* SAWADA.

Ariel Cruz Triana¹, Deyanira Rivero Glez¹, Benedicto Martínez Coca², Danay Infante²

1. Estación Experimental de Arroz, Km 1 ½ carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba.
Correo electrónico: actriana@inca.edu.cu;

2. Grupo de Fitopatología Protección de plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa L.*) es el alimento básico de la población cubana, con un consumo per cápita de 69,5 Kg, sin embargo, las producciones de este cereal solo satisfacen el 50 % del consumo nacional (Normas técnicas el Arroz, 2009). Entre los principales factores que limitan la producción de arroz en Cuba se destaca los bajos rendimientos obtenidos en el cultivo, los cuales están estrechamente relacionados con la alta incidencia de enfermedades fúngicas. En este sentido se destaca la pudrición de la vaina del arroz causada por el hongo *Sarocladium oryzae* (Sawada/Gams&Hawks), la cual es considerada la tercera enfermedad de importancia económica en el país, llegando a reducir los rendimientos hasta en 2 t/ha (MINAGRI, 1998; Sandoval y Bonilla, 2001).

En el manejo de esta enfermedad, numerosos fungicidas, en dosis cada vez mayores, son utilizados por los productores, sin lograr el control deseado, situación que incrementa los costos de producción y reduce los beneficios. Por otra parte, diferentes estudios indican que el tratamiento con cepas de *Trichoderma* spp., son promisorios en el control de numerosos hongos fitopatógenos (Rey *et al.*, 2000; Synowiecky, y Al-Khateeb, 2003; Chet, *et al.*, 2006; Chien, y Chou, 2006; Eweis, *et al.*, 2006). Esto se debe a que *Trichoderma* sp. presenta mecanismos de acción con varios efectos directos e indirectos sobre los microorganismos fitopatógenos, como son: inactivación de sistemas de infección, competencia, antibiosis, micoparasitismo, además de estimular el desarrollo vegetal e inducir sus mecanismos defensivos (Benítez, *et al.*, 2004).

Sobre la base de estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antagónico *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *Sarocladium oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el efecto antagónico de 4 aislamientos de *Trichoderma* spp. con actividad frente al hongo fitopatógeno *S. oryzae*, procedente del Laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Para ello se utilizó el método de cultivo dual, a partir de cultivos de los hongos, sembrados en medio Papa-Dextrosa-Agar (BIOCEN), pH 5,5, incubado a 26° C y oscuridad, durante 7 días. Se sembraron discos de 0,6 cm de diámetro del antagonista y del patógeno, diametralmente opuestos sobre placas de 9 cm de diámetro, contentivas medio PDA y se sometieron a similares condiciones de incubación, durante 11 días de observación. Se utilizó un control de cada patógeno, incubado en iguales condiciones. Se emplearon 5 réplicas por tratamiento.

Se evaluó la competencia por sustrato, antibiosis e interacción hifal.

Competencia por sustrato

Se midió el radio de las colonias a las 16, 24, 40, 48, 64, 72, 64, 72, 88, 96, 184, 208 y 232 horas, mediante el uso de una regla graduada (mm) y se determinó el grado de antagonismo según la Escala de Clase planteada por Bell y colaboradores (1982). Se emplearon 5 réplicas por tratamiento.

A las 64 horas, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógenos (PICR) según la fórmula de Samaniego (1989), citada por Bernal y colaboradores (2004):

$$\text{PICR} = \frac{r_1 - r_2}{r_1} * 100$$

Donde:

r₁: crecimiento radial de la colonia control.

r₂: crecimiento radial del aislamiento enfrentado al antagonista.

Antibiosis

Primeramente se determinó el efecto “antibiótico” de los aislamientos 3, 17, 75 y 85 de *Trichoderma* spp. en cultivo dual. Para ello se evaluó el crecimiento de los hongos patógenos, antes del momento de contacto físico con el antagonista; es decir, a las 48 horas.

Posteriormente se evaluó el efecto “antibiótico” de los metabolitos de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno *S. oryzae*. Se inocularon los aislamientos del hongo antagonista en Caldo Papa-Dextrosa, pH 5,5, a 28° C y oscuridad, durante 30 días y se filtraron mediante membranas miliporo (0,45 µm). Se embebieron, por 30 minutos, discos de micelio de 0,6 cm de diámetro, del patógeno, en los metabolitos obtenidos a partir de los aislamientos del antagonista, se colocaron en el centro de placas contentivas medio PDA (pH 5,5) y se incubaron en las condiciones descritas previamente, durante 7 días. Se utilizaron 4 réplicas por tratamiento.

Se midió el diámetro de las colonias a los 4, 5, 6 y 7 días y se comparó con los tratamientos controles, embebidos en agua destilada estéril y Caldo Papa Dextrosa.

Micoparasitismo

El tipo de micoparasitismo se observó al microscopio óptico (aumento de 400x), a partir de preparaciones del punto de interacción o contacto de ambos hongos (3 réplicas por tratamiento). Se determinaron los tipos de interacción hifal (lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración).

Se prepararon suspensiones de conidios de *S. oryzae*, a partir de los puntos de interacción con los aislados de *Trichoderma*, y se colocaron 100 µL de las mismas sobre láminas portaobjetos, las que posteriormente se incubaron en condiciones de cámara húmeda durante 24 horas. Para evaluar el porcentaje de germinación de los conidios se utilizaron 3 portaobjetos/tratamiento y se observaron 4 campos/lámina, con al menos 50 conidios/campo y se empleó como control una suspensión de conidios obtenida a partir de los tratamientos controles en el cultivo dual.

Para la realización de estos experimentos se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado. Los datos correspondientes a los porcentajes de germinación de conidios se transformaron mediante la expresión $2\text{Arcsen}\sqrt{\%}$. Los valores de PICR, y los de diámetro de las colonias correspondientes a los ensayos de Antibiosis, se procesaron a través de un ANOVA simple y las medias se compararon por la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p<0.05$). En los casos en que no se cumplieron los supuestos de normalidad, se realizaron las Pruebas no paramétricas Kruskal Wallis y Mann-Whitney (SPSS versión 11.5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Competencia por sustrato

Todas las cepas de *Trichoderma* spp. enfrentadas con el patógeno se ubicaron en el grado 1 de la Escala de Bell y colaboradores (1982), por lo que *Trichoderma* sp. creció completamente sobre el medio de cultivo y el organismo patógeno. Esto evidencia una alta capacidad antagónica de los aislamientos estudiados.

La mayoría de los aislamientos de *Trichoderma harzianum* crecieron considerablemente más rápido que *S. oryzae*, en las mismas condiciones de cultivo, y retardan el crecimiento y esporulación del mismo. Esto les confiere una importante ventaja competitiva por el espacio,

respecto al hongo fitopatógeno, inclusive antes de mostrar su arsenal de micotoxinas y actividad micoparasítica (Küçük, y Kivanç, 2004).

Los aislamientos 3, 17, 75 y 85 de *Trichoderma* spp. a las 72 horas manifestaron un efecto inhibitorio del crecimiento radial del patógeno con respecto al control, (Figura 1). Por otra parte el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (30 %) se observó con el aislamiento de T-85, pero sin diferir significativamente respecto a T-17 y T-75.

Existen numerosos trabajos relacionados con el uso de cepas del género *Trichoderma* en ensayos de competencia para el biocontrol de hongos fitopatógenos. El PICR alcanzado en el presente trabajo se encuentra en intervalos cercanos por otros autores con diferentes fitopatógenos; en *Phytophthora capsici* Leonina, fue de 30 % (Ezziyyani, et al., 2004); en *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Smith) Synder & Hansen., entre 38 y 58 % con 6 aislamientos de *Trichoderma* spp. (Bernal, et al., 2004). Frente al hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* Prill. mostró valores del orden del 35 % (Ruano, et al., 2003).

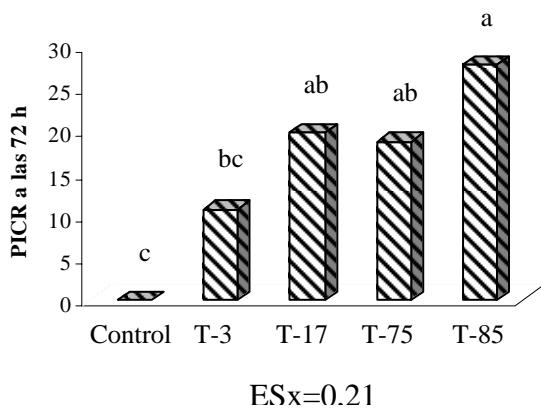


Figura 1: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *S. oryzae* en cultivos duales con aislamientos de *Trichoderma* spp., a las 72 horas.

En géneros de hongos patógenos aislados de semilla botánica de caña (*Curvularia*, *Bipolaris* y *Exserohilum*), dos especies de *Trichoderma* (*T. harzianum* y *T. viride*) mostraron competencia por el sustrato (Alfonso, et al., 2006).

La elevada competencia por nutrientes y espacio de *Trichoderma* sp. se debe en gran medida a que posee una mayor capacidad de tomar y movilizar nutrientes que otros organismos. Esto está relacionado, a su vez, con la versatilidad de azúcares que puede metabolizar para obtener ATP, así como con la producción de sideróforos altamente eficientes que forman quelatos, de manera que el hierro no queda disponible para otros microorganismos y de esta forma detener el crecimiento de estos hongos (Benítez, et al., 2004).

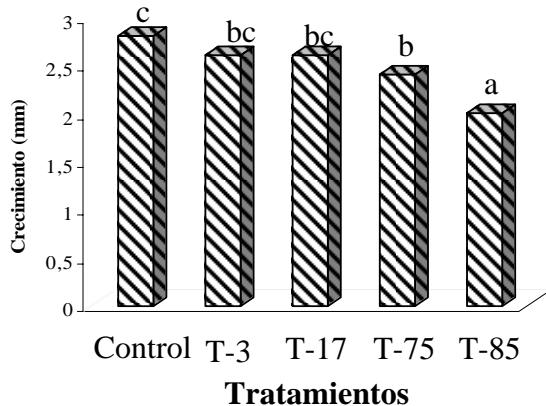
Antibiosis

A las 48 horas, previo al contacto físico entre el patógeno y los aislamientos antagonistas, sólo se observó efecto inhibitorio en algunos tratamientos (Figura 2). Los aislamientos de *Trichoderma* spp. T-75 y T-85 inhibieron el crecimiento del patógeno al presentar diferencias significativas respecto al control y a los restantes aislamientos antagonistas.

Este efecto inhibitorio, antes del contacto hifal, infiere la excreción al medio de metabolitos, por parte de *Trichoderma*, que ejercen una acción fungistática, debido a que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización de los microorganismos a su alrededor (Vey, et al., 2001).

En muchos casos, la producción de antibióticos se correlaciona con la capacidad biocontroladora; y los antibióticos purificados mimetizan el efecto de todo el agente (Benítez, et al., 2004).

Esto se ve ejemplificado en el caso de los metabolitos volátiles de *T. harzianum* T-10, T-15 y T-19, que inhibieron el crecimiento de *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subramanian & P. C. Jain., *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *Rhizoctonia cereales* Van der Hoeven, *F. moniliforme*, *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & Oliv. var. *tritici* Walker, *F. oxysporum*, *R. solani* y *Sclerotium rolfsii*; aunque los metabolitos no volátiles resultaron ser más efectivos.



$$ESx=0,021.$$

Figura 2: Efecto antibiótico de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *S. oryzae*.

Al analizar el efecto de los filtrados obtenidos a partir de *Trichoderma* spp., sobre *S. oryzae* (Tabla 1), se observó que el cuarto y quinto día hubo diferencias significativas en el diámetro de las colonias del patógeno con respecto a los controles, sin embargo, a partir del 6 día solo se observaron diferencias con respecto a los controles en el sexto día para el tratamiento con el aislamiento T-17, lo que evidencia la inestabilidad en el tiempo de los metabolitos evaluados con respecto a *S. oryzae*.

Tabla 1: Efecto de los metabolitos de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *S. oryzae*.

Tratamientos	Diámetro de la colonia (cm) de <i>S. oryzae</i> .			
	4 días	5 días	6 días	7 días
Control (Agua)	1,6 a	2,0 a	2,4 a	3,0 a
Control (PDA)	1,5 ab	2,0 a	2,3 ab	2,7 b
T-3	1,3 d	1,7 b	2,2 bc	2,6 b
T-17	1,3 d	1,7 b	2,1 c	2,6 b
T-75	1,4 bc	1,8 b	2,2 bc	2,7 b
T-85	1,3 d	1,7 b	2,2 bc	2,7 b
ESx	0,043	0,051	0,051	0,053

Micoparasitismo

Todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. presentaron micoparasitismo con interacción mediante lisis o degradación de las hifas con fragmentación de sus septos y vacuolización del contenido citoplasmático celular del micelio del patógeno.

Los dos tipos de interacción micoparasítica (lisis y vacuolización) de los aislados de *Trichoderma* evaluados frente al patógeno *S. oryzae* evidencian el potencial biocontrolador de los mismos, debido a la versatilidad de mecanismos y por ende, existe una menor probabilidad de aparición de formas resistentes de los patógenos a éstos.

Las interacciones micoparasíticas han sido estudiadas para numerosos agentes fitopatógenos, y en el presente trabajo se corroboran algunos de estos tipos de interacción hifal. En este sentido, González y colaboradores (2006) describieron el hiperparasitismo, enrollamiento, alteraciones citoplasmáticas con presencia de vacuolas y granulaciones y fragmentación de hifas a nivel de septo, en interacciones de *T. harzianum* y *T. viride* frente a *R. solani*.

Innumerables estudios se han realizado para llegar a dilucidar completamente los mecanismos bioquímicos y moleculares por medios de los cuales tiene lugar el micoparasitismo. Benítez y colaboradores (2004) y Harman y colaboradores (2004) plantean que éste involucra una secuencia de eventos complejos que incluye: reconocimiento, crecimiento hacia el patógeno, excreción de exoquitinasas, liberación de oligómeros de la pared celular del hospedante, producción de endoquitinasas fungitóxicas que difunden y comienzan a afectar al patógeno antes del contacto. Posteriormente el antagonista se adhiere a lectinas del patógeno a través de carbohidratos de la pared celular, se enrolla y/o forma estructuras semejantes a apresorios y posteriormente secreta enzimas degradadoras de la pared celular (quitinasas, glucanasas y proteasas) y antibióticos peptabioles (Reithner, et al., 2000), que facilitan la entrada de la hifa de *Trichoderma* al interior del lumen del hongo y la asimilación del contenido de la pared celular (Benhamou, y Chet, 1997). Se ha comprobado que la producción de estas enzimas hidrolíticas no depende del contacto, sino de una molécula difusible producida por el hospedante (Cortes, et al., 1998).

De forma general todos los aislados mostraron capacidades potenciales para ejercer un biocontrol sobre el hongo *S. oryzae*, destacándose la cepa T-85, la cual fue la más efectiva en la mayoría de los ensayos realizados. No obstante para ejercer un biocontrol efectivo frente al hongo *S. oryzae* será necesaria la integración a otras medidas de manejo, con potencialidades para el manejo de la pudrición de la vaina del arroz.

REFERENCIAS

1. Alfonso, Isabel; Alfonso, F.; Rivera, M. J. y Villa, Pilar. 2006. Perspectivas de biocontrol de hongos en la semilla botánica de la caña de azúcar en Cuba. *Fitosanidad*, 10 (2): 125.
2. Bell, D. K; Wells, H. D. y Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.
3. Benhamou, Nicole y Chet, I. 1997. Cellular and Molecular Mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (5): 2095-2099.
4. Benítez, Tahía.; Rincón, Ana M.; Limón, María C. y Codón, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
5. Bernal, A.; Andreu, C. M.; Moya, M. M.; González, Mabel y Fernández, O. 2004. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyd. & Hans. Dirección URL: <http://www.virtualcentre.org/es/enl/BTJ%20Taller/bernalalexander.htm>. Consultado: 9 de enero de 2007.
6. Chet, I.; Viterbo, A.; Brotman, Y. y Lousky, T. 2006. Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*. *Life Sciences Open Day*. Weizmann Institute of Science. Dirección URL: http://www.weizmann.ac.il/Biology/open_day_2006/book/Abstracts/Ilan_Chet.pdf. Consultado: 30 de marzo de 2007.

7. Chien, P. y Chou, C. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1964-1969.
8. Cortes, C.; Gutiérrez, A.; Olmedo, V.; Inbar, J.; Chet, I. y Herrera-Estrella, A. 1998. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a difusible factor. *Molecular and General Genetics*, 260 (2-3): 218-225.
9. Eweis, M.; Elkholy, S. S.; Elsabee, M. Z. 2006. Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38 (1): 1-8.
10. Ezziyyani, M.; Pérez, Consuelo; Sid, A.; Requena, María E. y Candela, María E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26: 35-45.
11. González, Marleny; Ramos, Elda; Fernández, Ana y Ramírez, Rebeca. 2006. Efecto antagonista de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* frente a aislamientos de *Rhizoctonia solani* obtenidos en semillas de tabaco con tecnología de bandejas flotantes. *Fitosanidad*, 10 (2): 180.
12. Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I. Y Lorito, M. 2004. *Trichoderma* spp.: Opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Microbiology Review*, 2: 43-56.
13. Küçük, Çiğdem y Kivanç, Merih. 2004. In vitro antifungal activity of Strains of *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology*, 28: 111-115.
14. MINAGRI. 1998. Informe sobre el vaneado de la panícula y la pudrición de la vaina del arroz, producida por el complejo del ácaro *Steneotarsonemus spinki* y el hongo *Sarocladium oryzae* Sawada. Biblioteca Instituto de Sanidad Vegetal (INISAV). 26 p.
15. Normas técnicas del cultivo del arroz. 2009. Sancti Spíritus. Cuba.
16. Reithner, Barbara; Brunner, K.; Shuhmacher, R.; Peiss, Isabel; Seidl, Verena, Krska, R. y Zeilinger, Sussanne. 2005. The G protein α subunit Tga 1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 42 (9): 749-760.
17. Rey, M.; Delgado-Jarana, J.; Rincón, Ana M.; Limón, María C. y Benítez, Tahía. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: 31-36.
18. Ruano-Rosa, D.; del Moral-Navarrete, L. y López-Herrera, C. J. 2003. Estudios de temperaturas de crecimiento *in vitro* en aislados de *Trichoderma* sp. y de *Rosellinia necatrix*. Evaluación del antagonismo mediante cultivos duales. *Actas del V Congreso Mundial del Aguacate*, p: 525-529.
19. Sandoval, Ileana y Bonilla, Tania. 2001. Comportamiento de la pudrición de la vaina del arroz por *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams & Haswks en variedades de la Habana y Pinar del Río. *FITOSANIDAD*. 5(1): p.3-6.
20. Synowiecky, J. y Al-Khateeb, Nadia A. 2003. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (2): 145-171.
21. Vey, A.; Hoagland, R. E. y Butt, T. M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrols agents. En: Butt, T. M.; Jackson, C. y Magan, N. (ed). *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, p: 311-346.