

Artículo original

## **Efectividad antagónica *In Vitro* de *Trichoderma* sp., frente a *Stemphylium lycopersici***

Jonathan Pozo-Serrano<sup>1</sup>

Enrique Reynaldo-de la Cruz<sup>2\*</sup>

María Teresa-Cardoso<sup>1</sup>

Ania Rodríguez-Pérez<sup>3</sup>

Jorge García-Pupo<sup>3</sup>

Yaisel Pérez-Tejeda<sup>3</sup>

Lisbet Guzman-Alberteris<sup>1</sup>

Esli Lobaina-Lobaina<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomía. Facultad de Ciencias Naturales y Agropecuarias. Universidad de Holguín. Sede José de la Luz y Caballero. Carretera de Mayarí Km 3 ½. Holguín, 80100, Cuba

<sup>2</sup>Departamento de Recursos Naturales. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales de Holguín. Calle 18 s/n e/ 1ra. y Maceo. Reparto. El Llano, Holguín, 80100, Cuba

<sup>3</sup>Departamento de micología. Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Prolongación de Carbo # 40 esquina Holguín, reparto Altura de Paredes, Holguín, 80100, Cuba

<sup>4</sup>Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Agropecuarias. Universidad de Ciego de Ávila (UNICA). Carretera de Morón km 9, Ciego de Ávila, 65200 Cuba

\* Autor para correspondencia. [ereynaldo@cisat.cu](mailto:ereynaldo@cisat.cu)

### **RESUMEN**

*Stemphylium lycopersici* constituye uno de los agentes causales de la mancha gris en las hojas del tomate, patología recurrente y extendida en los cultivos de tomate en Holguín. Se evaluó el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* cepas A-34, A-53 y *Trichoderma viride*

TS-3, frente a *Stemphylium lycopersici*. El enfrentamiento se realizó mediante un ensayo de antagonismo en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD). El indicador evaluado fue el porcentaje del índice de inhibición micelial IM (%). Las tres cepas demostraron una elevada efectividad antagónica *in vitro* frente a *Stemphylium lycopersici*.

**Palabras clave:** tomate; biocontrol, micelio, inhibición, patógeno

Recibido: 21/12/2018

Aceptado: 04/08/2019

## INTRODUCCIÓN

*Trichoderma* sp. es empleado como bioplaguicida, por sus propiedades para inhibir fitopatógenos fúngicos. Este hongo se puede encontrar distribuido en diferentes zonas y hábitats, especialmente en sitios que contienen abundante materia orgánica <sup>(1)</sup>. Su principal actividad antifúngica es el resultado de la competencia antagónica, mecanismo de vital importancia y definido como el comportamiento diferenciado de dos o más organismos frente a un mismo requerimiento, de manera que uno de los organismos reduce el espacio o los nutrientes disponibles del otro <sup>(2-3)</sup>. Ciertas características como la velocidad específica de crecimiento o el desarrollo y factores externos: temperatura, humedad o pH, influyen en la competencia antagónica <sup>(4)</sup>.

La producción global de tomate (*Lycopersicon esculentum*) para consumo, se estima en 108 000 000 t, con un rendimiento promedio de 36 t ha<sup>-1</sup>. China, es el mayor productor del mundo, seguido por EE.UU, Turquía, India, Egipto e Italia <sup>(5)</sup>. La producción anual de tomate en Cuba representa más del 50 % del área total cultivada por las hortalizas, con más de 200 000 t comercializada <sup>(6)</sup>. Para el año 2017 la FAO estimó que en Cuba se cultivaron 48713 ha de tomate; con una producción de 58 4072 t y un rendimiento superior a las 11 t ha<sup>-1</sup> <sup>(7)</sup>.

En los cultivos de tomate se ha observado una elevada incidencia de *Stemphylium lycopersici* en muchas regiones del mundo. Recientemente se ha informado un incremento de esta enfermedad en Sur América <sup>(8)</sup>. Este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en Cuba, incidiendo principalmente en el Occidente del país <sup>(9)</sup>. Provoca la marchitez de las hojas y tallos en las plantas y en consecuencia acorta el ciclo biológico normal y reduce los rendimientos <sup>(10)</sup>. En el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Holguín se ha

registrado, en los últimos 10 años, una afectación recurrente y masiva de este patógeno, lo que provoca grandes pérdidas de cosechas de tomate. Hasta el momento, no se conoce las causas que pudieran influir en el incremento de esta enfermedad.

Por lo antes expuesto se estableció como objetivo de este trabajo evaluar la efectividad antagonica *in vitro* de *T. harzianum* cepas A-34, A-53 y *T. viride* TS-3, frente a *S. lycopersici*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tres cepas: *Trichoderma harzianum* Rifai Cepa A-34, *Trichoderma harzianum* Rifai Cepa A-53 y *Trichoderma viride* Persoon Cepa TS-3, procedentes del Centro de Reproducción para el Control Biológico (CREE), de Ciudad Jardín, Empresa Agropecuaria de Holguín.

A partir de plantas de tomate *Lycopersicon sculentum*, Mill variedad HC-2580, con síntomas de *Stemphylium lycopersici* se colectaron las hojas que presentaron puntos oscuros o pequeñas manchas de unos 2 a 4 mm, de color pardo o negras y circulares con los contornos irregulares y rodeadas por un halo amarillento. En algunos casos las hojas colectadas presentaron manchas de color gris con un orificio en el centro de la hoja<sup>(10)</sup>. Las hojas fueron obtenidas de cultivos de tomate de los municipios de Gibara, Holguín y Banes en la provincia de Holguín.

Los ensayos de antagonismo se realizaron en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Holguín, en el departamento de micología. *Stemphylium lycopersici* se aisló a partir de hojas infectadas de *L. sculentum*. El patógeno fue reproducido mediante inoculación de suspensión micelial en placa Petri, con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD) a 28 °C, durante 72 horas en una incubadora<sup>(11)</sup>.

El enfrentamiento de *S. lycopersici* y *Trichoderma* sp. se realizó mediante el ensayo de antagonismo<sup>(12)</sup>. Se utilizaron placas Petri de 90 mm de diámetro, con medio de cultivo APD. El micelio de *S. lycopersici* y de las cepas de *Trichoderma* sp. fue obtenido del centro de las colonias crecidas en placas Petri al sexto día. Se colocó en un extremo de la placa un disco de 7 mm de diámetro del micelio del patógeno y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con micelio de cada cepa de *Trichoderma* sp, según los diferentes tratamientos. Muestras del patógeno no inoculadas con *Trichoderma* sp. se utilizaron como control. Se utilizaron seis

placas Petri por cada tratamiento para cada una de las cepas *T. harzianum* A-34, A-53 y *T. viride* TS-3. A partir del séptimo día de iniciar el enfrentamiento, se midió el porcentaje de inhibición micelial IM (%) <sup>(13,14)</sup>. Para determinar el área de crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. se empleó el software Image J de NHI <sup>(15)</sup>.

### Análisis estadístico

Para comparar el IM (%) entre las cepas, se realizó un PERMANOVA, con 10 000 permutaciones, empleando la distancia euclidiana, con un nivel de significación del 5 %, el valor de p sin corrección. Se utilizó el Software estadístico PAST 3.18 <sup>(16)</sup>.

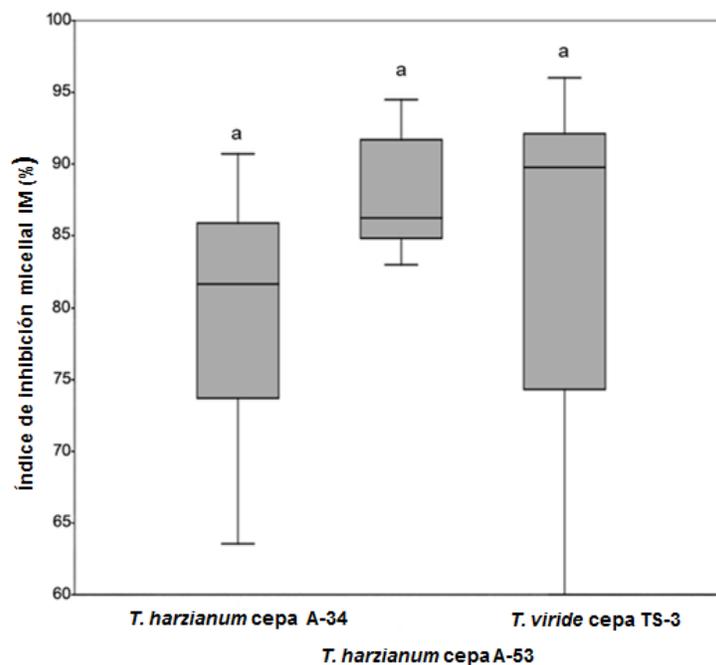
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó antagonismo *in vitro* de las tres cepas de *Trichoderma* sp. utilizadas frente a *S. lycopersici*. No se obtuvo diferencias estadísticas en el porcentaje de inhibición micelial de *S. lycopersici* por las distintas cepas de *Trichoderma* empleadas (Figura 1). Los valores obtenidos fueron en *T. harzianum* cepa A-53 IM (%)=87,2±4,53, seguido por *T. viride* cepa TS-3 IM (%)=81,13±13,80. El menor valor fue obtenido por *T. harzianum* cepa A-34 IM (%)=80,28±9,78.

La actividad antagónica mostrada por las cepas de *Trichoderma* sp. pudiera deberse a una mayor velocidad de crecimiento, a competencia por espacio y por los nutrientes u otros factores como la producción de enzimas, destacando las quitinasas, glucanasas y proteasas <sup>(17,18)</sup>.

Se ha demostrado que *Trichoderma* sp. presenta enzimas extracelulares con actividad lítica sobre las hifas del patógeno. Algunos estudios han mostrado evidencias de la producción de quitinasas, que contribuyen a la degradación de las paredes celulares de los microorganismos patógenos <sup>(19)</sup>.

La intensidad antagónica de *Trichoderma* sp. se considera elevada porque inhibió más de un 80 % el crecimiento de *S. lycopersici*. Una de las formas de antagonismo más común reportada por *Trichoderma* sp. es por hiperparasitismo, donde las hifas de *Trichoderma* recubren las del patógeno, entrelazando o entrecruzándose con este ocupando gran parte del espacio vital <sup>(20)</sup>.



Letras iguales representa que no existe diferencia entre las medias,  $p \leq 0.05$

**Figura 1.** Porcentaje de inhibición micelial de *Stemphylium lycopersici* frente a las cepas de *Trichoderma* sp. A-34, A-53 y TS-3 a los siete días a partir de la prueba PERMANOVA ( $p=0.29$  y  $F=1.31$ )

Otros trabajos muestran que *Trichoderma* sp. presenta una efectiva inhibición micelial de *Fusarium* sp., patógeno en semillas de cebolla. Este resultado se mantuvo en diferentes ciclos reproductivos de *Trichoderma* sp., fundamentalmente durante la esporulación<sup>(21)</sup>. Cepas de *T. harzianum* y *Trichoderma yunnanense* presentaron también una inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* de un 10,3 y 22,1 % al sexto día de iniciar el enfrentamiento<sup>(22)</sup>. Por otra parte, *Trichoderma longibranchiatum* mostró porcentajes de inhibición de 21,9 y 22,5 % contra *Colletotrichum gloeosporioides* y de 23,86 y 43,14 % frente a *Fusarium verticillioides*<sup>(23,24)</sup>. Estos valores son inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Ensayos similares de antagonismo realizados *in vitro* con *T. harzianum* cepa CCIBP-T4 demostraron una elevada actividad de hiperparasitismo a los seis días de inoculación frente a *Mycosphaerella fijiensis*, patógeno foliar en cultivos de plátano en Cuba. *Trichoderma*

provocó la ruptura en la pared celular de las hifas del patógeno y la salida del contenido extracelular <sup>(25)</sup>.

Otros autores evaluaron el efecto antagonista *in vitro* de 31 cepas de *Trichoderma* frente a *Phytophthora capsici*, mostrando las cepas un 97 % de inhibición micelial <sup>(26)</sup>.

El moho foliar *Cladosporium fulvum* es una enfermedad que afecta los cultivos de tomate en Perú. Para controlar este patógeno se realizaron enfrentamientos *in vitro* con: *Hansfordia pulvinata*, *T. harzianum*, *T. viride* y *Trichoderma virens*. Se encontró que a 24 °C y a las 72 h, *T. harzianum* presentó un porcentaje de inhibición micelial superior estadísticamente a las restantes tres especies, y a 28 °C fue similar a *T. viride* <sup>(27)</sup>.

Se establece el micoparasitismo como el mecanismo de acción más común de *Trichoderma* sp. durante la inhibición micelial en diferentes patógenos. Y se aduce como una temperatura óptima de inhibición en el rango de 20 a 30 °C <sup>(27)</sup>. En este sentido, es posible que la temperatura y el pH podrían ser los dos factores que más influyeron en no encontrar diferencias entre las cepas A-34, A-53 y TS-3, en la inhibición micelial de *S. lycopersici* en esta investigación. Ambos parámetros químicos-físicos se mantuvieron constantes durante los enfrentamientos y varios autores informan una fuerte relación de los mismos con la efectividad antagónica de *Trichoderma* sp. <sup>(21-27)</sup>.

Los resultados demuestran, por primera vez, la actividad antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (cepas A-53 y A-34) y *Trichoderma viride* (cepa TS-3) frente a *Stemphylium lycopersici*, patógeno foliar en los cultivos de tomate en la provincia de Holguín.

## CONCLUSIÓN

Las cepas A-53, A-34 y TS-3 de *Trichoderma* sp. presentan antagonismo *in vitro* frente al patógeno *Stemphylium lycopersici*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal. 2013;28(1):1–11.
2. Ríos ELV. Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. Revista Científica Agroecosistemas. 2014;2(1).

3. Pérez-Torres E, Bernal-Cabrera A, Milanés-Virelles P, Sierra-Reyes Y, Leiva-Mora M, Marín-Guerra S, et al. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro*. 2018;30(1):17–26.
4. de Prato SSS, Rodríguez M, Luis MLS, Peña AS, Santana IAR. Efectividad de *Trichoderma Harzianum* sobre la poblaci[on de nemátodos fitopatógmnros en el café *Coffea Arábica* L. en condiciones de vivero en el Municipio Junín, Estado Táchira. Venezuela. *Universidad&Ciencia*. 2016;5(2):175–87.
5. Estadísticas superficie, producción y rendimiento mundial del tomate del 2002. 2003.
6. Herrera Rodríguez A. Caracterización morfofisiológica y evaluación de *Alternaria solani* Sorauer en cultivares de tomate *Solanum lycopersicum* L. para el consumo fresco. [Villa Clara]: Universidad Central" Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
7. Datos para el desarrollo: Anuario estadístico de bolsillo de la FAO en el año 2017 [Internet]. [cited 2019 Nov 25]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
8. Franco MEE. Mancha gris de la hoja del tomate: identificación, biología y genómica del agente etiológico. Facultad de Ciencias Naturales y Museo; 2019.
9. Martínez E, Barrios G, Rovesti L, Santos R. Manejo Integrado de Plagas. Manual práctico. 2007. 564 p.
10. Franco MEE, Vera-Bahima J, Barcena A, López SMY, Medina R, Pastorino GN, et al. *Stemphylium lycopersici* es el agente causal de la Mancha Gris de la Hoja del tomate en las zonas de producción hortícola de Argentina. Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología REDBIO. 2013;8:491.
11. Samaniego-Fernández LM, Harouna M, Corbea O, Rondón-Castillo AJ, Placeres-Espinosa I. Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*. 2018;33(3).
12. Nasehi A, Kadir JB, Esfahani MN, Mahmodi F, Golkhandan E, Akter S, et al. Cultural and physiological characteristics of *Stemphylium lycopersici* causing leaf blight disease on vegetable crops. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2014;47(14):1658–65.
13. Rodríguez IC, Joksan F. Capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro*. 2018;30(1):49–58.
14. Campuzano-F SE, Laura U-T, Jessica V. Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *rhizoctonia solani*. *Nova*. 2017;15(28):45–55.
15. Rueden C, Dietz C, Horn M, Schindelin J, Northan B, Berthold M. ImageJ Ops [Internet]. ImageJ. 2016 [cited 2019 Nov 25]. Available from: [https://imagej.net/ImageJ\\_Ops](https://imagej.net/ImageJ_Ops)

16. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electrónica. Palaeontologia Electronica*. University of Oslo; 2001.
17. Monteiro VN, do Nascimento Silva R, Steindorff AS, Costa FT, Noronha EF, Ricart CAO, et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current microbiology*. 2010;61(4):298–305.
18. Khare E, Kumar S, Kim K. Role of peptaibols and lytic enzymes of *Trichoderma cerinum* Gur1 in biocontrol of *Fusarium oxysporum* and chickpea wilt. *Environmental Sustainability*. 2018;1(1):39–47.
19. Saravanakumar K, Yu C, Dou K, Wang M, Li Y, Chen J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*. 2016;94:37–46. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.12.001
20. Maheshwari NU, Vidhya K. Antagonistic effect of *Trichoderma* species against various fruit pathogens. *Int. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res*. 2016;36(I):1–9.
21. Abeyratne GDD, Deshappriya N. The effect of pH on the biological control activities of a *Trichoderma* sp. against *Fusarium* sp. isolated from the commercial onion fields in Sri Lanka. 2018;5(2):121–8.
22. De la Cruz-Quiroz R, Roussos S, Rodríguez-Herrera R, Hernandez-Castillo D, Aguilar CN. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*. 2018;4(2):237–43.
23. Santos AJC, Divina CC, Pineda FG, Lopez LLMA. *In vitro* Evaluation of the Antagonistic Activity of *Trichoderma* sp. against *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural Technology*. 2017;13(7.3):2539–48.
24. Joshi D, Singh P, Singh AK, Lal RJ, Tripathi N. Antifungal potential of metabolites from *Trichoderma* sp. against *Colletotrichum falcatum* went causing red rot of sugarcane. *Sugar Tech*. 2016;18(5):529–36.
25. Wolna-Maruwka A, Piechota T, Niewiadomska A, Dach J, Szczech M, Jędryczka M, et al. An assessment of adaptive and antagonistic properties of *Trichoderma* sp. strains in vegetable waste composts. *Archives of Environmental Protection*. 2017;43(4):72–81.
26. Osorio-Hernández E, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Castillo-Reyes F. *In-vitro* behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research*. 2011;6(19):4594–600.
27. Torres E, Iannacone J, Gómez H. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*. 2008;67(1):169–78.