

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE TRECE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Rhizoctonia* sp.

Yusimy Reyes*, B. Martínez** y Danay Infante**

*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, Correo electrónico: yusimy@isch.edu.cu

RESUMEN: El Tizón de la Vaina o Mancha Oriental, se considera la segunda enfermedad de importancia en Cuba y el mundo en el cultivo del arroz. Los métodos utilizados para su control aún no son efectivos; en la actualidad existe una tendencia al uso del Control Biológico, donde se reconoce la potencialidad de *Trichoderma*, con resultados positivos como antagonista sobre *Rhizoctonia* y otros patógenos del suelo. El presente trabajo tiene como objetivo seleccionar los aislamientos de *Trichoderma* promisorios en dependencia de su antagonismo *in vitro* y su eficacia en condiciones semicontroladas para el biocontrol de *Rhizoctonia* sp. El antagonismo se evaluó por el método del cultivo dual, donde se observó la competencia por el sustrato, micoparasitismo y la antibiosis. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) a las 96 horas. Los aislados que presentaron más de un 50 PICR y al menos dos tipos de interacción hifal se seleccionaron para el ensayo en condiciones semicontroladas donde se evaluó la eficacia técnica sobre el patógeno en bandejas de acero inoxidable de 0,30m². Los resultados mostraron que el 100 % de los aislados presentaron alta capacidad antagonica, con diferentes tipos de interacción hifal: lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración, por lo que se pudieron seleccionar cinco aislados. De estos tres mostraron una efectividad técnica del 50% en condiciones semicontroladas. Los aislamientos 39, 56 y 78 resultaron promisorios para ser evaluados en condiciones de campo.

(Palabras clave: *Trichoderma*; *Rhizoctonia*; arroz; control biológico)

EVALUATION OF THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF THIRTEEN *Trichoderma* spp. ISOLATES ON *Rhizoctonia* sp.

ABSTRACT: The sheath blight or blot easterly is considered the second important disease on rice in Cuba and worldwide. The methods used to control this disease have not been effective and, at present, there is a tendency to use the biological control. *Trichoderma* is recognized as a potential antagonist of soil pathogens, with positive results as an antagonist to *Rhizoctonia*. The objective of this work was to select promising strains of *Trichoderma* spp. according to their *in vitro* antagonism and effectiveness to control *Rhizoctonia* sp. under semicontrolled conditions. Antagonism was evaluated using the dual culture method, where the competition for the substrate, mycoparasitism and antibiosis could be observed. The colony radial growth was measured with a graduated ruler and the inhibition percentage was calculated after 96 hours. Micoparasitism was also observed using an optic microscope with 400x magnification, where the interaction between strains was evaluated. Strains showing a radial growth inhibition higher than 50 % and at least two types of hyphae interaction were selected to be tested under semicontrolled conditions for evaluating the technical effectiveness on the pathogen in stainless steel trays of 0,30cm². The 100 % of the strains had high antagonism capabilities with different types of hyphal interactions, lysis, vacuolization, rolling, and penetration. Five strains were selected, three of them showing a technical effectiveness of 50% under semicontrolled conditions. Strains 39, 56 and 78 resulted promising to control the disease under field conditions.

(Key words: *Trichoderma*; *Rhizoctonia*; rice; biological control)

INTRODUCCIÓN

Una de las causas que afecta los rendimientos en la producción de arroz en Cuba y el Mundo, es la incidencia de enfermedades, destacándose en los últimos años el Tizón de la Vaina o Mancha Oriental, causada por *Rhizoctonia solani* Kühn. La misma se considera actualmente una de las principales enfermedades del cultivo. El incremento de la enfermedad ha conllevado a la disminución de los rendimientos entre un 20 - 40% (1, 2).

Para controlar la enfermedad se han empleado medidas agrotécnicas, sin obtener resultados positivos. El control más efectivo se ha obtenido con el empleo de fungicidas químicos (1,3), método que presenta desventajas económicas y ecológicas por lo costoso y agresivo que resultan estos al medio ambiente (4,5).

Por esta razón es necesario introducir otras medidas de control que al combinarse con los fungicidas químicos disminuyan el efecto negativo al ambiente. La tendencia actual es desarrollar nuevas alternativas para el manejo a través del uso de agentes de control biológico. A escala mundial se reconocen un grupo de hongos (6,7, 8, 9) y de bacterias (7) con acción antagonista, donde sobresale la efectividad de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* con excelentes resultados en el antagonismo: por competencia, antibiosis, micoparasitismo, lisis enzimática y estimulación del crecimiento vegetal (6,7, 8).

Dada la importancia de la enfermedad en el país, las dificultades para su control y las bondades del hongo antagonista *Trichoderma*, el presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar aislamientos promisorios de *Trichoderma* para el biocontrol de *Rhizoctonia* sp., en dependencia de su antagonismo *in vitro* y su respuesta en condiciones semicontroladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de los diferentes modos de acción

Para la evaluación de la competencia por el sustrato, la interacción hifal y la antibiosis, se montó el método de Cultivo Dual (10). Se probaron 13 aislados de *Trichoderma* spp. (tratamientos) frente a la cepa (304 -11) de *Rhizoctonia* sp. del cepario del Laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Las condiciones de conservación de los hongos antes del cultivo dual fueron las siguientes: *Trichoderma* en Agar Malta (AM) Biocen, a una temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas y *Rhizoctonia* en Agar Papa Destrosa (PDA) Biocen,

incubados a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por siete días. El montaje del cultivo dual se realizó en placas Petri de 5cm de diámetro en medio PDA-Biocen, se incluyó un testigo de *Rhizoctonia* sp., todos los tratamientos se incubaron según las condiciones requeridas del fitopatógeno. Se midió el crecimiento lineal de ambos hongos con una regla graduada, hasta que uno de los dos (el antagonista o el patógeno) completara la placa. Se emplearon cinco réplicas en un diseño completamente aleatorizado. La evaluación se realizó dos veces al día; a las 8:00am y a las 4:00pm.

♣ Competencia por el sustrato

Se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del hongo patógeno (PCRI) a las 96 horas, empleando la fórmula de Samaniego citado por Bernal *et al.* (11).

♣ Micoparasitismo

Para evaluar los tipos de micoparasitismo (penetración, vacuolización, lisis y/o enrollamiento), se tomaron 3 muestras de la zona de interacción de ambos hongos por cada réplica (placa) y se colocaron sobre portaobjetos con una gota de lactofenol, la observación se realizó al microscopio óptico con aumento de 400x. Se evaluaron 15 réplicas por tratamiento (aislados de *Trichoderma*). Se tomaron fotos con el empleo de cámara digital (Canon).

♣ Antibiosis

La antibiosis se evaluó por el crecimiento de *Rhizoctonia* en el cultivo dual antes del momento de contacto entre ambos hongos a las 24 h, respecto al testigo *Rhizoctonia*.

Evaluación de la Efectividad Técnica de los aislados de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* en condiciones semicontroladas

El experimento se montó con los cinco mejores aislados del ensayo anterior, en casas de malla del CENSA, en bandejas de acero inoxidable con un área de 0,30 m², contentivas suelo Ferralítico Rojo Típico (FRT) estéril y pH 8,27. Primeramente se aplicó homogéneamente el patógeno (esclerocios y micelio crecidos sobre PDA-Biocen con 10-12 días de edad), a una concentración de $2,8 \times 10^4$ UFC.m⁻² en suspensión en agua destilada estéril; siete días posteriores se realizó la inoculación del antagonista a una concentración de 10^7 conidios.mL⁻¹ en agua destilada estéril, aplicando 250mL por réplica. La siembra del cultivo se realizó 15 días después de la inoculación de *Trichoderma*, utilizando la variedad de arroz Perla, susceptible al agente causal del "Tizón de la Vaina", con una densidad de siembra de 150g.m⁻², según

Instructivo Técnico del Arroz (3). Después de tener las plántulas más de 15 días, se mantuvo la lámina de agua estable hasta el momento de la evaluación.

Se montó un testigo de *Rhizoctonia* sp. y un testigo absoluto sin inocular el patógeno y el antagonista. Se montaron cuatro réplicas por tratamiento en un diseño aleatorio y la evaluación se realizó a los 90 días en la fase de embuchamiento-emergencia de la panícula, evaluando 25 plantas por réplica. En la evaluación se tuvo en cuenta:

- ◆ Manifestación de los síntomas de la enfermedad.
- ◆ Formación de esclerocios en las lesiones.

Con esta información se calculó la efectividad técnica de los aislamientos por la fórmula de Abbot (12).

Análisis estadístico

Los datos en porcentaje fueron transformados mediante $2\arcsin\sqrt{p/100}$, según Lerch (13). Los datos fueron procesados por el paquete estadístico SPSS.11.5, aplicando un análisis de varianza simple, las medias se compararon según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de los diferentes modos de acción

♣ Competencia por el sustrato

Los resultados del PIRC (Tabla 1) a las 96 horas muestran, que todos los aislamientos de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia* sp. presentaron efecto inhibitorio, en este momento el antagonista ha crecido sobre el patógeno y actúa sobre el por antibiosis, micoparasitismo directo o penetración, resultando favorecidos aquellos aislamientos que presentan mayor capacidad para competir por el sustrato (Fig. 1), ya que cubren el espacio vital y utilizan con mayor facilidad los nutrientes disponibles en el medio. El mejor comportamiento lo presenta el aislamiento 52 que difiere significativamente del resto de los aislados, no obstante se asume que los aislados que presentaron más del 50 PICR presentaron una acción promisoriosa frente al patógeno. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Hernández *et al.* (14) al evaluar *R. solani* aislada de Piña en cultivo dual con diferentes aislados de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento radial entre un 40-50%. Reyes *et al.* (15) obtuvieron efectividad antagónica y micoparasítica de *Trichoderma* para el control de *Pyricularia grisea* (Sacc.) y *R. solani* aislados de arroz.

Interacción hifal

Todos los aislamientos de *Trichoderma* evaluados poseen al menos un tipo de interacción hifal. La Tabla 2 muestra estos resultados donde sobresalen los aislamientos 33, 55, 56 y 59 con tres o más tipos de interacción hifal con predominio de la penetración (Fig. 2), el enrollamiento y la vacuolización, destacándose el aislamiento 56 que además presenta lisis celular. Diferentes autores hacen referencia a estos tipos de interacción hifal para *Trichoderma*, considerándolos como una potencialidad para su uso como biocontrol de hongos del suelo. Bernal *et al.* (11) encontraron enrollamiento y penetración de *Trichoderma* en *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans. Harman (8) encontró penetración en hifas de *Pythium* y *Rhizoctonia*. Los cambios estructurales que este antagonista produce al nivel celular se le atribuyen a los metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que ellos producen como hiperparásitos (16).

Antibiosis

En la evaluación de la antibiosis a las 24 horas, cuando aún no hay contacto entre ambos hongos; los aislamientos mostraron efecto inhibitorio del crecimiento del patógeno en cultivo dual. Esto se ve re-

TABLA 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia* sp. en cultivo dual con *Trichoderma* spp./ *Percentage of Rhizoctonia* sp. radial growth inhibition of in dual culture with *Trichoderma* spp.

Aislados de <i>Trichoderma</i>	PICR 96 horas	
	\bar{x} Original (%)	\bar{x} Transf.
30	56,3892	1,6068 bcd
33	51,1596	1,2693 cde
36	43,3626	1,8842 dc
39	57,2427	1,4362 bcd
40	57,0343	1,7322 bcd
50	72,1851	1,615 bc
51	69,6028	1,5738 b
52	83,3099	2,3536 a
55	34,5968	1,7038 e
56	42,3333	2,0078 de
57	61,2282	1,4279 b
59	49,4858	2,01 cde
78	51,4692	1,7359 cde
CV	20,76%	
ES _x	0,04*	

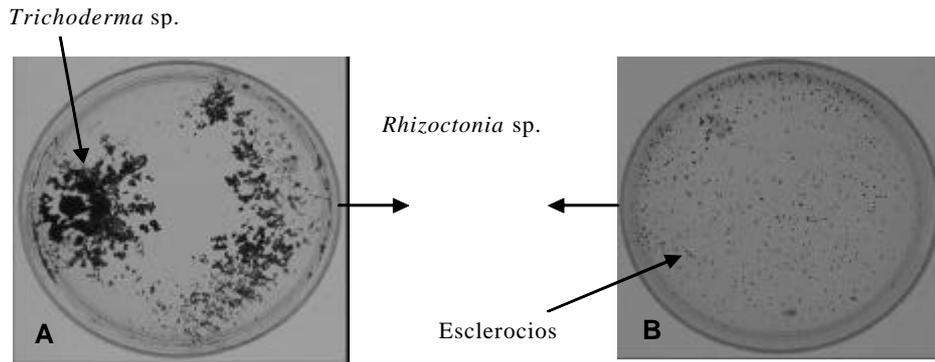


FIGURA 1. Cultivo dual del aislamiento 78 de *Trichoderma* sp. – *Rhizoctonia* sp. (A) Testigo *Rhizoctonia* (B)./ *Dual culture of the 78 isolates of Trichoderma* sp. – *Rhizoctonia* sp. (A) Control *Rhizoctonia* (B).

TABLA 2. Tipos de interacción hifal entre los aislados de *Trichoderma* y *Rhizoctonia* sp./ Types of hyphal interaction between isolates of *Trichoderma* spp. and *Rhizoctonia* sp.

Aislados de <i>Trichoderma</i> .	Tipo de Micoparasitismo
30	L-V
33	E-P-V
36	L-V
39	V-L
40	V-L
50	V
51	V
52	E
55	E-P-V
56	E-V-L-P
57	L-V
59	E-P-L
78	L-V

Leyenda: Lisis (L), Vacuolización (V), Enrollamiento (E), Penetración (P)

presentado en la Figura 3 donde el crecimiento de *Rhizoctonia* en el cultivo dual con *Trichoderma* difieren significativamente respecto al testigo de *Rhizoctonia*, destacándose con mayor efecto inhibitorio el aislamiento 52, sin diferir significativamente de los aislamientos 36, 40, 55, 56, 59 y 78. Por lo que en este caso se infiere que *Trichoderma* ha excretado al medio algún metabolito con acción fungistática sobre el patógeno inhibiendo su crecimiento. El efecto inhibitorio de *Trichoderma* sobre otros hongos antes del contacto hifal se ha explicado con la excreción de metabolitos al medio con efectos fungistáticos, que afectan el crecimiento del patógeno según Martínez (10); además se plantea que el antagonista excreta

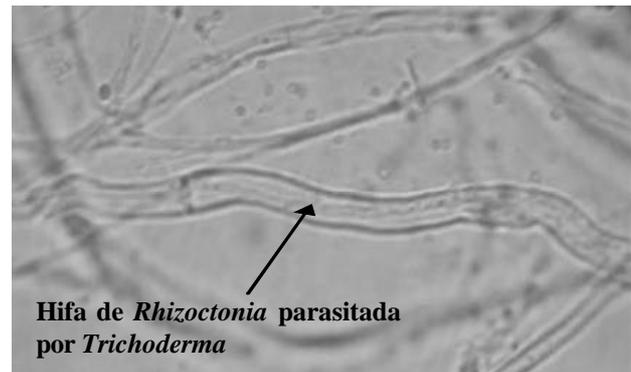


FIGURA 2. Penetración de *Trichoderma* en hifas de *Rhizoctonia* sp./ *Penetration of Trichoderma into Rhizoctonia* sp. hyphae.

antibióticos volátiles con un efecto fungistático, que debilita al patógeno y lo hace más sensible a los metabolitos solubles (16). De igual forma Hjeljord y Tronsmo (17) comparten la opinión que *Trichoderma* produce metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos con los que no hacen contacto físico y consideran a estas sustancias similares a antibióticos. Al integrar los resultados de competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis resultaron como promisorios para condiciones semicontroladas los aislamientos 30, 39, 40, 56 y 78.

Evaluación de la Efectividad Técnica de los aislados de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* en condiciones semicontroladas

En la Tabla 3 se muestra que los aislamientos 78, 56, 39 y 40 no difieren significativamente en cuanto a su efectividad técnica contra el patógeno, siendo esta superior al 80% en los primeros tres aislados mencio-

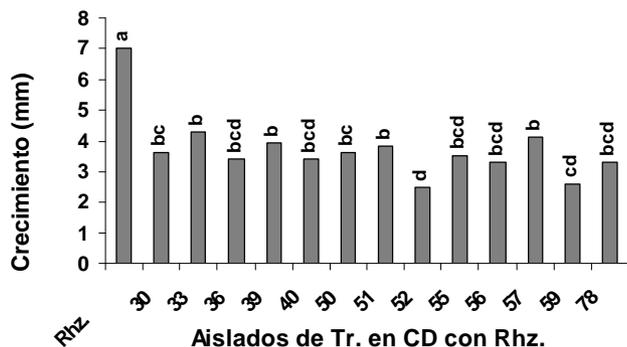


FIGURA 3. Inhibición del crecimiento lineal de *Rhizoctonia* sp. en cultivo dual con *Trichoderma* spp. a las 24 horas./ *Inhibition of the linear growth of Rhizoctonia* sp. in dual culture with *Trichoderma* spp. at 24 hours.

nados. Estos resultados muestran las perspectivas de aplicación de estos aislados, si se tiene en cuenta que fue utilizada una alta presión de inóculo en las bandejas, por lo que es de suponer que una formulación de los mismos mejoraría su actividad en condiciones de campo.

TABLA 3. Efectividad Técnica de aislados de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* sp. en condiciones semicontroladas./ *Technical effectiveness of Trichoderma* isolates on *Rhizoctonia* sp. under semicontrolled conditions

Aislamientos de <i>Trichoderma</i>	Eficacia Técnica	
	\bar{x} Original (%)	\bar{x} Transf.
30	69,0299	1,5384b
39	82,4627	1,9466a
40	79,8507	1,8667ab
56	82,8358	1,9632a
78	87,4378	2,1431a
CV	15,13%	
ES \bar{x}	0,064*	

La potencialidad de *Trichoderma* en condiciones controladas ha sido resaltada por varios autores; García *et al.* (18), evaluaron la efectividad de un biopreparado de *Trichoderma harzianum* Rifai, el cual mostró una alta capacidad antagonica contra *Rhizoctonia solani* en macetas. Por otro lado Martínez y Solano (10), evaluaron dos aislamientos de *Trichoderma* sobre *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout en hojas de tomate y la efectividad del biocontrol estuvo entre 38 y 46%, argumentando que estos resultados son aceptables y se encuentran dentro de los amplios rangos de efectividad determinados para el antagonismo. Beltrán y Garcés (19) detecta-

ron una reducción de los daños por *Rhizoctonia* en papa sembrada en casa de malla tratadas con los aislados de *Trichoderma* Th003 y Th034 y observaron además plantas con mayor vigor, tallos normales con abundante follaje y mejor crecimiento radical de las plantas.

Como resultado de este trabajo, se seleccionaron para futuros ensayos en condiciones de canteros en campo, los aislados que presentaron una efectividad técnica superior al 80%. Resulta alentador contar con tres aislamientos de *Trichoderma* spp. para evaluar en condiciones de campo, ya que existe una mayor probabilidad de disponer de aislamientos efectivos para el manejo biológico de *Rhizoctonia* sp. en arroz y con ello disminuir el uso de fungicida químicos.

REFERENCIAS

1. Cordero V, Rivero L. Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del Arroz en Cuba. ed. IIA: La Habana; 2001.
2. Infoagro. El cultivo del Arroz. 2006 Consultada: 4 Ene 2006. Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm>.
3. Instituto de Investigaciones del Arroz. Instructivo Técnico del Arroz. Ministerio de la Agricultura. Unión. C.A. Cuba; 2005.
4. Glissman SR. Agroecología: Procesos en agricultura sustentable. 2da ed. Da UFRGS: Porto Alegre; 2001.
5. Suquilanda V. Manejo Integrado de Plagas en el cultivo de Arroz. Proyecto Manejo Adecuado de Plaguicidas. 2003. OMS. OPS. Ecuador. Consultada: 29 Abr 2008. Disponible en: <http://www.opsecu.org/bevestre/revistas/Dr.%20Ar%C3%A1uz/MIPARROZ.pdf>
6. Cervantes A. Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos. 2007. Consultada: 16 feb 2007. Disponible en: http://www.infoagro.com/hortalizasmicroorganismos_beneficiosos_cultivos.htm.
7. Fernández-Larrea Orieta. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 2001;62:96-100.
8. Harman EG. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). 2203. Consultada: 2 feb 2003. Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>.

9. Santander C, Montealegre J, Herrera R. Control Biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y Bromuro de Metilo. Ciencia. Investigación. Agricultura. 2003;30(2):107-112.
10. Martínez B, Solano T. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. Protección Vegetal. 1994;10:221-225.
11. Bernal A, Andreu C, Moya M. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans. Cuba. 2004. Consultada: 22 abr 2004. Disponible en: <http://www.virtualcentr.org/es/enlIBTJ%20Tallr/bernalalezander.htm>.
12. Ciba-Geigy. Manual de ensayos de campo. Basilea. Suiza; 1979.
13. Lerch G. La experimentación Agrícola en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. La Habana. ed. Científico-Técnico. La Habana; 1977.
14. Hernández MA, Sierra PA, Carr A. Evaluación *in vitro* del antagonista de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de Piña. (*Ananas comosus* L. Merr). En memorias del Taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana del 28-31 de mayo del 2006.
15. Reyes RT, Rodríguez GG, Pupo ZD, Alarcón PL y Limonta CY. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). En memorias del taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana del 28 - 31 de mayo del 2006.
16. Martínez JT. Uso de *Trichoderma* para el Control Biológico de Organismos Patógenos de Plantas. En Memorias del Simposio sobre Agricultura Orgánica y de baja residualidad. Cuauhtémoc, Chih. México; 2 Julio 1998.
17. Hjeljord L, Troonsmo A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman GE, Kubice KCP. Edición. *Trichoderma & Gliocladium*. Volumen 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd., London, UK; 1998. p.131-151.
18. García R, Ricia R, Zambrano C, Gutiérrez L. Desarrollo de un fungicida biológico con base a una capa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región Andina Venezolana. En memorias del taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana del 28-31 de mayo del 2006.
19. Beltrán C, Garcés de Granada E. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn. en papa bajo condiciones de casa de malla. Acta Biológica Colombiana. 2006;10:1-79.

(Recibido 15-10-2007; Aceptado 4-2-2008)