

EFFECTIVIDAD *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.)

Luciano Alarcón Pérez, Teresa Reyes Rondón, Giselle Rodríguez Gutiérrez y Ana D. Pupo Zayas

Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Calle Genaro Rojas 86 e/ Marcelino Diéguez y Antonio Barrera, Las Tunas, Cuba, CP 75200, c.e.: lapsavlt@enet.cu.

RESUMEN

A partir de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad J-104 con síntomas de *Pyricularia grisea* Cav. y *Rhizoctonia solani* Kühn se realizaron siembras *in vitro* de partes de tallos, hojas y raíces dañadas en agar-agar y agar-peptona-dextrosa por los métodos tradicionales de siembra. Se realizaron las identificaciones y descripciones de los síntomas observados según las claves CMI, 1983, con el objetivo de comprobar la efectividad antagónica e hiperparasítica de *Trichoderma harzianum* contra ambos patógenos presentes en el cultivo. Para los ensayos de biocontrol se realizaron pruebas *in vitro* en cultivo dual de agar-peptona-dextrosa entre los patógenos y dos aislamientos de *T. harzianum*, procedentes del cepario de mantenimiento del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Las Tunas (cepas A-53 y A-34), generalizadas en la producción para el biocontrol de diferentes patógenos del suelo. Diariamente se midió el diámetro de las colonias, así como el nivel de competencia por el sustrato y el hiperparasitismo del patógeno, según el nivel de crecimiento y esporulación sobre las colonias. Se demostró la elevada actividad hiperparasítica y competitiva de las cepas A-34 y A-53 de *T. harzianum*, que exhibieron buenas potencialidades para el control de estos patógenos. Estadísticamente se encontraron diferencias altamente significativas a las 96 h, con un crecimiento promedio lineal en 7,37 cm en la cepa A-53 y 7,10 cm en la cepa A-34. En el caso de los patógenos el crecimiento promedio fue de 3,63 cm en *P. grisea* y 2,62 cm en *R. solani*.

Palabras clave: *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, antagonista, hiperparasitismo, hongos del suelo

ABSTRACT

Starting from plants of rice (*Oryza sativa* L.) variety J-104 with symptoms of *Pyricularia grisea* (Sacc.) and *Rhizoctonia solani* Kühn, seeding were made *in vitro* with affected parts such as stems, leaves and roots. The samples were processed according traditional methods of seeding agar-agar and agar-peptone-dextrose. Observed symptoms were identified and described by CMI keys, 1983, for verifying the antagonistic effectivity and hyperparasitic of *Trichoderma harzianum* against both present pathogens. Were realized bioassays test of dual cultures, agar-peptone-dextrose between the pathogens, and two *T. harzianum* strains (A-34 and A-53) from the maintenance strainer department of biological control in the Provincial Vegetable Health Laboratory of Las Tunas, generalized in mass production against different soil pathogens. Daily were measured the diameter of colonies and the competence level by the substrate and the hyperparasitism of the pathogen, according to the growing level and sporulation over colonies. The obtained results demonstrated high hyperparasitic and competitive activity of the strains A-34 and A-53 of *T. Harzianum*, sampling good powerness for the control of these pathogens. The statistic test paired samples indicated highly significant differences to 96 hours with a lineal rate growing on 7.37 cm in A-34 strain and 7.10 cm in A-53 strain. In the case of pathogens the rate growing was 3.63 cm *P. Grisea* (Sacc.) and 2.62 cm *R. solani* Kühn.

Key words: *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, antagonist, hyperparasitism, soil fungi

INTRODUCCIÓN

El arroz es considerado, junto al trigo y el maíz, el cereal que ocupa la preferencia en el consumo mundial, superado únicamente por el trigo [FAO, 1981]. En los últimos años su cultivo ha mantenido una evolución positiva, con una tendencia ascendente en áreas sembradas y rendimiento. Junto al incremento de las siembras se han presentado problemas fitosanitarios, en que las enfermedades fungosas, insectos, virus y ácaros son los que han hecho peligrar la cosecha. Las plagas del arroz destruyen 35% de la producción mundial, y correspon-

de a los patógenos 12% [Pantoja *et al.*, 1997]. Durante los últimos quince años la producción arrocería en Cuba se ha sustentado en la variedad J-104, que ha ocupado más de 70% del área sembrada durante este período por la alta adaptabilidad y potencial de rendimiento agrícola que presenta [IIA, 2001]. La piriculariosis causada por *Pyricularia grisea* (Sacc.) constituye mundialmente la más difundida y destructiva entre las enfermedades del arroz. Ha sido reportada en más de setenta países altamente productores de este cereal [Cordero y

Rivero, 2001]. El hongo afecta todas las partes aéreas de la planta: la hoja, los nudos del tallo, el cuello de la panícula y la panícula misma. Las temperaturas de 22-29°C y humedad relativa superior a 90% son responsables de pérdidas considerables. Si su ataque ocurre en la fase de plántulas o de macollamiento, estas quedan totalmente destruidas [Correa-Victoria y Guimarães, 1995]. El añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* Kühn es considerado actualmente una de las principales enfermedades del cultivo en las regiones tropicales y subtropicales. Se califica de alto riesgo en varios países de América Latina, y su incidencia ha causado la disminución de los rendimientos hasta 40% en la variedad Orizica 1 en Colombia. Los síntomas se observan inicialmente sobre las vainas y luego en las hojas de la base del tallo. La enfermedad progresa rápidamente desde el inicio, y se extiende desde la vaina hacia la hoja, y en ataques severos destruye el tallo. El patógeno está presente en todas las zonas arroceras, y la disminución del rendimiento, en condiciones de humedad y temperaturas altas, se ha estimado de varias maneras: en la hoja bandera pueden llegar hasta 20%, y cuando todas las vainas y láminas foliares están totalmente infectadas esa pérdida puede alcanzar hasta 40% [Correa-Victoria, 1992].

A partir de 1990 se realizaron diversos estudios de prospección de cepas promisorias, mecanismos de acción, compatibilidad con agroquímicos, parámetros de reproducción y aplicación, que permitieron la incorporación del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* a las medidas para combatir los patógenos fúngicos del suelo en diversos cultivos [Stefanova y Sandoval, 1995; Stefanova, 1997, citados por Stefanova *et al.*, 2004].

Actualmente se emplean formulados a base del hongo antagonista *Trichoderma* sp. para el control biológico de hongos del suelo como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, etc., así como de enfermedades foliares como mildiu y alternaria, que afectan un amplio rango de cultivos. *T. harzianum* se encuentra en el suelo en diversos sistemas de producción de arroz y despliega mayor actividad bajo condiciones de secano. Tiene la habilidad de descomponer los residuos de cosecha y de parasitar a *R. solani*. Poco se sabe sobre su manejo y su eficiencia en el campo [Correa-Victoria y Guimarães, 1995].

Sobre la base de los resultados con el antagonista *Trichoderma* sp. en el control de enfermedades fungosas en otros cultivos, se trazó como objetivo comprobar la efectividad antagónica e hiperparasítica de *T. harzianum* contra los patógenos *P. grisea* y *R. solani* en la variedad de arroz J-104.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) con síntomas de *P. oryzae* y *R. solani* se realizaron siembras de partes del tallo, hojas y raíces afectadas. Las muestras fueron procesadas según los métodos tradicionales de siembra en agar-agar y en agar-papa-dextrosa, y las identificaciones y descripciones de los patógenos se realizaron de acuerdo con las claves correspondientes [CMI, 1983].

Para los ensayos del biocontrol se realizaron pruebas *in vitro* en cultivo dual agar-dextrosa-peptona entre los patógenos *P. grisea* y *R. solani* procedentes de la colección de la sección de Micología del laboratorio y dos aislamientos de *T. harzianum* (cepas A-34 y A-53) de la sección de Lucha Biológica, utilizados como antagonistas de diferentes patógenos del suelo.

Por cada aislamiento se establecieron seis réplicas. La incubación se realizó a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Se midió diariamente el diámetro de las colonias hasta su enfrentamiento y se determinó el nivel de competencia por el sustrato, así como el hiperparasitismo por el antagonista de acuerdo con el nivel de crecimiento y esporulación sobre la colonia.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con seis réplicas y cuatro tratamientos. Los datos fueron procesados mediante el test de student para muestras pareadas mediante el programa Statistica, para el crecimiento de las colonias de los fitopatógenos y la interacción entre el antagonista y estos. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Newman-Keuls del programa [ICA, 1998].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre el comportamiento del crecimiento de las colonias de la cepa A-53 y A-34 de *T. harzianum* y los patógenos *P. grisea* y *R. solani* se produjeron diferencias significativas en el desarrollo del antagonista y los patógenos a las 24, 48, 72 y 96 h. El crecimiento promedio lineal fue de 7,375 cm en la cepa A-53 y 7,125 cm en la cepa A-34, y de 3,633 y 2,620 cm en *P. grisea* y *R. solani* respectivamente (Tabla 1). Estos resultados en la prueba *in vitro* demostraron que *T. harzianum* presentó una elevada actividad antagónica e hiperparasítica contra los patógenos *R. solani* y *P. grisea*, al mostrar una colonización total sobre ambos a las 120 h, y se observó que ambos aislados del antagonista mostraron una actividad parasítica elevada y buenas potencialidades contra los patógenos ensayados.

Tabla 1. Crecimiento lineal promedio de las colonias de las cepas A-53 y A-34 de *T. harzianum* y de los patógenos *R. solani* y *P. grisea*

Variables	Crecimiento lineal (cm)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>T. harzianum</i> (A-53)	1,625 a	2,575 a	4,975 a	7,375 a
<i>T. harzianum</i> (A-34)	0,425 b	2,300 b	4,750 b	7,125 b
<i>R. solani</i>	0,000 c	0,180 c	0,800 c	2,620 c
<i>P. grisea</i>	0,000 c	0,633 d	1,700 d	3,633 d

p < 0,05

Existió una alta significación entre las medias del crecimiento (Fig. 1) y la desviación estándar del antagonista con los patógenos, con valores de *t* alcanzados de 8,15 y 10,44 para la cepa A-53 en ambos patógenos, y la cepa A-34 con valores de *t* de 8,35 y 10,53 (Tabla 2). Se evidenció que la cepa A-34 frente a estos patógenos mostró una capacidad parasítica superior a la cepa A-53. Los

resultados concuerdan con los estudios realizados por Sandoval *et al.* (1993, 1995 y 1997), quienes plantearon que la cepa estándar (A-34) de *T. harzianum* es la más efectiva y de mayor espectro de acción, lo que demostró buenas potencialidades en el control de *R. solani*, así como su efectividad contra el patógeno en su competencia por el sustrato y el hiperparasitismo mostrado.

Tabla 2. Actividad antagonica e hiperparasitica de diferentes aislamientos de *T. harzianum* hacia los patógenos del arroz

Cepas	<i>Trichoderma</i>	<i>R. solani</i>	<i>t</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>P. grisea</i>	<i>t</i>
<i>T. harzianum</i> (A-53)	3,358***	0,542	8,15	3,860***	0,390	10,44
<i>T. harzianum</i> (A-34)	3,267***	0,546	8,35	3,515***	0,245	10,53

p < 0,05

Resultados similares cosechó González (2004) en ensayos *in vitro* con *T. harzianum* (cepa A-34), con el mayor efecto antagonico sobre *R. solani*, así como el más alto hiperparasitismo con la cepa C-66 y *T. viride* en frijol. Srivastava *et al.* (2002) trataron semillas de garbanzo afectadas por *R. solani* con *T. viride* (cepa PDBCTV 23 y 32) o *T. harzianum* (cepa PDBCRH 10). La cepa PDBCTV 32 de *T. viride* resultó ser la de mayor composición proteínica en la raíz (378 µg/mL) y la de más baja incidencia de la enfermedad en el cultivo (10,6%). Varón y Ramírez (2004) recogieron buenos resultados con *T. lignorum* (Tricogen WP) en Colombia contra *R. solani* en la desinfección de semillas de arroz con dosis de 400, 300 y 200 g/kg de semilla, con título de 10¹⁰ esporas/g, con incidencias superiores a 55% en el testigo e inferiores a 13% de infestación en plantación, así como un índice de 0,62 en los tratamientos y de 3,0 en el testigo.

Quarles (1993), Lorito *et al.* (1993), Ghisalberti y Sivasithamparan (1991), Sivan y Chet (1989), citados por Stefanova *et al.* (2004) han informado la eficacia de *T. harzianum* contra los hongos del suelo, y su actividad como antagonista se atribuye al micoparasitismo, producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas.

En el caso de *P. grisea* no se ha tenido conocimiento sobre estudios realizados con este hongo; pero sí se conoció que en trabajos hechos por investigadores del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal acerca de la bioefectividad de *Trichoderma* sobre hongos del orden Deuteromycetes, orden al que pertenece este patógeno con resultados satisfactorios [INISAV, 1992].

El empleo de *T. harzianum* como biocontrol de hongos del suelo ha sido señalado como efectivo en diversos cultivos, incluido el pepino. Los estudios relativos a su uso como biopreparado foliar son relativamente nuevos. En Cuba, Pérez y Echemendía (1994) informaron 20% de disminución del patógeno con la aplicación de *T. harzianum* en plantas de cebolla, en condiciones de campo, bajo infección natural de *Alternaria porri*.

Rodríguez *et al.* (1998) mostraron igualmente el efecto foliar de *T. harzianum* contra mildiu velludo y mildiu polvoriento en pepino, con reducciones de la incidencia en 35 y 23,2% respectivamente, y estimulación del desarrollo de las plantas, incrementos en la longitud del tallo y frutos, así como el peso de los frutos.

El crecimiento del antagonista *Trichoderma* (cepas A-53 y A-34) frente a los patógenos *R. solani* y *P. oryzae*

ocurrió a las 24 h después de sembrado. El patógeno *R. solani* comenzó su crecimiento a las 48 h y *P. oryzae* a las 72 h. Esto demostró la capacidad de *Trichoderma* para establecerse y competir, con la obtención de diferencias

altamente significativas en el crecimiento de las colonias de las cepas A-53 y A-34. Los patógenos presentaron diferencias altamente significativas en el crecimiento negativo de sus colonias.

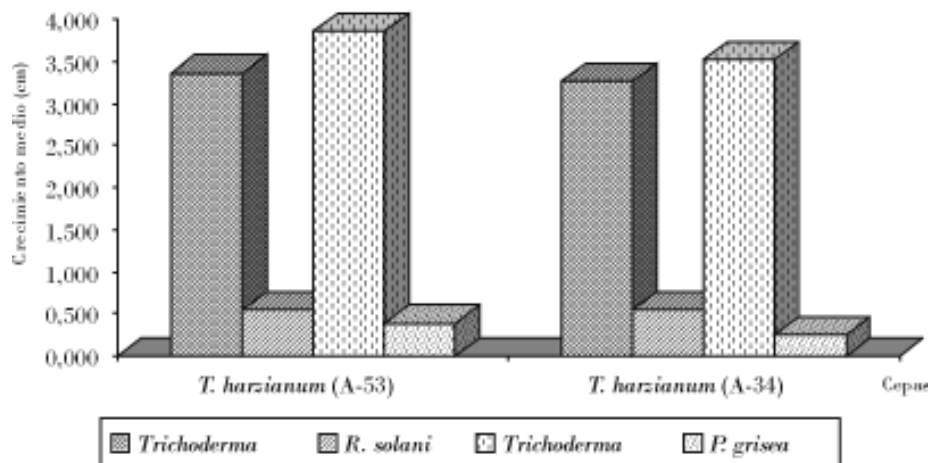


Figura 1. Efecto antagónico de las cepas A-53 y A-34 de *T. harzianum* contra *R. solani* y *P. grisea* en arroz, variedad J-104.

CONCLUSIONES

- Trichoderma harzianum* mostró ser un buen hiperparásito y antagonista de los hongos *Pyricularia grisea* (Sacc.) y *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*.
- La cepa A-34 (*T. harzianum*) fue la más efectiva y de mayor espectro de acción sobre los aislados de *P. grisea* (Sacc.) y *R. solani* Kühn.

REFERENCIAS

- Borda, F.; G. Arbeláez: «Determinación del antagonismo del aislamiento T-95 de *T. harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en plantas de pepino Cohombro», *Agronomía Colombiana*, 10(1):45-51, 1993.
- CMI: *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra, 1983.
- Cordero, V.; L. Rivero: «Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del arroz en Cuba», IIA, MINAGRI, octubre 2001.
- Correa-Victoria, F. J.; E. P. Guimarães: «Utilización del concepto de linaje genético de *Pyricularia grisea* en un programa de selección recurrente». I Taller Internacional de Selección Recurrente en Arroz, Goiania, Brasil, marzo de 1995, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 1995.
- González, Mercedes: «Utilización de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y del suelo en el cultivo del frijol. Resumen de tesis», *Fitosanidad*, 8(2):61, 2004.
- ICA. Analest (V2.0): *Programa sistema automatizado de análisis estadístico*, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, 1998.
- IIA: «Calidad del grano», Instituto de Investigaciones del Arroz, Boletín no. 1, MINAGRI, La Habana, octubre del 2001.
- INISAV: «Información preliminar sobre los estudios de *Trichoderma* sp. como biocontrol de patógenos en cultivos de importancia económica», División Microbiología, INISAV, La Habana, 1992 (inédito).
- Pantoja, A.; A. Ramírez; L. R. Sanint: «Producción de arroz en América Latina: Área sembrada y costos», capítulo 1, *MIP en arroz. Manejo Integrado de plagas (artrópodos, enfermedades y malezas)*, Publicación CIAT no. 292, septiembre de 1997.
- Pérez, N.; M. Echemendía: «Efectividad de *Trichoderma* spp. en el control de la mancha púrpura en cebolla». Resúmenes IX Forum de Ciencia y Técnica / II Encuentro Nacional de Bioplaguicidas, II EXPOCREE, CID-INISAV, 25-27 de octubre, La Habana, 1994.
- Rodríguez, F.; Marusia Stefanova; U. Gómez: «Efecto del biopreparado de *Trichoderma harzianum* (Rifai) contra *Pseudoperonospora cubensis* (Bert Curt) Rostov y *Erisiphe cichoracearum* D. C. en pepino (*Cucumis sativus* L.)», *Fitosanidad*, 2 (1-2):41-43, 1998.
- Sandoval, Ileana; M. Neyra; D. García; M. O. López; I. Mendoza: *Trichoderma*: biocontrol de hongos fitopatógenos en el cultivo del tomate en hidropónico». Resúmenes VI Simposio de Botánica, La Habana, junio de 1993.
- Sandoval, Ileana; M. O. López; D. García; I. Mendoza: *Trichoderma harzianum* (A-34): un biopreparado de hongos para micopatologías del tomate y del pimiento. CID-INISAV», *Boletín Técnico*, 1995.
- Sandoval, Ileana; M. Stefanova; M. O. López; D. García; B. Bernal; M. Neyra; F. Rodríguez: «Una alternativa ecológica y efectiva para el biocontrol de enfermedades fúngicas con la utilización de *Trichoderma harzianum* (A-34)». Resúmenes II Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, 23-27 de junio, La Habana, 1997.
- Srivastava, R. K.; R. D. Prasad; R. Rangeshwaran; P. Kannan: «Detection and Quantification of Proteins Induced by *Trichoderma* in Chickpea-Rhizoctonia System», *Plant Disease Research*, 17(2): 252-255, 2002.
- Stefanova, Marusia; Ileana Sandoval; María L. Martínez; Irma Heredia; María D. Ariosa; Raquel Arévalo: «Control de hongos fitopatógenos del suelo en semilleros de tabaco con *Trichoderma harzianum*», *Fitosanidad*, 8(2):35-38, 2004.
- Varón, R. U.; S. I. Ramírez: «Evaluación del antagonista *Trichoderma lignorum* al tratar la semilla de arroz (*Oryza sativa* L.) contra el hongo *Rhizoctonia solani*, agente causal del añublo de la vaina», Memorias V Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, 24-28 de mayo, La Habana, 2004.