

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL ANTAGONISMO DE ESPECIES DE *TRICHODERMA* SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN LAS VITROPLANTAS DE PIÑA (*ANANAS COMOSUS* (L.) MERR.)

Alexis A. Hernández Mansilla,¹ Aliuska Sierra Peña² y Aidanet Carr Pérez³

¹ Centro Meteorológico Provincial. Marcial Gómez 401 esq. Estrada, Ciego de Ávila, Cuba, ahmansilla@yahoo.es; agro@meteoro.fica.inf.cu

² Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón, Km 9½, Ciego de Ávila, Cuba

³ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11 600, acarr@inisav.cu

RESUMEN

Se evaluó la actividad antagonista de las especies *T. viride*, *T. atroviride*, *T. aureoviride* y *T. harzianum* (cepas A-34 y A-53) del género *Trichoderma* sobre *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium subglutinans*, fitopatógenos de vitroplantas de piña en la fase de aclimatación. El experimento se efectuó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), para lo cual se emplearon aislamientos de los antagonistas y fitopatógenos procedentes del laboratorio de Fitopatología de la UNICA, a excepción de *T. harzianum*, que procedía de la micoteca del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Se realizó un crecimiento dual y se determinó el porcentaje de inhibición mediante la medición del diámetro de las colonias. Sus valores se procesaron mediante análisis de varianza. Los porcentajes de inhibición resultantes fueron de 50% en *P. nicotianae*, por efecto de *T. viride* con diferencias significativas de las demás especies antagonistas, excepto al compararlas con *T. atroviride* y *T. aureoviride*, que causaron una inhibición de 41% sin diferencias entre ellas. *R. solani*, con 53 y 58% ante *T. harzianum* (A-34) y (A-53) respectivamente, que se señalan como las más eficientes sobre este fitopatógeno, y *F. subglutinans* con un porcentaje de inhibición de 48% ante *T. atroviride* y *T. harzianum* (A-53), sin diferencias significativas entre ellas y sí ante las restantes.

Palabras clave: *Trichoderma*, hongos fitopatógenos, piña, hongos antagonistas

ABSTRACT

The antagonistic activity of species *T. viride*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. harzianum* (strains A-34 and A-53) from genus *Trichoderma*, was evaluated on *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium subglutinans*, which are phytopathogens of pineapple vitroplants in the acclimatization phase. The experiment was developed at Genetics Improvement Laboratory of Bioplasmas Center in Ciego de Ávila University (UNICA). In this way phytopathogenic and antagonistic isolations from phytopathology laboratory of UNICA were used, except *T. harzianum* which was brought from the micoteca of Plant Health Research Institute. A dual growth was performed and the inhibition percentage was determined by measuring colonies diameter, the values were processed by variance analysis. The inhibition percentages were 50% in *P. nicotianae*, by effect of *T. viride* with significant differences of the rest antagonistic species, except when comparing with *T. atroviride* and *T. aureoviride*, which caused an inhibition of 41% without differences between them. *R. solani* with 53 and 58% on *T. harzianum* (A-34) and (A-53) respectively, which were the most efficient on this phytopathogenic and *F. subglutinans* with an inhibition percentage of 48% on *T. atroviride* and *T. harzianum* (A-53) with no significant differences between them but with the rest of the species study analyzed.

Key words: *Trichoderma*, phytopathogen fungi, pineapple, antagonistic fungi

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es un preciado fruto de un alto valor nutricional y agradable sabor, con amplias posibilidades para la industrialización. La región de Ciego de Ávila constituye en Cuba la más importante en la producción de esta fruta. Actualmente en la provincia se emplean como forma rápida de propagación las vitroplantas, las cuales resultan fuer-

temente afectadas por hongos fitopatógenos durante el proceso de aclimatación.

Estos sistemas presentan altos niveles de mortalidad a causa de afectaciones producidas por *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium subglutinans* (Wollenweb & Reinking) Nelson, Toussonn & Marasas [Hernández *et al.*, 2002], situa-

ción que constituye una problemática que implica la búsqueda de nuevas alternativas de control, dentro de las cuales el biológico constituye un método eficaz y sostenible.

Entre los microorganismos utilizados para el biocontrol de hongos fitopatógenos de suelos se recomiendan varias especies de *Trichoderma*, las cuales ocupan, actualmente, un lugar importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades, principalmente para combatir los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*, entre otros [Stefanova *et al.*, 1999]. El objetivo fundamental de este trabajo consistió en conocer la magnitud del efecto antagónico de *Trichoderma viride*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma aeuroviride* y *Trichoderma harzianum* (cepas A-34 y A-53) sobre *P. nicotianae*, *R. solani* y *F. subglutinans*, agentes causales de enfermedades de vitroplantas en fase de aclimatización, para establecer estrategias de control más eficientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se ejecutó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplasmas, perteneciente a la Universidad de Ciego de Ávila, durante el período de septiembre a diciembre del 2003.

La evaluación del antagonismo se realizó mediante una prueba de crecimiento dual [Sandoval y López, 2000], en la que se emplearon aislamientos de *Trichoderma viride* Pers.:Fr, *Trichoderma atroviride* Bissett y *Trichoderma aeuroviride* Rifai, procedentes de la Universidad de Ciego de Ávila y obtenidos de muestras de suelo ferralítico rojo dedicados al cultivo de la piña en la Empresa de Piña de Ciego de Ávila, y *T. harzianum* cepas A-34 y A-53 de la micoteca del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), para su enfrentamiento con los fitopatógenos de vitroplantas de piña *P. nicotianae* (P1), *R. solani* (R1) y *F. subglutinans* (F1) procedentes del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila.

Se realizaron siembras de todos los aislamientos de antagonista y fitopatógenos por dispersión sobre agar-papa-dextrosa, los que se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un régimen de luz/oscuridad de 8-16 h con el fin de obtener discos de crecimiento de colonias y así disponer de material suficiente para realizar los enfrentamientos.

Posteriormente se sembró un disco de crecimiento del antagonista en el centro de la placa y tres discos de

cada fitopatógeno próximos a los bordes de la placa y equidistantes al antagonista. De esta forma se establecieron tres réplicas por cada caso, con su correspondiente testigo, donde solamente se sembró el patógeno. Después se incubaron a temperatura de 27°C durante siete días. Las evaluaciones se realizaron mediante mediciones diarias del tamaño de las colonias con el empleo de una regla graduada hasta concluir cuando el testigo llegó a cubrir el total de la superficie del medio. Los valores del tamaño de las colonias se procesaron mediante análisis de varianza simple con su correspondiente prueba de significación, según test de Duncan [Lerch, 1977]. En su realización se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 8.0, sobre Windows. Se determinó además el porcentaje de inhibición mediante la fórmula de Bayer (1966) para conocer el efecto individual de cada una de las especies de *Trichoderma*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas *in vitro* desarrolladas con *T. viride*, *T. atroviride*, *T. aureoviride* y *T. harzianum* (A-34) y (A-53) enfrentadas con *P. nicotianae*, *R. solani* y *F. subglutinans* muestran la eficiente capacidad antagónica que ejercen estas tres especies sobre estos fitopatógenos, y su potencialidad como bioplaguicidas para proteger los sistemas de aclimatización de las vitroplantas de piña. Estos microorganismos son capaces de generar un elevado nivel de competitividad por el sustrato, pues ejercen un hiperparasitismo parcial y total sobre las colonias de los fitopatógenos, aspecto que se manifestó al realizar los ensayos y evaluarlos al término de 72 y 96 h después de sembrados. Los antagonistas se caracterizaron por mostrar un rápido crecimiento y un alto nivel de esporulación, así como en la totalidad de las placas, pasadas las 96 h, las especies de *Trichoderma* cubrían las colonias de los fitopatógenos.

La capacidad antagonista de las especies de *Trichoderma* está reconocida. Son buenos competidores por el sustrato y poseen una actividad metabólica muy particular que los capacita como eficientes hiperparásitos de las estructuras fúngicas de los hongos [Ghisalverti y Sivasithamparam, 1991; Huang *et al.*, 1995].

El resultado de los análisis estadísticos del crecimiento de los fitopatógenos demuestra el nivel de antago-

nismo que poseen las especies de *Trichoderma* sobre cada uno de ellos (Tabla). Este análisis destaca la fuerte inhibición que ejercieron *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aureoviride* sobre *P. nicotianae*, las que se diferencian significativamente de *T. harzianum* (A-34) y (A-53), lo que revela que las especies procedentes de los suelos de piña resultaron ser superiores a las cepas probadas

de *T. harzianum*, por lo que adquieren mayor perspectiva para usarse en el control de este fitopatógeno en los sistemas de aclimatización. Al respecto existen resultados que señalan a *T. harzianum* y *T. viride* por ejercer una acción hiperparásita muy similar sobre *P. nicotianae*, y las caracterizan por presentar una fuerte adherencia sobre las hifas del patógeno [Sandoval y López, 2000].

Comportamiento del crecimiento dual de las especies de *Trichoderma* y hongos fitopatógenos

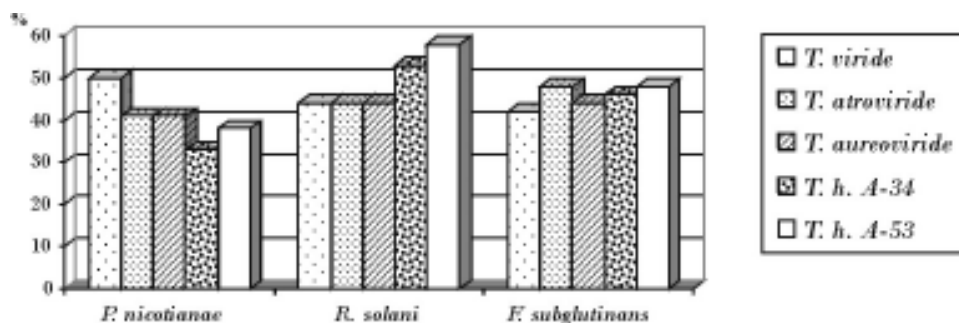
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>P. nicotianae</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. subglutinans</i>
<i>T. viride</i>	1,83 a	2,53 de	2,63 e
<i>T. atroviride</i>	2,13 abcd	2,53 de	2,33 cde
<i>T. aureoviride</i>	2,1 abc	2,53 de	2,53 de
<i>T. A-34</i>	2,4 cde	1,86 a	2,43 cde
<i>T. A-53</i>	2,26 bcde	1,93 ab	2,3 bcde
E.S.	0,12		

Letras desiguales difieren significativamente para $p \leq 0,05$.

El comportamiento de las especies de *Trichoderma* sobre *R. solani* difiere completamente al que manifestaron ante el anterior fitopatógeno. En este caso se observó una fuerte inhibición por parte de *T. harzianum* (A-34) y (A-53), que acompañó una drástica inhibición del crecimiento de *R. solani*, el cual alcanzó un diámetro significativamente diferente del alcanzado frente a *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aureoviride*. Esto señala a las cepas de *T. harzianum* como las más ventajosas en casos donde predomine la incidencia de *R. solani*. También se pudo determinar que la relación *T. harzianum* cepa A-34-*R. solani* es similar a *T. viride*-*P. nicotianae*, e incluso presentan un mismo nivel de significación (Tabla). Los resultados anteriores corroboran lo obtenido en varios trabajos realizados en Cuba por Sandoval y López (2000), los cuales avalan la eficiencia de *T. harzianum* sobre este mismo hongo en pruebas de antagonismo *in vitro*, y que también refieren el alto nivel de efectividad de esta especie sobre *Macrophomina phaseolina* en la protección de plantas de frijol. Otros informes también reflejan el exitoso biocontrol de patógenos de suelo que afectan plantas de tomate y pimiento, una vez aplicada esta especie al terreno o las semillas [Sandoval y López, 1995]. Al respec-

to se particulariza que especies como *T. viride* y *T. konin-gii* son fuertes inhibidores de *R. solani*, producto de la liberación de metabolitos volátiles [Dennis y Webster, 1971, citado por Bonilla, 1990], por lo que se demuestra que estas especies constituyen antagonistas competentes en la rizosfera [Sandoval y López, 2000].

En cuanto a la relación *Trichoderma*-*F. subglutinans* se puede inferir que los niveles de antagonismo y competencia por parte de las especies de *Trichoderma* son, de forma general, inferiores a la inhibición que alcanzaron los otros fitopatógenos a prueba; sin embargo, *T. atroviride* y *T. harzianum* (A-53), en particular, se distinguieron significativamente de los restantes antagonistas (Tabla). Este resultado indica que estas especies son las más promisorias para casos donde predomine *F. subglutinans*. No obstante, está demostrado el efecto inhibitorio que ejercen las especies de *Trichoderma* a causa de la eficiencia de dos metabolitos líquidos que actúan sobre este fitopatógeno [Claydon *et al.*, 1987]. Otras pruebas *in vitro* con diferentes especies de *Trichoderma* señalan la capacidad de hiperparasitismo que muestran *T. viride* y *T. harzianum* sobre *F. subglutinans* [Bonilla, 1990].



Comportamiento *in vitro* de la actividad inhibitoria de especies de *Trichoderma* sobre fitopatógenos que afectan el sistema de aclimatización de vitroplantas de piña.

El análisis del porcentaje de inhibición de cada fitopatógeno se muestra en la Fig. Estos resultados corroboran el comportamiento descrito anteriormente. La acción de *T. viride* ocasionó inhibiciones de 50% sobre *P. nicotianae*, mientras que *T. atroviride* y *T. aureoviride* lo hicieron en 41%. En el caso de *R. solani*, las mayores inhibiciones correspondieron a *T. harzianum* (A-34) y (A-53), que ejercieron 53 y 58%, respectivamente, a diferencia de *Fusarium subglutinans*, donde los porcentajes más altos fueron a causa de *T. atroviride* y *T. harzianum* (A-53) con 48% para ambos antagonistas.

Respecto a la actividad inhibitoria de especies de *Trichoderma*, existen trabajos con aislados de *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* sobre *F. subglutinans* que señalan un rango de efectividad desde 10 a 85%, donde *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii* particularmente alcanzan de 48 a 85%, y *T. viride* entre 10 y 48%, además de especificar que aislamientos de *T. harzianum* alcanzaron valores hasta de 84% [Bonilla, 1990].

Todos estos resultados dan la posibilidad de establecer una estrategia de biocontrol de uso diferenciado de las especies de *Trichoderma* para proteger los sistemas de aclimatización de vitroplantas de piña de los principales integrantes del patosistema de la piña en Cuba, por lo que preferentemente deben emplearse *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aureoviride* como antagonistas más eficientes de *P. nicotianae*, a *T. harzianum* cepas A-34 y A-53 para contrarrestar el desarrollo de *R. solani* y *T. atroviride*, y *T. harzianum* (A-53) como inhibidores más fuertes de *F. subglutinans*.

CONCLUSIONES

- Los aislamientos de *T. viride* con 50%, *T. atroviride* y *T. aureoviride* con 41%, respectivamente, ejercieron una fuerte inhibición sobre *P. nicotianae*, a diferencia de *T. harzianum*, cuyo mayor efecto resultó sobre

R. solani con 53 y 50% de inhibición, y *T. atroviride* y *T. harzianum* (A-53) con 48% ante *F. subglutinans*.

- Las diferencias encontradas en cuanto a la acción antagonista que ejercen *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aureoviride* sobre los fitopatógenos de piña brindan la oportunidad de establecer una estrategia de control diferenciada para cada uno de ellos, según su nivel de incidencia.

REFERENCIAS

- Bayer, A. G.: «Las bases para ensayos fitosanitarios», Bayer, AG, 16 (3), Alemania, 1966.
- Bonilla, M.: «Utilización de especies de *Trichoderma* no controles biológico de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *Subglutinans* Wr. & Rg. En Abacaxi E *Ananas comusus* (L.) Merrill. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. Curso de Pos-Graduação. Em Agronomia: Cruz Daz Almas Brasil;1990.
- Claydon, N.; M. Allan; J. R. Hanson: «Antifungal Alkyl Pyrones of *Trichoderma harzianum*», *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88:503-513, 1987.
- Ghisalverti, E. L.; K.Sivasithamparam: «Antifungal Antibiotics Produced by *Trichoderma* spp. Soil», *Biol. Biochem* (23):1010-1020, 1991.
- Hernández, A.; C. Roson; A. Sierra; O. Concepción; D. Escalante; N. Pérez: «Incidence, Estimate of Losses and Management in the Control of Fungi Pathogens in Systems of Propagation of Pineapple Crops *in vitro* (*Ananas escamosus* (L.))», Fourth International Pineapple Symposium. Veracruz City, México, April 16-19, 2002.
- Huang, Q.; Y. Tezuka; T. Kikuchi; A. Nishi; K. Tubaki; K. Tanaka: «Studies on Metabolites of Mycoparasitic fungi», *Metabolites of Trichoderma Koningii* (43):223-229, 1995.
- Lerch, G.: *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*, Ed. Científico-Técnica, La Habana, 1977.
- Sandoval, I.; M. O. López: «*Trichoderma harzianum* (cepa A-34): biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento», *Boletín Técnico* 4, CID-INISAV, La Habana, 1995.
- : «Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol», *Fitosanidad* 4(3-4):69-72, 2000.
- Stefanova, M.; A. Leiva; L. Larrinaga; M. F. Coronado: «Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo», *Rev. Fac. Agronomía (LUZ)*, (16):509-516, 1999.