

ARTÍCULO ORIGINAL

Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth

Benedicto Martínez^I, Yalainne Obret^I, Simón Pérez^{II}, Yusimy Reyes^{III}

^IGrupo Fitopatología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32700. Cuba. E-mail de contacto: bmcoca@censa.edu.cu. ^{II}IDEA, Caracas, Venezuela.

^{III}Universidad Agraria de La Habana (UNAH), San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Se evaluaron 27 aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a dos de *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth (*S. o-2* y *S. o-4*) utilizando la técnica de cultivo dual, comparando el crecimiento de las colonias de *Sarocladium* para determinar los modos de acción, en diferentes fases de la interacción. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba T- Student. El 81,48% de los aislamientos de *Trichoderma* presentó competencia por el sustrato, el 25,93% antibiosis y el 11,11% micoparasitismo, frente a los aislados *S. o-2* y *S. o-4*. Para el aislado *S. o-4* hubo dos aislamientos de *Trichoderma* T4 y T5 con los tres tipos de antagonismo, mientras que estos mismos aislamientos presentaron competencia por el sustrato para *S. o-2*, evidencia de variabilidad en la sensibilidad de los aislados del fitopatógeno frente al antagonista. Entre los aislamientos de *Trichoderma* más promisorios se encuentran: el T.29 con un marcado efecto antibiótico y el T.6 con más de dos tipos de antagonismo, para ambos aislados del fitopatógeno.

Palabras clave: competencia por el sustrato, micoparasitismo, cultivo dual.

***In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. strains against *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth**

ABSTRACT: Twenty seven isolates of *Trichoderma* spp. were evaluated against two of *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth (*S. o-2* y *S. o-4*) in dual culture. The action modes in the different interaction phases was determined by comparing the growth of *Sarocladium* colonies. The data were analyzed using Student's t test. With isolates *S. o-2* and *S. o-4*, competition by the substrate was shown by 81,48% of the *Trichoderma* isolates, 25,93% antibiosis and 11,11% mycoparasitism. Two *Trichoderma* isolates (T.4 and T.5) against the isolate *S. o-4* showed the three antagonism types, whereas against *S. o-2*, they showed only competition for the substrate. This is an evidence of sensitivity variability of the phytopathogen isolates against the antagonist. Among the *Trichoderma* isolates, T.29, with a marked antibiotic effect, and T.6, with more than two antagonism types, were the most promising against both pathogen isolates.

Key words: subtract competence, mycoparasitism, dual culture.

INTRODUCCIÓN

El arroz es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial. En Cuba, se estima que el consumo sobrepase las 500 mil toneladas al año; sin embargo, la producción nacional no satisface aún esa demanda. Entre las causas de este déficit, se encuentran los daños ocasionados por enfermedades que afectan al cultivo, como la Piriculariosis causada por

Pyricularia grisea Sacc.; el Tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn) y la Pudrición de la vaina y vaneado [*Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth], entre otras (1). Esta última adquirió mayor importancia por las pérdidas que ocasionó en asociación con el ácaro del vaneado *Steneotarsonemus pinki* Smiley, resultando en la necesidad de intensificar la búsqueda de medidas para su control.

En la actualidad la agricultura latinoamericana, y la cubana en particular, están envueltas en un proceso de transformación, donde los principios de autosustentabilidad encuentran un espacio importante. El peligro de los efectos contaminantes al ambiente y la salud humana, promueven el aumento del uso de bioplaguicidas y la reducción del empleo de productos agroquímicos como fertilizantes y plaguicidas. Es por ello que, la producción y aplicación de medios biológicos para el control de plagas, resulta decisivo, porque disminuyen los riesgos de desarrollo de resistencia por parte de los patógenos y de la existencia de residuos de fungicidas en los alimentos y las aguas (2, 3).

En este contexto, por esto, la prospección y selección de agentes de control biológico es una tarea necesaria como alternativa menos agresiva para el ecosistema y el hombre. *Trichoderma* es uno de los agentes fúngicos que presenta efectos antagónicos frente a otros microorganismos (4) siendo las especies de este género los antagonistas más utilizados para el control de agentes causantes de enfermedades fungosas en las plantas. Conocer los modos de acción de sus especies /aislados, resulta imprescindible para garantizar una buena selección de agentes de control biológico promisorios (5) y la eficacia en campo de las cepas seleccionadas.

El objetivo del trabajo fue determinar los modos de acción de aislamientos de *Trichoderma* frente a *S. oryzae* en ensayos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se emplearon dos aislamientos de *S. oryzae* con características culturales diferentes (Fig. 1) procedentes de tejidos infectados: *S. o-2* (vaina) y *S. o-4* (granos de arroz), ambos originarios de la variedad INCA LP-4, localidad Los Palacios (Pinar del Río, Cuba) y 27 aislamientos de *Trichoderma* spp., conservados a 4°C en el cepario del Laboratorio de Micología Vegetal del CENSA, en medio Czapek y Agar Malta (AM), respectivamente.

Los aislados de *S. oryzae* y de *Trichoderma* se multiplicaron mediante la siembra de un disco (5 mm de Ø) centralmente en placas de 90 mm en medio Czapek y AM, incubados en oscuridad a 25°C por 240 h y a 28°C por 96 h, respectivamente.

Enfrentamiento en cultivo dual

La eficacia de los aislamientos de *Trichoderma* se determinó por el tipo de antagonismo en los cultivos duales (CD) con *S. oryzae*. Los dos hongos



FIGURA 1. Diferencias culturales en las colonias de *S. oryzae* (*S. o-2* izquierda y *S. o-4* derecha) a los siete días de cultivo. / Cultural differences between *S. oryzae* colonies (Left : *S. o-2*, right: *S. o-4*) after seven days of growth.

(*Trichoderma* y *Sarocladium*) se sembraron en placas (Ø = 90mm) con medio Czapek, a una separación del borde de las mismas de 5 mm. Las placas se incubaron a 26°C ± 1°C y oscuridad. Se evaluó el crecimiento radial de *S. oryzae* hasta 144 horas, en dependencia del momento del contacto con el antagonista.

Se hicieron tres réplicas (placas) por aislamiento de *Trichoderma*. Como control de comparación se sembró el fitopatógeno de igual forma que en el cultivo dual, sin el antagonista.

Procesamiento de los datos

Los datos tomados en diferentes momentos evaluativos se analizaron mediante la Prueba de T-Student del programa SPSS versión 10.

La competencia por el sustrato se determinó al comparar el crecimiento de los aislados de *Sarocladium* en cultivo dual con el de los testigos (sin *Trichoderma*) en la última evaluación de cada interacción.

La antibiosis se estableció al comparar el crecimiento del fitopatógeno en la última evaluación antes del contacto hifal (*Sarocladium-Trichoderma*) con el del testigo (fitopatógeno sin *Trichoderma*) para igual período de tiempo.

El micoparasitismo se analizó al comparar el crecimiento de los aislados de *Sarocladium* en el cultivo dual en el momento del contacto entre los dos hongos (patógeno-antagonista) y el del propio patógeno en la última evaluación post contacto. Cuando el diámetro de la colonia de *Sarocladium* fue igual o menor en la última evaluación, respecto al del inicio del contacto hifal entre *Trichoderma* y *Sarocladium*, se consideró que hubo parasitismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 85,18% de los aislamientos de *Trichoderma* tuvo al menos un tipo de antagonismo frente a los aislados de *S. oryzae* (Tabla 1), mientras que dos tipos muestra-

TABLA 1. Tipos de antagonismo (expresados en %) detectados en los aislamientos de *Trichoderma* frente a *Sarocladium* (*S. o-2* y *S. o-4*)./ *Antogonism types (expressed in %) in Trichoderma isolates against Sarocladium (S. o-2 y S. o-4).*

Tipo de antagonismo	Aislamientos		
	<i>S. o-2</i>	<i>S. o-4</i>	Total
Competencia por el sustrato	77,78	37,04	81,48
Micoparasitismo	0	11,11	11,11
Antibiosis	3,70	25,93	25,93
Antagonismo general	77,78	55,56	85,18

ron, solo el 14,81 y 22,22 % del total, ante *S.o-2* y *So-4*, respectivamente; y el 7,41 % de los aislamientos de *Trichoderma* exhibieron tres tipos de antagonismo, pero solamente para *S.o-4*. Sin embargo, el mayor porcentaje de aislamientos de *Trichoderma* con competencia por el sustrato se obtuvo frente a *S. o-2*, dado posiblemente, por tener más baja velocidad de crecimiento (Fig. 1). Esto evidencia que estos aislados de *S.oryzae* no solo difieren en cuanto a características culturales, sino también en su reacción frente al antagonista.

El crecimiento de los aislamientos de *Sarocladium* fue inhibido antes del contacto entre los dos hongos, al compararse con el de los correspondientes controles. En el aislado *S. o-2* se produjo inhibición del mismo, cuando se enfrentó al aislamiento T. 29 de *Trichoderma* y en el *S. o-4* ante los aislamientos T. 4, T. 5, T. 14, T. 15, T. 20, T. 24 y T. 29, lo que evidenció que *Trichoderma* excretó compuestos al medio, que limitaron el crecimiento de los aislados del patógeno.

En este tipo de antagonismo, reconocido como antibiosis, se sugiere un modo de acción que pudiera estar asociado a una exoquitinasa extracelular, que provoca la liberación de algunos oligómeros de la pared del hongo diana, induciendo la expresión de endoquitinasas del micoparásito (6). Al ser liberadas estas, difunden y hacen que *Trichoderma* comience el ataque al hongo diana antes del contacto físico entre ellos (7). Aún, cuando hubo un 25,93 % de inhibición del crecimiento en ambos aislados de *Sarocladium* antes del contacto (Tabla 1), el reducido número de aislamientos que presentaron este mecanismo sugirió que resulta necesario continuar la búsqueda de nuevos aislamientos para el control de *Sarocladium*. Por otro lado, reafirmó las diferencias entre los dos aislados de *Sarocladium* al presentar variaciones en la sensibilidad frente a los aislados de *Trichoderma*.

Al considerar el crecimiento en la última evaluación (después del contacto hifal) de los dos aislados (*S.o-2* y *S.o-4*) y compararlo con el de los correspondientes controles, se observó inhibición del crecimiento de *S.o-2* por 21 aislamientos de *Trichoderma* y del de *S.o-4* por 10 (Tabla 2). Esto evidencia una acción de competencia por el sustrato y al parecer micoparasítica (Fig. 2 y 2.1). Sin embargo, cuando se comparó el crecimiento de los aislados de *S. oryzae* en el momento del contacto hifal, con el control de los mismos en la última evaluación, solo tres aislamientos de *Trichoderma* para *S.o-2* y seis para *S.o-4* lograron disminuir el crecimiento del patógeno (Fig. 3).

Aunque el análisis estadístico demostró que solo tres aislados de *Trichoderma* de manera general presentaron diferencias significativas, desde el punto de vista biológico, se observó dicho efecto en otros (Tabla 3). Esto permitió inferir la existencia de un efecto micoparasítico. Particular interés presenta el aislamiento

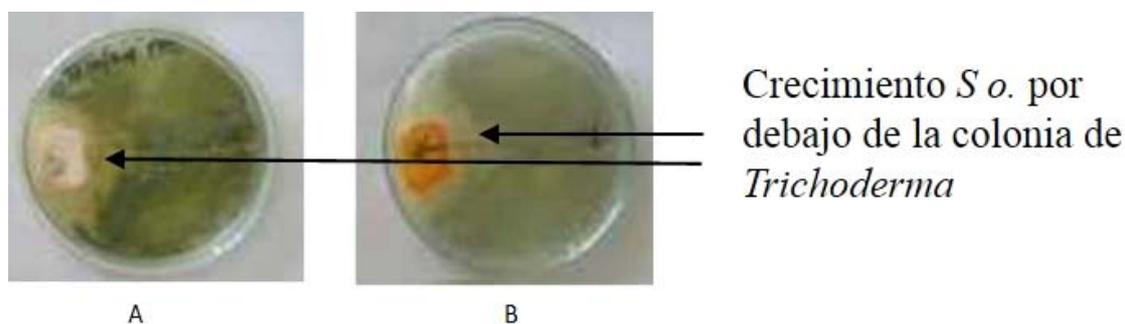


FIGURA 2. (A anverso) Competencia aparente por el sustrato en *S.o-4*. (B reverso) Desarrollo de *Sarocladium* por debajo de la colonia de *Trichoderma*./ (A obverse) Apparent competence for the substrate with *S.o-4*. (B reverse) *Sarocladium* growth under *Trichoderma* colony.

TABLA 2. Competencia por el sustrato en base a la comparación del crecimiento de la colonia de los aislados de *Sarocladium* en las últimas evaluaciones^a./ *Competition for the substrate based on the comparison of colony growth of Sarocladium isolates in the last evaluations.*

Aislamientos de <i>Trichoderma</i>	S.o-2 (mm)	Sig	S.o-4 (mm)	Sig
T. 0	26,67± 1,86	ns	24,33±1,76	ns
T. 1	17,00± 6,43	ns	0,00	* *
T. 2	11,50±4,65	*	9,83±3,72	*
T. 4	8,33±1,67	*	2,67±0,33	* *
T. 5	6,50±1,32	* *	3,50±1,50	* *
T. 6	6,33±3,50	*	6,67±0,88	* *
T. 7	26,50±1,61	ns	40,00±5,00	ns
T. 8	14,67±1,09	ns	15,00±3,51	ns
T. 10	15,33±4,18	*	22,67±1,67	ns
T. 11	10,00±2,25	*	16,00±8,00	ns
T. 12	10,00±2,90	*	11,50±1,26	*
T. 13	13,33±3,18	*	20,50±1,5	*
T. 14	4,00±2,08	* *	14,67±1,20	* *
T. 15	6,33±3,48	*	11,67±1,86	* *
T. 16	8,50±3,33	*	11,00±4,16	*
T. 17	13,00±3,79	*	20,67±4,18	ns
T. 18	15,00±8,50	ns	13,00±3,05	ns
T. 20	12,67±1,76	* *	13,33±1,76	ns
T. 21	17,83±9,18	ns	16,33±2,19	ns
T. 22	6,33±0,67	* *	6,00±2,08	ns
T. 23	5,33±0,67	* *	10,33±1,20	ns
T. 24	13,67±1,45	* *	12,67±1,20	ns
T. 25	15,17±2,74	* *	9,67±0,88	ns
T. 26	22,67±1,33	*	12,33±1,20	ns
T. 27	13,00±0,58	* *	10,33±1,20	ns
T. 28	9,00±2,52	* *	12,00±1,15	ns
T. 29	8,33±2,67	* *	6,33±3,33	ns

Leyenda: ^a Evaluaciones de *Sarocladium* en el testigo y en cultivo dual.

Significación * p<0,05; **p<0,01



FIGURA 2.1. Competencia por el sustrato en el Cultivo Dual de *Sarocladium* S.o-4./ *Competence for the substrate in dual crop of Sarocladium (S.o-4).*

to de *Trichoderma* T. 1, que logró parasitar por completo al aislado S.o-4 en la evaluación final. La disminución de la colonia del patógeno en estos casos, concuerda con lo notificado por Vinale *et al.* (2) y Rey *et al.* (8) cuando plantearon que la degradación de la pared celular de los fitopatógenos comienza por la acción de varios compuestos que pudieran tener efecto sinérgico, así como de varios mecanismos que interactúan (9) y permiten la penetración del agente biocontrolador, provocando la vacuolización, lisis de las hifas y desintegración del patógeno.

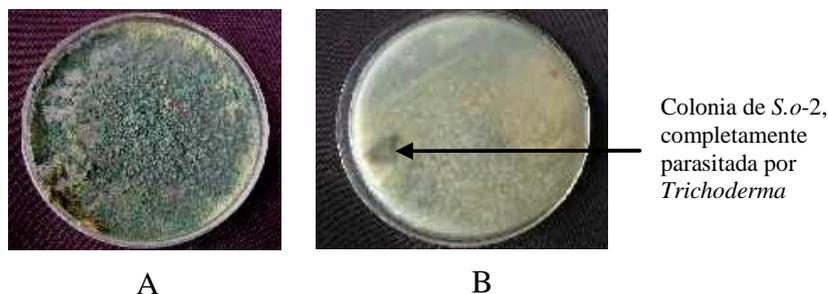


FIGURA 3. Micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *Sarocladium S.o-2* (A anverso, B reverso)./ *Trichoderma mycoparasitism on Sarocladium S.o-2* (A obverse, B reverse).

TABLA 3. Análisis del micoparasitismo de aislamientos seleccionados de *Trichoderma* en base a la diferencia en el diámetro de la colonia de *S. oryzae* (al momento del contacto hifal y en la última evaluación de cada aislado)./ *Analysis of mycoparasitism of Trichoderma selected isolates based on diameter differences of S. oryzae colony*^a

<i>Trichoderma</i>	<i>S.o-2</i> crec. (mm)		Sig.	<i>S.o-4</i> crec. (mm)		Sig.
	b	c		b	c	
T. 1	-	-		8,33±1,67	0,00	*
T. 4	-	-		5,00±0,58	2,67±0,33	*
T. 5	-	-		5,67±0,33	3,33±1,33	ns
T. 6	8,67±1,76	6,33±3,48	ns	6,67±0,88	3,83±0,60	*
T. 14	4,67±0,33	4,00±2,08	ns	-	-	
T. 22	-	-		9,67±0,67	6,00±2,08	ns
T. 23	6,67±0,33	5,33±0,67	ns	11,83±1,48	10,33±1,20	ns

Leyenda: a.- (at the moment of hyphal contact and at the last evaluation, of each isolate). b.- Diámetro de la colonia en el momento de la interacción; c.- Diámetro de la colonia en la última evaluación; -.- No hubo evidencias de micoparasitismo. * Significación para $p < 0,05$.

Pocos aislados presentaron los tres tipos de antagonismo, y esto solo para el *S.o-4*, lo que ratifica la necesidad de seguir la búsqueda y prueba de nuevos aislados de *Trichoderma* para lograr candidatos eficaces a bioplaguicidas frente a este patógeno. Esta expresión tiene más fortaleza si se tiene en cuenta que el estudio realizado abarca solo los ensayos *in vitro* y que es de esperar que en condiciones semi-controladas y/o de campo el porcentaje disminuya mucho más, como se ha notificado por otros autores (10).

De manera general, cuando se analizaron los resultados de la acción antagónica de los aislamientos de *Trichoderma* frente a ambos aislados de *Sarocladium* se observó que existe una diferenciación entre ellos (Tabla 4), lo que refuerza la evidencia detectada en el aspecto morfológico y en parte en la inoculación de semillas (datos no publicados de los autores). Esto sugiere que al seleccionar aislados de *Trichoderma* para el control de este fitopatógeno se tenga en cuenta no solo un aislamiento, aun cuando éste sea de los más agresivos, ya que existe variabili-

dad en la respuesta de sensibilidad al agente controlador biológico.

El análisis de los aislamientos por tipos de antagonismo (Tabla 4) mostró, que para *S.o-2* la antibiosis fue la menos representada con solo un aislamiento T. 29. En la práctica para la elaboración de bioplaguicidas las cepas promisorias seleccionadas del antagonista deben tener al menos dos tipos de antagonismo, entonces las de mayores perspectivas para el control del *S.o-2* fueron: T. 6, T. 14, T. 23 y T. 29, mientras que para *S.o-4*: T. 1, T. 4, T. 5, T. 6, T. 14 y T. 15; para este último (*S.o-4*), los aislados T. 4 y T. 5 mostraron los tres tipos de antagonismo. Al conjugar estos resultados, para ambos aislados de *Sarocladium* sobresalió como más promisorio el aislamiento T. 6, que presentó dos tipos de antagonismo (Competencia y Micoparasitismo) (Tabla 4).

Si se toma en cuenta que el inóculo primario de *Sarocladium* se transmite por semilla, tanto externa como internamente, entonces el aislado T. 29 adquiere gran importancia, pues podría ser una vía eficaz de

TABLA 4. Distribución de los aislamientos de *Trichoderma* por tipos de antagonismo frente a las cepas de *S.o.*/
Distribution of Trichoderma isolates by antagonism types against S.o strains

Tipos de antagonismo	S.o-2	S.o-4
Antibiosis	T. 29*	T. 4, T. 5, T. 14, T. 15, T. 20, T. 24, T. 29
Competencia por el sustrato	T. 2, T. 4, T. 5, T. 6, T. 10, T. 11, T. 12, T. 13, T. 14, T. 15, T. 16, T. 17, T. 20, T. 22, T. 23, T. 24, T. 26, T. 27, T. 28, T. 29	T. 1, T. 2, T. 4, T. 5, T. 6, T. 12, T. 13, T. 14, T. 15, T. 16
Micoparasitismo	T. 6, T. 14, T. 23	T. 1, T. 4, T. 5, T. 6, T. 22, T. 23

*En negrita se destacan aislamientos con tipos de antagonismos comunes para ambos aislados de *Sarocladium*.

limitar la infección, ya que actúa por antibiosis sobre los dos aislados probados. Si la infección se encuentra en el campo, además de este aislamiento se pudiera emplear el T. 6 por tener un efecto combinado de competencia y parasitismo.

A pesar de estas inferencias, los estudios realizados en el presente trabajo abarcaron solo el antagonismo *in vitro* entre algunos aislamientos de *Trichoderma* y el agente patógeno, lo que constituye la piedra angular para la elaboración de nuevos bioplaguicidas, pero son necesarios más estudios: bioecológicos, fisiológicos y de formas de aplicación del posible producto, entre otros, que complementen la selección.

CONCLUSIONES

1. Los aislamientos de *Sarocladium oryzae* poseen variabilidad en su respuesta o sensibilidad al control biológico.
2. Los aislamientos más promisorios de *Trichoderma* fueron: el T. 6 que presentó dos modos de acción (competencia por el sustrato y micoparasitismo) frente a ambos aislados de *Sarocladium*, el T. 29 y T. 23 que mostraron antibiosis y micoparasitismo, respectivamente, y los aislamientos T. 4 y T. 5 que manifestaron los tres modos de acción para el aislado (S.o-4) de *Sarocladium*.

REFERENCIAS

1. Instituto de Investigaciones de Arroz (IIA). Instructivo Técnico del cultivo del arroz. Ministerio de la Agricultura, Cuba. p. 112, 2005.
2. Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalberti E L, Marraa R, Woo L, Lorito M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 2008;40:1-10.
3. Kalaiselvi S, Panneerselvam A. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma* sp. against *Sarocladium oryzae* causing sheath rot disease in paddy. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2011;2(1):179-183.
4. Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev Protección Veg*. 2013;28(1):1-11.
5. Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev Protección Veg*. 2009;24(1):14-21.
6. Harman G. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 2006;96(2):190-194.
7. Distefano G, La Malfa S, Vitale A, Lorito M, Deng Z, Gentile A. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res*. 2008;17:873-879.
8. Rey M, Delgado-Jarana J, Rincón AM, Limón M del C, Benítez T. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17:1-36.
9. Jeger MJ, Jeffries P, Elad Y, Xu XM. A generic theoretical model for biological control of foliar Plant Diseases. *J Theor Biol*. 2009;256:201-214.
10. Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. Candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev Protección Veg*. 2008; 23(2):118-25.

Recibido: 23-10-2013.

Aceptado: 5-2-2014.