

# Evaluación *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg como promisorios agentes para el control de *Alternaria solani* Sorauer



<https://eqrcode.co/a/yO1PSu>

## *In vitro* evaluation of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg strains as promising agents for the control of *Alternaria solani* Sorauer

**Benedicto Martínez Coca**<sup>1\*</sup>, **Edwin Ronnie Gakenge**<sup>2</sup>, **Ileana Miranda Cabrera**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria CENSA, Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, CP 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Institute for Agricultural Research (IIA), Chianga, Huambo, CP 401. Angola.

**RESUMEN:** El objetivo de este trabajo fue evaluar el antagonismo *in vitro* de 13 cepas cubanas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente *Alternaria solani* Sorauer. Para ello se determinaron los modos de acción de las cepas de *T. asperellum* frente a *A. solani* en cultivo dual. Los resultados mostraron diferencias entre las cepas del antagonista. En la antibiosis se destacaron las cepas *Ta.* 90, *Ta.* 78, *Ta.* 75 y *Ta.* 85. En la competencia por espacio, solo la *Ta.* 85 colonizó el 100 % del patógeno (grado 1 de la escala de Bell *et al.*), mientras que *Ta.* 17, *Ta.* 3, *Ta.* 90, *Ta.* 78 y *Ta.* 28 tuvieron un crecimiento mayor al 80 % sobre *A. solani*, grado 2 de la escala. No obstante, las cepas *Ta.* 75, *Ta.* 78, *Ta.* 79 y *Ta.* 85 mostraron ser buenas competidoras por espacio frente al patógeno, con más de 50 % de inhibición del crecimiento radial del mismo. Las cepas *Ta.* 13, *Ta.* 56 y *Ta.* 85 presentaron cuatro interacciones hifales frente a *A. solani*. Las más observadas fueron la vacuolización, penetración y granulación. Las cepas *Ta.* 1, *Ta.* 3, *Ta.* 12, *Ta.* 13, *Ta.* 25, *Ta.* 28, *Ta.* 56 y *Ta.* 85 provocaron reducción significativa del área ocupada por el patógeno a las 400 h, con relación al tamaño a las 96 h. En esta acción sobresalieron las cepas *Ta.* 85, *Ta.* 1 y *Ta.* 12; la cepa *Ta.* 85 se seleccionó como la más promisoría. No obstante, *Ta.* 28, *Ta.* 56 y *Ta.* 13 mostraron buenas cualidades para su evaluación en condiciones de campo.

**Palabras clave:** control biológico, papa, *Solanum tuberosum*.

**ABSTRACT:** The aim of this work was to evaluate *in vitro* antagonism of 13 Cuban *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (*Ta.*) strains against *Alternaria solani* Sorauer. The modes of action of *T. asperellum* strains against *A. solani* in dual culture were determined. The results showed differences between the antagonist strains. The strains *Ta.* 90, *Ta.* 78, *Ta.* 75, and *Ta.* 85 were highlighted by their antibiotic effect. In the space competition, only *Ta.* 85 colonized 100 % of the pathogen (Bell *et al.* scale Grade 1.), while *Ta.* 17, *Ta.* 3, *Ta.* 90, *Ta.* 78, and *Ta.* 28 had more than 80 % growth over *A. solani* (Grade 2 of the scale). However, *Ta.* 75, *Ta.* 78, *Ta.* 79, and *Ta.* 85 strains proved to be good space competitors against the pathogen, with more than 50 % inhibition of radial growth of the pathogen. The strains *Ta.* 13, *Ta.* 56 and *Ta.* 85 had four hyphal interactions with *A. solani*; the most observed were vacuolization, penetration and granulation. The strains *Ta.* 1, *Ta.* 3, *Ta.* 12, *Ta.* 13, *Ta.* 25, *Ta.* 28, *Ta.* 56 and *Ta.* 85 caused significant reduction of the area occupied by the pathogen at 400 h, relative to the size at 96 h. The strains *Ta.* 85, *Ta.* 1 and *Ta.* 12 were highlighted in this action; the strain *Ta.* 85 was selected as the most promising; however, *Ta.* 28, *Ta.* 56 and *Ta.* 13 showed good qualities for evaluation in field conditions.

**Key words:** biological control, potato, *Solanum tuberosum*.

\*Autor para correspondencia: *Benedicto Martínez Coca*. E-mail: [bmcocha@censa.edu.cu](mailto:bmcocha@censa.edu.cu)

Recibido: 21/04/2020

Aceptado: 11/06/2020

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es originario de los Andes y constituye una de las contribuciones más importantes de la región andina, por ser uno de los alimentos más consumido, apreciado y por favorecer, de manera decisiva, a la seguridad alimentaria de toda la humanidad (1, 2). La incidencia de enfermedades es uno de los factores que limita la producción del cultivo de la papa en la mayoría de los países tropicales. Entre estas, el Tizón temprano, causado por el hongo *Alternaria solani* Sorauer, es una de las enfermedades más significativas del cultivo a nivel mundial (3), con pérdidas de hasta 30 % del rendimiento (4). En Cuba, las pérdidas estimadas se encuentran entre 17 y 37 % (1), en áreas con condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad.

No obstante a los conocimientos existentes sobre la enfermedad y su control, esta es uno de los principales factores limitantes de la producción de papa en el mundo (5, 6, 7). La necesidad de disminuir los plaguicidas que afectan al ecosistema justifica plenamente la búsqueda de otros métodos menos agresivos para el control de *A. solani*, como son los Agentes de Control Biológico (ACB) y dentro de estos se destacan aislamientos del género *Trichoderma* spp.

En la actualidad, existen cepas antagonistas de *Trichoderma* caracterizadas patogénicamente frente a un amplio grupo de hongos causantes de enfermedades en cultivos de importancia económica, pero muy pocas ante *A. solani*. Es por ello que se propuso como objetivo de este trabajo seleccionar cepas de *Trichoderma* eficaces frente a *A. solani* por su antagonismo *in vitro*, con perspectivas para su evaluación posterior en condiciones de campo en el control del Tizón temprano en papa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de los cultivos microbianos y producción de los inóculos

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología Vegetal (LMV) del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (Latitud

22,991867; Longitud -82,153892), provincia Mayabeque, Cuba.

Las cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg usadas (Ta.1, Ta. 3, Ta. 12, Ta. 13, Ta. 17, Ta. 25, Ta. 28, Ta. 52, Ta. 75, Ta. 78, Ta. 79, Ta. 85 y Ta. 90) proceden de la Colección del Laboratorio de Micología Vegetal (CLMV) del CENSA y previamente se caracterizaron morfofisiológica (8), molecular y patogénicamente frente a diferentes dianas (9).

Los cultivos usados partieron de tubos con las cepas conservadas a 4°C y se sembraron fragmentos de micelio de las colonias en placas Petri con medio Agar Malta (AM) (BIOCEN) pH 5,6±0,2 durante 72 h a 30±1°C y oscuridad.

### Agente patógeno

Se usó el aislamiento altamente patogénico de *A. solani* No. 160 (número de catálogo en el CLMV de *Alternaria* spp.), previamente aislado de hojas de papa con síntomas típicos de Tizón temprano, procedente de la provincia Las Tunas, Cuba. El aislamiento se purificó mediante la siembra de fragmentos de micelio del mismo en placas Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (BIOCEN) pH 5,6 durante siete días a temperatura de 28±1°C y oscuridad. La patogenicidad de este aislado se reactivó en hojas sanas de papa cv. Romano de 25 días de edad; para ello se inocularon cuatro hojas, dos por el haz y dos por el envés, con discos del patógeno obtenido a partir de las colonias desarrolladas del primer subcultivo. Las hojas se incubaron en cámara húmeda a temperatura de 23±2°C. Con la aparición de los síntomas en las hojas y el desarrollo del hongo sobre el tejido vegetal, se realizó el reaislamiento del hongo, al que se le comprobó su identidad según la clave descrita por Simmons (10).

Los inóculos de los hongos (fitopatógeno y antagonistas) consistieron en discos de 5 mm de diámetro, que se tomaron a partir de la periferia de las colonias de los mismos, inoculados en placas Petri contentivas de los medios descritos anteriormente para cada organismo. Todas las placas inoculadas con estos se incubaron a 30±1°C y a oscuridad.

## Selección *in vitro* de cepas de *T. asperellum* para el control de *A. solani*

Se evaluó el efecto antagónico de las cepas de *T. asperellum* frente a *A. solani* por la técnica de Cultivo Dual (CD) (11), según diseño completamente al azar. Se seleccionaron para cada cepa tres placas Petri (90 mm de Ø) que contenían medio de cultivo PDA. En una placa se sembraron dos discos (ambos de 5 mm) de micelio de las colonias de *Trichoderma* y del patógeno, diametralmente opuestos, a una distancia aproximada de 5 mm del borde de la placa. Las placas sembradas con ambos hongos se sellaron con papel parafilm. Como control se usaron placas (tres) sembradas con el patógeno, de igual manera que las anteriores, pero sin el antagonista. Las placas se incubaron a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  y a oscuridad.

Las evaluaciones del crecimiento (radio en mm) de ambos hongos se realizaron con una regla graduada, a las 16, 40, 48, 64, 72, 88, 96, 160, 184, 208, 232, 328, 352 y 400 h. Se evaluaron los modos de acción: antibiosis, competencia por espacio y micoparasitismo.

### Antibiosis

Se midió el crecimiento lineal (mm) de la colonia de *A. solani* con una regla graduada hasta las 72 h. La antibiosis se determinó al comparar el crecimiento del patógeno en el CD en el momento del contacto físico de ambos hongos, con el del control (12). Los datos se procesaron a través de un ANOVA simple y las medias se compararon mediante la Prueba de LSD Fisher ( $p\leq 0,05$ ). El criterio de selección para este modo de acción se definió como 3 mm, basado en el cálculo del intervalo de confianza de la media, para  $p=0,05$ .

### Competencia por espacio

Se evaluó el porcentaje de área ocupada por el antagonista y el patógeno. Se clasificaron las cepas de *T. asperellum* en base a su antagonismo, según la escala de clase referida por Bell *et al.* (11). A las 96 horas se determinó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial del patógeno (PICR) según la fórmula:

$$\text{PICR} = (R1 - R2) / R1 \times 100$$

Donde R1 es el radio del patógeno control y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

Los datos de porcentaje de área ocupada se analizaron mediante un ANOVA y las medias se compararon por los rangos múltiples de Duncan,  $p\leq 0,05$ .

### Micoparasitismo

Para observar las interacciones hifales en el micoparasitismo (enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis), se tomaron al azar tres muestras de la zona de interacción de ambos hongos por cada réplica (placa Petri) a las 96 h, y se colocaron en portaobjetos sobre una gota de lactofenol. Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss (400/630x) con sistema de foto documentación KSS. Además, se evaluó el efecto del crecimiento del antagonista sobre el patógeno a partir de las 96 hasta las 400 h. Los datos se compararon con los del control mediante la prueba T de Student para ese mismo tiempo de evaluación. Se realizaron curvas de regresión con los datos de las cepas de *T. asperellum* que tuvieron diferencias significativas.

Para la selección de las cepas, según el modo de acción, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- i. Ubicación de la cepa en el grado 1 de la escala de Bell *et al.*
- ii. Efecto de antibiosis con al menos 3 mm de inhibición del crecimiento del patógeno.
- iii. Antagonista con tres o más interacciones hifales con el patógeno.

Análisis de los datos: para el procesamiento de los datos en todos los experimentos se tabularon en Microsoft Excel y se usó el paquete estadístico InfoStat versión 2016 (13).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Antagonismo *in vitro* de cepas de *T. asperellum* para el control de *A. solani*

#### Antibiosis

Todas las cepas de *T. asperellum* mostraron efecto de antibiosis frente a *A. solani*, pero hubo diferencias en la inhibición del crecimiento del patógeno, basado en la liberación de metabolitos

antes del contacto hifal entre los dos hongos, sobresaliendo un grupo de 10 cepas que no presentan diferencias significativas entre ellas (Tabla 1).

Este efecto es más evidente en las cepas *Ta.* 90 (Fig. 1), *Ta.* 78, *Ta.* 75 y *Ta.* 85, cuya reducción equivale al crecimiento del control durante 24 h.

Esta inhibición del crecimiento del patógeno pudiera estar relacionada con la acción de metabolitos volátiles y no volátiles como: enzimas (quitinasas, glucanasas, celulasas, xylanases, laminarinasas, esterases, glucosidasas, lipasas y proteasas), toxinas (6-pentil-  $\alpha$ - pirona), antibióticos (gliotoxina, viridina, gliovirina), hormonas (ácido-3-indolacético, ácido

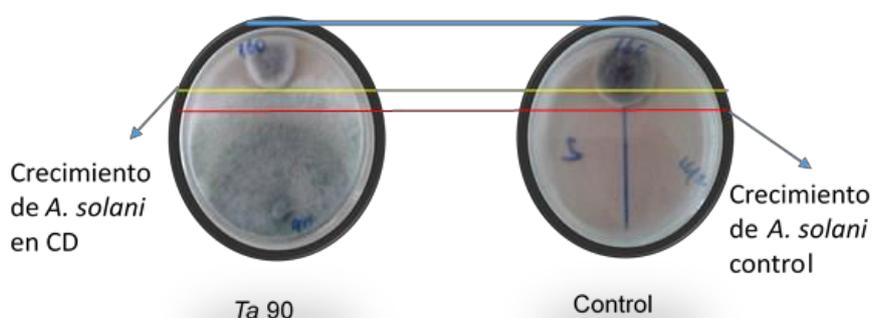
Indolbutírico, L-triptófano, etileno, auxinas y giberelinas) como notificaron Romero *et al.* (14) y Hernández *et al.* (15), entre otros. Este modo de acción aumenta su relevancia práctica, ya que *Trichoderma*, al colonizar las raíces de las plantas y libere estos compuestos tóxicos al patógeno, puede hacer que la planta escape a la penetración y colonización del mismo, o que su daño sea menor. Este efecto en el follaje pudiera detectarse también durante el proceso de germinación de las esporas del antagonista, al liberarse algunos de estos metabolitos, que limiten la germinación o el crecimiento del fitopatógeno (16).

Este mecanismo de control en *Trichoderma* es evidente, ya que se puede observar aún sin estar

**Tabla 1.** Efecto inhibitorio *in vitro* de cepas de *T. asperellum* sobre el crecimiento de *A. solani* a las 72 h./ *In vitro inhibitory effect of T. asperellum strains on A. solani growth at 72 h.*

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Inhibición del crecimiento micelial de <i>A. solani</i> (mm)
<i>Ta.</i> 12	0,66 a
<i>Ta.</i> 3	1,66 ab
<i>Ta.</i> 25	2,00 abc
<i>Ta.</i> 13	2,33 abcd
<i>Ta.</i> 1	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 79	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 56	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 17	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 28	2,66 abcd
<i>Ta.</i> 85	3,66 bcd
<i>Ta.</i> 75	4,00 cd
<i>Ta.</i> 78	4,16 d
<i>Ta.</i> 90	4,33 d
ESx	0,23
CV	0,52

Medias con letras diferentes difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ , según dócima de LSD Fisher).



**Figura 1.** Efecto de antibiosis de la cepa *Ta.* 90 de *T. asperellum* frente a *A. solani* en Cultivo Dual a las 72 h. / *Antibiosis effect of Ta. 90 strain of T. asperellum against A. solani in Dual Culture at 72 h.*

en contacto con el patógeno; además, las enzimas hidrolíticas presentes en este favorecen la penetración y el saprofitismo.

Los resultados ratifican esta acción y muestran el importante papel que puede desempeñar *Trichoderma* como agente de control biológico; en este caso para el control de *A. solani*, cuyo manejo en la actualidad no es lo suficientemente eficiente (5).

### Competencia por espacio

Las cepas de *T. asperellum* presentaron efecto antagonista positivo con alta competencia por el espacio (Tabla 2). Es de destacar que la velocidad de crecimiento de las cepas de *T. asperellum* varió entre 0,77 y 0,69 mm.h<sup>-1</sup>, mientras que la de *A. solani* fue de 0,17 mm.h<sup>-1</sup>. Esta diferencia en la velocidad de crecimiento entre el antagonista y el patógeno es la causa fundamental para que *Trichoderma* ocupe rápidamente gran parte del área de la placa. No obstante, este proceso se favorece por la gama de metabolitos que presenta este antagonista con los que logra limitar el avance del patógeno.

Entre las cepas de *Trichoderma* se observaron diferencias significativas en cuanto al área que ocuparon sus colonias en la placa; se destacan las cepas *Ta. 1*, *Ta. 3*, *Ta. 12*, *Ta. 25* y *Ta. 85* (Tabla 2). A partir de las 72 h, las cepas de *Trichoderma* comenzaron a crecer sobre la colonia del patógeno y, en este caso, también hubo diferencias entre ellas. Las cepas *Ta. 3*, *Ta. 17*, *Ta. 28*, *Ta. 78*, *Ta. 85* y *Ta. 90* tuvieron mayor crecimiento ( $\geq 80$  %) sobre el patógeno. De acuerdo con estos resultados, la mayoría de las cepas evaluadas se ubica en el grado 2 de la escala de Bell *et al.*; solo la cepa *Ta. 85* alcanzó el grado 1 (Tabla 2). El análisis del PICR mostró que este varió entre 36,62 y 54,45, donde sobresalieron con resultados superiores a 50 % las cepas *Ta. 75*, *Ta. 78*, *Ta. 79* y *Ta. 85*. Los resultados demuestran que *T. asperellum* es un buen competidor por espacio frente a *A. solani* y el importante papel que tiene la cepa del antagonista en el control de este fitopatógeno, lo que justifica la necesidad de la selección de aislamientos como agentes de control promisorios.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Martínez *et al.* (17), quienes observaron aislamientos de *Trichoderma* spp. con actividad inhibitoria del crecimiento de *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams y Haswks. Los resultados reafirmaron los de Khaliq *et al.* (18) y Kayim *et al.* (19), al informar alta capacidad competitiva (más de 70 %) de aislamientos de *T. harzianum* frente a *Alternaria* spp. *in vitro*.

Los resultados de esta investigación contrastan con los de Hernández *et al.* (15), pues notificaron que 14 de 31 aislados de *Trichoderma* spp. mostraron el máximo efecto competitivo (clase 1 de la escala mencionada); es decir, más de 45 % de los aislamientos; mientras que, en el presente trabajo, solo alcanzó el 7,69 %. Es probable que esta diferencia se deba a que el fitopatógeno diana (*Rhizoctonia solani* Kühn) y/o las cepas del antagonista no fueron los mismos a los del presente trabajo.

Teniendo en cuenta los criterios que consideran que la competencia por espacio o por nutrientes es uno de los mecanismos básicos del control de *Trichoderma*, las cepas de *T. asperellum* evaluadas con alta capacidad competitiva podrían tener resultados positivos, como controladores biológicos de *A. solani* en campo.

### Micoparasitismo

Las cepas *Ta. 12*, *Ta. 13*, *Ta. 28*, *Ta. 56* y *Ta. 85* (Tabla 3) presentaron tres o más interacciones hifales frente a *A. solani*. Las interacciones hifales más observadas fueron la vacuolización, penetración y granulación. (Tabla 3, Fig. 2)

Los resultados de las observaciones microscópicas sugieren la posible presencia de enzimas extracelulares del antagonista con actividad lítica sobre las hifas del patógeno. En diferentes investigaciones se mostraron evidencias de la producción de enzimas líticas (quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas,  $\beta$ -1,6-glucanasas y proteasas, entre otras) por especies de *Trichoderma* que contribuyen a la degradación de las paredes celulares de los microorganismos patógenos (20).

**Tabla 2.** Competencia por espacio de las cepas de *Trichoderma* respecto al crecimiento en Cultivo Dual a las 96 h./ *Space competition of Trichoderma strains with respect to growth in dual culture at 96 h.*

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Crecimiento micelial de <i>Ta.</i> respecto al área (mm)	Grados de la Escala de Bell <i>et al.</i>	PICR
<i>Ta.</i> 56	67,00 a	2	42,56
<i>Ta.</i> 28	67,67 ab	2	42,56
<i>Ta.</i> 17	68,33 ab	2	39,59
<i>Ta.</i> 90	69,33 abc	2	46,52
<i>Ta.</i> 79	69,33 abc	2	50,49
<i>Ta.</i> 13	69,67 abcd	2	42,56
<i>Ta.</i> 78	70,33 bcde	2	54,45
<i>Ta.</i> 75	70,33 bcde	2	50,49
<i>Ta.</i> 3	72,00 cdef	2	44,54
<i>Ta.</i> 12	72,67 def	2	46,52
<i>Ta.</i> 1	73,33 ef	2	36,62
<i>Ta.</i> 25	74,00 f	2	45,53
<i>Ta.</i> 85	74,33 f	1	50,49
ESx	0,51		
CV	0,05		

Medias con letras diferentes difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ , según dócima de Duncan)

Esta podría ser una de las causas por la cual varias cepas de las de *T. asperellum* evaluadas exhibieron estos resultados, pues previamente se demostró que poseen actividades  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas (21). No obstante, es necesario profundizar en este aspecto y en la identificación de las enzimas que puedan estar presentes en la interacción *T. asperellum* y *A. solani*.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Mokhtar y Dehimat (22), que observaron que los aislamientos de *T. Harzianum* ocasionaron lisis y parasitismo en las paredes de *Cladosporium* sp. y *Stemphyllium botryosum* Wallroth; sin embargo, estos autores no hacen referencia a la vacuolización y granulación.

Los análisis de la prueba T de Student mostraron que ocho de las cepas de *T. asperellum* (*Ta.* 1, *Ta.* 3, *Ta.* 12, *Ta.* 13, *Ta.* 25, *Ta.* 28, *Ta.* 56 y *Ta.* 85) provocaron reducción significativa del área ocupada por el patógeno a las 400 h, con relación al tamaño de la propia colonia del patógeno a las 96 h, con tendencia a su eliminación con el tiempo, según se aprecia en las ecuaciones de regresión (Fig. 3). Se destaca la cepa *Ta.* 85 con la mayor reducción de esta, con una confiabilidad de  $R^2$  0,99, le siguen la *Ta.* 1 y

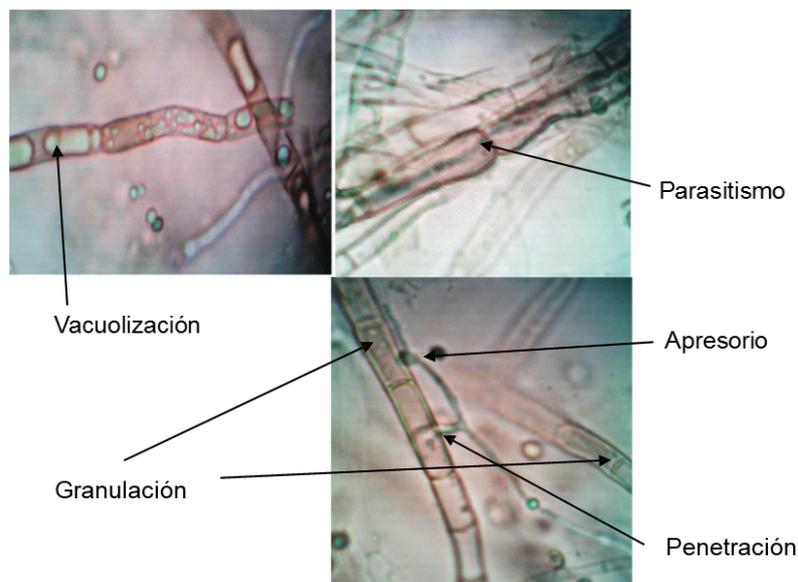
*Ta.* 12, con 0,89 y 0,86, respectivamente. Se puede inferir que en esta interacción antagonista-patógeno predomina el micoparasitismo, aunque debe intervenir también la actividad enzimática de los aislamientos, para que se degrade la pared de las hifas del patógeno y puedan penetrar las del antagonista y, así, provocar la disminución del tamaño de la colonia de *A. solani* en el tiempo de la interacción. Es posible que esto tenga relación con lo demostrado por Shafique *et al.* (23), quienes observaron que los metabolitos de *Trichoderma koningii* Rifai fueron capaces de reducir la biomasa de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. entre 10-90 %. Este resultado tiene valiosa importancia desde el punto de vista del desarrollo del antagonismo, pues en condiciones de campo los fitopatógenos, casi siempre preceden, en posicionamiento físico del área, a los ACB, por lo que cepas con estas características tienen la capacidad de reducir el espacio ocupado por estos, dándole ventajas a la planta en su enfrentamiento ante estos patógenos.

Independientemente de la información existente acerca de las especies de *Trichoderma* como antagonistas de varios hongos fitopatógenos (24), en la práctica es necesario realizar una selección exhaustiva del agente

**Tabla 3.** Tipos de interacciones hifales de las cepas de *T. asperellum* sobre *A. solani* en Cultivo Dual a las 96 h. / *Types of hyphal interactions of T. asperellum strains on A. solani in dual culture at 96 h.*

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Tipos de interacciones hifales
Ta. 1	V-P
Ta. 3	G
Ta. 12	V-G-P
Ta. 13	V-G-L-P
Ta. 17	V-P
Ta. 25	V-P
Ta. 28	V-L-P
Ta. 56	V-G-L-P
Ta. 75	V
Ta. 78	V-G
Ta. 79	G
Ta. 85	V-G-L-P
Ta. 90	V-G

Leyenda: (V), Vacuolización, (G) Granulación, (L) Lisis y (P) Penetración

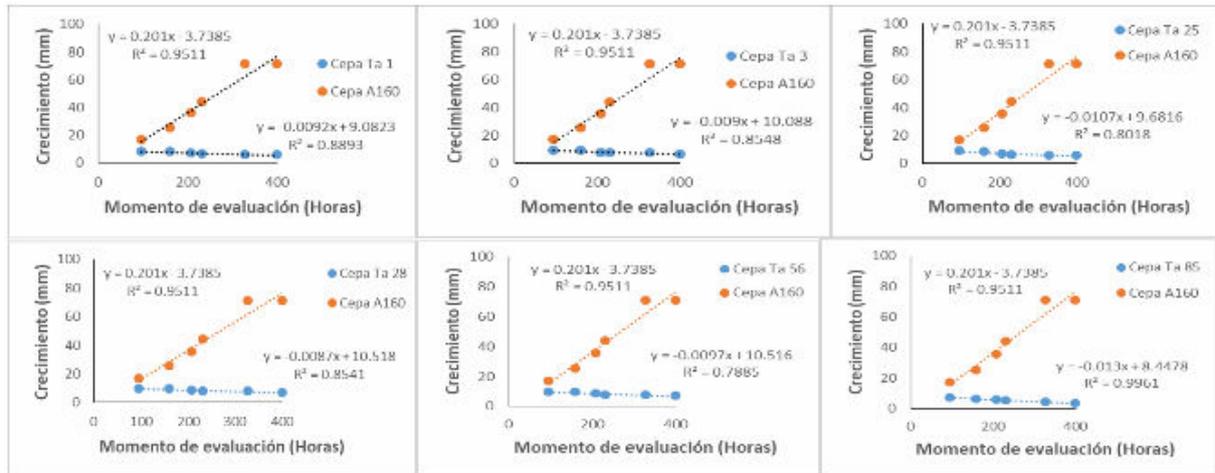


**Figura 2.** Interacciones hifales de la cepa Ta. 85 de *T. asperellum* sobre *A. solani* en Cultivo Dual a las 162 h. / *Hyphal interactions of Ta. 85 strain of T. asperellum on A. solani in dual culture at 162 h.*

controlador frente a cada patógeno diana, antes de ser aplicado en condiciones de campo (25).

El establecimiento *in vitro* de los modos de acción presentes en los aislamientos de *Trichoderma* constituye la base de la selección de estos, no solo para las pruebas posteriores en condiciones semicontroladas y/o campo, sino como orientación de la forma de producción que se debe realizar para lograr mayor estabilidad y eficacia en los resultados en campo.

El análisis integral de los resultados obtenidos, sobre la base a los criterios de selección establecidos y al decrecimiento ocasionado posterior al contacto con el patógeno, demostró que la cepa Ta. 85 cumplió con todos los criterios y ocasionó la mayor reducción de la colonia de *A. solani* poscontacto, por lo que se seleccionó como la cepa más promisoría. No obstante, las cepas Ta. 28, Ta. 56 y Ta. 13 pudieran ser consideradas para su evaluación en condiciones de campo.



**Figura 3.** Disminución del área ocupada por *A. solani* posterior al contacto hifal con las cepas *Ta. 1*, *Ta. 3*, *Ta. 12*, *Ta. 13*, *Ta. 25*, *Ta. 28*, *Ta. 56*, y *Ta. 85* de *T. asperellum*. / Decrease of the area occupied by *A. solani* after hyphal contact with *Ta. 1*, *Ta. 3*, *Ta. 12*, *Ta. 13*, *Ta. 25*, *Ta. 28*, *Ta. 56*, and *Ta. 85* of *T. asperellum*.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los colegas y técnicos del Laboratorio de Micología Vegetal de la dirección de Sanidad Vegetal del CENSA, por la ayuda brindada en el desarrollo del trabajo.

### REFERENCIAS

1. Ministerio de la Agricultura (MINAG). Instructivo Técnico para la producción de papa en Cuba. Dirección de Agricultura. Editorial Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba. 2016; 62.
2. Hernández-Mansilla A, Sorí-Gómez R, González-Alfonso D, López-Mayea A. Escenarios bioclimáticos para el tizón tardío [*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary] y tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer.) de la papa en Cuba. Revista Latinoamericana de la Papa. 2017; 21(1): 55 - 72.
3. Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI). January 2018. *Alternaria solani* (Early blight of potato and tomato). Invasive Species Compendium. En: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/4528#totaxonomicTree> Consulta: Febrero 2018.
4. Acuña B, Sandoval C. Enfermedades de la papa: Tizón temprano de la papa. INIA. Ficha Técnica 49. 2017.
5. Hollingshead K. Control of *Alternaria solani* Resistance to Boscalid, Fluopyram, and Chlorothalonil. A Thesis submitted to the Faculty of Brigham Young University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. 2015; 1-50.
6. Pérez S, Solórzano E, Sosa C, Martínez B. Induction of tomato resistance to *Alternaria solani* Sor. by biological and chemical activators in the field. Rev. ProtecciónVeg. 2016; 31(3): 201-212.
7. Ahmed A. Biological control of potato brown leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* using *Brevibacillus formosus* strain DSM 9885 and *Brevibacillus brevis* strain NBRC 15304. J Plant Pathol Microbiol. 2017;8(6):1-8.
8. Infante D, Reyes Y, Peteira B, Martínez B. Variabilidad fisiológica y patogénica de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Métodos en Ecología y Sistemática. 2015;10(3):41-59.
9. Infante D, Reyes Y, Gonzalez N, Martínez B. Molecular identification of thirteen isolates of *Trichoderma* spp. and evaluation of their pathogenicity towards *Rhizoctonia solani* Kühn. Biotecnología Aplicada. 2013;30:23-28.
10. Simmons G. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on Solanaceae. Mycotaxon. 2000;LXXV:1-15.

11. Bell K, Wells D, Markam R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. *Phytopathology*. 1982;72(4):379-382.
12. Martínez B, Solano T. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. *Rev. Protección Veg.* 1995;10:221-225.
13. Di Rienzo J, Balzarini M, Casanoves F, González L, Tablada M, Walter R. InfoStat versión 1.1. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2016.
14. Romero T, López-Pérez A, Ramírez-Lepe M, Cuervo-Parra A. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean J. Agric. Anim. Sci., exAgro-Ciencia*. 2015; 31(3): 32-45.
15. Hernández O, Castillo D, Herrera R, Fuentes E, Drouaillet E, Santillán A. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani in vitro*. *Investigación y Ciencia*. 2016;24(67):5-11.
16. Pérez N. Control biológico de *Alternaria porri* (Ellis) Cif. en cebolla con *Trichoderma* spp. p.89-107. *En: Gomero L. y Tazza M. (eds.), Innovación de Tecnologías Ecológicas para el Agro en América Latina*. 2001; Resultados del Primer Congreso Latinoamericano. RAP-AL, Lima, Perú.
17. Martínez B, Obret Y, Pérez S, Reyes Y. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth. *Rev. Protección Veg.* 2014;29(2):106-111.
18. Khaliq A, Khan H, Khan N, Zada L, Ali M, Zahoor M, *et al.* *In vitro* efficacy of *Trichoderma harzianum* Rifai against various isolates of *Alternaria* sp. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2017; 5(1): 442-445.
19. Kayim M, Yones M, Endes A. Biocontrol of *Alternaria alternata* causing leaf spot disease on faba bean (*Vicia faba* L.) using some *Trichoderma harzianum* isolates under *in vitro* condition. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 2018; 22(2): 169-178.
20. Acosta-Suárez M, Pichardo T, Roque B, Cruz-Martín M, Mena E, Leiva-Mora M, *et al.* Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biocología Vegetal*. 2013;13(4):231-235.
21. González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, Miranda I, *et al.* Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. *Biocología Aplicada* 2012;29: 12-16.
22. Mokhtar H, Dehimat A. Antagonism capability *in vitro* of *Trichoderma harzianum* against some pathogenic fungi. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2012;3(11): 452-460.
23. Shafique S, Shafique S, Javed A, Akhtar N, Bibi S. Analysis of Antagonistic Potential of Secondary Metabolites and Organic Fractions of *Trichoderma* Species Against *Alternaria Alternata*. *Biocontrol Science*. 2019; 24 (2): 81-88.
24. Idrees S, Chohan S, Abid M, Perveen R, Malik MT. Biological potential of *Trichoderma* species in the control of some phytopathogenic fungi. *Pak. J. Phytopathol.* 2019; 31 (02): 201-206.
25. Reyes Y, Infante D, Martínez B. Eficacia de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn en condiciones de campo. *Rev. Protección Veg.* 2016; 31(2): 107-113.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** **Benedicto Martínez Coca:** Concibió los experimentos. Participó en la búsqueda de información y diseñó de los experimentos. Participó en el análisis e hizo la interpretación de los datos. Participó en el análisis, revisión y redacción final del artículo. **Edwin Ronnie Gakegne:** Participó en la búsqueda de información. Participó en el diseño de los experimentos. Realizó el montaje, evaluación y recolección de los datos de los ensayos. Participó en el análisis de los resultados, en la redacción del borrador del artículo y en la aprobación final del mismo. **Ileana Miranda Cabrera:** Aportó en el análisis estadístico, en la definición del criterio de selección a partir de los resultados estadísticos y en la escritura del documento.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)