

ARTÍCULO ORIGINAL

## Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo

Rosa Castro<sup>I,II\*</sup>, Marcia Pesántez<sup>I</sup>, Valeria Flores<sup>I</sup>, Carmen Díaz<sup>I</sup>, Lidia Castro<sup>I</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>II</sup>

<sup>I</sup>Facultad de Recursos Naturales. Departamento de Fitopatología. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). Panamericana Sur km 1 ½. CP 06-01-4703, Riobamba. Ecuador. <sup>II</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. CP 54830, Villa Clara. Cuba.

**RESUMEN:** Se determinó el efecto de una cepa nativa del Ecuador de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el desarrollo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) inoculadas artificialmente con el patógeno y desarrolladas en casa de cultivo. Se comprobó que la aplicación foliar de la cepa provocó cambios en la evolución de los síntomas y en las variables epifitológicas evaluadas. El periodo de incubación se alargó, se incrementó el tiempo de evolución de los síntomas y se redujeron el tiempo de desarrollo de la enfermedad, el índice de infección y el estado de síntomas promedio. La eficacia, a los 64 días posteriores a la inoculación, fue del 68,8%. Los resultados indicaron la capacidad de la cepa nativa *T. harzianum* CCECH-p1 como antagonista de *M. fijiensis* en casa de cultivo.

**Palabras clave:** bioproductos, control biológico, enfermedad de la mancha negra de la hoja, *Mycosphaerella fijiensis*, *Trichoderma*.

---

### Effect of an ecuadorian strain of *Trichoderma harzianum* Rifai as an antagonist of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet under greenhouse conditions

**ABSTRACT:** The effect of a native strain of *Trichoderma harzianum* Rifai on the development of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) artificially inoculated in banana plants cv. 'Williams' (*Musa* AAA) was determined in a greenhouse. It was shown that the foliar application of this native Ecuadorian strain of *T. harzianum* caused changes in the evolution of symptoms and in the variables evaluated. The incubation period and the symptom evolution time and disease development time became longer. The infection index and the state of symptom average decreased. Effectiveness after sixty- four days of the inoculation was 68.8%. The results showed the capability of the native Ecuadorian strain of *T. harzianum* CCECH-p1 as an antagonist of *M. fijiensis* under greenhouse conditions.

**Key words:** biological control, bioproducts, black leaf spot disease, *Mycosphaerella fijiensis*, *Trichoderma*.

---

## INTRODUCCIÓN

El uso de agentes de control biológico es un componente importante de la agricultura sostenible (1). Este aspecto cobra gran importancia en la producción orgánica de cultivos como los plátanos y bananos (*Musa* spp.), donde se aplican prácticas agronómicas encaminadas al control de patógenos (2).

La mancha negra de la hoja o Sigatoka negra, ocasionada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, provoca pérdidas cuantiosas en la producción bananera a nivel mundial y representa un factor limitante de la producción en la industria bananera ecuatoriana. Las medidas de control se basan, principalmente, en el uso de fungicidas químicos, productos que son tóxicos para animales y plantas y crean resis-

---

\*Autor para correspondencia: Rosa Castro. Correo electrónico: [rosa.castro@esPOCH.edu.ec](mailto:rosa.castro@esPOCH.edu.ec).

tencia en las cepas del patógeno (3). Sin embargo, la percepción pública en los últimos años ejerció alta presión sobre los agricultores e investigadores para desarrollar sistemas de producción ambientalmente más amigables y sostenibles (4).

Diferentes especies del género *Trichoderma* son el ingrediente activo de bioproductos comerciales que se emplean para el control de patógenos de cultivos de gran importancia económica. Entre los principales mecanismos de acción se encuentran: antibiosis, competencia, micoparasitismo e inducción de resistencia (1,5).

Este microorganismo antagonista se usó anteriormente en el manejo de enfermedades poscosecha de plátanos y bananos (*Musa* spp.) (6,7). En el caso de la Sigatoka negra, Arzate-Vega *et al.* (8) informaron resultados promisorios en casa de cultivo, cuando emplearon dos cepas nativas de México. Debido a la necesidad de identificar cepas nativas de *Trichoderma* con potencial para el control biológico de *M. fijiensis* este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *M. fijiensis* en casa de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon cepas de microorganismos, pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), que fueron aisladas de una bananera orgánica. Como patógeno se utilizó la cepa CCCh-Mf1 de *Mycosphaerella fijiensis* y como agente de control biológico *Trichoderma harzianum* CCECH-p1, cepa aislada de suelo, de rápido crecimiento *in vitro* y antagonista *in vitro* de *M. fijiensis*, así como de otros patógenos.

Para determinar el efecto de la aplicación de una cepa nativa de *T. harzianum* sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en casa de cultivo se utilizaron plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) (susceptible a la enfermedad). Estas fueron obtenidas por cultivo *in vitro* en el Centro Internacional Biotecnológico del Ecuador (CIBE), vía organogénesis, con una altura de 30 cm y tres hojas activas. Las plantas se colocaron en recipientes de 5,0 L de capacidad con sustrato compuesto por humus de lombriz, compost y turba en proporción 5:3:2 (v/v).

Se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos, cinco plantas de banano con tres hojas inoculadas por tratamiento, para un total de 15 unidades experimentales y el ensayo se repitió dos veces (n=30). Los tratamientos consistieron en la aplicación

de una suspensión acuosa de conidios de *T. harzianum* CCCh-p1 tres días después de inoculado el patógeno y un control, compuesto por plantas inoculadas con *M. fijiensis*. Se incluyeron plantas de banano sin inocular como control absoluto.

La suspensión de conidios se preparó a partir de una formulación del antagonista (polvo seco, libre de sustrato) que se obtuvo por fermentación sólida en sustrato de arroz. La concentración se ajustó a  $\sim 5 \times 10^9$  conidios.ml<sup>-1</sup> y no se incluyeron otros aditivos. Se aplicó con un aspersor manual, aproximadamente 1 ml por planta.

La preparación de la suspensión micelial de *M. fijiensis*, así como el proceso de inoculación artificial, se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Leiva-Mora *et al.* (9). La inoculación de *M. fijiensis* se realizó con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas y se utilizó gelatina 0,1% (m/v) como adherente. Se ajustó la concentración a  $\sim 5 \times 10^5$  fragmentos de micelio.ml<sup>-1</sup>.

El riego se realizó por aspersión, los tres primeros días constante para mantener la humedad relativa al 100% y, posteriormente, tres veces al día, para que estuviera por encima del 70%. La iluminación fue solar. La temperatura media durante el desarrollo del experimento fue de 26,4 °C (temperatura máxima 38,5 °C y mínima de 14,4 °C) y la humedad relativa media de 71% (humedad relativa máxima 99% y mínima de 43%).

Las evaluaciones se realizaron a partir de los diez días posteriores a la inoculación del patógeno y hasta los 64 días (cada 5 días después de los 14 días). En cada una se determinó el estado de síntomas en las tres hojas de cada planta inoculadas con *M. fijiensis*, de acuerdo con la escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (10) que incluye seis estados (Tabla 1).

En los tratamientos donde se inoculó *M. fijiensis* se describió la frecuencia de aparición de los síntomas, se determinó el periodo de incubación (tiempo que media desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas) (días) y se calcularon el índice de infección, el tiempo de evolución de los síntomas (tiempo desde que aparecen los primeros síntomas hasta la aparición de manchas grises con centro seco) (días) y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (TDE) (tiempo que media desde la inoculación hasta que aparecen manchas grises con centro seco) (días) según Carlier *et al.* (11). Además, se calculó el estado de síntomas promedio en cada evaluación.

La eficacia de la aplicación del antagonista, en el control del patógeno inoculado artificialmente, se deter-

**TABLA 1.** Escala para evaluación de estados de síntomas ocasionados por *M. fijiensis* sobre plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente en casa de cultivo (10)./ *Scale to evaluate the symptom states caused by M. fijiensis on Musa spp. artificially inoculated in a greenhouse (10)*

Estado	Descripción
0	Hoja sin síntomas.
1	Hoja con pequeñas lesiones, puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz.
2	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de color pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz.
3	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz.
4	Hoja con manchas negras (elípticas o circulares) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene tejido verde.
5	Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y pueden colgar del pseudotallo.

minó a través de la variable índice de infección a los 64 días posteriores a la inoculación del patógeno, mediante la fórmula:  $IIC - IIf / IIC \times 100$ , donde IIC representa el índice de infección en el control y IIf el índice de infección en las plantas donde se aplicó el antagonista.

Los datos de las variables: estado de síntomas promedio e índice de infección se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y las medias se compararon por la prueba de Mann Whitney para  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó que la aplicación foliar de una cepa nativa de *T. harzianum* provocó cambios en la evolución de los síntomas y en las variables epifitológicas evaluadas.

En el control inoculado, los primeros síntomas puntiformes aparecieron en el envés de las hojas a los 14 días posteriores a la inoculación (dpi) del patógeno (periodo de incubación). Sin embargo, en el tratamiento donde se aplicó la suspensión de conidios de *T. harzianum* CCCh-p1 fue a los 19 dpi. El periodo de incubación se empleó por otros autores (12) para diferenciar cultivares de *Musa* con respecto a su respuesta frente a *M. fijiensis* en casa de cultivo, pero no para evaluar productos biológicos y resultó útil en este trabajo.

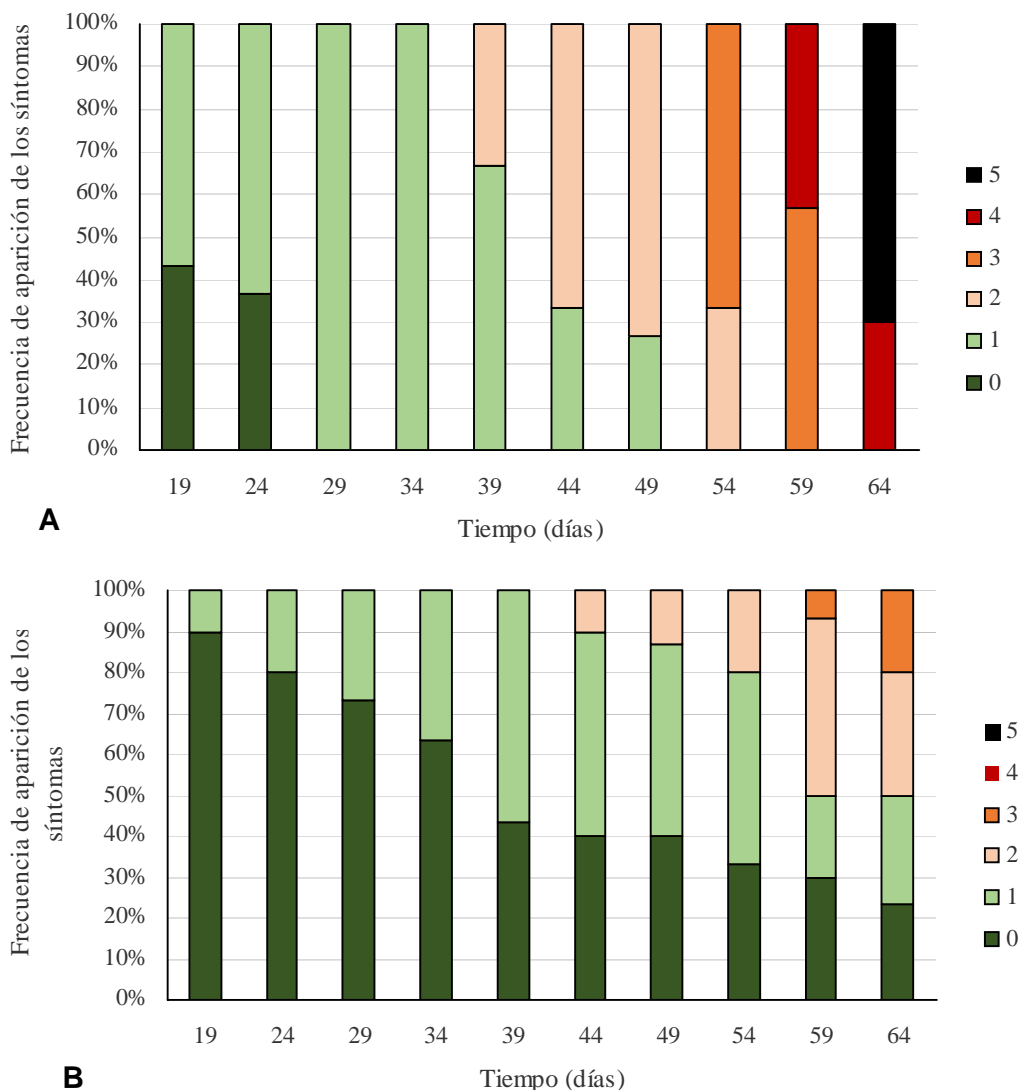
De igual forma, se observó un retraso en la aparición de los estados de síntomas y una reducción en la frecuencia de aparición de estos en el tratamiento con *T. harzianum*. En estas plantas predominaron los primeros estados de síntomas (1 y 2) hasta el día 54 después de la inoculación del patógeno y solo evolucionaron hasta el estado 3 (manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el

haz) al final del periodo, a diferencia del control inoculado donde se observó que el patógeno ocasionó síntomas hasta el estado 5 (manchas negras con centros secos grises) (Fig.1). El estado de síntomas promedio en este tratamiento fue significativamente menor con respecto al control inoculado (Fig. 2).

En correspondencia con lo anterior, la aplicación foliar de *T. harzianum* alargó el tiempo de evolución de los síntomas y el tiempo de desarrollo de la enfermedad. En las plantas donde se aplicó *T. harzianum* no se pudieron calcular estas variables al término del periodo de evaluación, ya que los síntomas no alcanzaron los estados de mancha necrótica. Además, se observó una disminución significativa de la variable índice de infección y estado de síntomas promedio (Tabla 2).

*M. fijiensis* es un hongo hemibiotrófico, que en su proceso de colonización de la hoja de banano, antes de penetrar por los estomas crece epifíticamente (3). En este ensayo, para garantizar su presencia en las hojas, se aplicó el antagonista tres días después de inoculado. Atendiendo a los resultados de la variable índice de infección, la eficacia de *T. harzianum* CCCh-p1 a los 64 días posteriores a la inoculación fue del 68,8%. Ello indicó una reducción del inóculo del patógeno por acción del antagonista, que pudiera relacionarse con los mecanismos descritos sobre competencia y micoparasitismo observados previamente *in vitro* entre estas dos especies de hongos filamentosos (13).

Los resultados de este estudio coinciden con los informes previos de Arzate-Vega *et al.* (8), quienes evaluaron varias cepas mexicanas de *Trichoderma* y comprobaron que dos de ellas redujeron la infección ocasionada por *M. fijiensis* en casa de cultivo. Además, apoya referencias positivas de la aplicación de cepas



**FIGURA 1.** Efecto de la aplicación foliar de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre la evolución de síntomas de *M. fijiensis* en plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) inoculadas artificialmente en casa de cultivo. a. Control inoculado, b. *T. harzianum* CCCh-p1./ *Effect of the foliar application of T. harzianum* CCCh-p1 on the symptom evolution of *M. fijiensis* on banana plants cv. 'Williams' (*Musa* AAA) artificially inoculated in a greenhouse. a. Inoculated control, b. *T. harzianum* CCCh-p1. n=30.

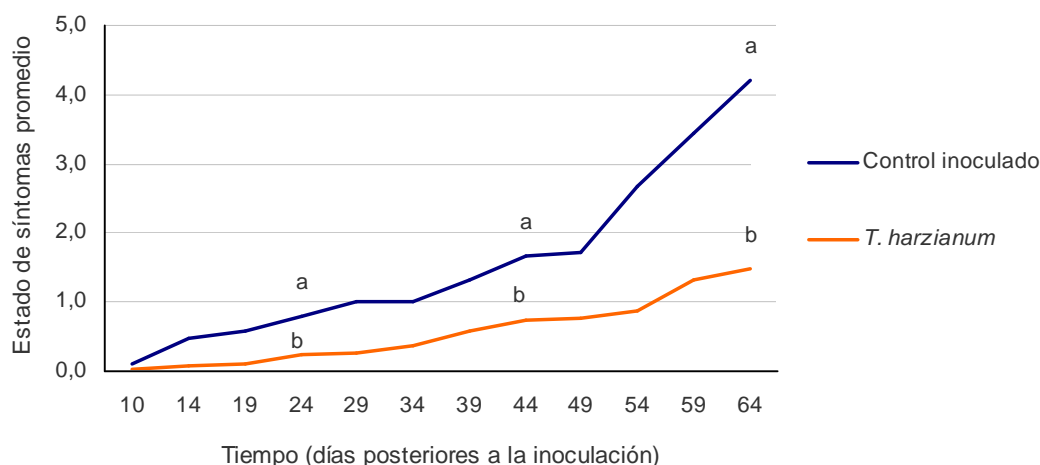
de *Trichoderma* spp. contra enfermedades foliares como las causadas por *Cercospora beticola* Sacc (14) y *Botrytis cinerea* (De Bary) Whetzel (15).

De igual forma, indicaron la capacidad de la cepa nativa (Ecuador) *T. harzianum* CCECH-p1 para reducir el inóculo de *M. fijiensis* y su potencial como antagonista de este patógeno. No obstante, se requiere profundizar en otros estudios para comprender los mecanismos involucrados en el efecto antagónico de este agente de control biológico en el patosistema *Musa-M. fijiensis* y evaluar su eficacia en campo. A partir de

ello, la efectividad del control podría ser mejorada con el diseño de un bioproducto que permita una adecuada adherencia y durabilidad del microorganismo en la hoja.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Beca otorgada por la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República de Ecuador para estudios de Doctorado. Convocatoria Abierta 2011.



**FIGURA 2.** Efecto de la aplicación foliar de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre el estado de síntomas ocasionados por *M. fijiensis* en plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) inoculadas artificialmente en casa de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney,  $p < 0,05$ . / *Effect of the foliar application of T. harzianum CCCh-p1 on M. fijiensis symptom stage on banana plants cv. 'Williams' (Musa AAA) artificially inoculated in a greenhouse. Different letters indicate significant differences between treatments according Kruskal Wallis/Mann Whitney test,  $p < 0,05$ . n=30.*

**TABLA 2.** Efecto de la aplicación de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre el desarrollo de Sigatoka negra en plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) inoculadas artificialmente en casa de cultivo. / *Effect of T. harzianum application on Black Sigatoka development on banana plants cv. 'Williams (Musa AAA) artificially inoculated in a greenhouse.*

Tratamiento	TES	TDE	Índice de infección			ESP
			24 dpi	44dpi	64 dpi	64dpi
Control inoculado	50	64	10,56a	27,78a	78,33a	0,13b
<i>T. harzianum</i> CCCh-p1	>64	>64	3,33b	11,67b	24,44b	1,47a

**Leyenda:** TES: tiempo de evolución de los síntomas, TDE: tiempo de desarrollo de la enfermedad, ESP: Estado de síntomas promedio, dpi: días posteriores a la inoculación. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para  $p < 0,05$ . n=30.

## REFERENCIAS

- Xu X-M, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*. 2011;101:1024-1031.
- Gomieroa T., Pimentel D., Paoletta MG. Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices: Conventional vs. Organic Agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2011;30(1-2):95-124.
- Marín D, Romero R, Guzmán M, Sutton TB. Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis*. 2003;87(3):208-222.
- Pérez VL. Strategies to reduce the use of agrochemicals in banana and plantain. XX Reunión Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (Bananas e Plátanos) 9 a 13 de setembro de 2013. Acorbat Brasil 2013. Fortaleza, CE.
- Harman GE, Michal Shoshit. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. En: Vurro M, Gressel J (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, 131-155. 2007 Springer.
- Alvinda DG, Natsuaki KT. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for

- biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Prot.* 2008;27:1200-1207.
7. Abolade Adebesein, Chris Adebode, Awo Ayodele. Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Plant Protection Research.* 2009;49(3):302-308.
  8. Arzate VJ, Aceves ACM, Domínguez VM, Santos OA. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2006;24(002): 98-104.
  9. Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Roque B. Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biocología Vegetal.* 2010;10(2):79-88.
  10. Alvarado-Capó Y, Leiva-Mora M, Dita Rodríguez MA, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Portal N, et al. Early evaluation of black leaf streak resistance on *Musa* spp. breeding programme by the use mycelium suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome L, Leproive P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (eds). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana: present status and outlook. Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. 2003;169-175. INIBAP, Montpellier.
  11. Carlier J, De Waele D, Escalant JV. Global evaluation of *Musa* germplasm for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases, and nematodes: In-depth evaluation. En: Vezina A, Picq C (eds.). INIBAP Technical Guidelines 6 (2002). (pp. 37-48). Montpellier: INIBAP.
  12. Abadie C, Elhadrami A, Fouré E, Carlier J. Efficiency and durability of partial resistance against black leaf streak disease. En: Jacome L, Leproive P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (eds). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana: present status and outlook. Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. 2003;161-168. INIBAP, Montpellier.
  13. 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
  14. Galletti S, Pier Luigi B, Cerato C, Marinello S, Sala E. *Trichoderma* as a potencial biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. *BioControl.* 2008;53:917-930.
  15. Elmhirst Janice F, Haselhan C, Punja ZK. Evaluation of biological control agents for control of botrytis blight of geranium and powdery mildew of rose. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 2011;33(4):499-505.

Recibido: 16-6-2014.

Aceptado: 5-2-2015.