

Control *in vitro* con *Trichoderma* spp. de hongos fitopatógenos de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.

Control *in vitro* with *Trichoderma* spp. of phytopathogenus of pineapple vitroplants (*Pineapples comosus* (L). Merr.

Aliuska Sierra Peña¹, Alexis A. Hernández Mansilla¹, José A. Díaz¹, Adianet Carr Pérez².

¹Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Ciego de Ávila.

²Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Ciudad de La Habana.

E-mail: pfa_aliuska@agronomia.unica.cu

RESUMEN. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila. El objetivo del mismo fue buscar nuevas alternativas de control biológico con especies de *Trichoderma* autóctonas de suelos de piña que presenten una mayor competitividad y antagonismo sobre agentes causales presentes en el patosistema: *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium subglutinans* (Wollenweb & Reinking) Nelson, Toussonn & Marasas. Se aislaron de suelos ferralíticos rojos dedicados a este cultivo *T. viride* Pers.: Fr., *T. atroviride* Bissett, *T. aureoviride* Rifai, estas dos últimas se informan por primera vez en los suelos dedicados al cultivo de la piña en la provincia de Ciego de Ávila. La evaluación *in vitro* reveló la capacidad hiperparasítica de los aislamientos utilizados en el biocontrol, además de ejercer un fuerte antagonismo sobre *P. nicotianae*, *R. solani* y *F. subglutinans*. Estos resultados enriquecen la tecnología del cultivo de la piña y amplían la posibilidad de la lucha biológica para su uso en sistemas productivos sostenibles y orgánicos.

Palabras clave: Control *in vitro*, hongos fitopatógenos, *Trichoderma* spp., vitroplantas de piña.

ABSTRACT. The present work was carried out in the Laboratory of Genetic Improvement of the Center of Bioplant of the University of Ciego de Ávila. The objectives were to look for new alternatives of biological control with species of autochthonous *Trichoderma* of pineapple soils that present a bigger competitiveness and antagonism has more than enough agents causal present in the patho-system: *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium subglutinans* (Wollenweb & Reinking) Nelson, Toussonn & Marasas. they were isolated of floors red ferralíticos dedicated to this cultivation *T. viride* Pers.: Fr., *T. atroviride* Bissett, *T. aureoviride* Rifai, these two last they are informed for the first time in the floors dedicated to the cultivation of the pineapple in the county of Ciego de Ávila. The evaluation in Vitro revealed the capacity hiperparasític of the isolations used in the biocontrol, besides exercising a strong antagonism it has more than enough *P. nicotianae*, *R. solani*, *F. subglutinans*. These results enrich the technology of the cultivation of the pineapple and it enlarges the possibility of the biological fight for their use in sustainable and organic productive systems.

Key words: Control *in vitro*, phytopathogenus fungi, *Trichoderma* spp., vitroplants of pineapple.

INTRODUCCIÓN

Uno de los agentes de control biológico más estudiado y evaluado es el hongo *Trichoderma*, debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en muchos sustratos, control de amplio rango de patógenos, acción como microparásito y alta competencia por alimento y espacio (Wells, 1988). Los hongos de este género ocupan actualmente un lugar

importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades, principalmente para combatir los géneros: *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pytium*, *Phytophthora* y *Fusarium*, entre otros (Stefanova *et al.*, 1999). *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos hifas, clamidosporas y conidios; éstos son activos contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. (Fernández-Larrea, 2001)

Las especies de *Trichoderma* poseen buenas posibilidades como antagonistas competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a las que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Bengston *et al.*, 1992); (Cherif *et al.*, 1990); (Mauch *et al.*, 1988); (Sivan *et al.*, 1989). Por ello, especies del género *Trichoderma* pueden ser empleadas como medio biológico para controlar hongos fitopatógenos de suelos. El objetivo de este trabajo consistió en determinar la efectividad del antagonismo de las especies de *Trichoderma* en las pruebas "in vitro" para el biocontrol de hongos fitopatógenos del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la evaluación del antagonismo de *Trichoderma* spp se tomaron colonias sembradas en medio PDA en tubos de ensayo a partir de aislamientos de cada una de las especies identificadas: *T. viride* Pers.:Fr, *T. atroviride* Bissett y *T. aureoviride* Rifai obtenidos en los análisis ejecutados. Se enfrentaron a aislamientos de *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan, *Rizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium subglutinans* (Wollenweb & Reinking), agentes causales de pudriciones de las vitropiantas de piña en fase de aclimatización procedentes del centro de biopiantas. Se realizó además la evaluación del antagonismo de dos cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en la producción a nivel nacional: (A-34 y A-53) frente a *P. Nicotianae*, *R. solani*, y *F. subglutinans*.

El procedimiento para la evaluación del antagonismo se realizó mediante una prueba de crecimiento dual (Sandoval y López, 2000): Se tomaron tres aislados uno por cada especie de *Trichoderma* a comprobar, todos procedentes de suelos ferralíticos rojos dedicados al cultivo de la piña (Empresa de Piña de Ciego de Ávila) y A-34, A-53 (identificadas como *T. harzianum*) cepas pertenecientes a la micoteca del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Estos aislamientos se enfrentaron ante aislados de *P. nicotianae*, *R. Solani* y *F. subglutinans* del Centro de Biopiantas de la Universidad de Ciego de Ávila.

Para mostrar el efecto antagonista se replicó la técnica de crecimiento dual en PDA (Sandoval y López, 2000), la cual se describe a continuación: Se tomaron ponchetes de cultivo de *P. nicotianae*, *R. solani*, *F. subglutinans* y se situaron de forma equidistante uno de los otros y del centro donde se colocó un ponchete de cada especie del hongo antagonista *Trichoderma* de los aislamientos mencionados en placas de Petri con medio agar-papa-dextrosa (PDA), para su posterior incubación en condiciones de laboratorio (25 ° C y 8-16 horas, luz-oscuridad).

Para todos los enfrentamientos se emplearon tres placas como réplicas y un testigo sembrado con cada uno de los hongos fitopatógenos analizados sin la presencia de *Trichoderma*.

Se evaluó el diámetro de las colonias en el momento en que el control alcanzó el mayor crecimiento, sus colonias cubrieron el total de la placa. Con los valores del diámetro de las colonias se obtuvo el porcentaje de inhibición mediante la fórmula de Bayer, (1966).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crec. del testigo} - \text{Crec. ante el antagonista}}{\text{Crec. del testigo}} \times 100$$

Se utilizó un ANOVA simple para establecer las diferencias entre las especies de *Trichoderma* y su correspondiente prueba de significación según test de Duncan para el establecimiento de las diferencias entre las medias (Lerch, 1977). Para su realización se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 8.0) sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo de las áreas productivas de la Empresa de piña, se identificaron las siguientes especies del género *Trichoderma*: *T. viride* Pers.:Fr., *T. atroviride* Bissett y *T. aureoviride* Rifai. Los análisis de las pruebas de antagonismo constituyen un parámetro fundamental que permite conocer la capacidad competitiva de las especies en relación específica con los hongos fitopatógenos y establecer estrategias de selección para el control de acuerdo al movimiento poblacional de los fitopatógenos en el agroecosistema una vez confirmados en los ensayos de campo. Los resultados de las

pruebas de antagonismo desarrolladas con *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aureoviride*, T. (A-34) y T. (A-53) informan el potencial como bioplaguicida a emplear en el combate de los hongos y fitopatógenos que afectan los sistemas de aclimatización de las vitroplantas de piña. Estos microorganismos son capaces de generar un elevado nivel de competitividad por el sustrato, 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 horas de sembrados los enfrentamientos patógeno/antagonista, los cuales mostraron un rápido crecimiento y alto nivel de esporulación.

La respuesta de las especies de *Trichoderma* spp. cuando se relacionan con *R. solani* difiere completamente de la respuesta de *Trichoderma* spp. con *P. nicotianae* (Tabla 1). Esta relación se

caracterizó por una fuerte acción antagonica de *T. harzianum* (A-34 y A-53), las cuales detienen el crecimiento de *R. solani* con diferencias significativas en comparación con *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aureoviride*, aspecto que corrobora la posibilidad de emplear las cepas de *T. (A-34)* y *(A-53)* en casos donde predomine la incidencia o exista un equilibrio poblacional a favor de *R. solani*. Debe destacarse que la relación de *T. harzianum-R. solani* es similar a la respuesta *T. viride-P. nicotianae* en cuanto al nivel de significación. Resultados similares en cuanto a la eficacia de *T. harzianum* sobre *R. solani* fueron obtenidos en pruebas de antagonismo al enfrentar *in vitro* aislados de este agente fitopatógeno procedente de suelos sembrados con frijol, así como una buena efectividad en parcelas de suelo ferralítico rojo infectadas con *Macrophomina phaseolina* donde el biopreparado de *Trichoderma* spp. logró un alto número de raíces no infectadas. (Sandoval y López, 2000)

Tabla 1. Antagonismo interespecífico de *Trichoderma* spp. y los hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en vitroplantas de piña

<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.		0,122020	

Medias con letras desiguales en la columna difieren estadísticamente (ANOVA, Duncan, $p < 0,05$).

Análisis microscópicos realizados sobre el hiperparasitismo que ejercen las cepas (A-34 y A-53) de *Trichoderma harzianum* en comparación con *T. viride* resultan similares, estos demuestran que la acción parasítica ocurre por fragmentación de las hifas del patógeno (*R. solani*), aunque no se observó en todos los casos, cuando se analizó la relación *T. viride-R. solani* (Sandoval y López, 2000). Esta situación puede explicar las diferencias encontradas en este trabajo referentes a la respuesta que mostraron las especies de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos de piña y *T. harzianum* hacia *R. solani*.

En cuanto a la relación *Trichoderma* spp.-*F. subglutinans*, se puede inferir que los niveles de antagonismo y competencia por parte de las especies de *Trichoderma* en general fueron inferiores a la inhibición que alcanzaron los otros fitopatógenos a prueba, sin embargo de forma particular *T. atroviride* y *T. harzianum* (A-53) se distinguieron

significativamente de los restantes. (Tabla 1). Este aspecto indica que en casos donde predomine *F. subglutinans* estas especies pueden ser empleadas de manera promisorias en comparación con las demás. La actividad inhibitoria de aislados de *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii* sobre *F. subglutinans* está catalogada, en que estas especies pueden llegar a ejercer un porcentaje de inhibición entre 10 y 85 % donde *T. harzianum*, *T. Koningil* y *T. pseudokoningii* se destacan en un primer grupo con un porcentaje de 48 a 85 % y *T. viride* se incluye en un segundo que muestra de 10 a 48 %. Se especifica que aislados de *T. harzianum* alcanzaron valores de hasta 84 % (Bonilla, 1990). Además su efecto inhibitorio es a causa de la eficiencia de dos metabolitos, constatado por Claydon *et al.* (1987) en estudios sobre los efectos de metabolitos líquidos liberados por *T. harzianum* sobre *F. subglutinans*.

En pruebas realizadas *in vitro* con diferentes especies de *Trichoderma* se pudo observar la capacidad de hiperparasitismo que muestran *T. viride* y *T. harzianum* sobre *F. subglutinans*, donde se observó que las hifas de *Trichoderma* entran en contacto íntimo con las del fitopatógeno. (Bonilla, 1990)

La actividad y efectividad de las especies de *Trichoderma* se analizaron además en función del porcentaje de inhibición de cada fitopatógeno en comparación con un testigo sin presencia del antagonista (figura 1). Este análisis coincide con los resultados anteriores donde

solo se tuvo en cuenta el crecimiento desarrollado por cada especie en particular. Los mayores porcentajes de inhibición de *P. nicotianae* se observaron con *T. viride* (50 %), *T. atroviride* y *T. aureoviride* con un 41 %. Referente a *R. solani*, los porcentajes más altos se corresponden con los alcanzados por *T. (A-34)* y *(A-53)*, con un 53 % y 58 %, respectivamente. A diferencia de *Fusarium subglutinans* donde los porcentajes más altos están en correspondencia con *T. atroviride* y *T. (A-53)* con un 48 % para ambas. Estos resultados corroboran el comportamiento resultante de los análisis anteriores.

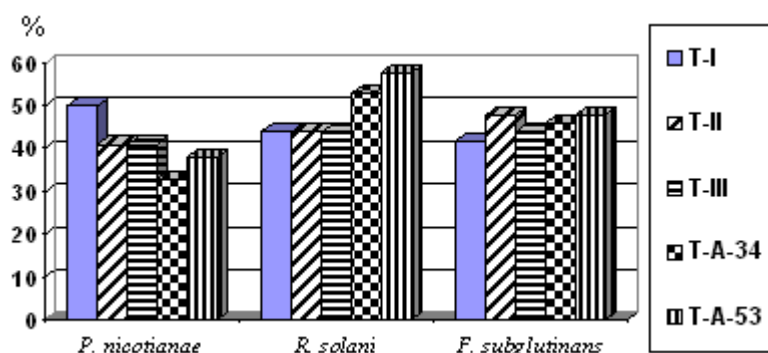


Figura 1. Porcentajes de inhibición de los hongos fitopatógenos que afectan el sistema de aclimatización de vitroplantas de piña

Todos estos resultados demuestran que el control de los hongos integrantes del patosistema de aclimatización de vitroplantas de piña puede contar con una opción más sostenible si se emplean las especies de *Trichoderma*. Permite además elaborar estrategias más efectivas y selectivas en función de los niveles poblacionales que muestren las especies fitopatógenas: de predominar *P. nicotianae* la implementación de *T. viride*, *T. atroviride* y *T. aureoviride* constituirá la variante más efectiva; a diferencia de si predomina *R. solani* sobre la cual el efecto antagónico de *T. (A-34)* y *(A-53)* es muy buenos. Y de observar un predominio de *F. subglutinans* cabe seleccionar a *T. atroviride* y *T. (A-53)* que ejercen una fuerte competencia como la opción más idónea. Así como en casos más complejos la utilización de mezclas con estas especies puede constituir una opción promisoría que evitaría incluso un efecto de selección entre los fitopatógenos que componen este patosistema. Estas reflexiones conducen al perfeccionamiento de la

estrategia de control biológico en estos sistemas de propagación biotecnológica al mismo tiempo que amplían la disposición del número de especies de *Trichoderma* para combatir las enfermedades que afectan las plántulas en adaptación y en plantaciones de piña, elementos valiosos que pueden pasar a formar parte del Sistema de Manejo Integrado para el control de hongos fitopatógenos en el cultivo de la piña.

CONCLUSIONES

1. Se informa por primera vez la presencia de *T. atroviride* y *T. aureoviride* en los suelos dedicados al cultivo de la piña en la provincia de Ciego de Ávila, de conjunto con *T. Viride*, las cuales demostraron ser eficientes antagonistas de *P. nicotianae*, con un 41 % de inhibición para las dos primeras y un 50 % para la última.
2. Las cepas de *T. harzianum* (*A-34* y *A-53*) de-

mostraron un alto nivel de antagonismo hacia *R. solani* con una inhibición de 53 a 58 %, muy similar al efecto observado de *T. atroviride* y *T. harzianum* (A-53) sobre *F. Subglutinans*, las cuales resultaron las de mayor inhibición con un 48 %.

Fitosanidad 4 (3-4): 69-72, 2000.

10. Stefanova, M.; A. Leiva, L. Larrinaga y M. F. CORONADO: "Actividad metabólica de cepas de *Tricho-derma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo", Rev. Fac. Agronomía LUZ (16): 509-516, 1999.

11. SIVAN, A. AND I. CHET: "Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*", *J. Gen Microbiol.* 135(3): 675-682, 1989.

12. WELLS, H.D.: "*Trichoderma* as abiocontrol agent", in *Biocontrol of Plant Diseases*, Vol I. K.G Mukerji and kL Garg. Eds CRC: Press, Boca, Ratón, FL, 1988.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAYER, A.G.: "Las bases para ensayos fitosanitarios", BAYER AG 16(3), Alemania, 1966.

2. BENGSTON, G.; K. W. BOEDDEKER; H. P. HANSEEN AND I. URBASCH: "Recovery of 6-pantyl-alpha pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by pervapora-tion". *Biotechnol. Tech.* 6(1): 23-26, 1992.

3. BISSETT, J. A.: "Revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification", *Can. J. Bot.* (69): 2357-2372, 1991.

4. BONILLA, M.: Utilización de especies de *Trichoderma* no controles biológico de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *Subglutinans* Wr. & Rg. En *Abacaxi E Ananas comusus* (L.) Merril. [Dissertacao de Mestrado?, Universidade Federal da Bahia, Curso de Pos-Graduacao, Em Agronomia: Cruz Daz Almas, Brasil, 1990.

5. CHERIF, M. AND N. BENHAMOU: "CYTOCHEMICAL ASPECTS of chitin breakdown during the parasite action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f spp. *radicis lycopersici*". *Phytopatology* 80 (12): 1406-1414, 1990.

6. CLAYDON, N.; M. ALLAN, AND J. R HANSON: "Anti-fungal alkalylyl pyrones of *Trichoderma harzianum*". *Trans. Br. Mycol. Soc.* (88): 503-513, 1987.

7. FERNÁNDEZ-LARREA, V. O.: Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas, INISAV, La Habana, 2001.

MAUCH, F. B. AND B. MAUCH-MANIAND: "Antifungal hidrolases in peatissue. II inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and b 1,3 gluconase", *Plant Physiol.* 88(3): 936-942, 1988.

8. RIFAI, M. A.: "A revision of the genus *Trichoderma*", *Mycol* (116): 1-56, 1969.

9. SANDOVAL, I.Y M. LÓPEZ: "Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol".

Recibido: 23/Febrero/2007

Aceptado: 11/Junio/2007