

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.)

Antagonistic activity *Trichoderma harzianum* Rifai on the causal agent of rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.)

Ernesto Juniors Pérez Torres¹, Alexander Bernal Cabrera², Pausides Milanés Virelles¹, Michel Leiva Mora³, Yurisandra Sierra Reyes¹, René Cupull Santana²

¹ Departamento de Agronomía, Universidad de Camagüey "Ignacio Agramante y Loynaz", Circunvalación Norte km 5 y medio, Camagüey, Cuba. CP 70100

² Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba. CP 54830

³ Agritechbio Cia. Ltda, Venezuela 11 28 entre Darquea y Cuba, Riobamba, Ecuador. CP 060150

E-mail: ernesto.perez@reduc.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la actividad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre el agente causal del tizón del arroz (*P. grisea*), se montó un experimento en el que se estudiaron los mecanismos de acción de competencia a través del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial de las hifas de *P. grisea* desde las 24 hasta las 240 horas y la capacidad antagónica; además, se evaluó el micoparasitismo a través de la observación al microscopio de los eventos de enrollamiento, penetración, vacuolización, lisis, así como la antibiosis mediante la observación a las 24 horas del enfrentamiento entre las hifas del hongo fitopatógeno y el agente de control biológico. Se obtuvo a las 120 horas un 100 % de inhibición del crecimiento micelial del agente causal, lo que correspondió al grado 1 de la escala de capacidad antagónica y se registra como una acción hiperparasítica sobre *P. grisea*. Se evidenció un efecto antibiótico de los metabolitos producidos por la cepa A-34 de *T. harzianum* a las 24 horas del enfrentamiento, momento donde no existió interacción entre las hifas de los microorganismos con un 14,3 % de inhibición; igualmente se observaron los eventos de micoparasitismo por enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis en las células del hongo fitopatógeno. Estos resultados demostraron la capacidad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre el agente causal del tizón del arroz (*P. grisea*).

Palabras clave: antibiosis, competencia, micoparasitismo, porcentaje de inhibición del crecimiento radial

ABSTRACT

With the objective to evaluate the antagonistic activity of *T. harzianum* (strain A-34) on the causal agent of rice blast (*P. grisea*), were developed several in vitro experiments. It was evaluated the biocontrol mechanisms such as competition through mounted the percent inhibition of radial growth of hyphae of *P. grisea* from 24 to 240 hours and the antagonistic capacity. In addition, was evaluated micoparasitism to inclination the observation of events Microscopy winding, penetration,

vacuolization, lysis, and antibiosis by observing 24 hours a confrontation between the hyphae of the phytopathogenic fungus and biological control agent. It was obtained at 120 hours 100 % inhibition of micelial growth of causal agent, what corresponded with the degree 1 of antagonistic capacity (scale) and is recorded as a hyperparasitic action on *P. grisea*. It was evidenced an antibiotic effect of metabolites produced by *T. harzianum* (strain A-34) to 24 hours of confrontation, where there was time interaction between the hyphae of microorganisms with 14,3 % inhibition, also was evidence the micoparasitism events by penetration, vacuolization and lysis in the cells of phytopathogenic fungus. These results demonstrated the ability of *T. harzianum* (strain A-34) on causal agent of rice blast (*P. grisea*).

Keywords: antibiosis, competition, micoparasitism, inhibition of the ratial growth percentage

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.), alimento básico de más de la mitad de la población mundial, ocupa el segundo lugar de importancia entre los cereales del planeta, después del trigo (*Triticum aestivum* L.) y es considerado la principal fuente de empleo, ingresos y nutrición de muchas regiones pobres y con una alimentación precaria. La diferencia entre el aumento de la producción y el rápido crecimiento de la población en los países consumidores de arroz es notable, lo que trae consigo la misión consagrada de investigadores para obtener mayores rendimientos de este grano (FAO, 2016).

Las pérdidas del rendimiento agrícola en el arroz por la incidencia de plagas desempeñan un papel determinante en las restricciones productivas de este cultivo. Dentro de este amplio grupo de agentes nocivos; el tizón del arroz, ocasionado por el hongo *Pyricularia grisea* Sacc, es considerado el causante de la enfermedad fúngica de mayor importancia económica mundialmente y para Cuba, al reducir los rendimientos agrícolas entre un 25 % y 90 %, respectivamente (Manimegalai et al., 2011; Pérez et al., 2015).

Esta es una enfermedad muy severa, debido a la variabilidad patogénica y rapidez con que el hongo vence la resistencia de la planta (Rodrigues et al., 2012). En Cuba, incide durante todas las épocas de siembra (Pérez et al., 2016). Según Cristo et al. (2012) la alta variabilidad de las variedades tolerantes o resistentes a las razas de este hongo fitopatógeno confirma que en Cuba no existen cultivares resistentes a todas, sino resistentes a determinadas razas, por lo que constituye un elemento importante a estudiar a través de diferentes métodos de fitomejoramiento genético.

Entre los métodos de control del tizón del arroz se encuentra el uso de agentes de control biológico (De Souza et al., 2017); y entre las especies más utilizadas se encuentran las del género *Trichoderma* Persoon ex Gray. Estos microorganismos ejercen mecanismos de acción directa como competencia por el sustrato y micoparasitismo e indirecta como antibiosis, que permiten establecer un control sobre las estructuras vegetativas y reproductivas de los hongos (Guédez et al., 2012). Kushwaha y Verma (2014) hacen referencia a la especie *T. harzianum* como una de las más promisorias en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos. Por lo antes expuesto la presente investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antagonica de *T. harzianum* sobre el agente causal del tizón del arroz (*P. grisea*).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Microbiología Agrícola y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV) en Villa Clara, Cuba, durante el periodo comprendido de noviembre a enero de 2012.

Los aislados monospóricos de *P. grisea* (Pg 27-09) altamente patogénicos, provinieron del cepario del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey e identificados de acuerdo con las claves micológicas correspondientes (CMI, 1983). Como antagonista se utilizó la cepa A-34 de *T. harzianum* perteneciente al Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

El inóculo de *P. grisea* se preparó con 15 días de antelación en medio de cultivo Agar Salvado

de Arroz (ASA) estéril a una temperatura de 27 ± 1 °C en oscuridad y a pH 5,5. El antagonista *T. harzianum* se obtuvo con 72 horas (h) de crecimiento en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, Biocen).

Para evaluar el efecto antagónico se tomaron discos de 10 mm de diámetro de los aislamientos del hongo fitopatígeno y del antagonista y se depositaron en placas Petri de 90 mm de diámetro, con medio de cultivo (PDA) Biocen a pH 5,5 e incubados a una temperatura de 27 ± 1 °C en oscuridad. Las siembras se realizaron por el método de cultivo dual (Bell *et al.*, 1982) y se siguieron las indicaciones de Rincón *et al.* (1992).

Se evaluaron los mecanismos de acción (competencia por espacio, micoparasitismo y antibiosis) ejercidos por *T. harzianum* cepa A-34 sobre *P. grisea*. Para el mecanismo de competencia se utilizó un diseño completamente aleatorizado, en el que se ensayaron dos tratamientos (1. Interacción *T. harzianum* – *P. grisea* y 2.-Control (*P. grisea*)), replicados cinco veces cada uno. Se midió con una regla graduada el crecimiento radial de las colonias del agente causal en interacción con el antagonista y del control a partir de las 24 h, hasta que uno de los microorganismos en enfrentamiento cubriera toda la placa.

La capacidad antagónica fue determinada mediante la escala de cinco grados de Bell *et al.* (1982) (Tabla 1) y el efecto del biocontrol sobre el crecimiento micelial del hongo fitopatígeno se calculó a través del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) mediante la fórmula de Samaniego *et al.* (1989).

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100 \quad (1)$$

donde,

R1 - crecimiento radial del control

R2 - crecimiento radial del hongo patógeno en interacción con el antagonista

Para evaluar el mecanismo de micoparasitismo se tomaron fragmentos de micelio de la zona de interacción hifal, a partir de que existiera contacto entre las hifas de *T. harzianum* y las de *P. grisea*. Se observó el tipo de interacción hifal (enrollamiento, penetración, vacuolización y/o lisis) al microscopio óptico Motic modelo BA-210 con aumento de 400x, mecanismo que fue documentado gráficamente por medio de una cámara digital Canon modelo EOS-60D.

Se evaluó la antibiosis de *T. harzianum* sobre el agente causal a través del PICR en cultivo dual a las 24 h, momento donde no existía contacto físico entre las hifas del antagonista y del hongo patógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El antagonismo de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *P. grisea* manifestó a las 96 h un PICR del hongo fitopatígeno de 93,1 % y a partir de las 120 h se alcanzó un 100 % de capacidad antagónica (Tabla 2), resultados que ubican al agente de control biológico en el grado 1 de la escala. Esto demuestra el micoparasitismo sobre el agente causal de tizón del arroz.

El mecanismo de acción de competencia a las 48 h muestra al antagonista cubriendo las tres cuartas partes de placa (A) (Figura 1), lo que evidenció el rápido crecimiento de la cepa A-34 de *T. harzianum* y la reducción del crecimiento hifal de *P. grisea*.

Las investigaciones sobre la evaluación de especies de *Trichoderma* en el control in vitro de *P. grisea* son muy escasas. Autores como

Tabla 1. Escala para la determinación de la capacidad antagónica de los microorganismos

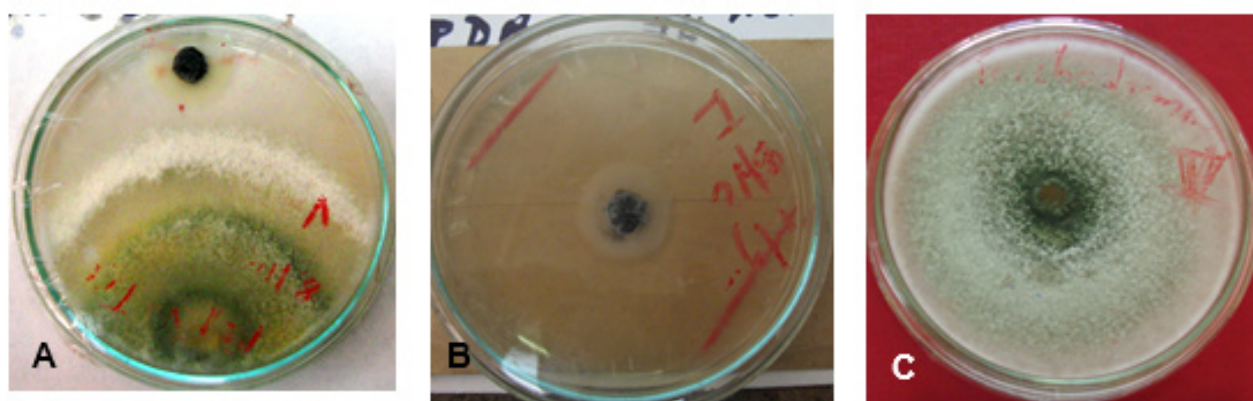
GRADO	CAPACIDAD ANTAGONICA
1	El antagonista crece completamente sobre el patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo
2	El antagonista crece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	Antagonista y patógeno colonizan la mitad de la superficie del medio de cultivo y ninguno de los dos domina sobre otro
4	El patógeno coloniza al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
5	El patógeno crece por encima del antagonista y ocupa casi toda la superficie del medio de cultivo

Tabla 2. Capacidad antagonica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *P. grisea*

Indicadores	Tiempo (h)									
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
PICR (%)*	14,3	14,6	47,9	93,1	100	100	100	100	100	100
Grado de capacidad antagonica	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Antibiosis						+				

*PICR - Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de *Pyricularia grisea*

(+): Presencia del mecanismo de acción

**Figura 1.** Cultivo dual de *T. harzianum* frente a *P. grisea* a las 48 h

A - Interacción hifal entre *T. harzianum* - *P. grisea*;

B - *P. grisea*; C - *T. harzianum*

Alarcón et al. (2005) hicieron referencia a la utilización de la cepa A-34 de *T. harzianum* en enfrentamiento con este agente patógeno, los que obtuvieron resultados alentadores aunque no calcularon el porcentaje de inhibición del agente patógeno por la fórmula de Samaniego (1989), aspecto que no permite comparar sus resultados con los obtenidos en esta investigación.

Pérez et al. (2013) refieren que al hacer alusión sobre el control de *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker y *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams y Hawkse, agentes causales de las enfermedades mancha parda y pudrición de la vaina del arroz con la cepa A-34, se evidencian los mecanismos de acción de competencia, micoparasitismo y antibiosis.

El antagonista *T. harzianum* mostró los eventos de micoparasitismo por enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis (Figura 2). En la literatura consultada no se encontraron evidencias del mecanismo de acción de

micoparasitismo por cepas cubanas o foráneas de *T. harzianum* sobre el agente causal del tizon del arroz. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Reyes (2011) y Osorio et al. (2016) al observar micoparasitismo por enrollamiento, penetración y vacuolización de aislamientos de *Trichoderma* sobre el agente causal del tizon de la vaina del arroz *Rhizoctonia solani* Kühn y con López et al. (2015) quienes comprobaron estos mismos eventos entre la interacción de *Trichoderma* spp. con *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennebert, agente causal de la pudrición de raíz conocida como pudrición texana que afecta a más de 2300 especies de plantas dicotiledóneas.

El efecto antibiótico se manifestó a las 24 h del enfrentamiento con un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de 14,3 %, cuando no existió interacción entre las hifas del agente de biocontrol y *P. grisea*. Esta respuesta puede estar dada por la presencia de sustancias

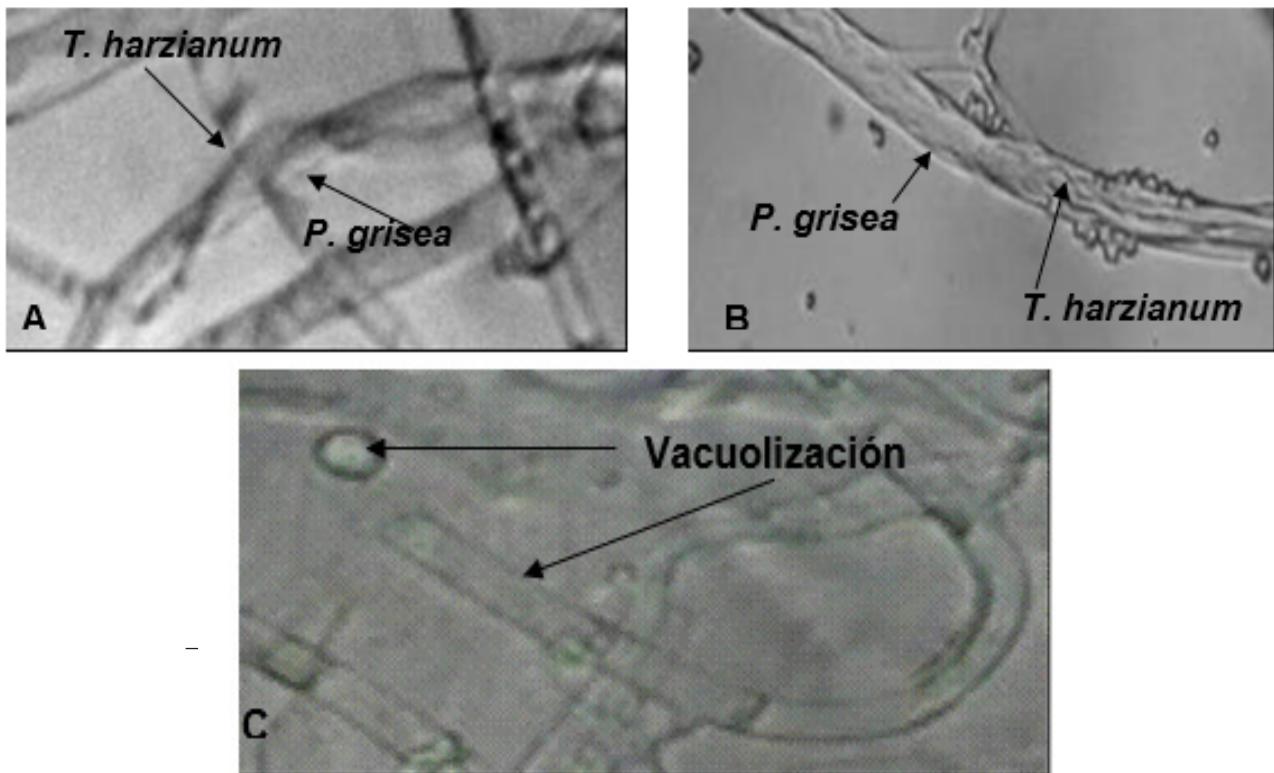


Figura 2. Micoparasitismo por enrollamiento

A – Penetración, B – vacuolización, C – vacuolización de *T. harzianum* sobre *P. grisea*

bioactivas de naturaleza volátil (no difusibles) y no volátil (difusibles) producidas por cepas de *Trichoderma* (Hamed *et al.*, 2015). Resultados que se corresponden con los de Villarroel (2014), quien hace referencia a la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de cepas de *T. harzianum* mejoradas por fusión de protoplastos en enfrentamiento con *Fusarium* spp. Ruiz (2011) indicó la presencia de sustancias bioactivas, entre la que resaltó Trichodermin como el antibiótico que inhibe la actividad ribosomal de los hongos fitopatógenos.

CONCLUSIONES

La cepa A-34 de *T. harzianum* manifestó los mecanismos de acción de competencia, micoparasitismo y antibiosis sobre el aislado de *P. grisea*.

T. harzianum (cepa A-34) mostró el mecanismo de acción de competencia con un 100 % de Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial de *P. grisea* a partir de las 120 horas de enfrentamiento, con un efecto hiperparásito de capacidad antagónica.

Se observó el mecanismo de acción de

micoparasitismo por enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre el agente causal *P. grisea*.

Se demostró el efecto antibiótico de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *P. grisea* con un Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial de 14,3 % a las 24 horas del enfrentamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- ALARCÓN, L., T. REYES, G. RODRÍGUEZ, A. PUPO. Efectividad in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad*, 9 (3): 57-60, 2005.
- BELL, K., D. WELLS, R. MARKHAM. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382, 1982.
- CRISTO, E., N.J. PÉREZ, A. ECHEVARRÍA, M.C. GONZÁLEZ, R.M. CÁRDENAS, E. VENTURA. Efectos de bajos suministros de agua en el comportamiento agronómico e industrial de nuevos genotipos de arroz (*Oryza*

- sativa) obtenidos por diferentes métodos de mejora. *Cultivos Tropicales*, 33 (1): 50-56, 2012.
- DE SOUZA, I.T., J. TAVARES, B. OBES, G. DALTROZO, A. BITTENCOURT. Expansion of the biocontrol spectrum of foliar diseases in rice with combinations of rhizobacteria. *Revista Ciência Agronômica*, 48 (3): 513-522, 2017.
- FAO. Comercios y mercados. Seguimiento del Mercado de Arroz de la FAO (SMA). 2016. En sitio web: <http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/> Consultado el 27 de junio de 2016.
- GUÉDEZ, C., L. CAÑIZALEZ, C. CASTILLO, R. OLIVAR. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32 (3): 44-49, 2012.
- HAMED, E.R., H.A. AWAD, E.A. GHAZI, N.G. EL-GAMAL, H.S. SHEHATA. *Trichoderma asperellum* isolated from salinity soil using rice straw waste as biocontrol agent for cowpea plant pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (2): 091 – 098, 2015.
- KUSHWAHA, M. Y A.K. VERMA. Antagonistic Activity of *Trichoderma* spp, (A BioControl Agent) Against Isolated and Identified Plant Pathogens. *JCBS RESEARCH PAPER*, 1 (1): 1-6, 2014.
- LÓPEZ, B.E., A.D. ARMANTA, S. HERNÁNDEZ, M.A. APODACA, J.A. SAMANIEGO, K.Y. LEYVA (*et al.*). Selección in vitro e identificación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos para el control de *Phymatotrichopsis omnivora*. *ITEA*, 111(4): 310 – 325, 2015.
- MANIMEGALAI, V., V. AMBIKAPATHY, A. PANNEERSELVAM. Antifungal potentiality of some medicinal plant extracts against *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1 (3): 77- 80, 2011.
- OSORIO, E., F.D. HERNÁNDEZ, R. RODRÍGUEZ, S.E. VARELA, B. ESTRADA, J.A. LÓPEZ. Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. Sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación y Ciencia*, 67: 5-11, 2016.
- PÉREZ, N. DE J., M.C. GONZÁLEZ, R.I. CASTRO, M. AGUILAR. Evaluating rice cultivars in different rice-producing areas from Los Palacios, Pinar del Río, to be used in breeding programs. *Cultivos Tropicales*, 37 (1): 116 – 123, 2016.
- PÉREZ, N. DE J., M.C. GONZÁLEZ, R. MÁRQUEZ, R.I. CASTRO, M. AGUILAR. Utilización de haplotipos de *Pyricularia grisea* Sacc. aislados en Cuba para la selección de cultivares de arroz resistentes a la Piriculariosis. *Cultivos Tropicales*, 36 (1): 129-133, 2015.
- PÉREZ, E.J., P. MILANÉS, A. BERNAL, M. LEIVA, G. GARCÍA, L.P. LOBATO (*et al.*). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagüeyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. *Centro Agrícola*, 40 (3), 29-36, 2013.
- REYES, Y. Aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios para el control biológico de tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn) en arroz. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Mayabeque, Cuba. 2011, 94 p.
- RINCÓN, A.A., J. LEGUIZAMÓN, G. ARBELÁEZ. Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Trichoderma* spp. en semilleros de café. *Revista Cenicafé*, 43 (3): 73-83, 1992.
- RODRIGUES, G., FONTANA, A.C., IGNACIO, M., DE CASTRO, M.D., RODRIGUES, M., DE SOUZA, R. W. Diversidad de *Magnaporthe grisea* em arroz de terras altas no sul do Estado do Tocantins, na safra 2008/09. *Revista Ceres*, 59 (1): 36-43, 2012.
- RUIZ, A. Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* – *Sclerotium rolfsii*. Tesis en opción al grado de Master en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Morelos, México. 2011, 86 p.
- SAMANIEGO, G., S. ULLOA, S. HERRERA. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 8: 86-95, 1989.

VILLARROEL, M.E. Evaluación del control biológico de *Fusarium* spp. mediante fusión de protoplastos de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* e

inducción de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Tesis en opción al título de ingeniero en Biotecnología. Sangolquí, Ecuador. 2014, 84 p.

Recibido el 4 de julio de 2016 y aceptado el 9 de junio de 2017