

## Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Mayra Acosta-Suárez<sup>1\*</sup>, Tatiana Pichardo<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Mileidy Cruz-Martín<sup>1</sup>, Eilyn Mena<sup>1</sup>, Michel Leiva-Mora<sup>1</sup>, Rosa Castro<sup>1,2</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>. \*Autora para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

<sup>2</sup>Facultad de Recursos Naturales. Departamento de Fitopatología. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana Sur km 1 ½. Riobamba. Ecuador. CP 06-01-4703.

### RESUMEN

Se evaluó el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* frente *Mycosphaerella fijiensis*, patógeno foliar de plátanos y bananos. Los ensayos se efectuaron mediante el método de cultivo dual. La competencia por espacio y nutrientes, la capacidad antagónica y las formas e intensidad del antagonismo se determinaron tomando en cuenta la invasión de la superficie de la colonia, colonización y esporulación de *T. harzianum* sobre *M. fijiensis* a los siete días de inoculación. Finalmente se evaluó el efecto de metabolitos volátiles de *T. harzianum*. Los resultados mostraron que existió antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* sobre *M. fijiensis* por competencia tanto por espacio como por los nutrientes del medio de cultivo. *Trichoderma* creció sobre la colonia del patógeno con hiperparasitismo e intensidad elevada. Además, cubrió totalmente la superficie del medio de cultivo. *T. harzianum* no inhibió el crecimiento de *M. fijiensis* por metabolitos volátiles. Se observaron daños en la integridad de la pared celular de las hifas de *M. fijiensis* y salida del contenido celular al exterior. El empleo de hongos antagonistas, pudiera contribuir al diseño de estrategias para el manejo integrado de esta enfermedad.

Palabras clave: bananos y plátanos, biocontrol, mecanismos de acción.

## *In vitro* antagonism of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

### ABSTRACT

The *in vitro* antagonism of *Trichoderma harzianum* against *Mycosphaerella fijiensis*, foliar pathogen of banana and plantain, was evaluated. The assays were performed using the dual culture method. Competition for space and nutrients, the antagonistic capacity and forms and intensity of antagonism were determined considering the invasion of the surface of the colony, colonization and sporulation of *T. harzianum* on *M. fijiensis* after seven days of inoculation. Finally, the effect of volatile metabolites of *T. harzianum* was evaluated. The results showed *in vitro* antagonism of *T. harzianum* against *M. fijiensis* by competition for space and nutrients of the culture medium. *Trichoderma* grew over the pathogen colony with hyperparasitism and high intensity. Also, it completely covered the surface of the culture medium. *T. harzianum* not inhibited the growth of *M. fijiensis* by volatile metabolites. Damage was observed in the integrity of the cell wall of *M. fijiensis* hyphae and the cell content exit. The use of antagonistic fungi, could contribute to the design of strategies for integrated management of this disease.

Key words: banana and plantain, biocontrol, mechanisms of action.

### INTRODUCCIÓN

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet es un patógeno fúngico que ocasiona la enfermedad conocida como Raya negra de la hoja o Sigatoka negra (Marín *et al.*, 2003). Aunque se han desarrollado numerosos estudios sobre la interacción entre la planta y el patógeno en aras de diseñar mejores estrategias de control y se aplican

sistemas de manejo integrado, aún sigue siendo la enfermedad más perjudicial para este cultivo (Churchill, 2010).

La aplicación de fungicidas de origen químico es el método de control más efectivo para combatir esta enfermedad, sin embargo, el costo total de su inversión para la protección de plantaciones de bananos ha sido muy

elevado. Por ello, se requieren estrategias de manejo integrado más eficientes y menos dañinas al medio ambiente entre las cuales pudiera estar el control biológico si se identifican microorganismos con alta capacidad antagonista (Guzmán, 2012).

Entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como agentes de control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma*. Se han descrito diferentes mecanismos de acción que le permite el control de los hongos fitopatógenos. Entre estos se encuentran: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno y resistencia inducida. Mientras mayor cantidad de mecanismos posea un aislamiento de *Trichoderma*, más eficiente y duradero será el control sobre el agente fitopatógeno que se desee controlar; aspectos que no poseen los plaguicidas químicos (Howell, 2003; Infante *et al.*, 2009).

Estudios previos realizados por Arzate-Vega *et al.* (2006) informaron del antagonismo *in vitro* y en casa de cultivo de dos cepas nativas (México) de *Trichoderma* frente a *M. fijiensis* aunque no se especificaron los mecanismos por los cuales se inhibía el crecimiento del patógeno. La identificación de cepas de *Trichoderma* con potencial para el control de este patógeno foliar podría contribuir al manejo de la enfermedad. Este trabajo tuvo como objetivo determinar *in vitro* la capacidad antagonista de una cepa de *Trichoderma harzianum* frente a *M. fijiensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon las cepas de *Trichoderma harzianum* CCIBP-T4 y *M. fijiensis* CCIBP-Mf83 pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP. Ambos microorganismos se enfrentaron mediante cultivo dual en placas de Petri de 90mm de diámetro con medio de cultivo agar papa y dextrosa (PDA). Se colocó en un extremo de la placa un disco de 7mm de diámetro de micelio del patógeno (tomado del crecimiento en placa de Petri inoculada con suspensión micelial en medio de cultivo PDA) y en el extremo opuesto otro disco de 7mm con micelio del antagonista con 50mm de separación entre ellos (Howell, 2003). Los cultivos se incubaron a 30°C y

oscuridad y cada 24 horas se midió el crecimiento radial del micelio de los hongos hasta los siete días de inoculados.

Además, se evaluó la capacidad antagonista de *T. harzianum* según escala propuesta por Bell *et al.* (1982) (Tabla 1) y las formas e intensidad del antagonismo por los criterios propuestos por Davet *et al.* (1981). Como formas de antagonismo se consideraron: el antagonismo físico donde las hifas de los dos hongos forman un relieve en la zona de contacto, antagonismo químico en el cual las hifas dan origen al fenómeno de lisis en la zona de contacto, antagonismo por hiperparasitismo que implica que las hifas del antagonista recubren las del parásito entrelazando o entrecruzándose con estos y ocupando el espacio vital y antagonismo físico-químico donde las hifas de los dos hongos no alcanzan a tomar contacto, dando origen a un espacio vacío. La intensidad del antagonismo se catalogó como elevado (evidente, el patógeno es inhibido en el crecimiento más del 25%), intermedio (el patógeno es inhibido en el crecimiento menos del 25%) o escasa (el patógeno no es inhibido en el crecimiento por el antagonista).

Además, se determinó el tipo de interacción entre las hifas (enrollamiento, penetración, vacuolización o lisis) mediante microcultivos (Riddel, 1950) donde se inocularon el patógeno y el antagonista de conjunto. Para las observaciones se utilizó un microscopio Olympus (400x).

Finalmente, se comprobó si el antagonismo era producido por metabolitos volátiles de *T. harzianum*. Para esto se siguió el protocolo propuesto por Dennis y Webster (1971). En una tapa de una placa Petri de 90mm de diámetro se añadió medio de cultivo PDA mezclado con una suspensión de micelio de *M. fijiensis* ( $5.0 \times 10^5$  fragmentos de micelio.  $\text{ml}^{-1}$ ). En la tapa de otra placa Petri se añadió medio de cultivo PDA con un disco de micelio de 7mm de diámetro de *Trichoderma harzianum*. Se colocaron las dos tapas una frente a la otra y se sellaron con Parafilm®. Las placas se incubaron a 28°C durante siete días. Pasado el tiempo de incubación se observó el crecimiento de la suspensión de micelios de *M. fijiensis* y se comparó con el control en ausencia del antagonista.

Tabla 1. Escala empleada para evaluar el antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* contra *M. fijiensis* a partir de lo referido por Bell *et al.* (1982).

Grado	Capacidad antagónica
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo.
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo y ningún organismo parece dominar al otro.
4	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio de cultivo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* CCIBP-T4 frente a *M. fijiensis* CCIBP-Mf83. *M. fijiensis* es un hongo filamentosos de crecimiento lento en condiciones *in vitro* y sus colonias son compactas y aterciopeladas (Meredith y Lawrence, 1969). En el cultivo dual se comprobaron estas características con muy poco cambio en el diámetro de la colonia al término del periodo de evaluación. Sin embargo, ya a los cuatro días de enfrentamiento, el antagonista alcanzó un crecimiento radial de 70mm, cubrió la totalidad del medio de cultivo y sobrecreció la colonia de *M. fijiensis* (Figura 1). Ello evidenció una mayor velocidad de crecimiento, competencia por espacio y por los nutrientes del medio de cultivo.

La capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* sobre *M. fijiensis* fue de grado 1 ya que sobrecreció completamente la colonia del patógeno y además, el micelio cubrió la superficie del medio de cultivo en toda la placa de Petri. Por otra parte, la forma del antagonismo fue por hiperparasitismo, las hifas del antagonista recubrieron las del patógeno entrelazando o entrecruzándose con este y ocuparon todo el espacio vital aunque no se observó enrollamiento ni penetración. La intensidad del antagonismo fue elevada porque se inhibió en un 100% el crecimiento de *M. fijiensis* y además, se observó esporulación *T. harzianum* sobre el micelio de *M. fijiensis* (Figura 1).

En presencia de *Trichoderma harzianum*, se observaron daños en la integridad de la pared celular de las hifas de *M. fijiensis* con ruptura y derrame del contenido celular (Figura 1). Se comprobó, además, la utilidad del cultivo dual mediante microcultivos ya que la interacción de ambos hongos filamentosos se pudo observar directamente sin necesidad de tomar muestras de la zona de contacto de las hifas. Los resultados de las observaciones microscópicas sugieren la posible presencia de enzimas extracelulares del antagonista con actividad lítica sobre las hifas del patógeno. Sobre lo anterior, diferentes investigaciones han mostrado evidencias de la producción de enzimas por especies de *Trichoderma* entre las que se mencionan quitinasas, glucanasas y proteasas que contribuyen a la degradación de las paredes celulares de los microorganismos patógenos (Neves *et al.*, 2010). Se requieren otros estudios para profundizar en este aspecto e identificar las enzimas que pueden estar presentes en esta interacción de *T. harzianum* y *M. fijiensis*.

La presencia de metabolitos volátiles producidos por la cepa de *T. harzianum* no inhibió el crecimiento de *M. fijiensis*.

Los resultados de esta investigación se corresponden con los informados por otros autores sobre el antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* sobre hongos fitopatógenos. En este sentido, Suárez *et al.* (2008) comprobaron mayor competencia por los nutrientes y el espacio vital de *T. harzianum* frente a *Fusarium solani* (Mart) y asociaron este fenómeno con la

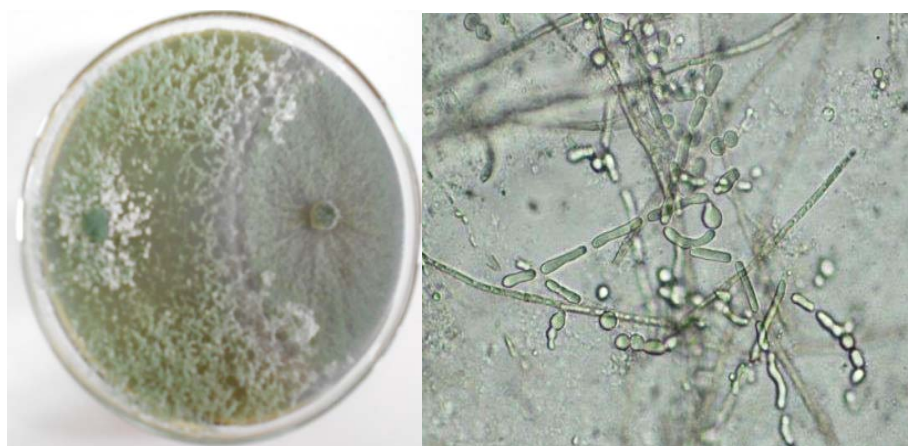


Figura 1. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* contra *M. fijiensis*. Izquierda: Cultivo dual. *T. harzianum* sobrecrece la colonia de *M. fijiensis* y desarrolla estructuras de reproducción. Derecha: Observación microscópica del efecto de *T. harzianum* sobre hifas de *M. fijiensis* en microcultivo.

velocidad de crecimiento, una mayor intensidad metabólica así como una mayor tasa de incorporación y asimilación de nutrientes. Por su parte, Osorio-Hernández *et al.* (2011) evaluaron el efecto antagonista *in vitro* de 31 cepas de *Trichoderma* frente a *Phytophthora capsici* Leonian. Los resultados indicaron que el 97% de las cepas mostraron competencia y cubrieron la placa completamente.

Se ha considerado que el antagonismo de *Trichoderma* es variable. Este depende de diferentes factores entre los cuales se encuentran la especificidad de la cepa y sus mecanismos de acción. Por tanto, pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de un patógeno que otro. Por tal motivo, la especificidad debe ser evaluada (Martínez *et al.*, 2008).

El empleo de hongos antagonistas, como *Trichoderma harzianum* pudiera contribuir al diseño de estrategias para el manejo integrado de esta enfermedad.

## CONCLUSIONES

Se comprobó la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* contra *M. fijiensis* en condiciones *in vitro*. Ello se evidenció a través de competencia tanto por el espacio vital como por los nutrientes del medio de cultivo. Además, se observó hiperparasitismo con intensidad elevada, ruptura de los extremos de las hifas y derrame del contenido celular.

## REFERENCIAS

- Arzate-Vega Juan, Alejandro Casimiro, Michel Aceves, Víctor Manuel Domínguez Márquez, Osmin Antonio Santos Eméstica (2006) 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 24(002): 98-104
- Bell DK, Wells HD, Markaman CR (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. Phytopathology 72: 379-382
- Churchill, A (2010) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology 14: 307-328
- Davet, P, Artigues M, Martin C (1981) Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique. Agronomie 10(1): 933-936
- Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 25-39
- Guzmán, M (2012) Control biológico y cultural de la Sigatoka negra. Trabajo presentado en el 45° Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Brazilian Phytopathological Society, Manaus, AM. Tropical Plant Pathology 37 (Suplemento)
- Howell C (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(1): 4-10

- Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y (2009) Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal* 24(1):14-21
- Marín D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant disease* 87(3): 208-222
- Martínez, B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños Heyker, Cruz A (2008) Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista de Protección Vegetal* 23(2):118-125
- Meredith DS, Lawrence, JS (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52(3): 459-476
- Neves M V, do Nascimento R, Stecca A, Teles F, Ferreira E, Ornelas CA, Valle de Sousa M, Henning M, Ulhoa CJ (2010) New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr Microbiol* 61: 298–305
- Osorio-Hernández E, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Castillo-Reyes F (2011) *In vitro* behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research* 6(19): 4594-460
- Riddell RW (1950) Permanent strained mycological preparation obtained by slide cultures. *Micología* (82): 265-270
- Suárez CI, Fernández RJ, Valero NO, Gómez RM, Paez AR (2008) Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) Sacc., asociado a la marchitez en Maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2): 35-43

Recibido: 19-07-2013

Aceptado: 20-09-2013