Centro Agrícola, 39(2):43-48; abril-junio, 2012
ISSN papel: 0253-5785 ISSN on line: 2072-2001
CE: 19,11 CF: cag082121850

ARTICULOS GENERALES

Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* y su efecto antagonista frente a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.

Isolation and selection of strains of *Trichoderma* and its antagonistic effect against *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp.

Roberto León Aguilar[1]; Sonia de la C. Pino Morera[2]; Benedicto Martínez Coca[3]; Ramón Liriano Gonzalez[1] y Dania Bárbara Núñez Sosa[1]

1. Univesidad de Matanzas ¨Camilo Cienfuegos¨, Matanzas, Cuba.
2. Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Matanzas, Cuba.
3. Centro Nacional Sanidad Vegetal, Autopista Nacional km 24, San José, Mayabeque, Cuba.

E-mail: roberto.leon@umcc.cu

RESUMEN. Se tomaron muestras de suelo en distintos agroecosistemas (caña y arboleda) del municipio de Colón, provincia Matanzas, donde no se había aplicado *Trichoderma* spp., con el objetivo de aislar, seleccionar morfológica, cultural y patogénicamente cepas autóctonas del territorio con capacidad antagónica. Para el aislamiento se siguió la metodología propuesta por el Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Se probó su antagonismo frente a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. mediante el cultivo dual. Se obtuvieron 126 aislados de los cuales se seleccionaron 72 que cumplían con las condiciones de crecimiento, textura de la colonia y esporulación. Se iniciaron las pruebas con seis aislamientos, tres procedentes de la superficie (Tb111, Tb211 y Tc241) y tres de la profundidad de cinco cm (Tb122, Tc112 y Tc242). Dos (Tb111 y Tc241) mostraron el mayor antagonismo frente a los hongos patógenos antes mencionados. Las características de estos aislados coincide con las descritas para *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* respectivamente.

Palabrac clave: Aislamiento, antagonismo, cepas, *Trichoderma* spp.

ABSTRACT. Soil samples were collected from different agro-ecosystems (sugar cain and forest) of municipality of Colón, province of Matanzas, where *Trichoderma spp,* was not been applied. The aim of the present work was the isolation and the morphological, cultural and pathogenic selection of autochthonous strains with antagonistic capacity. The isolation of the strain was carried out by the method suggested by the National Institute of Plant Sanitation Research. The antagonistic effect of isolated strains was tested against *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp. using a dual culture. A total of 126 strains were isolated, but only 72 achieved the growth, colony texture and sporulation conditions. The tests stared with six isolations, Tb111, Tb211 and Tc241 from the surface and Tb122, Tc112 y Tc242 obtained from 5 cm. deep into the soil. Tb111 y Tc241 showed the higher antagonistic effect against the fungi pathogens species. The characteristic of the isolated strains agree with those reported for *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum,* respectively.

Keywords: Isolation, antagonism, strains, *Trichoderma* spp.

INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de los micoparásitos, los aislamientos del género *Trichoderma* son los más conocidos y estudiados, recomendándose para el control de hongos del suelo (Stefanova, 1997). Son antagonistas que pueden expresar su acción con más de un mecanismo (Harman, 2003), constituyendo el conocimiento de su modo de acción un factor decisivo para obtener éxito cuando se pretende utilizar en el manejo de enfermedades. En los primeros estudios de *Trichoderma* spp. se observó que la actividad antagónica está relacionada con la biología de los aislamientos, lo cual se está esclareciendo con estudios recientes a nivel celular y molecular sobre la diversidad de vías y mecanismos de acción de este hongo (Harman, 2004). Es por esto que la búsqueda de cepas promisorias debe ser una tarea continua.

Desde el año 1986, el Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal comenzó una colección de cepas de *Trichoderma* spp., en la que se encuentran representadas las secciones *Pachybasium*, *Longibrachiatum* y *Trichoderma* (Pérez, 2004), aunque a partir de 1980 se comenzaron a desarrollar tecnologías artesanales para la reproducción de aislamientos de *Trichoderma.* (Fernández-Larrea, 2002)

En Cuba el control de hongos fitopatógenos a través de biopreparados de *Trichoderma*, es uno de los métodos utilizados en el manejo integrado de plagas, sin embargo el uso de cepas comerciales presenta dificultades con su persistencia en el suelo. Por esta razón se considera importante la obtención de aislamientos nativos, mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona especifica donde serán aplicados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se seleccionaron agroecosistemas de caña y arboledas del municipio de Colón, provincia de Matanzas donde no se habían aplicado medios biológicos a base de Trichoderma.

Para la toma de muestras de suelo se siguió la metodología propuesta por Bateman y Carey (1995), para la prospección de nuevas cepas de *Trichoderma*.

Las muestras se tomaron en cinco puntos de cuatro campos (alejados de los bordes a 3-4m), en forma bandera inglesa y al azar. En cada punto se colectaron de 100 a 200g de suelo, a tres profundidades: en la superficie, a cinco y a 10 cm, lo más cercano al sistema radical de las plantas, vertiéndose las muestras de suelo en bolsas de nylon, las cuales se sellaron y rotularon.

Para efectuar las diluciones seriadas utilizamos la técnica descrita por Sandoval (1992). La identificación de los aislamientos estuvo basada fundamentalmente en las características culturales y morfológicas de *Trichoderma* cultivado sobre PDA y Agar Malta, efectuándose observaciones macro y microscópicas (microcultivos) de cada aislamiento teniendo en cuenta las descripciones que aparecen en las revisiones del género hecha por Rifai (1969) y Gams y Bisset (1998).

Para determinar la efectividad biológica de los aislamientos seleccionados se realizó la prueba de antagonismo por la técnica de cultivo dual (Bell *et al*., 1982).

En placas Petri de 9 cm, con medio de cultivo PDA fueron sembrados 2 discos de 5 mm de diámetro, pertenecientes, uno, a cada aislamiento de *Trichoderma* y el otro, a los patógenos: *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium rolfsii y Fusarium* sp. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio de control de fase a 400x, para describir los tipos de interacción hifal entre el patógeno y el antagonista. Se midió el crecimiento radial diariamente con una regla graduada hasta las 96 horas, evaluándose el grado del antagonismo y se determinó la velocidad de crecimiento a las 72 horas. De la selección previa, se seleccionaron los dos mejores aislamientos de los obtenidos teniendo en cuenta: esporulación homogénea, velocidad de crecimiento (al menos 7 cm de diámetro a las 72 horas) y textura compacta de las colonias, y además por su eficacia en cultivo dual comparada con una de las cepas estándares (*Trichoderma harzianum*_Ts3 procedente de la micoteca del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal) que se utiliza en producción.

Para la identificación de los aislados se emplearon las claves taxonómicas descritas por Rifai, 1969; Gams y Bisett, 1998.

Los aislamientos fueron sembrados en medio PDA y Agar Malta, incubándose a 25ºC en condiciones de oscuridad. Se observaron las características de las colonias, además de realizar microcultivos en los que se midieron el grosor de las hifas, tamaño de los conidióforos, de las fiálides, conidios y clamidosporas.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias fueron probadas utilizando la dócima de comparación de Student Newman Weul (SNK) del paquete estadístico SPPS versión 11.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras tomadas en los agroecosistemas de caña y arboleda se obtuvieron 61 y 65 aislados respectivamente, para un total de 126. (tabla 1)

Tabla 1. Influencia de la profundidad de muestreo en el número de aislados de *Trichoderma* en los agroecosistemas seleccionados

Agroecosistemas	Profundidad (cm)			
	Superficial	Hasta 5 cm	Hasta 10 cm	Total
Caña 1	11	13	8	32
Caña 2	11	14	4	29
Arboleda 1	14	12	8	34
Arboleda 2	15	9	7	31
Total	51	48	27	126

Al comparar el número de aislamientos totales obtenidos en los agroecosistemas seleccionados a diferentes profundidades (tablas2), se observa que existe diferencia significativa, se obtuvo el mayor número de aislamientos a 5 cm de profundidad en el caso del agroecosistema caña de azúcar con 27, el cual difiere significativamente del resto de las profundidades. En el caso del agroecosistema arboleda el número de aislamientos se incrementó hasta 29 en la superficie del suelo, que difiere significativamente del resto de las profundidades estudiadas. El número de aislamientos totales no difiere significativamente entre la superficie y 5 cm, se considera que esté en correspondencia con factores tales como: humedad, radiación solar y oxigeno disponible. En el agroecosistema caña (con edad del cultivo hasta tres meses) la radiación solar y la temperatura sobre la superficie del suelo eran intensas y la humedad era baja, aspecto que limitan la germinación de los conidios y el crecimiento del hongo. A profundidad de 5 cm la radiación solar y la temperatura disminuye respecto a la superficie y el nivel de oxigeno es aceptable y la humedad no es óptima pero mayor que en la superficie. En la profundidad de 10 cm se limita el nivel de oxigeno, aspecto importante para el desarrollo de las especies de este género. Al analizar el agroecosistema arboleda el mayor número de aislamientos se obtuvo en la superficie, donde hubo radiación solar directa, temperaturas moderadas, suficiente materia orgánica en descomposición, sin embargo al aumentar la profundidad disminuyen el oxigeno, la temperatura y la materia orgánica, aumenta la humedad, aspecto que frenan el desarrollo de *Trichoderma*, como ha sido notificado por Villegas (2005) y Paéz (2006).

Tabla 2. Número de aislamientos de *Trichoderma* por profundidad en los agroecosistemas estudiados

Agroecosistemas	Profundidad (cm)		
	Superficial	Hasta 5 cm	Hasta 10 cm
Caña	22 ^{b}	27^{a}	12 ^{c}
Arboleda	29 ^{a}	21^{b}	15 ^{c}
Total	51^{a}	48^{a}	27^{b}
EE ± x	4.94	4.24	2.12

De los 126 aislamientos de *Trichoderma* purificados se seleccionaron 72, que cumplían con las condiciones de crecimiento, textura de la colonia y esporulación, los que representan el 57 %. Se decidió iniciar la evaluación con seis de los aislamientos: tres procedentes de la superficie Tb111 (*Trichoderma* arboleda, campo 1, muestra 1, profundidad 1), Tb211 (*Trichoderma* arboleda, campo 2, muestra 1, profundidad 1), Tc241(*Trichoderma* caña, campo 2, muestra 4, profundidad 1) y tres de la profundidad de cinco cm Tb122 (*Trichoderma* arboleda, campo 1, muestra 2, profundidad 2), Tc112 (*Trichoderma* caña, campo 1, muestra 1, profundidad 2) y Tc242 (*Trichoderma* caña, campo 2, muestra 4, profundidad 2).

Entre los aislamientos de *Trichoderma* obtenidos, la mayoría presentaban colonias de bordes regulares, de crecimiento rápido, entre 7-9 cm de

diámetro después de 72 – 96 horas de incubación a una temperatura de 25 ± 1ºC, micelio aéreo ralo o flocoso, frecuentemente limitado en el margen de la colonia por un halo de color blanco, lo que coincide con (Páez, 2006) que plantea, que *Trichoderma* generalmente posee un rápido crecimiento y desarrollo. Las colonias presentan inicialmente un color blanco, tornándose verdosas posteriormente, hasta finalmente adoptar un color de verde azuloso claro a verde más oscuro. Estas observaciones se corresponden con las realizadas por Rodríguez (2002).

La esporulación fue variable, desde conidios que se forman en ramilletes, diseminados por la superficie del medio, con esporulación cerca del borde de la placa Petri, hasta formando halos concéntricos. Resultados similares se han notificado por Piedra (2002), en diferentes aislados de *Trichoderma.* El reverso de la colonia al inicio es hialino y posteriormente se torna amarillo pálido hasta llegar a amarillo-ocre posterior a las 72 horas. Según Chet (1990), es posible que esta coloración se deba a la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas o proteasas.

Al realizar observaciones microscópicas del micelio se detectó la presencia de clamidosporas, aunque el número de las mismas difirió entre aislamientos por ejemplo el aislado Tb111 presentó como promedio 19 clamidosporas, mientras que el Tc241 solo 4,6. Las observaciones realizadas corresponden con las descripciones de aislamientos del género *Trichoderma* hechas por Rifai (1969) y con las secciones *Trichoderma* y *Longibrachiatum* (Gams y Bisset, 1998).

A las 72 horas todos los aislados de *Trichoderma* crecieron más de la tercera parte de la superficie de la placa, lo que los sitúa en la clase 2 de la escala de Bell *et al.* (1982), excepción hacen los aislamientos Tb111 y Tc 241 que se desarrollaron en toda la placa, lo que hizo que se ubicaran en la clase 1. Estos aislados poseen la mayor velocidad de crecimiento (1,25mm/h), pues ya a las 72 h habían cubierto toda la superficie del medio de cultivo. Estos aislamientos muestran casi el doble del crecimiento que presenta el aislado estándar (Ts3). No obstante, todos los aislamientos pueden ser considerados como antagonistas según Bell *et al*. (1982). (Tabla 3)

Los aislamientos de *Trichoderma* en el enfrentamiento a *Rhizoctonia* manifiestan una menor acción como competidores por el sustrato, que para el caso de *Sclerotium*; inclusive la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* es inferior estando relacionado con la existencia de una interacción a distancia entre los dos hongos, que origina que el efecto antagonista de *Trichoderma* sea menor (tabla 4).

Tabla 3. Enfrentamiento en cultivo dual *Trichoderma y Sclerotium rolfsii*

Tiempo (h) / *T/Scl.*	24	48	72	96
Tb111	18/0	39/0	90/1 (1,25mm/h)*	90/1
Tb122	8/0	43/5	58/19 (0,81mm/h)*	69/21
Tb211	9/2	32/14	60/14 (0,83mm/h)*	71/15
Tc112	10/1	30/8	50/30 (0,69mm/h)*	63/30
Tc241	22/0	43/0	90/1 (1,25mm/h)*	90/1
Tc242	29/17	55/30	66/39 (0,92mm/h)*	72/39
Ts3	7/3	20/13	44/34 (0,61mm/h)	47/35
Scl	0	7	58	85

*( ) Velocidad de crecimiento de *Trichoderma* en el cultivo dual.

No obstante, los mejores aislamientos en el modo de acción competencia por el sustrato a las 96 h fueron el Tb111, Tb122 y el Tb211 los que se encontraban cubriendo las dos terceras partes de la placa lo que los ubica en la case 2 según Bell *et al.* (1982), mostrando resultados superiores al Ts3. Sin embargo, de manera general, los aislamientos Tb111 y Tc241 a las 96h mostraron además, micoparasitismo al crecer y esporular abundantemente sobre este hongo patógeno.

Tabla 4. Enfrentamiento en cultivo dual *Trichoderma y Rhizoctonia*

Tiempo (h) / *T/Rhiz.*	24	48	72	96
Tb111	26/0	44/9	56/34 (0,78mm/h)*	73/41
Tb122	8/2	29/10	43/34 (0,60mm/h)*	69/35
Tb211	12/4	29/11	44/33 (0,61mm/h)*	69/35
Tc112	21/16	40/36	43/36 (0,60mm/h)*	57/36
Tc241	22/14	43/34	45/36 (0,62mm/h)*	59/36
Tc242	22/14	41/36	43/36 (0,60mm/h)*	57/36
Ts3	7/2	22/19	41/34 (0,56mm/h)*	46/34

* (mm/h) Velocidad de crecimiento de *Trichoderma* en cultivo dual.

En el enfrentamiento de los aislamientos de *Trichoderma* ante *Fusarium* se pudo observar (tabla 5), que a las 72 horas los aislados de *Trichoderma* tenían un crecimiento mayor a las dos terceras partes de la placa, por lo que estos aislamientos se ubican en la clase 2 de la escala de Bell *et al.* (1982). Sin embargo, a las 96 horas los aislamientos seleccionados Tb111 y Tc241 habían crecido en la totalidad de la placa, lo que los sitúa en la clase 1, superiores al aislado estándar Ts3. Esto es un elemento, que se debe tener en cuenta a la hora de seleccionar aislamientos de *Trichoderma* con fines de control biológico, ya que se pueden eliminar aislados, que pudieran ser buenos candidatos como biocontrol en momentos posteriores a las 72h.

Tabla 5. Enfrentamiento en cultivo dual *Trichoderma y Fusarium*

Tiempo (h) / *T/Fus.*	24	48	72	96
Tb 111	5/3	29/7	87/13 (1,21mm/h)*	90/13
Tb122	4/1	30/2	63/15 (0,87 mm/h)*	70/15
Tb211	31/5	47/6	58/28 (0,80mm/h)*	65/32
Tc112	2/0	25/5	56/12 (0,77mm/h)*	60/20
Tc241	7/0	31/12	79/16 (1,09mm/h)*	90/16
Tc242	10/3	38/14	65/18 (0,90mm/h)*	72/22
Ts3	5/2	22/12	50/24 (0,69mm/h)*	56/30
Fusarium	8	24	47	66

*( ) Velocidad de crecimiento de *Trichoderma* en cultivo dual.

Los mejores aislamientos de *Trichoderma* para los tres patógenos fueron Tb111 y Tc241, que ocasionaron micoparasitismo en los patógenos con estrangulamiento y lisis de las paredes de las hifas y con ello la desintegración y degradación de las paredes celulares y el debilitamiento o muerte de los hongos fitopatógenos.

La identificación de estos aislados mostró que el aislamiento Tb111 se caracteriza por colonias de crecimiento rápido (1,25mm/h), esporulación polvorienta, con una coloración que pasó de verde claro a verde más oscuro rápidamente, reverso de la colonia amarillo pálido a amarillo más oscuro después de las 96 horas, presenta micelio septado (1,17- 5,13 µm de ancho), los conidióforos tienen de largo de 77,72 a 193,26 µm con media de 115,63 µm, presenta fiálides en verticilios de tres, de forma ampuliforme a lageniforme que llegan a medir de 10,57 a 10,54 µm, los conidios son lisos, redondeados, de color verde pálido, de tamaño de 2,39-3,95 µm y abundantes clamidosporas con talla de 5,62-11,96 µm. Estas características concuerdan con las descritas para la especie *T. harzianum* (Gams y Bisett, 1998).

El aislamiento Tc241 presenta colonias de crecimiento rápido (1,25 mm/h), con una coloración que pasó de verde claro azuloso a verde azuloso oscuro, reverso de

la colonia amarillo pálido, el micelio septado (con ancho de 1,63-5,60 µm), conidióforos largos (76,60-172,72 µm), con cortas ramificaciones, las fiálides son lageniformes, pueden estar en solitario, pareadas y en raras ocasiones en verticilios de tres, con tamaños que van desde 17,04-23,57 x 4,67-8,87µm, además presenta fiálides terminales mayores de 14 µm con fiálides intercalares por debajo de la fiálide terminal. Los conidios son lisos, de globosos a elipsoidales con tamaño de 2,63-5,50 x 1,79-3,47 µm, presencia de clamidosporas con dimensiones de 5,86-11,96 µm. De acuerdo a esta caracterización este aislamiento coincide con *T. longibrachiatum* (Gams y Bisett, 1998).

CONCLUSIONES

1. El mayor número de aislamientos en el agroecosistema arboleda se obtuvo en la superficie y en caña hasta 5 cm de profundidad con 29 y 27 aislamientos respectivamente.

2. Se dispone de dos cepas de *Trichoderma* identificadas como *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum;* autóctonas del municipio de Colón, provincia de Matanzas.

3. Las cepas de *Trichoderma* estudiadas manifestaron un alto potencial antagonista ante *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp comparadas con el aislado estándar Ts3.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bateman, R. y Carey M.: Metodología para la toma de muestra. Boletín Técnico (2), Editado CABI, Reino Unido, 21p., 1985.

2. Bell, D. K.; Wells, H. D. y Markaman, C. R.: *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. Phytopathology 72: 379-382, 1982.

3. Chet, I.: Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. CAB International, Wallingford. U.K., p. 15-25, 1990.

4. Fernández-Larrea, Orietta.: Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad. INISAV. La Habana, Cuba. 25 p.. 2002.

5.Gams, W. y Bisset, J.: Morphology and identification of *Trichoderma*. In: C. Kubicek; G. Harman (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium* 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London, UK. p. 3-34, 1998.

6. Harman, G. E.: Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant. Dis. 84:377-393, 2004.

7. Harman, G. E. *Trichoderma harzianum, T. viridis, T. koningii, T hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales), 2003. En sitio web: http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html. Consultado: febrero, 2, 2007.

8. Páez, O. Uso Agrícola del *Trichoderma* 2006. En sitio web: http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml Consultado: abril, 19, 2007].

9. Pérez, Nilda.: Manejo Ecológico de plagas. En: *Trichoderma* spp. como agente de control biológico. Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba. p.255-284, 2004.

10. Piedra, R. Control biológico en floricultura 2002. En sitio web: http://www.infoagro.go.cr/organico/7.Conceptos_agroecologia.htm Consultado: mayo, 9, 2007.

11. Rifai, M. A.: A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Paper 1(56): p. 116, 1969.

12. Rodríguez, V. J. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofíticos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (Damping off) en plantas de tomate" 2002. En sitio web: http://72.30.186.56/search/cache?p=investigaciones+con+trichoderma [Consultado: mayo, 30, 2007].

13. Sandoval, Ileana.: Metodología para la toma de muestra en la prospección de nuevas cepas de Bacillus y hongos entomopatógenos. Ed. INISAV. La Habana, Cuba. 20 p, 1992.

14. Stefanova, Marusia.: Biopreparados de *Trichoderma*: una forma de lucha efectiva contra patógenos fúngicos del suelo. Agricultura Orgánica 3 (2 y 3): p. 22-24, 1997.

15. Villegas, M.A. *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la Agricultura Sostenible 2005. En sitio web: http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?idP%20,66,0,0,1,0 [Consultado: abril, 25, 2007].

Recibido: *27/03/2011*
Aceptado: *19/12/2011*