

Influencia del tiempo de incubación de *Trichoderma harzianum* Rifai en la actividad antifúngica del filtrado de cultivo contra *Bipolaris oryzae*

Influence of incubation time of *Trichoderma harzianum* Rifai and antifungal activity of culture filtrate against *Bipolaris oryzae*

Ernesto Juniors Pérez Torres¹, Alexander Bernal Cabrera², Pausides Milanés Virreyes³, Michel Leiva Mora⁴, Ercilla Lopes², Yurisandra Sierra Reyes¹, René Cupull².

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

2. Centro de Investigaciones Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba.

3. Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Camagüey. Avenida Carlos J. Finlay. km 2 y medio. Camagüey.

4. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba.

E-mail: fernestoj@uclv.edu.cu; ernestoj@uclv.edu.cu; ernesto.perez@reduc.edu.cu

RESUMEN. El presente trabajo se desarrolla en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, con el objetivo de evaluar la influencia del tiempo de incubación de *Trichoderma harzianum* Rifai en la actividad antifúngica del filtrado de cultivo contra *Bipolaris oryzae*. Para ello, se utilizaron erlenmeyer con caldo Czapek, con discos de micelios del hongo antagonista de 10 mm de diámetro, incubados durante 20 y 30 días a una temperatura de 28±1°C bajo oscuridad. *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) se sometió a un proceso de filtrado, comparando en cada tiempo las concentraciones de 0%, 25%, 50%, 75%, 100% (v/v). Las concentraciones que mostraron un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fueron las de 75% y 100% tanto a los 20 y 30 días de incubación. A los 20 días se obtuvieron la mayor inhibición del crecimiento micelial entre 61.7% y 64.4%, difiriendo significativamente de los obtenidos en los 30 días con 36.8% y 34.31%, respectivamente.

Palabras clave: *Bipolaris oryzae*, filtrados de cultivo, inhibición del crecimiento micelial, *Trichoderma harzianum*

ABSTRACT. This work was developed at Agriculture Microbiology laboratory in the Agriculture Faculty at Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, with the aim to evaluate the influence of incubation time of *Trichoderma harzianum* Rifai on antifungal activity of its culture filtrates against *Bipolaris oryzae*. Flask with Czapek broth was used for growing *T. harzianum*, then one disc of mycelium were incubated during 20 and 30 days at 28±1°C and dark. *Trichoderma harzianum* (strain A-34) was submitted to filtration process, and comparison were done among concentration of 0%, 25%, 50%, 75%, 100% (v/v). Major inhibition porcentaje were observed in concentrations of 75% y 100% both at 20 and 30 days of incubation. At 20 day the inhibition porcentaje was greater in comparison with 30 days.

Key words: *Bipolaris oryzae*, filtrate of cultures, inhibition of the mycelial growth, *Trichoderma harzianum*.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) a nivel mundial es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, ocupa el segundo lugar después del trigo (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2011). Este tiene gran importancia en la alimentación humana, animal y como fuente de empleo, proporcionando más calorías por hectárea que cualquier otro cereal (Infoagro, 2006).

El cultivo es sumamente afectado por varios agentes nocivos, encontrándose entre éstos un grupo importante de hongos que causan distintas enfermedades como es el caso de la mancha marrón provocada por el hongo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoemaker, la cual es una de las enfermedades más importantes en el cultivo. Esta se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial y ha sido reportada en todos los países productores de arroz (Ojeda y Subero, 2004), utilizando para su control cultivares resistentes y

Influencia del tiempo de incubación de *T. harzianum* en la actividad antifúngica contra *B. oryzae* Pérez *et al.*, 2013 fungicidas que implican la contaminación del medio ambiente. (Fonseca, 2010)

El control biológico permite la reducción del uso de los agrotóxicos (Silva y Mello, 2007). *Trichoderma*, es un hongo antagonista que vive en el suelo y puede ser utilizado en el combate de enfermedades fúngicas que causan daños económicos a los cultivos en los países tropicales. La mayoría de las especies del género *Trichoderma*, son utilizadas como agentes de control biológico para el manejo de enfermedades causadas por hongos del suelo de géneros como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas (UCLV) y en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Agropecuarias de la propia facultad.

Se utilizó un aislado virulento del hongo fitopatógeno *B. oryzae*, perteneciente a la micoteca del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey y como antagonista se empleó *T. harzianum* Rifai (cepa A-34), perteneciente al Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

Para la determinación de las condiciones de producción de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34), se utilizaron erlenmeyer con 100 mL de medio de cultivo Caldo Czapek, ajustado a pH 5.5. Posteriormente, los frascos se inocularon con discos de 10 mm de diámetro (uno por frasco) de cultivos de 48 horas de crecimiento del antagonista. La incubación se realizó durante veinte y treinta días en condiciones estáticas a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

Pasado los tiempos de incubación, los cultivos de *T. harzianum* fueron filtrados al vacío, utilizando para ello papel de filtro Whatman 1 colocados en el interior de embudos de porcelana, estos se acoplaron a quitazatos acoplados a una bomba de vacío marca SCOLI. El resultado final del filtrado fue centrifugado en tubos Vortex (VF2) con una

centrífuga (Heal Force) a 16000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 28°C , se tomó el sobrenadante y este fue filtrado con el empleo de filtros milipore a través de membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ en un flujo laminar de tipo vertical modelo FASTER Bio 60.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del tiempo de incubación de *Trichoderma harzianum* Rifai en la actividad antifúngica del filtrado de cultivo contra *Bipolaris oryzae*

centrífuga (Heal Force) a 16000 rpm durante 30 minutos a una temperatura de 28°C , se tomó el sobrenadante y este fue filtrado con el empleo de filtros milipore a través de membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ en un flujo laminar de tipo vertical modelo FASTER Bio 60.

Efecto del tiempo de incubación en la actividad Inhibitoria del crecimiento micelial de *B. oryzae* por la acción de diferentes concentraciones de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34).

Para evaluar el efecto “*in vitro*” del tiempo de incubación de diferentes concentraciones los filtrados de cultivo del hongo antagonista sobre el crecimiento micelial de *B. oryzae*, se utilizó el método de papel de filtro envenenado (Pozo, 1987). Se emplearon placas Petri de 90mm de diámetro contentivas con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), con cuatro discos del hongo patógeno de 5mm de diámetro en los extremos y en el centro un disco de papel de filtro embebido con filtrados de cultivo a las concentraciones de 0% (control), 25%, 50%, 75% y 100% con 20 réplicas para cada concentración y para cada tiempo de incubación. La incubación de las placas Petri se realizaron a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

Se midió el crecimiento micelial de las colonias del hongo fitopatógeno desde las 24 horas hasta las 168 horas, con el empleo de una regla graduada. Estas evaluaciones nos permitieron determinar el efecto de los filtrados sobre el crecimiento micelial de los fitopatógenos con relación al control. Para determinar el Porcentaje de inhibición del Crecimiento Micelial

(PICR), se utilizó la fórmula propuesta por (Samaniego *et al.*, 1989) $PICR = R1 - R2 / R1 * 100$ en el que. R1 (crecimiento radial de la colonia del patógeno ante el control con agua destilada) y R2. (Crecimiento radial del patógeno ante el tratamiento)

El procesamiento estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 20.0 para

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los 20 días de incubación en la actividad Inhibitoria del crecimiento micelial de *B. oryzae* por la acción de diferentes concentraciones de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34).

El efecto a los veinte días de incubación en la actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de *B. oryzae* por la acción de las concentraciones de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34) mostró que a las 24 horas de evaluación los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) se lograron con las concentraciones de 75% y 100%, las cuales se diferenciaron estadísticamente del resto de los tratamientos (Figura 1). En el segundo momento de evaluación (72 horas), la concentraciones de 75% y 100% continuaron mostrando los mayores PICR, al diferenciarse de las demás concentraciones, coincidiendo con las observaciones realizadas a los 120 horas de exposición de las diferentes concentraciones de

Windows, a través de un experimento factorial (Factor 1: Tiempo de incubación, Factor 2: Concentración de filtrados de la cepa A-34 de *T. harzianum*), a través de un análisis de varianza múltiple y para indicar significación estadística se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para un 5 % de significación. Para el factor tiempo de incubación se utilizó el test de Student.

filtrados. Resultados similares se obtuvieron en la inhibición del crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* a través de filtrados de *Trichoderma* de la cepa CEN252 alcanzando un PICR de 72.35% (Correa *et al.*, 2007).

Lokesha y Benagi (2007) informan que las especies de *T. harzianum* y *T. virens* (Miller, Giddens & Foster) Arx, ejercen un control eficaz “*in vitro*” de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanish, al mostrar PICR de 73,88% y 78,22%, respectivamente

Estos resultados demuestran como en la medida que se incrementaron las concentraciones de los filtrados de *T. harzianum* se logró una mayor inhibición de este agente fitopatógeno, lo cual nos indica una mayor concentración de las sustancias bioactivas excretadas por este microorganismo antagonista en el medio de cultivo. Stefanova (1999) probó aislamientos de las cepas A-34, A-53, A-86 de *Trichoderma*, en medio

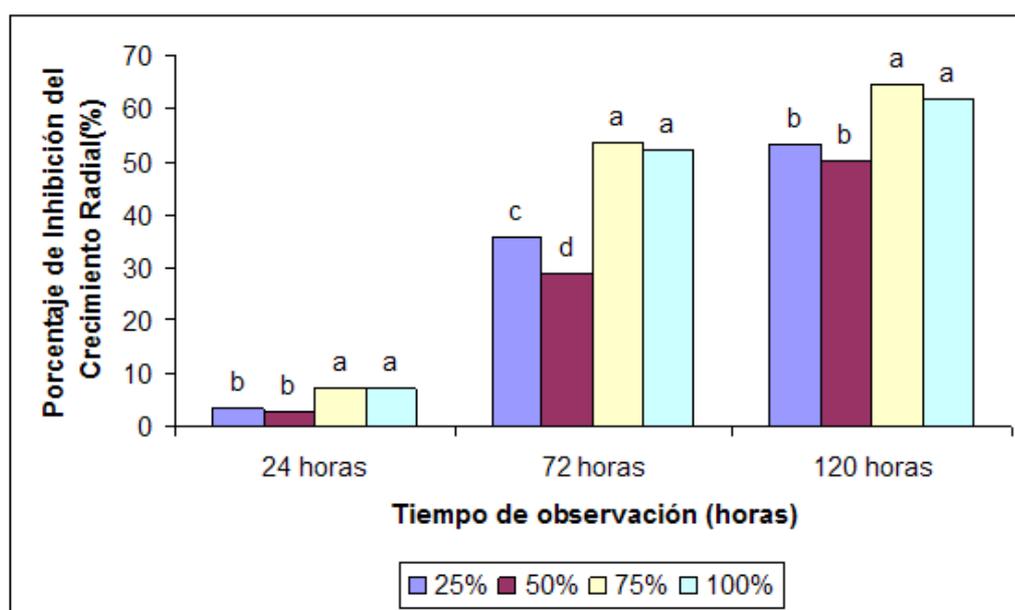


Figura 1. Efecto de los 20 días de incubación en el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento micelial de *B. oryzae* por la acción de las concentraciones del filtrado de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34)

de cultivo (PDA), demostrando limitaciones en el crecimiento de las especies fitopatógenas, por la presencia de metabolitos biológicamente activos, encontrándose en los filtrados la presencia de las enzimas líticas, carboximetilcelulasa, quitinasa y β 1,3 glucanasa mediante la hidrólisis del almidón, gelatina, carboximetilcelulosa, quitina y caseína.

Resultados similares han sido obtenidos por Pilar (2002) con efectos positivos en el resultado antagónico, probando que la producción de metabolitos activos está involucrada en el efecto antagonista de diferentes agentes nocivos. Michel *et al.*, (2005) evaluaron la producción de las enzimas quitinasas de *T. harzianum* y glucanasas de *Trichoderma koningii*, en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinans*, con un 21% y 35% respecto al control, reduciendo la producción de conidios en un 86% y 95%, respectivamente.

González (2004) demuestra en condiciones “*in vitro*” la capacidad de las cepas A-34 de *T. harzianum* y CC-66 de *T. viride* en el control de *R. solani* en el cultivo del fríjol. Martínez *et al.*, (2010) obtiene buenos resultados en el control de los agentes causales del tizón de la vaina y la pudrición de la vaina *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams y Hawks, con aislamientos de *Trichoderma* en condiciones “*in vitro*” y semicontroladas e Infante *et al.*, (2011) logran el control de *B. oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker con cepas de *T. asperellum* Samuels en condiciones de campo.

Trichoderma secreta un conjunto de enzimas hidrolíticas que causan lisis en la pared celular de los hongos, detectando en filtrados de cultivo de *T. harzianum* varias proteínas con actividad proteolítica, verificando que la proteína responsable de esta actividad fue la PRA1 (Suárez, 2004).

Efecto de los 30 días de incubación en la actividad Inhibitoria del crecimiento micelial de *B. oryzae* por la acción de diferentes concentraciones de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34).

El tiempo de incubación de 30 días mostró que a las 24 horas hubo un menor porcentaje de inhibición en la concentración al 50% del filtrado del cultivo ya que solo logró inhibir un 27,38%, demostrando que existen diferencias significativas con 75% (Figura 2). El resto de las concentraciones sobrepasó el 30% de PICR y entre estas no existió diferencias significativas. A las 72 horas hubo una disminución de las inhibiciones del filtrado en las niveles de 25% y 50%, hasta 7.83% y 12.98%, sin demostrar diferencias significativas entre ellas, mientras que las de 75% y 100% mantuvieron estables sus valores.

A las 120 horas se observó una disminución en los valores de porcentaje de inhibición para todas las concentraciones en comparación con las 72 horas, que llegó a ser menor para las concentraciones de 25% y 50%, mostrando diferencias significativas entre ellas con las de 75% y 100%.

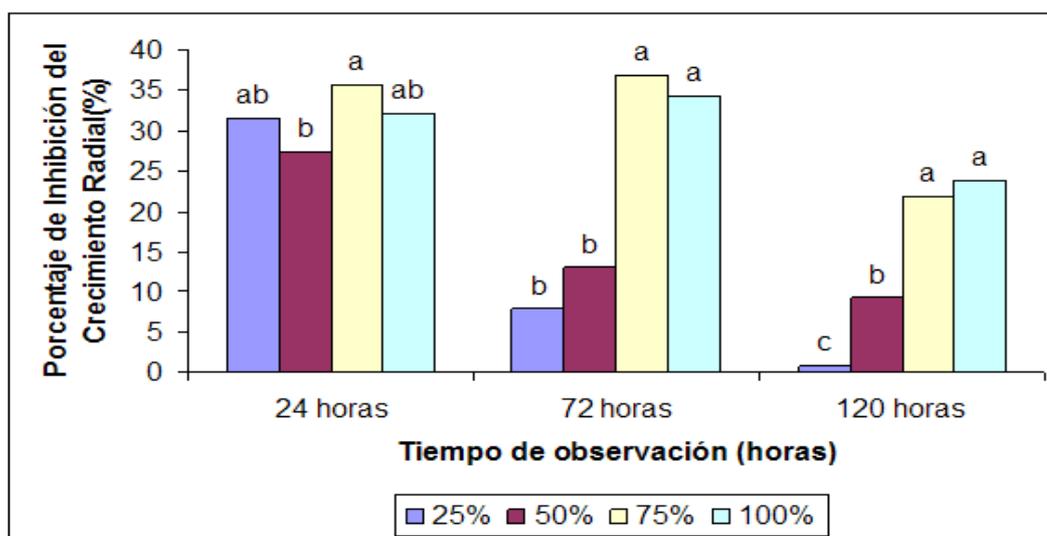


Figura 2. Efecto de los 30 días de incubación en el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial de *Bipolaris oryzae* por la acción de las concentraciones de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34)

Los valores de inhibición del crecimiento micelial de *B. oryzae* a los 20 días de incubación por la acción de los filtrados de *T. harzianum*, mostraron significación matemática con los obtenidos a los 30 días de incubación para las concentraciones de 75% y 100%.

Estos resultados coinciden con Osorio *et al.*, (2009) quienes demostraron, que *Trichoderma* produce metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos, considerando estos compuestos un grupo químicamente heterogéneo y de bajo peso molecular, secretados por algunos microorganismos que, en bajas concentraciones, demeritan el crecimiento o las actividades metabólicas de otros organismos. Espinal *et al.*, (2010) informan la eficacia de los filtrados de cultivo obtenidos de de *Trichoderma inhamatum* Veerkamp and Gams a base de la producción de metabolitos secundarios, inhibiendo el crecimiento micelial de *Botrytis fabae* Sardiña en un 52.84%.

CONCLUSIONES

1. La mayor actividad inhibitoria del crecimiento micelial de *Bipolaris oryzae* se obtiene con filtrados de cultivo de *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) producidos a los 20 días de incubación.

2. Las concentraciones más altas de los filtrados de cultivo de *T. harzianum* (75% y 100%) fueron las que mostraron mayor inhibición del crecimiento radial de *B. oryzae* tanto a los 20 como a los 30 días de incubación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arzate, J.; A. C. Michel; V. M. Domínguez y O. A. Santos.: "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(2): pp 98-104.

2. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. El cultivo del arroz. 2011.

3. Correa, Sueli; Z. Ávila, I. minaré; R. Pádua y D. A. Gomes. Cepas de *Trichoderma spp.* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*. 2007. 11(1). p 3-10.

4. Espinal, C.; M. Huanta; E. Terrazas y A. Jiménez. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 QD, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*). *BIOFARBO*. 2010. 18(1).

5. Fonseca, L.; J. Schafer; B. Correa; P. Beneddeti y A. Moura. Controle biológico da mancha parda em arroz irrigado pelo uso de Rizobacterias isoladas e combinadas. Departamento de Fitosanidade, FAEM, UFPel, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. 2010.

6. González, M. Utilización de *Trichoderma spp.* para el control de hongos patógenos de la semilla y del suelo en el cultivo del frijol. Resumen de tesis», *Fitosanidad*. 2004. 8(2):61.

7. Infante, Danay.; N. González; Y. Reyes y B. Martínez. Evaluación de la efectividad de doce cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels sobre tres fitopatógenos en condiciones de campo. *Protección Vegetal*. 2011.

8. Infoagro. El cultivo del Arroz. 2006. Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm> [24de noviembre de 2011].

9. Lokesha, N. y Benagi, I. Biological management of pigeonpea dry root rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *J. Agric. Sci. Karnataka*. 2007. 20(1): 54-56.

10. Martínez, B.; Y. Reyes; D. Infante; E. González; H. Baños; Y. Obret y A. Cruz. Selección "in vitro" de aislamientos de *Trichoderma* para el control de hongos patógenos en arroz. Cuidad de la Habana. *Fitosanidad*. 2010. 14(1).

11. Michel, A. C.; M. A. Otero; O. Rebolledo; R. Lezama y M. E. Ochoa. Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *Chapingo*. 2005. 273-278.

12. Ojeda, Adriana. y L. J. Subero. Ubicación, sobrevivencia y transmisión de *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoem., en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) .*Rev. Fac. Agron. (Maracay)*. 2004. 30: 27-37.

13. Osorio, E.; R. Rodríguez y F. D. Castillo. *Trichoderma spp.*, una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. *CIENCIACIERTA*. 2009. (17).

14. Pilar, M.; J. Roselló; R. Yacer y V. Sanchos. Actividad antagonista de *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a hongos, bacterias e insectos “*in vitro*”. Departamento de Biología Vegetal, E.U.I.T.A. Valencia, Spain; Food Technology Dept., University of Lleida, CeRTA, Lleida, Spain. 2002
15. Pozo, E. Aspectos biológicos y sensibilidad a plaguicidas de tres biorreguladores de Homópteros de cítricos y café. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba. 1987.
16. Samaniego, G.; S. Ulloa y S. Herrera. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. Rev. Mex. Fitopatología. 1989. 8:86-95.
17. Silva, Gisele. y S. C. Mello. Utilização de Trichoderma no control de fungos fitopatogênicos. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2007.
18. Stefanova Marusia. Producción y aplicación de *Trichoderma spp.* como antagonista de hongos fitopatógenos.. (1999). Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/TRICHODE.htm>
19. Suárez, B. M. Rey; P. Castillo; E. Monte y A. Llobell. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. Aplícate Microbiol Biotechnol (2004) 65: 46–55.

Recibido: 09/12/2012

Aceptado: 24/02/2013