

## **BASES CIENTÍFICO - METODOLÓGICAS PARA LA SELECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y USO DE AISLAMIENTOS DE *TRICHODERMA* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN DE LA VAINA (*RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN) EN ARROZ**

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

**AUTORES:** Benedicto Martínez Coca \*(i), Danay Infante Martínez\* (ii), Yusimy Reyes Duque\*\* (ii), Ivonne González Marquetti\* (ii), Belkis Peteira Delgado-Oramas\* (ii), Yailén Arias Vargas\* (ii), Yanisia Duarte Leal\* (ii), Ileana Miranda Cabrera\* (ii), Ariel Cruz Triana\*\*\* (ii), Esteban González Fuentes\* (ii)

**COLABORADORES:** Alfredo Herrera Estrella (Langebio, Cinvestav, México), Noreidys Fernández Gálvez \*, Noyma González Morejón\*, Heyker Lellanis Baños Díaz\*, Deiby Carrasquel Salaza (Estudiante) \*\*, Ararita C. Payajo Saldaña (Estudiante) \*\*, José García Borrego.- Cooperativa de Producción Agropecuaria Gilberto León, San Antonio de los Baños, Prov. Artemisa.

### **OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:**

\* Dpto Fitopatología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apdo.10, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

\*\* Dpto. Bio-v Fronom Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

\*\*\*Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Pinos" INC Los Pinos, Pinar del Río.

### **AUTOR PARA CORRESPONDENCIA:**

Benedicto Martínez Coca.

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA),  
Carretera de Jamaica, Apdo. 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correo: [bmcoca@censa.edu.cu](mailto:bmcoca@censa.edu.cu)

### **RESUMEN**

La caracterización integral e identificación de aislamientos es una premisa indispensable en la selección de agentes de control biológico. El presente trabajo tuvo como objetivos identificar y seleccionar a partir de la caracterización fisiológica, patogénica, morfo-cultural, bioquímica y molecular, aislamientos de *Trichoderma* como posibles agentes de control de fitopatógenos. En base a los resultados *in vitro*, en casa de malla y canteros, se seleccionaron tres aislamientos (*T. 17*, *T. 75*, *T. 78*) con alto potencial antagónico para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn. En condiciones de campo se determinó que la aplicación de estos aislamientos se debe efectuar a las posturas y/o en el primer estrés hídrico. Los aislamientos de mejor respuesta (*T. 17* y *T. 78*) mostraron una eficacia superior al 70% en el control de *R. solani* a las dosis de  $10^{11}$  conidios.ha<sup>-1</sup>. Estos presentaron variabilidad ante los factores temperatura y pH, pero de forma general, el crecimiento y la esporulación de los aislados se favorecieron

a las temperaturas de 25 y 30°C, y 30°C, respectivamente, independientemente del pH. Este último, no es un factor limitante para el desarrollo de los aislamientos. Los productos metamidfos y bispiribac-sodio fueron compatibles y azoxistrobina, cipermetrina, cihalotrin, fenoxaprop-p-etilo se consideran medianamente compatibles con los aislamientos del antagonista. De acuerdo al efecto residual de los cuatro herbicidas la aplicación de estos aislamientos (*T. 17* y *T. 78*) debe realizarse después de 7 y 14 días, posterior a la aplicación de los herbicidas, respectivamente. El aislamiento *T. 17* alcanzó los mayores niveles de actividad glucanasa, mientras que, *T. 78* mostró los más altos de quitinasa. La identificación de estos aislamientos como *T. asperellum*, basado en la similitud de las secuencias obtenidas de la amplificación del ITS de la región del ADNr y del factor de elongación (*tef1*) con las depositadas en las bases de datos *TrichoBLAST* y *TrichOkey2/ GenBank* con 100% de identidad, constituyó la primera notificación de esta especie en el país. Los aislamientos tuvieron variabilidad morfo-cultural y molecular, aspectos de gran importancia para la identificación y autenticación de los aislamientos, lo que se informó por primera vez para este género en el país. Además, estos mostraron variabilidad en su capacidad antagónica frente a *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijny, *Bipolaris. Oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker y *Fusarium. o. f. sp. lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder y H.N. Hans, destacándose con grado 1 de la escala de Bell *et al. Ta. 17* frente a *F. o. f. sp. lycopersici* y en micoparasitismo *Ta. 78* con penetración de sus hifas en la de los tres patógenos. Estos resultados constituyen la primera caracterización fisiológica, morfo-cultural, bioquímica, molecular y patogénica de forma integrada, de aislamientos autóctonos de *Trichoderma*, lo que permitió la selección y caracterización de la cepa *Ta. 78* de *T. asperellum* con alto potencial biorregulador de *R. solani* fitopatógeno en el cultivo del arroz.

## COMUNICACIÓN CORTA

### Introducción

En el mundo se conoce un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos. Los antagonistas presentan diferentes modos de acción que permiten la atenuación de daños causados por las enfermedades. *Trichoderma* es uno de los géneros más ampliamente utilizado (Fernández, 2001), por su rápido crecimiento, amplia plasticidad ecológica, efecto estimulante e inductor de resistencia sistémica en la planta ante diferentes patógenos (Harman, 2004; Cervantes, 2007). La identificación de especies, basada solo en caracteres morfológicos trajo como consecuencia errores en la notificación de las mismas. Los trabajos realizados hasta 1985 se basaron fundamentalmente, en caracteres morfológicos. Posteriormente, se profundizó en la identificación de *Trichoderma viride* Pers. ex, por vías moleculares. Lieckfeldt *et al.* (1999) encontraron que estaba constituida por dos tipos morfológicamente distintos (tipo I y II) y distinguieron al tipo I como el "verdadero" *T. viride* y al tipo II caracterizado y definido molecularmente como nueva especie, *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Entre los problemas que afectan el incremento de la producción en los cultivos están las enfermedades. En Cuba, se seleccionaron cepas nativas de *T. harzianum* (A-34, A-53) y *T. viride* (TS-3, C-66) por diferentes técnicas, y se incorporaron a diferentes manejos de cultivos para el control de enfermedades fungosas en: tabaco, hortalizas, plátano y flores, con resultados satisfactorios

(Stefanova *et al.*, 2001; Muiño *et al.*, 2006; Ferrer *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2009). En arroz, en los últimos años destaca el Tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn), considerada una de las principales enfermedades del cultivo, cuyas pérdidas pueden alcanzar hasta el 40% (MINAGRI, 2006; Anónimo, 2016). Sobre la base de estos antecedentes, con el fin disminuir la incidencia de este patógeno y el impacto al medio por aplicación de agroquímicos, se propuso como objetivos seleccionar, identificar y caracterizar patogénica, bioquímica y molecularmente aislamientos de *Trichoderma* para el control de *R. solani* en arroz.

## Desarrollo

### Ensayo en laboratorio

Cultivo Dual (Bell *et al.*, 1982) ---- Se probaron 59 aislamientos de *Trichoderma* en base a los mecanismos de acción: antibiosis, competencia por el sustrato y micoparasitismo, frente a *R. solani*.

### Criterios de selección

Ubicación de los aislamientos en la clase 1 de la escala de Bell.

El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) del patógeno en cultivo dual superior al 10% y al 60 % a las 24 y 72 horas de evaluación, respectivamente. Presencia de micoparasitismo (al menos dos formas de interacción hifal).

### Ensayo de eficacia en casa de malla y en canteros tecnificados

Se evaluó la Eficacia Técnica (ET) de 11 aislamientos seleccionados por su antagonismo *in vitro* (CD) en casa de malla y de estos, siete en cantero tecnificado, bajo los criterios que la ET fuera igual o superior al 50% para casa de malla y 90% para canteros tecnificados, y ausencia de esclerocios en las plantas analizadas para ambos casos.

### Ensayo de eficacia a campo abierto

Se probaron en campo, tres aislamientos seleccionados de la evaluación en canteros tecnificados, sobre la base de la diferencia estadística entre los tratamientos (cepas), para cada momento y/o dosis de aplicación, y que mostraran una ET superior al 60 %.

### Caracterización de aislamientos seleccionados sobre las bases:

Fisiológica (efecto de las temperaturas-pHs en el desarrollo del antagonista), compatibilidad con agroquímicos, bioquímica (actividades enzimáticas), morfo-cultural [se realizó según Rifai (1969) y Gams y Bisett (1998)], molecular (análisis por RAPD) y patogénica (antagonismo *in vitro* sobre otros patógenos).

**Identificación molecular de los aislamientos seleccionados** (comparación de las secuencias de los ITS y del factor de elongación - *tef1* con las de las bases de datos *TrichoBLAST* y *TrichOkey2/* Genbank).

## Resultados

La actividad antagónica mostró que el 93,22% de los aislamientos presentaron alta capacidad antagónica (competencia y parasitismo fundamentalmente\_ Figs. 1A y 1B),

con un porcentaje de inhibición entre 60 y 64%, y el 18% evidenció el proceso micoparasítico completo. (Referencias 1, 2 y 3)



Figura 1A Cultivo dual de *R. solani* y *Trichoderma* sp.



Figura 1B Hifa de *R. solani* parasitada por *Trichoderma* sp.

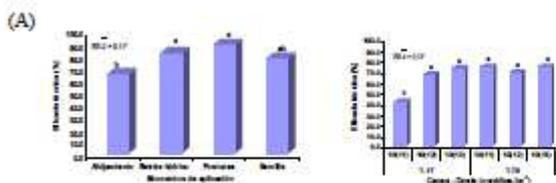
En casa de malla, siete aislamientos mostraron una eficacia técnica superior al 50% y no se observó la formación de esclerocios en el tejido vegetal. Estos se evaluaron en canteros tecnificados, resultando promisorios tres de ellos con una eficacia técnica superior al 90% para evaluar en condiciones de producción (Tabla 1). (Referencia 2).

En condiciones de producción las cepas seleccionadas tuvieron la mayor eficacia en la inoculación a las posturas y en la aplicación en el primer estrés hídrico (Figura 2A). La eficacia técnica de las aplicaciones fue superior al 70%, sobresaliendo la cepa *T. 78* a la dosis de  $10^{11}$  conidios. $ha^{-1}$  (Figura 2B). (Referencia 3 y 14).

Tabla 1 Eficacia Técnica de *Trichoderma* sp. en el control de *R. solani* en condiciones de canteros tecnificados

Aislados de <i>T.</i>	Eficacia técnica			
	Cartero 1-80 días		Cartero 2-100 días	
	$\bar{x}$ Original (%)	$\bar{x}$ Transf.	$\bar{x}$ Original (%)	$\bar{x}$ Transf.
T.17	97,0	2,95 a	92,4	2,62 ab
T.27	88,0	2,59 ab	84,4	2,38 b
T.32	76,0	2,20 b	84,0	2,36 b
T.56	86,0	2,55 ab	85,2	2,41 b
T.75	82,0	2,47 ab	96,4	2,90 a
T.78	86,0	2,51 ab	93,2	2,65 ab
T.81	74,0	2,12 b	86,0	2,41 b
ES $\bar{x}$		0,066*		0,039*

Medias con letras diferentes difieren significativamente dentro de la columna según Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



Medias con letras diferentes difieren significativamente, según Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Figura 2. E T de las cepas de *Trichoderma* sp. en diferentes momentos (A) y dosis (B) para el control de *R. solani* en condiciones de producción.

Medias con letras diferentes difieren significativamente, según Tukey ( $p \leq 0,05$ ). De forma general, el crecimiento *in vitro* de los dos aislamientos (*T. 17* y *T. 78*) es menor a 20 y 35°C, excepto para el *T. 78* a 20°C, y se favorece a 25 y 30°C. El pH (4-9) no tuvo influencia decisiva en el crecimiento de los aislamientos, excepto para algunos

puntualmente. Respecto a la esporulación, se observó que los aislamientos presentan la mayor esporulación a 30°C y en algunas variantes a 25°C para *T. 78*. Este tiene un crecimiento y esporulación aceptables para las temperaturas 20, 25 y 30°C. Los aislamientos seleccionados crecieron muy poco y no esporularon a 35°C. (Referencia 5). Los plaguicidas afectan los diferentes procesos biológicos (germinación de conidios, crecimiento y esporulación) de las cepas de forma diferenciada. Los productos metamidofos y bispiribac-sodio fueron compatibles, y azoxistrobina, cipermetrina, cihalotrin, fenoxaprop-p-etilo se consideran medianamente compatibles con los aislamientos del antagonista. La cepa *T. 78* mostró mayor compatibilidad con los productos. De acuerdo al efecto residual de los herbicidas probados, la aplicación de estos aislamientos (*T. 17* y *T. 78*) debe realizarse después de los 7 y 14 días, respectivamente, posterior a la aplicación de los herbicidas (Referencias 9 y 10). En cuanto a la actividad enzimática, el aislamiento *T. 17* alcanzó los mayores niveles de actividad glucanasa, mientras que, *T. 78* mostró los mayores valores de actividad quitinasa. (Referencias 6, 7 y 8).

Este resultado corrobora la capacidad antagónica del aislamiento *T. 78* sobre el patógeno *R. solani*, que presenta un contenido significativo de quitina en su pared. De la comparación de las secuencias de los amplicones del Espaciador Interno del Transcrito (ITS) del ADNr y del factor de elongación, con las secuencias existentes en las bases de datos *TrichoBlast/GenBank* y *TrichOkey2*, se identificaron los aislamientos como *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, especie notificada por primera vez para el país. (Referencias 11 y 12). Los aislamientos mostraron capacidad antagónica frente *C. lunata*, *B. oryzae* y *F. o. f. sp. lycopersici*, destacándose con grado 1 de la escala de Bell *et al.* el *Ta. 17* frente a *F. o. f. sp. lycopersici*. (Referencia 5). El efecto micoparasítico fue mayor para *Ta. 78* con penetración de sus hifas en la de los tres patógenos. Los resultados demuestran el potencial como agente de control biológico del aislamiento *Ta. 78*. Se logró, mediante una evaluación estructurada de los atributos biológicos relacionados con el potencial de los aislamientos como control biológico, la selección efectiva de la cepa *Ta. 78* eficaz para el control del Tizón de la vaina en arroz. (Referencias 4, 13 y 14).

#### **Variabilidad morfo-cultural y molecular de los aislamientos seleccionados**

Los aislamientos de *Trichoderma* mostraron características comunes: colonias con crecimiento circular uniforme, inicialmente blanquecinas, presencia de hifas hialinas septadas, conidióforos en penachos compactados en forma piramidal, conidios ligeramente rugosos. Presencia de clamidosporas intercalares y terminales. Estos resultados coinciden con reportes realizados por Samuels *et al.* (1999) y Sriram *et al.* (2013) para la especie. No obstante, los aislamientos presentaron diferencias en la textura y coloración de las colonias, en la morfometría de los conidios y en la arquitectura de los conidióforos.

Los datos generados por los RAPD arrojaron una evidencia más de la variabilidad intraespecífica entre las cepas *Ta. 17* y *Ta. 78*, al ubicarse en grupos diferentes (Fig. 3).

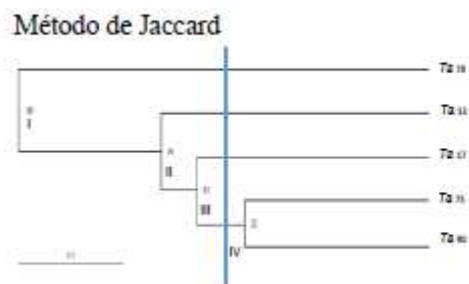


Figura 3. Agrupamiento de cepas de *T. asperellum* basado en el polimorfismo por RAPD por método de Jaccard

El iniciador OPE-14 amplificó dos bandas en *Ta.17* que lo diferencia de *Ta.78* y OPH-19, produjo una banda en *Ta.17* que lo distingue del resto de los aislados incluyendo al *Ta. 78*, diferencias que puntualizan dicha variabilidad que puede ser usada para la detección de estos.. Estos resultados tienen importancia para el diseño de cebadores específicos, para la identificación de dichas cepas, aspecto primordial para la autenticación, protección, y monitoreo de una cepa en campo. Otros autores detectaron variabilidad intraespecífica mediante iniciadores arbitrarios (Latha y Mukherjee, 2002; Hernández *et al.*, 2013). Para Cuba, este es el primer informe de variabilidad molecular de aislados de *Trichoderma* (Referencia 15).

#### **Originalidad e impacto científico:**

Por primera vez para Cuba se caracterizan de forma Integral\_ patogénico y bioquímico, aislamientos autóctonos de *Trichoderma*, lo que permitió la selección de dos cepas con alto potencial biorregulador sobre *R. solani* patógeno en arroz y otros cultivos.

Se demuestra que en el desarrollo de los aislamientos de *Trichoderma* influye más la temperatura, que el pH y que existe en los aislamientos especificidad respecto a estos factores.

Se seleccionó la cepa *Ta. 78* completamente caracterizada y con más de un 70% de eficacia técnica para el control de *R. solani* en el cultivo del arroz, con las especificaciones de momento y dosis de aplicación, así como su compatibilidad con los principales agroquímicos usados en el cultivo.

Se detectaron elevadas actividades glucanasa y quitinasa en las cepas *Ta. 17* y *Ta. 78*, respectivamente lo que esclarece los modos de acción de los antagonistas frente a los patógenos.

Se logra por primera vez para el país la identificación molecular y notificación de la especie *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg.

#### **Impacto económico:**

Se ofrece un sistema de selección de aislamientos eficaces de *Trichoderma* para el control de patógenos fúngicos.

La aplicación de dos cepas con una eficacia técnica superior al 70%, conllevará a la disminución de importaciones de fungicidas, y del impacto ambiental que genera el uso de estos productos.

La aplicación de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas en condiciones de campo, adicionalmente mostraron efecto estimulante, que se tradujo en un mayor ahijamiento en el cultivo, lo que repercute en el rendimiento del arroz.

**Publicaciones:**

1. Reyes Y, *et al.* Evaluación de la actividad antagonica de 13 aislamientos de *Trichoderma* spp. Sobre *Rhizoctonia* sp. Revista Protección Vegetal.2008; 23 (2): 112:117.
2. Martínez B, *et al.* Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Revista Protección Vegetal. 2008; 23 (2):118-125.
3. Reyes Y, *et al.* Selección de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol del Tizón de la vaina en arroz en condiciones de campo. Phytopathology. 2009. 99(6) S: 190. Grupo 1
4. Martínez B, *et al.* La selección de cepas de *Trichoderma*, un elemento importante en la concepción de un bioproducto: Estudio de casos. *Rev. Protección Veg.*, Dic 2015, vol.30, suppl.1, p.72-72. ISSN 1010- 2752.
5. Infante D, *et al.* Variabilidad fisiológica y patogénica de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Métodos en Ecología y Sistemática Vol. 10(3): 41, 2015. **Grupo I.**
6. González I, *et al.* Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico I. Actividad quitinasa. Revista Protección Vegetal. 2010; 25(1): 58-63.
7. González I, *et al.* Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico II. expresión de actividad glucanasa. Revista Protección Vegetal. 2011; 26 (1):23-30.
8. González I, *et al.* Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. Biotecnología Aplicada 2012; 29:12-16. **Grupo I.**
9. Reyes Y, *et al.* Compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz. *Rev. Prot. Veg.* Vol. 27 No. 1 (2012): 45-53.
10. Reyes Y, *et al.* Efecto de algunos plaguicidas sobre el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. *Rev. Protección Veg.*, Dic 2015, vol.30, suppl.1, p.78-78.
11. Martínez B, *et al.* About the identification of some *Trichoderma* isolates reported in Revista de Protección Vegetal. Revista Protección Vegetal. 2010; 25(2): 135.
12. Infante D, *et al.* Identificación Molecular y Caracterización Patogénica, de trece aislamientos de *Trichoderma* sp. Biotecnología Aplicada 2013; 30:23-28. **Grupo I.**
13. Cruz A, *et al.* *Trichoderma asperellum* en el manejo de hongos fitopatógenos en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L.). *Rev. Protección Veg.* vol.30 suppl.1 La Habana dic. 2015. Resumen del segundo Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria (SISA).
14. Martínez B, *et al.* *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.* Vol. 28 No. 1 (2013): 1-11.
15. Infante D, *et al.* Morphological and genetic variability of isolates of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. *Academia Journal of Microbiology Research* (ISSN 2315-7771) Article ID: AJMR-16-119 DOI: 10.15413/ajmr.2016.0119.