

Actividad antagónica de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani* Sor.

Antagonic activity of *Trichoderma* sp. isolated from a soil of the Granma province, Cuba against *Alternaria solani* Sor.

C. H. González Salgado.¹, A. Puertas Arias.¹, M. Fonseca Flores.¹, E. Suárez Soto.¹ y R. Blaya Gómez.¹

Resumen

Se estudió la actividad antagónica de una cepa de *Trichoderma* sp. nativa, aislada de un suelo en la provincia Granma, Cuba y la comercial *Trichoderma harzianum* R. (A-34) frente a tres aislados de *Alternaria solani* Sor. sobre la base del crecimiento micelial y el efecto metabólico. Las cepas de *Trichoderma* mostraron un alto efecto antagónico frente a *A. solani*, tanto en forma micelial como metabólica, destacándose la cepa nativa que ejerció un efecto antagónico e hiperparásitico significativamente superior ($P \leq 0,05$) a la comercial.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Alternaria solani*, hiperparasitismo, antagonismo.

Abstract

The antagonic activity of a native strain of *Trichoderma* sp. isolated from a soil of the Granma province, Cuba and the commercial strain *Trichoderma harzianum* R. (A-34) against three isolated of *Alternaria solani* Sor., was studied, based on micelial growth and metabolic effect. The strains of *Trichoderma* showed a high antagonic effect both micelial and metabolic form against *A. solani* strains, but the native strain showed an antagonic and hyperparasitic effect significantly ($p \leq 0.05$) higher than the commercial strain.

Key words: *Trichoderma*, *Alternaria solani*, hyperparasitism, antagonism.

Recibido el 30-10-1998 ● Aceptado el 18-12-1998

I. I.I.A. "Jorge Dimitrov", G.P. 21 40, Bayamo 85 100, Granma, Cuba.

Introducción

El conocimiento de los tipos de antagonismos de hongos biocontrolados es necesario para desarrollar una buena estrategia en la implantación de una agricultura sostenible (7).

La actividad antagonista de *Trichoderma harzianum* R. frente a determinadas especies fungosas fitopatógenas de importancia agrícola, ha sido estudiada extensivamente en diferentes partes del mundo (3, 8), con el propósito de evaluar en condiciones controladas su potencial fungicida y a la vez recomendar las de mejor comportamiento, para pruebas de campo.

En Cuba el control de hongos fitopatógenos a través del empleo de

biopreparados a base de *Trichoderma*, es uno de los métodos utilizados en el manejo integrado de plagas de solanáceas, 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 específica donde serán aplicados.

Este trabajo presenta los resultados obtenidos al comparar la actividad antagonista de una cepa de *Trichoderma* sp. aislada de un suelo de la provincia Granma y la cepa comercial *Trichoderma harzianum* R. (A-34) frente a *Alternaria solani* Sor.

Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en el Departamento de Sanidad Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", siguiendo un arreglo completamente aleatorizado con cinco repeticiones.

Procedencia de las cepas. El aislado *Trichoderma* sp. Dimitrov II se obtuvo en placas Petri con Agar Patata Dextrosa (APD) a partir de diluciones 10^{-4} de suelo "Vertisol", tomado a una profundidad de 0-15 cm en la zona de Jiguaní, provincia Granma, Cuba. La identificación del género se realizó mediante el estudio morfológico de las colonias desarrolladas sobre Agar-Malta (MA) y Agar-Czapeck y de las conidias, fálides y conidióforos, según la clave

de Rifai (9).

La cepa de *Trichoderma harzianum* R. (A-34) procede del Instituto Nacional de Sanidad Vegetal de Cuba y es utilizada masivamente para el control de enfermedades fungosas en todo el país.

Las cepas de *A. solani* CENSA-18 y CENSA-45 fueron aisladas y clasificadas por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de Cuba y la cepa Dimitrov-1, se obtuvo mediante el cultivo monospórico de esporas encontradas sobre hojas enfermas de la variedad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Lignon, las cuales fueron sembradas sobre medio de cultivo APD y se realizaron las pruebas de Koch (4).

Masa seca de los antagonistas. Se sembró micelio de cada cepa de *Trichoderma* en 50 mL de caldo de papa dextrosa (CPD) y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 días. Posteriormente se filtraron y se mantuvieron en una desecadora por tres días a 30°C y luego se determinó la masa seca de cinco colonias por tratamiento.

Dinámica del crecimiento de las colonias. Las cepas *Trichoderma harzianum* R.(A-34), *Trichoderma Dimitrov II*, *A. solani* CENSA-18, *A. solani* CENSA-45 y *A. solani* Dimitrov-1 se sembraron en cinco placas Petri de 80x15 mm con 20 mL de APD con pH 6,0 y se incubaron a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. El diámetro de las colonias se midió cada 24 h, durante tres días consecutivos; este diámetro se ajustó al porcentaje de área ocupada (PAO) por las mismas, conociéndose que el área total de la placa Petri es de 5 024 mm², la cual equivale al 100%.

Interacción patógeno-antagonista. Se sembró en placa Petri sobre medio de cultivo APD un disco de micelio (6 mm de diámetro) del patógeno diametralmente opuesto a uno del antagonista, considerándose cinco repeticiones por tratamiento, con un total de seis tratamientos. Se determinó el área ocupada por cada especie, según el procedimiento anterior. El cálculo del área se realizó cada 24 h, hasta que se produjo el enfrentamiento.

Efecto de los metabolitos antagonistas sobre el desarrollo de los patógenos. Ambos aislados de *Trichoderma* sp. se cultivaron en CPD durante 15 días a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, se filtraron y el filtrado obtenido se enriqueció con 5 g de dextrosa, se vertieron 50 mL en erlenmeyers de 100 mL y se sembraron las cepas patógenas. Como control se consideró el crecimiento en CPD. Los cultivos se mantuvieron durante 15 días a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, posteriormente se filtraron y se determinó la masa seca de cinco colonias por cada tratamiento.

Para el procesamiento estadístico de los datos procedentes de los ensayos: masa seca de los antagonistas, dinámica del crecimiento de las colonias y efecto de los metabolitos antagonistas sobre el desarrollo de los patógenos, se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple y las medias se compararon por la prueba de rangos múltiples de Duncan para $P \leq 0,05$, mientras los valores pertenecientes a la interacción antagonista-patógeno se procesaron a través de un análisis de varianza de clasificación triple y las medias fueron comparadas mediante la prueba de comparaciones múltiple de media de Newman Keuls. Los valores correspondientes al porcentaje de área ocupada se transformaron mediante la ecuación $Y_1 = \arcsin \sqrt{Y}$. Todos estos cálculos se realizaron a través del paquete estadístico profesional computarizado, Complete Statistical System (CSS).

Resultados y discusión

Masa seca de los antagonistas. La masa seca del micelio (cuadro 1) de las cepas antagonistas estudiadas no mostró diferencias significativas, lo que demuestra que alcanzaron un nivel de desarrollo similar bajo las condiciones experimentadas.

Dinámica del crecimiento de las colonias. El PAO para las cepas antagonistas fue significativamente superior al de las cepas patógenas en las tres mediciones realizadas (cuadro 2), sin embargo, no se manifestaron diferencias significativas entre ellas. *Trichoderma* mostró una velocidad de crecimiento mayor a las cepas patógenas durante todo el tiempo de ejecución del experimento. Resultados similares obtuvieron González *et al.*, (5) con las mismas cepas de *Trichoderma* frente a *F. oxysporum*.

Interacción antagonista-patógeno. El análisis de varianza de clasificación triple mostró diferencias significativas para la interacción de los tres factores considerados (tiempo de incubación, cepas antagonistas, cepas patógenas), (cuadro 3), destacándose que a las 72 h de incubación las dos cepas antagonistas desarrollaron el mayor PAO. La cepa *Trichoderma* sp. Dimitrov II mostró los mayores valores del PAO, con diferencias significativas del resto, lo que señala una mayor habilidad con relación a la comercial para competir por un sustrato común frente a las cepas patógenas; esto unido al mayor efecto hiperparasítico

mostrado por la misma, permite señalar que ella ejerce un mejor control sobre los patógenos estudiados. Otros autores (2) encontraron que el género *Trichoderma* presentó un crecimiento más rápido y vigoroso que el patógeno *A. solani*, así como, que provocó inhibición del crecimiento micelial al compartir un sustrato común, lo cual puede deberse, entre otros factores, a que *Trichoderma* produce antibióticos y enzimas: (Quitinasa, 1.3-glucanasa y Proteasa) degradadoras de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo (2, 6).

Efecto de los metabolitos antagonistas sobre el desarrollo de los patógenos. El desarrollo de las colonias de las cepas patógenas (*A. solani* CENSA-18, *A. solani* CENSA-45 y *A. solani* Dimitrov-1) determinado por el peso de la masa seca del micelio (cuadro 4) fue significativamente mayor en el testigo (CPD) que cuando se cultivaron en los filtrados de *T. harzianum* A-34 y *Trichoderma* sp. Dimitrov II, lográndose una disminución del peso micelial de las cepas patógenas entre 12-14 % en presencia de los metabolitos de *Trichoderma*. Además, las cepas patógenas mostraron un crecimiento más rápido y vigoroso en CPD, ocupando toda la superficie del medio en 10 días. Resultados similares obtuvieron Alfonso y Cruz (1) con *Trichoderma* spp. frente a *Collectotricum falcatum*.

Cuadro 1. Masa seca (g) de las cepas de *Trichoderma* en CPD.

Variante	Masa seca (g)
<i>T. harzianum</i> (A-34)	2,41 ^a
<i>Trichoderma</i> sp. Dimitrov II	2,55 ^a
CV.	2%

Letras iguales dentro de la misma columna denotan la no existencia de diferencias significativas para $P \leq 0,05$.

Cuadro 2. Medias originales del porcentaje de área ocupada por los microorganismos a diferentes tiempos de incubación.

Microorganismo	Porcentaje de área ocupada (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
<i>T. harzianum</i> A-34	11,66 ^a	88,93 ^a	100,00 ^a
<i>Trichoderma</i> sp. Dimitrov II	10,82 ^a	73,75 ^a	100,00 ^a
<i>A. solani</i> CENSA-18	1,17 ^b	5,29 ^b	10,80 ^b
<i>A. solani</i> CENSA-45	1,18 ^b	5,09 ^b	10,58 ^b
<i>A. solani</i> Dimitrov-1	1,26 ^b	2,90 ^b	4,66 ^b
CV.	11%	2%	6%

Letras desiguales dentro de la misma columna denotan diferencias significativas para $P \leq 0,05$.

Cuadro 3. Medias originales del porcentaje de área ocupada por los microorganismos durante la interacción antagonista-patógeno, a diferentes tiempos de incubación.

Tiempo de incubación	Antagonista	Patógeno	PAO
24 horas	<i>T. harzianum</i> (A-34)	<i>A. solani</i> CENSA-18	14,31 ^e
		<i>A. solani</i> CENSA-45	13,33 ^e
		<i>A. solani</i> Dimitrov 1	12,92 ^e
		<i>A. solani</i> CENSA-18	14,31 ^e
48 horas	<i>Trichoderma</i> sp. II	<i>A. solani</i> CENSA-45	12,41 ^e
		<i>A. solani</i> Dimitrov 1	12,22 ^e
		<i>A. solani</i> CENSA-18	51,53 ^d
		<i>A. solani</i> CENSA-45	61,37 ^e
72 horas	<i>T. harzianum</i> (A-34)	<i>A. solani</i> Dimitrov 1	56,45 ^d
		<i>A. solani</i> CENSA-18	55,43 ^d
		<i>A. solani</i> CENSA-45	54,31 ^d
		<i>A. solani</i> Dimitrov 1	52,71 ^d
	<i>Trichoderma</i> sp. II	<i>A. solani</i> CENSA-18	91,27 ^b
		<i>A. solani</i> CENSA-45	91,57 ^b
		<i>A. solani</i> Dimitrov 1	91,42 ^b
		<i>A. solani</i> CENSA-18	94,34 ^a
	<i>Trichoderma</i> sp. II	<i>A. solani</i> CENSA-45	94,56 ^a
		<i>A. solani</i> Dimitrov 1	95,73 ^a
CV.		11%	

Letras desiguales dentro de la misma columna denotan diferencias significativas para $P \leq 0,05$.

Cuadro 4. Masa seca (g) de *A. solani* frente a metabolitos de *Trichoderma* a los 15 días de incubación.

Variante	A.s.Censa-18	A.s.Censa-45	A.s.Dimitrov1
CPD+ <i>T.harzianum</i> A-34	1,13 ^b	1,10 ^b	1,12 ^b
CPD+ <i>Trichoderma</i> sp. Dimit. II	1,06 ^b	1,15 ^b	1,09 ^b
CPD (testigo)	1,35 ^a	1,59 ^a	1,53 ^a
CV.	13%	12%	10%

Letras desiguales dentro de la misma columna denotan diferencias significativas para $P \leq 0,05$

Conclusiones

Las cepas *Trichoderma harzianum* R. (A-34) y *Trichoderma* sp. Dimitrov II mostraron un alto potencial antagonístico sobre el crecimiento micelial, tanto en forma natural como metabólica, al compartir

un sustrato común con las cepas patógenas de *Alternaria solani* estudiadas, destacándose la cepa *Trichoderma* sp. Dimitrov II que mostró un efecto hiperparasítico e inhibitorio superior a *T. harzianum* R. (A-34).

Recomendaciones

Continuar estudios en condiciones de campo para el posible uso de la cepa *Trichoderma* sp.

Dimitrov II como control de *Alternaria solani*.

Literatura citada

1. Alfonso, F. y B. Cruz, 1987. Actividad antagonística *in vitro* de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. contra *Collectotricum falcatum*. Protección Vegetal 2(2):119-124.
2. Andreu, R., R. Cupull, S. Mayea y M. Reynoso. 1992. Relaciones antagonísticas sobre el crecimiento micelial de *Alternaria solani* por *Trichoderma* spp. y *Verticillium* spp. Centro Agrícola 19(2-3): 114-116.
3. Aranguren, M., A. García y H., Grillo. 1994. Evaluación *in vitro* de tres aislamientos de *Trichoderma* spp. como antagonista de patógenos de post-cosecha de los frutos cítricos. Centro Agrícola 21(2):42-45.
4. Frobisher, M. 1944. Microbiología. Ediciones salvat, S.A., Barcelona, España.
5. González, C., L. Rodríguez, A. Puertas, M. Fonseca y E. Suárez. 1997. Actividad antagonística de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos de la provincia Granma. p. 162. En: Programa y Resumen III Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Cuba.
6. Herrera, A. 1997. Understanding and improving fungal biocontrol agents for plant protection. p. 45. En: Programa/Resumen III Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Cuba, Protección Vegetal.
7. Martínez, B., L. Fernández y T. Solano. 1994. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco. Cultivos Tropicales, 15 (3):54.
8. Naar, Z. And M., Kecskès. 1995. A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotium miror*. Microbiol. Research 150:239-246.
9. Rifai, M. 1969. A revision of genus *Trichoderma*. Mycology Pap. 116:1-13.