

Desarrollo y utilización de *Trichoderma viride* y *Gliocadium virens* como antagonista de hongos fitopatogénos

Lino Jorge Soto, Juan L. García, María de los Ángeles Pérez, Eddy Perera, Rafael Castañeda, Norma Marrero, Nercy Rodríguez, Jesús González, Luis A. González, René Viza, Doris Macías y Nirva González.

***Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical
“Alejandro de Humboldt” INIFAT***

RESUMEN

En la década de los 80 se realizaron trabajos preliminares para la introducción acelerada en Cuba de controles biológicos en sustitución de pesticidas de síntesis química. El INIFAT fue de las primeras instituciones en presentar resultados alentadores en este campo. Algunas decenas de aislados fueron investigados como antagonistas de hongos patógenos de mayor importancia económica en los principales cultivos. Fueron identificados y aislados *Trichoderma viride* y *Gliocadium virens* como los antagonistas más promisorios. Desde los primeros trabajos fueron incluidos *Rizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasitica var nicotianae*. Las primeras investigaciones se realizaron en condiciones de laboratorio y posteriormente en condiciones de invernadero, las que mostraban la potencialidad de las especies de hongos en estudio como una gran promesa en este campo. Simultáneamente, se comenzó a elaborar una metodología de producción de biopreparado que se correspondiera con los resultados del trabajo y que posibilitara obtener una mayor producción y que fuera a su vez aplicable a las condiciones reales y prácticas de la producción agrícola. De esta forma surgió la técnica operatoria para la elaboración y empleo de los biopreparados, donde se recomienda la producción por fermentación sólida como la más factible y adecuada a nuestras condiciones, posteriormente todos los resultados fueron comparados en condiciones de campo

por su efectividad en el control del Damping off en los cultivos de tabaco, berro, tomate y actualmente continua su aplicación en diversos cultivos, producto del desarrollo de la Agricultura Urbana y Convencional, seguido del proceso de escalado de biofungicida Trifisol en forma de granulado y polvo.

INTRODUCCION

Las investigaciones relacionadas con el uso de los controles biológicos, se ha caracterizado en los últimos 20 años por una intensa actividad. Actualmente se estudian numerosas enfermedades en busca de medios biológicos para su control. Esto se puede apreciar por la gran cantidad de publicaciones sobre control biológico que aparecen cada año en la literatura científica.

La búsqueda acelerada de agentes de control biológico para combatir los organismos fitopatógenos es una respuesta a la baja efectividad de los fungicidas que se han estado utilizando en el tratamiento de semillas, lo que unido a los cada vez mas frecuentes reportes de fungoresistencia, la creciente preocupación por la presencia de residuos tóxicos en los productos agrícolas y la prohibición del empleo de un determinado grupo de plagicidas, esta propiciando un mayor interés en el biocontrol de hongos fitopatógenos.

El control biológico de los organismos fitopatógenos que habitan en el suelo y son responsables de enfermedades conocidas como Damping off o necrosis del cuello de las plantas, constituye una forma muy eficaz de reducir las pérdidas por esta causa.

Weidling, (1934), reportó el parasitismo del *Trichoderma lignorum* sobre *Esclerotium rolfii* sacc. y *Rhizoctonia solani* Kuhen. En Cuba existen algunos antecedentes al respecto Mitov, (1973); Pérez et al, (1990) y Soto et al (1990). Actualmente se realizan diferentes experiencias para ampliar y perfeccionar el espectro de empleo y desarrollo en la agricultura para el control biológico de enfermedades en cultivos de importancia económica, se investiga en la búsqueda de agentes de control biológico de patógenos foliares basados en *Trichoderma*, *Verticillium lecanii* y *Pseudomonas*, entre las enfermedades están los tizones de la

papa; la mancha púrpura en cebolla; la roya del cafeto, caña de azúcar y frijol; el moho azul del tabaco y los mildius Pérez (2003).

El control biológico da respuesta a muchos de los problemas de la agricultura moderna y es uno de los componentes esenciales en el desarrollo de la agricultura sostenible. Es por esto que se realiza este trabajo con el objetivo de desarrollar bioproductos a base de *Trichoderma viride* para ser empleado como biocontroles en cultivos económicos.

DESARROLLO

Características de los antagonistas

La cepa 2684 aislada de la parte inferior del tallo de una planta de tomate y 1731 a partir de un hongo Basidiomiceto de la familia Poriaceae, ambos conservadas en el cepario del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical, INIFAT, fue el resultado de una selección de 20 cepas de hongos con posibilidades de ser empleadas como antagonistas de algunas especies fungosas de patógenos, los cuales fueron sometidos a una serie de pruebas para lograr su identificación taxonómica como *Trichoderma viridee* y *Gliocladium virens* y conocer algunas características primarias.

Influencia de la temperatura sobre el desarrollo in vitro.

Trichoderma viridee.

El desarrollo óptimo se obtuvo entre 25 y 28 °C, un comportamiento similar se evidenció respecto a la esporulación y en ambos casos los valores observados a 28 °C fueron superiores.

Gliocladium virens.

Entre 25 y 28 °C se observó el mayor crecimiento miceliar notándose a 28 °C el máximo desarrollo, a 15 °C no esporuló y a 20 °C prácticamente no se observaron

esporas. La mayor formación de conidios ocurrió a 28 °C lo cual definió significativamente el resto de las temperaturas probadas.

Tabla 1. Influencia de la temperatura en el crecimiento y esporulación de *T. viride* y *G. virens*

Variantes	<i>T. viride</i>		<i>G. virens</i>	
	Diámetro colonia (x mm)	Esporulación (X x 10 ⁶ esp/ml)	Diámetro colonia (x mm)	Esporulación (X x 10 ⁶ esp/ml)
28	70.3 a	9.45 a	66.9 a	13.31 a
25	54.2b	8.99ab	66.6b	3.09b
35	45.0c	7.09c	39.2c	4.00b
20	36.7d	8.10bc	29.3d	0.26c
15	14.1e	0d	7.4e	0c
10	0f	0d	0f	0c
40	0f	0d	0f	0c

Influencia del PH del medio de cultivos sobre el desarrollo in vitro de *Trichoderma viride* y *Gliocladium virens* .

Se observó un comportamiento semejante en ambas cepas. Entre los valores de pH ensayados el menor crecimiento y formación de conidios se obtuvo a pH 11 y los valores máximos en general se presentaron pH 5 y 7.

Tabla 2. Influencia del pH del medio de cultivo en el crecimiento y esporulación.

Variantes	<i>T. viride</i>		<i>G. virens</i>	
	Diámetro colonia (x mm)	Esporulación (X x 10 ⁶ esp/ml)	Diámetro colonia (x mm)	Esporulación (X x 10 ⁶ esp/ml)
7	57.5 a	8.86 a	60.70 a	11.85 a
5	56.0 a	8.45 a	58.20 a	8.70 b
9	53.6 b	9.36 a	49.9 b	8.83 b
11	20.0 c	0.07 b	36.6 b	4.60 c

Determinación de la viabilidad de los conidios del biopreparado.

Trichoderma viridee.

En el caso de esta cepa el título se mantuvo en el orden de 10⁹ observándose las mayores concentraciones a los 35 y 50 días. En las 4 muestras, la germinación de los conidios fue satisfactoria disminuyendo ligeramente con el tiempo de incubación.

Tabla 3. Esporulación y viabilidad de los conidios a diferentes tiempos de incubación

Tiempo de incubación (días)	<i>T. viridee</i>		<i>G. virens</i>	
	Concentración (x 10 ⁹ esp/ml)	Porcentaje de germinación en conidios	Concentración (x 10 ⁸ esp/ml)	Porcentaje de germinación en conidios
15	1.16 b	96.8	1.99 c	97
35	1.20 b	96	3.8 a	94.8
50	1.4 a	95	4.43 a	95
90	0.30 c	91	2.86 b	93

Gliocladium virens.

El título de esporas de esta cepa se mantuvo en el orden de 10^8 esp/ml, sin observarse diferencias significativas entre las 4 muestras realizadas (15, 35,50 y 90 días). La germinación de los conidios siempre fue mayor de 90 % aunque se observó una tendencia a disminuir el porcentaje de germinación con el tiempo.

Características de los antagonistas.

La introducción de antagonistas de aplicación directa de control biológico de patógenos de las plantas se realizó entre 1920 y 1940. En esta época se hicieron ensayos en las cuales se inocularon suelos de vivero con 13 organismos antagonistas para controlar el damping-off de posturas de pino. El término control biológico de patógenos y su efecto fue enunciado en 1931.

Mecanismos de acción:

El antagonismo se produce cuando un organismo participa en una acción que interfiere con la de otro organismo, se denomina así a los agentes con potencial para interferir la acción de los patógenos de las plantas.

Una de las estrategias que se emplean en el control biológico de hongos fitopatógenos, esta basada en la utilización de los antagonistas. Dentro de estos se incluyen hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus y viroides, la actuación de estos puede tener lugar a través de diferentes mecanismos de acción, entre los principales acciones antagónicas están, el hiperparasitismo, la antibiosis y la competición.

Entre los micoorganismos más importantes se encuentran bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *bacillus* y los más representativos de los hongos pertenecen a los géneros *Glioclodium* y *Trichoderma* , siendo este último el más utilizado en el control de un grupo importante de hongos patógenos del suelo, resultando su efecto principal el hiperparasitismo o micoparaistismo por tratarse de

un hongo, lo cual consiste en el enrollamiento de sus hifas alrededor de las hifas del hospedante con penetración y destrucción de estas por la producción de haustorios y desorganización del contenido celular.

La antibiosis es el resultado de un proceso del metabolismo de un organismo, donde se producen toxinas que inhiben el crecimiento o eliminan a otros, las toxinas frecuentemente son antibióticos y micóticos que actúan como un mecanismo de control.

La competición puede ocurrir entre dos o más organismos, por los nutrientes (carbono, nitrógeno, hierro), así como por el oxígeno, espacio y luz donde juegan un papel muy importante los requerimientos: velocidad de crecimiento y adaptabilidad a la diversidad de ecosistemas y a diferentes condiciones de humedad y temperatura.

Desarrollo alcanzado en Cuba:

La producción de biopreparados a partir de diferentes cepas de *Trichoderma spp* se realizan mediante métodos semiartesanales, sólidos, bifásico y por cultivos líquidos estáticos y en los últimos años se ensayan procesos de fermentación sumergida que se encuentran en fases experimentales de laboratorio. Desde 1993 se puso a punto una metodología para la producción masiva de *Trichoderma* por métodos artesanales, la cual constituye actualmente una línea de producción en varios de los CREE que funcionan en el país. La aplicación de estos antagonistas ha sido el resultado de las investigaciones en diferentes regiones del país por un grupo de instituciones científicas y académicas. Actualmente se obtiene un promedio de 250 TM anuales y su aplicación en más de 100 000 hectáreas de cultivos en la agricultura convencional, cultivo protegido y a través de la producción de la Agricultura Urbana, ha permitido la reducción de productos químicos.

Se adjunta técnica operatoria para la producción y empleo de los biopreparados a partir de los hongos *Trichoderma viridee* y *Gliocladium virens* .

Técnica operatoria para la producción de los biopreparados a partir de los hongos *Trichoderma viride* y *Gliocadium virens*

Metodología de trabajo

Las cepas recomendadas para este trabajo son *Trichoderma viride* (cepa 2684) y *Gliocadium virens* (cepa 1731), incorporadas al cepario del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”, INIFAT del Ministerio de la Agricultura.

1. Preparación del sustrato

Como sustrato de base para la obtención del inóculo de estos hongos antagonistas se recomienda el uso de la cáscara de arroz por las condiciones físico-químicas que posee, la cual favorece la rápida colonización y con escasos riesgos de contaminación, por su bajo costo y por ser un producto de desecho. En lugares donde se dificulte su adquisición se puede emplear bagacillo de caña, paja de caña triturada, cáscara de café, vainas de frijol, cáscara de trigo y residuos de torta de NIM.

Además debe añadirse por cada Kg. de cáscara de arroz, 250 gramos de cabecilla de arroz o de consumo y 600ml de agua potable, la cual se mezcla adecuadamente de forma homogénea y se esterilizan en autoclave a 120 °C y 1.5 atmósfera durante 45 minutos. A continuación se llevan a una cámara de siembra estéril o un flujo laminar y el sustrato se coloca en las bolsas de nylon transparente, utilizados comercialmente (50x44 cm.), posteriormente se procede a la inoculación y en el extremo abierto de las mismas se debe colocar un pequeño tapón de gasa y algodón alrededor del cual se recogen los bordes y se amarran con un cordel. Las bolsas se deben distribuir a los centros de producción ya estériles. Estas bolsas pueden reutilizarse, después de lavadas y secas, se esterilizan nuevamente.

Como alternativa a la no existencia de bolsas de nylon se pueden utilizar bandejas metálicas u otro recipiente contenedor del sustrato, que en el caso de ser frascos, estos deben ser de boca ancha para facilitar la manipulación. Si se emplean

bandejas metálicas para la producción de biopreparados de *G. virens* es necesario apuntar que para los tapones se debe utilizar un material transparente que facilite el paso de la luz ya que el desarrollo del hongo responde positivamente ante la misma.

La fermentación sólida de sustratos en la producción de biopreparados ofrece las ventajas de obtener un título de 10^9 conidios/g para *T. viride* y 10^8 conidios/g para *G.virens*. La conservación en el tiempo del producto con alta efectividad por más de 4 meses a temperatura ambiente, permite efectuar producciones para ser utilizados posteriormente en los momentos de mayor demanda.

2-Inoculación e incubación del sustrato.

Se basa en cepas puras de primer pase contenidas en tubos de ensayo con medios de cultivo que pueden ser czapek, extracto de malta, PDA o PSA. Para inocular el sustrato se debe preparar un preinoculo que puede ser líquido o sólido incubado durante 7 a 10 días.

Los preinoculos líquidos se preparan con los medios de cultivos señalados sin agar y los sólidos con el sustrato indicado de 1 Kg. de cáscara de arroz, 250 g de cabecilla de arroz y 600 ml de agua se coloca en el erlenmeyer de 250 a 500 ml u otro recipientes adecuado. Se diluye a razón de un mililitro o gramo por 10 ml de agua y se utilizan 10 ml por bolsa o bandeja, es importante señalar que la inoculación debe hacerse con una dispersión homogénea para facilitar la colonización rápida en todo el sustrato, si son bolsas se deben colocar de forma horizontal. La temperatura optima de incubación es entre 28 y 30 °C, estando listo para su empleo a los 10-15 días. Se ha podido comprobar que si se alarga el período de incubación de este tipo de sustrato se desarrolla un proceso de colonización continua del hongo a todo el medio.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos con las cepas 1731 de *Gliocadium virens* y 2684 de *Trichoderma viride*, permiten afirmar tienen una alta capacidad antagónica contra un grupo de hongos fitopatógenos que causan pérdidas en cultivos de importancia económica.
- *T. viride* y *G. virens*, ejercen un control biológico efectivo sobre *R. solani*, *M. phaseolina*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* y *P. parasítica* var. *Nicotianae*.
- El empleo de biopreparados de *T. viride* y *G. virens*, pueden sustituir el uso de fungicidas químicos en condiciones de producción urbana y rural.
- La metodología de reproducción sólida de estos hongos permite lograr producciones de biopreparados para su uso a escala comercial.

RECOMENDACIONES

- Continuar los trabajos de investigación con las cepas 1731 de *G. virens* y 2684 de *T. viride*, con el objetivo de lograr un mejor empleo de las potencialidades contenidas en las mismas para el control biológico de enfermedades causadas por hongos en cultivos de importancia económica.
- Generalizar el empleo de los biopreparados de estas cepas en el control de enfermedades en todos los sistemas de producción agrícola del país.

BIBLIOGRAFIA

- Fernández, O. (2001) Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas, La Habana. INISAV, 138p
- Mitov, N. (1973) Estudios Sobre el “mal de Panamá” del plátano en Cuba. Serie agrícola, Academia de Ciencias. Cuba, IIT. La Habana, 28:1-23
- Pérez, N.; Echemendía, M y Pérez Guzmán, M. C. (1990): Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma spp.* Sobre *Puccinia melanocéphala*. Resúmenes VI Jornada Científica, INIFAT-MINAG, 56 p.
- Pérez, N. (2003) Agricultura Orgánica: Bases para el manejo ecológico de plagas. CEDAR. ACTAF. La Habana.

- Soto, L.; Rodríguez de la Rosa, N. y González Merchan, M. (1990); Control biológico causante del “tizón sureño” en maní Resúmenes VI Jornada Científica, INIFAT-MINAG, 29 p.
- Weidling, R. (1934): Studies of principal effective in the parasitic action of *Trichoderma Lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopatology, 24: 1153-1179.

Efecto de *Trichoderma* sobre hongos fitopatògenos



Fig 1. *Fusarium* + *Trichoderma*
24 horas



Fig. 2. *Sclerotium* + *Trichoderma*
+ 72 horas



Fig. 3. *Fusarium* + *Trichoderma*
+ de 72 horas



Fig.4. *Sclerotium*+*Trichoderma*
+ de 72 horas



Fig.5. *Alternaria*+*Trichoderma*
24 horas