

EFICIENCIA DE *Trichoderma harzianum* (CEPA A-34) Y SUS FILTRADOS EN EL CONTROL DE TRES ENFERMEDADES FÚNGICAS FOLIARES EN ARROZ

Ernesto Pérez-Torres¹, Alexander Bernal-Cabrera², Pausides Milanés-Virelles¹, Yurisandra Sierra-Reyes¹, Michel Leiva-Mora³, Soraya Marín-Guerra² y Odalys Monteagudo-Hernández²

RESUMEN

Debido a resultados obtenidos con los mecanismos de acción de competencia, micoparasitismo y antibiosis de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa A-34), así como la demostrada actividad de filtrados del cultivo de este antagonista sobre los agentes causales de las enfermedades mancha parda (*Bipolaris oryzae*), pudrición de la vaina (*Sarocladium oryzae*) y tizón del arroz (*Pyricularia grisea*), el objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones semicontroladas la eficiencia del antagonista y sus filtrados de cultivo como alternativa de control de estas enfermedades fúngicas foliares del arroz. La investigación se desarrolló en la casa de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas en la provincia de Villa Clara, Cuba, en el periodo de mayo a septiembre de 2012. Se estudiaron nueve tratamientos, tres concentraciones del agente de control biológico, cuatro diluciones de filtrados de cultivo, un control relativo (Azoxistrobina) y un control absoluto. Se determinó la eficiencia y la variable epifitológica de área bajo la curva del progreso de cada enfermedad (ABCPE). Como variedad de arroz se utilizó Perla de Cuba. Los experimentos afirmaron que el antagonista y sus filtrados de cultivo ejercieron un control sobre las enfermedades fúngicas del arroz antes mencionadas, con niveles de eficiencia entre 70 y 90 %; además, se logró una disminución superior al 67,5 % del ABCPE, con la aplicación de las alternativas de control biológico.

Palabras clave adicionales: Antagonista, *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Oriza sativa*, *Pyricularia grisea*

ABSTRACT

Efficiency of *Trichoderma harzianum* (strain A-34) and its culture filtrates on control of three rice fungal aerial diseases
Due to the results obtained with the action mechanisms of competition, micoparasitism and antibiosis of *Trichoderma harzianum* Rifai (strain A-34), as well as the activity that its culture filtrates have demonstrated of on the causal agents of the diseases known as brown spot (*Bipolaris oryzae*), sheath rot (*Sarocladium oryzae*) and rice blast (*Pyricularia grisea*), the objective of this study was to evaluate under semicontrolled conditions the efficiency of the antagonist and its culture filtrates as alternative of control of those rice fungal aerial diseases. The investigation was conducted in the crop house of the Institute of Biotechnology of the Plants (IBP), belonging to the Central University "Marta Abreu" of Las Villas in the county of Villa Clara, Cuba, in the period of May to September 2012. The following nine treatments were studied: three concentrations of biological control agents, four dilutions of culture filtrates, one relative control (Azoxistrobina) and one absolute control. It was determined the control efficiency along with the epiphytologic variable of area under the disease progress curve (AUDPC). The rice variety used was Perla de Cuba. The experiments showed that the antagonist and their culture filtrates controlled the fungal diseases with levels of efficiency between 70 and 90 %; also, a decrease superior to 67.5 % of AUDPC was obtained with the application of the biological control alternatives.

Additional key words: Antagonist, *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Oriza sativa*, *Pyricularia grisea*

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas del rendimiento en el arroz por la

incidencia de plagas desempeñan un papel determinante en las restricciones productivas de este cultivo. Dentro de este amplio grupo de

Recibido: Abril 5, 2017

Aceptado: Noviembre 20, 2017

¹ Dpto. de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz". Camagüey. Cuba. CP: 74650. e-mail: ernesto.perez@reduc.edu.cu, pausides.milanes@reduc.edu.cu, yurizandra.sierra@reduc.edu.cu

² Dpto. de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas. Villa Clara. Cuba. CP: 78600. e-mail: alexanderbc@uclv.edu.cu, sorayamg@uclv.edu.cu, odalysmh@uclv.edu.cu

³ Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas. Villa Clara. Cuba. CP: 78600. e-mail: michellm@ibp.co.cu

agentes nocivos, las enfermedades fúngicas como la mancha parda y el tizón del arroz, ocasionadas por los hongos *Bipolaris oryzae* (Breda de Hann) Shoemaker y *Pyricularia grisea* Sacc, son consideradas de importancia económica a nivel mundial y para Cuba, al reducir los rendimientos entre un 25,0 % y 90,0 %, respectivamente (Cristo et al., 2012; Archana y Prakash, 2013). Autores como Rivero et al. (2012) consideraron que *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw, agente causal de la pudrición de la vaina del arroz, es una de las enfermedades más importantes que atacan al cultivo en el mundo, con reducciones del rendimiento en más de un 20,0 %, corroborado en países como China, Corea, Filipinas, India y más reciente en Colombia, República Dominicana y Panamá.

Una vía para atenuar las afectaciones de hongos fitopatógenos es la utilización de alternativas ecológicas como medidas culturales, etológicas y el uso de microorganismos antagonistas como agentes de biocontrol. Entre estos se encuentran las especies del género *Trichoderma* Persoon ex Gray (Astorga et al., 2014), en el que su uso en la agricultura se debe a mecanismos de acción como competencia, micoparasitismo (Awad et al., 2018), antibiosis (Nawrocka et al., 2018) y la producción de compuestos volátiles que reducen la infección de agentes causales de enfermedades en plantas (Osorio et al., 2016).

La aplicación de *Trichoderma* en el arroz ha sido poco estudiada. En la última década se han obtenido resultados satisfactorios en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* (Martínez et al., 2014; Pérez et al., 2017). Todos ellos mediante la interacción *in vitro* entre estos hongos fitopatógenos del arroz y especies de *Trichoderma*. Sin embargo, a pesar de la existencia de literatura científica sobre la aplicación de este agente de control biológico en el cultivo de arroz contra *P. grisea* (Núñez y Pavone, 2014), son escasos los antecedentes científicos que hacen referencia a su uso *in vivo* como microorganismo antagonista y a la acción de sus filtrados de cultivo contra los agentes causales de la mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz. Por estas razones se propone evaluar la eficiencia de *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo como alternativa de control de las enfermedades fúngicas foliares del arroz mancha

parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en la casa de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), perteneciente a la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, provincia Villa Clara, Cuba, en el periodo de mayo a septiembre de 2012. Se utilizaron como unidad experimental bolsas de polietileno con 5 kg de suelo esterilizado durante 30 min a 121 °C en una autoclave. La fertilización se realizó según MINAGRI (2008) a razón de 1200 kg·ha⁻¹ de nitrógeno, 34 kg·ha⁻¹ de fósforo y potasio y 4 kg·ha⁻¹ de cinc asimilable, a partir de urea, superfosfato triple cloruro de potasio y sulfato de cinc.

La siembra se efectuó de forma directa a razón de tres semillas por bolsa de la variedad Perla de Cuba, variedad susceptible a los tres agentes fitopatógenos, con categoría Certificada II provenientes del Complejo Agroindustrial de Granos “Ruta Invasora” del municipio Vertientes, provincia Camagüey, Cuba. Las semillas empleadas tuvieron un poder germinativo de 95 %, y fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % y lavadas con agua destilada estéril durante tres min.

El riego se condujo de manera localizada, y a partir de los 20 días de germinado (ddg) el grano hasta la culminación del ciclo biológico del cultivo se mantuvo una sobresaturación del suelo con una lámina de agua de 10,0 cm. Durante el transcurso de los experimentos no se realizaron aplicaciones de plaguicidas para el control de agentes nocivos.

Para cada agente fitopatógeno se realizó un experimento completamente aleatorizado con nueve tratamientos y cuatro réplicas, los que incluyeron la aplicación del agente de control biológico *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo a diferentes diluciones, un control relativo en el que se empleó el fungicida Amistar 250 SC (Azoxistrobina) de Syngenta y un control absoluto (Cuadro 1).

La producción del antagonista se realizó en bandejas de acero inoxidable (0,30 m x 0,40 m) y se utilizó como sustrato cabecilla de arroz previamente esterilizada en autoclave a 121 °C durante 30 min según metodología descrita por

Márquez et al. (2010). El inóculo provino de placas Petri de 168 h en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA)-Biocen bajo oscuridad. El biopreparado se incubó a una temperatura de 28 ± 1 °C durante 15 d para luego determinar la concentración de los conidios.

Cuadro 1. Tratamientos de *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo en condiciones semicontroladas

Tratamientos	Concentraciones/Diluciones
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	$3,1 \times 10^9$ conidios·mL ⁻¹
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	$3,5 \times 10^{10}$ conidios·mL ⁻¹
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	$3,9 \times 10^{11}$ conidios·mL ⁻¹
Control relativo (Azoxistrobina)	100 mg·L ⁻¹ i.a.
Filtrados de cultivos de <i>T. harzianum</i>	100 %*
Filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	75 %
Filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	50 %
Filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	25 %
Control absoluto	-

*Filtrado sin diluir de *T. harzianum* (cepa A-34)

Para la producción de filtrados de cultivo de *T. harzianum* se utilizaron matraces estériles de 250 mL en los que se vertieron 100 mL del medio de cultivo líquido Czapek compuesto por 0,5 g de cloruro de potasio (KCl), 0,02 g de sulfato de hierro heptahidratado (FeSO₄·7H₂O), 30 g de sacarosa, 10 g de nitrato de potasio (KNO₃), 5,0 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄), 2,5 g de sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O) en 1000 mL de agua destilada estéril, a un pH de 5,5 con la utilización de NaOH y HCl 0,1 M. En cada frasco se inoculó un disco de 10 mm de diámetro de cultivos de 72 h de crecimiento micelial de *T. harzianum* y se sometió a un proceso de incubación en oscuridad durante 20 d a 28 ± 1 °C en agitación, empleando un vibrador orbital con una aceleración de 120 g.

La esterilización se realizó mediante filtración al vacío, para ello se utilizó papel de filtro Whatman # 1 en embudos de porcelana, los que se acoplaron a quitasatos y a una bomba de vacío. El resultado final del filtrado se centrifugó con una aceleración de 16000 g durante 30 min a 28 °C; se desecharon las estructuras del hongo y se utilizó el

sobrenadante. El fluido fue filtrado con el empleo de filtros milipore a través de membranas de 0,22 µm en un flujo laminar de tipo vertical. Posteriormente, los filtrados fueron refrigerados a 4 °C y su aplicación se realizó una semana después empleando diluciones de 25, 50, 75 y 100 % (filtrado sin diluir).

El inóculo de los tres agentes fitopatógenos provino de placas Petri con medio de cultivo PDA-Biocen incubados a 28 ± 1 °C en oscuridad, excepto *P. grisea* que se sometió a alternancia de luz - oscuridad cada 12 h. El agente patógeno *B. oryzae* procedió de placas Petri de 15 d de incubación y se inocularon micelios y conidios a los 35 ddg el cultivo a una suspensión de $4,5 \times 10^8$ ufc mL⁻¹. Las placas Petri con *S. oryzae* se incubaron por 14 d y se aplicaron sus estructuras infectivas (micelios y conidios) en la etapa fisiológica de cambio de primordio o diferenciación de la panícula (60-65 ddg) con una suspensión de $3,5 \times 10^8$ ufc·mL⁻¹. El hongo *P. grisea* se inoculó a los 25 ddg en el arroz, proveniente de placas Petri con 15 d de incubación y se aplicó a una concentración de $4,5 \times 10^8$ ufc·mL⁻¹.

La inoculación de cada agente fitopatógeno se realizó por separado con un micropulverizador manual por la superficie adaxial y abaxial de las hojas a razón de 30 mL por planta de las suspensiones antes descritas. Luego el material vegetal se cubrió con bolsas de polietileno transparente durante 72 h para asegurar una alta humedad relativa (cerca al 100 %) y facilitar el proceso de infección. Las plantas se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas, con temperatura media de 27,5 °C y humedad relativa media de 82 %.

Transcurridas 72 h después de la inoculación de cada hongo fitopatógeno y una vez retiradas las bolsas de polietileno transparente, el antagonista y sus filtrados de cultivo se aplicaron tres veces cada 10 d. Los tratamientos al arroz con Azoxistrobina se realizaron en las etapas fisiológicas de cambio de primordio e inicio de paniculación, cuando el índice de infección de cada agente patógeno sobrepasó al 5 % del área foliar afectada, según lo recomendado por Pérez et al. (2009).

En cada experimento, según el hongo fitopatógeno en estudio, se muestrearon previo al momento de la aplicación de los tratamientos y

con una frecuencia de 10 d, diez hojas por planta (tres plantas) de manera aleatoria para un total de treinta hojas por cada réplica. Para evaluar en cada muestreo el área foliar afectada (AFA) por la mancha parda, pudrición de la vaina y del tizón del arroz, se utilizaron las escalas del Sistema Estándar de Evaluaciones para Arroz propuesto por el International Rice Research Institute (IRRI, 1996).

Con estos datos se calcularon los porcentajes de infección de cada enfermedad mediante la expresión matemática de Townsend-Heuberger recomendada para los ensayos de campo por Ciba-Geigy (1981) y con la información de los índices de infección obtenidos por muestreo se determinó la eficiencia mediante la fórmula de Abbott:

$$E = (Cd - Td / Cd) * 100$$

donde: E = eficacia (eficiencia) de la aplicación, Cd = infección en la parcela testigo después del tratamiento y Td = infección en la parcela tratada después del tratamiento.

El área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) se calculó por la fórmula de Shaner y Finney:

$$ABCPE = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

donde y_i = expresa el índice de infección de cada enfermedad por muestreo, t_i = tiempo (días) de la observación y n = número total de observaciones. Se utilizaron los datos obtenidos en el primero y en los dos últimos muestreos realizados a las plantas infectadas por los hongos fitopatógenos; en *B. oryzae* se utilizaron los datos obtenidos en los muestreos de los 45, 85 y 95 ddg, para *S.*

oryzae las evaluaciones realizadas a los 75, 85 y 95 ddg y para *P. grisea* a los 35, 85 y 95 ddg el cultivo.

Los datos de los porcentajes de eficiencia y de infección de cada enfermedad se transformaron mediante una expresión angular según Lerch (1977) y se procesaron a través de un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey. Para cada análisis se comprobaron los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza. Los datos de ABCPE se analizaron estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En todos los análisis se utilizó con el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

RESULTADOS

El Cuadro 2 hace referencia a la eficiencia de *T. harzianum* en el control de las enfermedades. En el caso de la mancha parda del arroz, se aprecia que no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de eficiencia de los tratamientos con las concentraciones de 10^{10} , 10^{11} , Azoxistrobina, y los filtrados de cultivo al 75 % y 100 %, con valores que oscilan entre 91,3 % a 94,5 %, siendo este último para el fungicida. La concentración más baja (10^9) y los filtrados al 25 % y 50 % resultaron inferiores ($P \leq 0,05$) al resto de los tratamientos al mostrar valores de eficiencia de 81,4 %, 82,8 % y 81,7 % respectivamente. En todas las variantes donde se utilizó alternativas de control biológico de *T. harzianum* (biopreparado y sus filtrados) se alcanzó un control por encima del 80 % de eficiencia, resultados alentadores para un hongo antagonista.

Cuadro 2. Eficiencia de *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo en el control de la mancha parda de arroz (*B. oryzae*), pudrición de la vaina (*S. oryzae*) y tizón del arroz (*P. grisea*)

Tratamiento	Eficiencia (%)		
	Mancha parda	Pudrición de la vaina	Tizón del arroz
10^9 *	81,4 b	67,0 d	63,0 c
10^{10} *	91,3 a	71,5 c	75,1 bc
10^{11} *	93,1 a	77,7 b	81,9 b
Azoxistrobina	94,5 a	93,8 a	98,0 a
100 %	93,2 a	75,9 b	83,7 b
75 %	92,8 a	75,3 bc	76,9 b
50 %	81,7 b	74,0 bc	71,1 bc
25 %	82,8 b	60,0 c	70,2 bc

*Concentraciones de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa A-34) expresada en conidios·mL⁻¹.

Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

En la enfermedad conocida como pudrición de la vaina, el tratamiento con Azoxistrobina produjo el valor más elevado con un 93,8 % de eficiencia, al presentar diferencias significativas con el antagonista y con los filtrados. La concentración de 10^{11} , no presentó significación estadística con las diluciones al 100, 75 y 50 %, con eficiencias de 74,0 a 77,7 %.

Los tratamientos con los filtrados de cultivo al 25 % y las concentraciones de 10^9 y 10^{10} del agente de biocontrol alcanzaron los valores más discretos de eficiencia, aunque esta última concentración no mostró diferencias significativas con el filtrado diluido al 75 y 50 %. Estas alternativas de control muestran eficiencias entre 60,0 y 77,7 %, valores que se consideran aceptables para este método de control biológico de enfermedades. Esto representa que los mecanismos de acción de *T. harzianum*, lograron *in vivo* reducir las afectaciones de esta enfermedad fúngica del arroz.

En el control del agente causal del tizón del arroz *Pyricularia grisea* Sacc, el efecto de los tratamientos mantuvo la tendencia observada en las enfermedades mancha parda y pudrición de la vaina, donde el fungicida Azoxistrobina obtuvo el valor más elevado de eficiencia (98,0 %) con diferencias sobre el resto de las variantes estudiadas. En este caso, solo existió significación estadística entre la concentración más baja de 10^9 con el valor más discreto de eficiencia de 63,0 % con relación a 10^{11} (81,9 %) y a los filtrados más puros de 75 % y 100 % con valores de 76,9 % y 83,7 %, respectivamente.

Se lograron eficiencias para *P. grisea* entre 63,0 y 81,3 % con la aplicación del hongo antagonista y entre 70,7 % y 83,2 % con los filtrados de cultivo, lo que evidenció que estas alternativas biológicas de control permitieron reducir las afectaciones de esta enfermedad fúngica, considerada la más devastadora tanto en Cuba como a nivel mundial. Aspecto que es necesario resaltar si se tiene en cuenta la alta virulencia del aislado inoculado y a la susceptibilidad que presenta la variedad de arroz utilizada en la investigación.

Durante la conducción de los experimentos se registraron temperaturas por encima de 28 °C y humedad relativa superiores al 80,0 %, lo que favoreció la germinación de los conidios del

antagonista y el proceso de infección de los agentes fitopatógenos.

Los resultados obtenidos *in vitro* por *T. harzianum* (cepa A-34) a través de los mecanismos de acción de competencia, antibiosis y micoparasitismo (enrollamiento, penetración, lisis y vacuolización) en la interacción con los agentes patógenos *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* (Pérez et al., 2013b; Pérez et al., 2017) permite inferir que este antagonista es capaz de ejercer en la planta de arroz el control de las enfermedades en condiciones semicontroladas.

La aplicación de los filtrados de cultivo de *T. harzianum* logró reducir el índice de infección de las enfermedades, lo que trajo consigo el incremento de la eficiencia a medida que transcurrió el tiempo de permanencia de estos en las plantas de arroz. El efecto inhibitor del crecimiento micelial, esporulación e inhibición de la germinación conidial de estos agentes patógenos obtenidos en condiciones *in vitro* por los metabolitos de *T. harzianum* (Pérez, 2016), pudo lograr en la planta una reducción de los daños causados por estos hongos.

Bajo estas condiciones, se lograron valores de eficiencia que oscilan entre el 60,0 % y 93,2 %; los que se consideran alentadores si se tiene en cuenta que se han obtenido por la aplicación de *T. harzianum* como alternativa de control de estas tres enfermedades. Dado la alta carga infectiva (10^8 ufc mL⁻¹) de los agentes patógenos inoculados y la temperatura y humedad relativa que favorecieron la infección.

En relación a los resultados obtenidos con la variable epifitiológica Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) (Cuadro 3), el tratamiento de Azoxistrobina mostró los valores más bajos, al presentar diferencias significativas con el resto de las variantes en las enfermedades pudrición de la vaina y tizón del arroz. Sin embargo, en la mancha parda, el fungicida no expresa significación con el filtrado de cultivo de *T. harzianum* al 100 %. Este último tratamiento, no difirió con la dilución al 75,0 %, que a su vez no presentó significación con el tratamiento de 10^{11} conidios mL⁻¹ y si con las restantes alternativas de control.

En cada hongo fitopatógeno, se incrementó el ABCPE en la medida en que se usaron las menores concentraciones de *T. harzianum* y

diluciones de los filtrados de cultivo, respectivamente. Así mismo, todas las variantes en que se emplearon alternativas para reducir las afectaciones de los agentes patógenos mostraron diferencias significativas con el control absoluto. De igual modo, los mejores resultados de las

alternativas de control biológico, lograron una disminución del área bajo la curva de las enfermedades provocadas por *B. oryzae* (100 %), *S. oryzae* (100 %) y *P. grisea* (10¹¹*) al compararlas con el control absoluto del 67,5 %, 83,9 % y 79,8 %, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo sobre el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) en la variedad de arroz Perla de Cuba, inoculados artificialmente con *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

Tratamiento	ABCPE					
	Mancha parda		Pudrición de la vaina		Tizón del arroz	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
10 ⁹ *	1656,1	63,8 e	395,8	50,3 d	1806,2	72,0 f
10 ¹⁰ *	1552,0	50,2 d	360,0	37,1 cd	1361,1	44,3 d
10 ¹¹ *	1386,7	33,0 c	334,3	32,4 c	941,8	18,4 b
Azoxistrobina	1213,1	11,2 a	99,5	5,5 a	138,0	5,5 a
100 %	1255,9	16,4 ab	266,0	16,8 b	983,2	22,6 b
75 %	1319,4	24,9 bc	384,7	41,0 cd	1249,6	36,7 c
50 %	1539,5	48,9 d	482,4	69,5 e	1501,3	55,6 e
25 %	2186,9	75,5 f	485,4	71,4 e	1723,1	68,8 f
Control absoluto	3864,1	85,5 g	1656,8	85,5 f	4671,2	85,5 g

* Concentraciones de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa A-34) expresada en conidios m^{-L}⁻¹; SE: error estándar Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente según la prueba de Kruskal-Wallis (P≤0,05)

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos manifiestan una marcada acción antagonista de *T. harzianum* que se evidenció a través del control de las enfermedades fúngicas del arroz, con porcentajes de eficiencia superiores al 60 %, valores que se incrementaron a medida que los filtrados de cultivo estuvieron menos diluidos y las concentraciones del biopreparado se hicieron mayores. Los antecedentes de interacción antagonista de la cepa A-34 con los hongos patógenos del arroz estudiados en la investigación provienen de la década del 2000 (Alarcón et al. 2005; Reyes et al. 2007), con la obtención de un mejor control con este aislamiento de *T. harzianum* que con A-53. Posteriormente se realizaron investigaciones (Pérez et al. 2013b; 2017; Rodríguez et al. 2016) sobre la actividad antagonista de *T. harzianum* (A-34) a través de sus mecanismos de acción, en los que se lograron porcentajes de inhibición del crecimiento de los micelios de los agentes

causales entre 64 y 100 %, con reducción en el desarrollo de las hifas a las 24 h lo que evidenció la presencia de metabolitos volátiles y no volátiles. Además, se observaron los eventos de micoparasitismo por enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis.

Otros resultados con esta cepa se han alcanzado en la producción de filtrados de cultivo (Pérez et al. 2013a; Pérez et al. 2015) que han inhibido el crecimiento de los micelios, la germinación de los conidios y la esporulación de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea in vitro*, estructuras vegetativas y reproductivas que propician la infección de estos hongos. Khalili et al. (2012) demostraron la capacidad de *T. harzianum* para controlar *in vitro* e *in vivo* a *B. oryzae*, y Núñez y Pavone (2014) lograron el control de *P. grisea* utilizando filtrados del antagonista. Todo esto permite inferir que *T. harzianum* ejerce diferentes mecanismos de acción que propician el control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina

y tizón del arroz.

En los últimos diez años, se han utilizado especies de *Trichoderma* no solo para el control de hongos patógenos que habitan en el suelo, sino que se ha incursionado en su aplicación contra agentes causales de enfermedades foliares, con la obtención de una eficiencia del 80 % ante *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, al aplicar en parcelas de *Musa* spp. cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai (Castro et al., 2015). También se ha informado en el control de *Helminthosporium solani* Dur. & Mont, agente causal de la mancha plateada en *Solanum tuberosum* L. (Mamani et al., 2012). En una investigación reciente (Rodríguez y Flores, 2018), se encontró en pruebas de enfrentamiento que dos aislamientos de *T. harzianum* fueron efectivos en inhibir el crecimiento y esporulación de *Fusarium verticillioides*.

En el cultivo de la cebada, especie también perteneciente a la familia *Poaceae*, se obtuvo un efecto fungistático sobre *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoemaker por la aplicación de sustancias elicitoras de *Trichoderma* (Ondráčková et al, 2013) y en el cultivo de *Musa* spp. se alcanzaron valores superiores al 90,0 % de reducción de *Ralstonia solanacearum* (Smith), agente causal de la enfermedad moko de plátano, con dos cepas de *Trichoderma* spp. y los filtrados al 40,0 % (Ceballos et al., 2014).

Existe una tendencia al estudio de hongos endofíticos o microorganismos mutualistas en tejidos de la rizosfera y filosfera de las plantas, con capacidad para producir un grupo de sustancias que provocan resistencia contra patógenos de plantas, con énfasis en la estrecha interacción planta-antagonista-patógeno. Estos estudios se obtienen con el efecto de *Trichoderma* spp. aislado de plantas de plátano y banano (*Musa* spp.) en el control de *Rodopholus similis* (Cobb) Thorn (Vargas et al., 2015) y en plátano como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra, con un alto porcentaje de colonización de especies de *Trichoderma* en el cormo, pseudotallo y en las hojas de las plantas (Castro, 2015).

En estudios realizados sobre la interacción *Trichoderma* - *Allium cepa* - *Sclerotium rolfsii*, la aplicación del antagonista favoreció la producción en los bulbos de cebolla, de las enzimas ascorbato peroxidasa, catalasa y fenilalanina amonio-liasas,

al provocar cambios en el metabolismo del agente patógeno y a la vez, estimuló en los órganos de la planta (bulbos) la producción de compuestos con marcado efecto antifúngico como flavonoides y fenoles (Peñaloza, 2014). Este fenómeno descrito anteriormente, pudiera favorecer las reducciones de la intensidad de ataque de los hongos fitopatógenos del arroz estudiados en condiciones semicontroladas, aspectos que deben ser profundizados en futuras investigaciones.

El estudio de variables epifitológicas como el ABCPE permite evaluar la dinámica de enfermedades bajo la influencia de diferentes métodos de control. Se ha encontrado en la literatura efectos positivos de aislamientos de *T. asperellum* combinado con fertilización a base de silicio que lograron disminuir las afectaciones del tizón de la hoja del arroz (*Magnaporthe oryzae* Cavara) en invernadero (de Souza et al. 2015). *Trichoderma* también se ha utilizado en el control de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao, con reducción del área bajo la curva de esta enfermedad por la aplicación de cepas comerciales y nativas de especies de este agente de biocontrol (Villamil et al, 2015). En el cultivo del plátano *Musa* spp. se ha informado el uso de microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* en el control de hongos foliares (Castro, 2015).

Otros autores hacen referencia a la utilización de esta variable en el efecto de la aplicación de material compostado de estiércol bovino, enmienda mineral y cascarilla de arroz aplicados de manera combinada y ricos en microorganismos celulolíticos, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. en el comportamiento de la marchitez del aguacate (*Persea americana* Mill.) cuyo agente causal más importante es *Phytophthora cinnamomi* Rands, con resultados alentadores en el descenso del ABCPE de esta enfermedad (Ramírez et al., 2013).

CONCLUSIONES

En lo referente al control biológico, el antagonista *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo lograron eficiencias entre 60 % y 93,2 % en el control de las enfermedades conocidas como mancha parda (*B. oryzae*), pudrición de la vaina (*S. oryzae*) y tizón del arroz (*P. grisea*), y produjeron una disminución del área

bajo la curva de progreso de estas enfermedades. La mejor respuesta se logró con la concentración más alta del antagonista (10^{11}) y con los filtrados de cultivo menos diluidos (75 y 100 %). No obstante, en general, la mejor respuesta de control frente a las variables evaluadas la produjo el uso del fungicida Azoxistrobina.

LITERATURA CITADA

- Alarcón, L., T. Reyes, G. Rodríguez y A. Pupo. 2005. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) Fitosanidad 9(3): 57-60.
- Archana, B. y H. S. Prakash. 2013. Survey of seed borne fungi associated with rice seeds in India. International Journal of Research in Applied Microbiology 3(1): 25-29.
- Astorga, K., K. Meneses, C. Zúñiga, J. Brenes y W. Rivera. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha 7(2): 82-91.
- Awad, N., H. Kassem, M. Hamed, A. Elfiki, M. Elnaggar, K. Mahmoud y M. Ali. 2018. Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. Mycology 10 (on line). <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1423126> (consulta del 10/01/2018)
- Castro, M. del P. 2015. Bioproducto a base de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* Rifai para el manejo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en bananeras orgánicas. Tesis. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Villa Clara, Cuba. 100 p.
- Castro M. del Pilar, M. Pesántez, P. Lemaa, J. Quevedoc, P. Arichabalad y Y. Alvarado. 2015. Potential use of *Trichoderma*-based bioproduct for black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) management in the field. Biocontrol Science and Technology 25(4): 481-486.
- Ceballos, G., E. Álvarez y M. M. Bolaños. 2014. Reducción de poblaciones de *Rastonia solanacearum* raza 2 (Smith) en plátano (*Musa AAB Simmonds*) con la aplicación de extractos de *Trichoderma* sp. (Alexopoulos y Nims) y bacterias antagonistas. Acta Agronómica 63(1): 80-87.
- Ciba-Geigy. 1981. Manual para Ensayos de Campo en Protección Vegetal. Werner Püntener. División Agricultura, Ciba-Geigy. Basilea, Suiza. 205 p.
- Cristo, E.; N. J. Pérez, A. Echevarría, M. C. González, R. M. Cárdenas y E. Ventura. 2012. Efectos de bajos suministros de agua en el comportamiento agronómico e industrial de nuevos genotipos de arroz (*Oryza sativa*) obtenidos por diferentes métodos de mejora. Cultivos Tropicales 33(1): 50-56.
- de Souza, A. C., T. Pereira, M. Vinicius, F. Á. Rodrigues, G. Barata y M. C. Filippi. 2015. Enzyme-Induced Defense Response in the Suppression of Rice Leaf Blast (*Magnaporthe oryzae*) By Silicon Fertilization and Bioagents. International Journal of Research Studies in Biosciences 3(5): 22-32.
- IRRI (International Rice Research Institute). 1996. Standard Evaluation System for Rice. Genetic Resources Center. <http://www.fao.org/arroz.html> (consulta del 09/02/2006).
- Khalili E, M. Sadravi, S. Naeimi y V. Khosravi. 2012. Biological control of rice brown spot with natives isolates of three *Trichoderma* species. Braz. J. Microbiol. 43: 297-305.
- Lerch, G. 1977. La experimentación Agrícola en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Edit. Científico-Técnica. La Habana. 452 p.
- Mamani, P., J. Limachi y N. Ortuño. 2012. Uso de microorganismos nativos como promotores de crecimiento y supresores de patógenos en el cultivo de la papa en Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa 17(1): 74-96.
- Márquez, M. E., O. Fernández-Larrea, J. Jiménez, O. Elósegui, R. Gómez, B. Cabrera et al. 2010. Tecnología de producción artesanal sobre sustratos sólidos del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* (cepa A-34). MINAGRI. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana. pp. 34-38.
- Martínez, B. Y. Obret, S. Pérez y Y. Reyes.

2014. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth. *Revista de Protección Vegetal* 29(2): 106-111.
7. MINAGRI (Ministerio de la Agricultura). 2008. Instructivo Técnico del Arroz. Instituto de Investigaciones del Arroz. La Habana. 113 p.
 8. Nawrocka, J., M. Szczech y U. Malolepsza. 2018. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. *Plant Protect. Sci.* 54(1): 17-23.
 9. Núñez, L. y D. Pavone. 2014. Tratamiento biológico del cultivo de arroz en condiciones de vivero empleando el hongo *Trichoderma* spp. *Interciencia* 39(3): 185-190.
 10. Ondráčková, E., M. Ondřej, E. Provinová y M. Nesrsta. 2013. Mycoparasitic fungi reducing the incidence and virulence of *Bipolaris sorokiniana*. *Czech Mycology* 65(1): 103-112.
 11. Osorio, E., F. D. Hernández, R. Rodríguez, S. E. Varela, B. Estrada y J. A. López. 2016. Actividad antagonica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani in vitro*. *Investigación y Ciencia* 24(67): 5-11.
 12. Peñaloza, S. 2014. Actividad de enzimas antioxidantes y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en la interacción Cebolla-*Trichoderma* spp.-*Sclerotium rolfsii*. Tesis. Instituto Politécnico Nacional (IPN). Yautepec, Morelos, México. 69 p.
 13. Pérez, L., V. Cordero y L. Fabret. 2009. Eficiencia de azoxistrobin y diferentes triazoles en el control en campo de las principales enfermedades fúngicas del arroz en Cuba. *Centro Agrícola* 36(2): 15-23.
 14. Pérez, E. J., A. Bernal, P. Milanés, M. Leiva, E. Lopes, Y. Sierra y R. Cupull. 2013a. Influencia del tiempo de incubación de *Trichoderma harzianum* Rifai en la actividad antifúngica del filtrado de cultivo contra *Bipolaris oryzae*. *Centro Agrícola* 40(2): 27-36.
 15. Pérez, E. J., P. Milanés, A. Bernal, M. Leiva, G. García, L. P. Lobato et al. 2013b. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagüeyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. *Centro Agrícola* 40(3): 29-36.
 16. Pérez, E. J., A. Bernal, P. Milanés, Y. Sierra, M. Leiva, S. Martín y O. A. Monteagudo. 2015. Efecto de diferentes factores de cultivo en la obtención de filtrados de *Trichoderma harzianum* con actividad antifúngica sobre *Magnaporthe grisea*. *Revista de Protección Vegetal* 30: 92.
 17. Pérez, E. J. 2016. Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de tres hongos fitopatógenos foliares en arroz. *Revista de Protección Vegetal* 31(2): 150.
 18. Pérez, E. J., A. Bernal, P. Milanés, M. Leiva, Y. Sierra y R. Cupull. 2017. Actividad antagonica de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Centro Agrícola* 44(3): 13-19.
 19. Ramírez, J. G., D. A. Castañeda y J. G. Morales. 2013. Dinámica microbial del suelo asociada a diferentes estrategias de manejo de *Phytophthora cinnamomi* Rands en aguacate. *Rev. Ceres* 80(6): 811-819.
 20. Reyes, T. G., Rodríguez, D. Pupo, L. Alarcón y Y. Limonta. 2007. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad* 11(1): 29-33.
 21. Rivero, D., A. Cruz, A. T. Rodríguez, A. Echeverría y B. Martínez. 2012. Hongos asociados al manchado del grano en la variedad de arroz INCA LP-5 (*Oryza sativa* L.) en Cuba. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 32: 132-138.
 22. Rodríguez, M. F., P. Milanés, E. Pérez y Y. Sierra. 2016. Compatibilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai con fungicidas del arroz y su efecto sobre tres fitopatógenos fúngicos. *Agrisost.* 22(2): 54-67.
 23. Rodríguez, I. y J. Flores. 2018. Capacidad antagonica *in vitro* de *Trichoderma* spp frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro* 30(1): 49-58.

24. Vargas, R., A. Wang, M. Obregón y M. Araya. 2015. Efecto de *Trichoderma* spp., *Paecilomyces lilacinus* y la inyección de nematicida en el pseudotallo en el combate de *Radopholus similis* y la producción de banano. *Agronomía Costarricense* 39(2): 61-76.
25. Villamil, J. E., L. J. Sierra, Y. Olarte, A. T. Mosquera, J. D. Fajardo, E. H. Pinzón y J. W. Martínez. 2015. Integración de prácticas culturales y control biológico para el manejo de *Moniliophthora roreri* Cif & Par. *Revista de Ciencias Agrícolas* 32(2): 13-25.