

# Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. *in vitro* como potenciales biofungicidas para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn en la papa

Pérez, A. A., Pérez, M. A., Martínez Coca, B., Rollhaiser, I. N. y Blengini, M. C.

DOI: 10.31047/1668.298x.v37.n2.29419

## RESUMEN

La calidad y rendimiento en los sistemas de producción de papa se ve seriamente afectado por enfermedades por hongos como *Rhizoctonia solani*, cuyo control químico es ineficiente. El objetivo de este trabajo fue seleccionar aislamientos de *Trichoderma* spp. *in vitro* como potenciales biofungicidas para el control de *R. solani* en papa. A partir de muestras de suelo de los departamentos Calamuchita, Río Primero, Punilla y San Javier, de la provincia de Córdoba (Argentina), se aislaron e identificaron genéticamente 18 cepas nativas de *Trichoderma*. A través de cultivos duales *in vitro* se evaluó la competencia por el sustrato, micoparasitismo y capacidad de antibiosis. Se identificaron cinco cepas promisorias: *T. atroviride* ACp8 y CBa3, *T. konigiopsis* CBk2 y CBk4 y *T. harzianum* CBh2. Estas cepas presentaron un sobrecrecimiento mayor al 85 % sobre el patógeno; fueron muy competitivas por el sustrato (Grado 1) y presentaron una elevada capacidad de antibiosis mayor al 35 % lo que inhibió el crecimiento radial por al menos cuatro mecanismos de interacción hifal frente a *R. solani*. Las cepas seleccionadas que reconocen específicamente al fitopatógeno y presentan alta adaptación edafoclimática por su condición de nativas, podrán ser incorporadas al manejo del cultivo favoreciendo la sustentabilidad del sistema.

**Palabras clave:** control biológico; infección; mecanismos de acción; rhizoctoniasis.

Pérez, A. A., Pérez, M. A., Martínez Coca, B., Rollhaiser, I. N. and Blengini, M. C. 2020. Selection of *Trichoderma* spp. isolates *in vitro* as potential biofungicides for the control of *Rhizoctonia solani* Kühn on potato. Agriscientia 37 (2): 21-33

## SUMMARY

Quality and performance in potato production systems is seriously affected by fungi diseases such as *R. solani*, whose chemical control is inefficient. The objective of the present work was to select isolates of *Trichoderma* spp. *in vitro* as potential biofungicides for the control of *Rhizoctonia solani* on potato. From soil samples from Calamuchita, Río Primero, Punilla and San Javier departments in the Province of Córdoba (Argentina), 18 native *Trichoderma* strains were isolated and genetically identified. They were evaluated *in vitro* by the dual culture method on their competence for the substrate, mycoparasitism and antibiosis capacity. It was possible to identify a group of five promising strains: *T. atroviride* ACp8 y CBa3, *T. konigiopsis* CBk2 y CBk4 y *T. harzianum* CBh2. These strains had more than 85 % overgrowth over the pathogen, were very competitive for the substrate (Grade 1) and had an antibiosis capacity higher than 35 % which inhibited radial growth through at least four mechanisms of hyphal interaction against *R. solani*. The selected strains that specifically recognize the phytopathogen and due to their native condition present high edaphoclimatic adaptation, may be incorporated into crop management improving the system sustainability.

**Key Words:** biological control; infection; action mechanisms; rhizoctoniasis.

Pérez, A. A. (ORCID: 0000-0001-7208-0992), Rollhaiser, I. N. (ORCID: 0000-0001-8291-0558) y Blengini, M. C. (ORCID: 0000-0002-6697-2318): Centro de Transferencia de Bioinsumos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Pérez, M. A. (ORCID: 0000-0001-8400-5084): Centro de Transferencia Calidad Agroalimentaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Martínez Coca, B. (ORCID: 0000-0002-2700-0305): Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba. Correspondencia a: alejandroaperez@agro.unc.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo de amplia distribución mundial y representa un alimento de alto valor nutricional (Argenpapa, 2018). La multiplicación vegetativa de este tubérculo es una forma de mantener las características varietales por generaciones sucesivas. Sin embargo, es un medio de transporte y diseminación de enfermedades que ocasionan pérdidas en la calidad sanitaria y el rendimiento alcanzado (García Crespo, Arcia Montesuma, Pérez Tortolero y Riera, 2012). Entre las enfermedades en papa, se destaca por su importancia la rhizoctoniasis o costra negra, provocada por *Rhizoctonia solani* Kühn. Éste patógeno ocasiona fallas en la emergencia de plantas, disminución del rendimiento y malformaciones en los tubérculos, con la particularidad de presentar numerosos hospedantes y al no implementarse métodos de control eficiente, se acumula en el suelo en forma de esclerocios (Beltrán Acosta, Moreno Velandia y Cotes, 2011; Mantecón, 2015; Osorio Hernández

*et al.*, 2016; Alarcón Flor, 2019). La aplicación de fungicidas al suelo o como desinfectantes de tubérculos para el control de la rhizoctoniasis en papa beneficia su calidad sanitaria con niveles de incidencia aceptables del 5 %, sin aumentar el rendimiento (Mantecón, 2015). El control químico de la enfermedad no ha sido eficaz, por lo que la búsqueda de agentes nativos de control biológico para disminuir la carga infectiva del agente causal e incorporarse al manejo de la enfermedad, constituirá una alternativa más para reducir las pérdidas, los costos de producción y los niveles de contaminación ambiental (Osorio Hernández *et al.*, 2016).

Entre los microorganismos propuestos para el manejo de enfermedades se menciona a *Trichoderma*, un hongo anaerobio facultativo, potencialmente antagonista de fitopatógenos y colonizador de la rizósfera (Beltrán Acosta, Moreno Velandia y Cotes, 2011; Osorio Hernández *et al.*, 2016; Companioni González, Domínguez Arizmendi y García Velasco, 2019; Gakegne y Martínez Coca

2019; Infante y Martínez Coca, 2019). Numerosas especies y cepas de *Trichoderma* han sido identificadas a nivel mundial, sin embargo, no todas han sido eficientes agentes de biocontrol, por lo que se requiere un trabajo minucioso que permita evaluar diferentes aislamientos y seleccionar el que presente mayor eficacia (Cotes, 2018; Companioni González *et al.*, 2019).

En particular existen estudios acerca de la acción de diferentes especies de *Trichoderma* sobre la rhizoctoniasis (Beltrán Acosta, Moreno Velandia y Cotes, 2011; García *et al.*, 2012; Alarcón Flor, 2019; Infante y Martínez Coca, 2019), pero hay que destacar que su efecto no es el mismo, según la región agrícola. Debido a lo expuesto, resulta importante la búsqueda y evaluación de cepas nativas de *Trichoderma*, para el control de hongos patógenos en las condiciones ambientales de producción y poder identificar los mecanismos de acción a fin de lograr bioformulados de alta eficacia (Castro, 2015; Companioni Gonzalez *et al.*, 2019). Al respecto, Martínez, Infante y Reyes (2013) y Cotes (2018) mencionan como mecanismos de acción del género *Trichoderma* la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y la producción de metabolitos antibióticos de naturaleza volátil y no volátil.

A pesar de la potencialidad de *Trichoderma* como biocontrolador, su adopción en Argentina como parte del manejo de enfermedades en papa no ha sido relevante, posiblemente debido a los resultados variables que se han obtenido, la cepa incorporada y/o a la calidad del producto aplicado.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar aislamientos de *Trichoderma* spp. *in vitro* como potenciales biofungicidas para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn en papa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo de suelos para la obtención de aislamientos nativos de *Trichoderma* spp.

Para la prospección de nuevos aislamientos, se tomaron muestras de suelo de los departamentos Calamuchita, Río Primero, Punilla, San Javier y Córdoba Capital (cinturón verde) en la provincia de Córdoba, Argentina. El muestreo se realizó en zonas de monte y campos cultivados sin aplicaciones previas de *Trichoderma* spp. De cada ecosistema, se recolectaron con barreno cuatro submuestras de los primeros 20 cm de profundidad, tomadas en diferentes posiciones del lote, para totalizar 1 kg de suelo de cada sitio, eliminando la materia orgánica superficial. Cada muestra se acondicionó

en conservadora y se trasladó al laboratorio para ser procesada.

### Aislamiento e identificación

Luego de homogeneizar cada muestra de suelo, se tomó una submuestra de 10 g, colocándola en 90 ml de agua destilada estéril y se agitó durante 20 a 30 min en agitador orbital a 170 rpm. De dicha dilución se tomó un ml y se diluyó en nueve ml de agua destilada esterilizada.

El aislamiento de *Trichoderma* del suelo se realizó de acuerdo al método de dilución propuesto por Nelson, Toussoun y Marasas (1983) en placas Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG), más antibiótico Cloranfenicol al 0,01 %, para inhibir la proliferación bacteriana. Se realizaron siembras sobre las placas con 0,5 µL de suspensión de suelo en agua destilada estéril 1/1000 p/v de cada muestra. Las cajas se incubaron a 25 °C, con alternancia luz/oscuridad de 12 h. Las observaciones fueron diarias hasta los 6 días desde la siembra seleccionando todas las colonias correspondientes al género *Trichoderma*, de acuerdo a sus características morfológicas: micelio, conidióforos, fiálides, conidios, tipo, textura y color de la colonia (Gams y Bisset, 1998).

Para la identificación y el establecimiento de una colección de cepas puras de *Trichoderma*, se desarrollaron cultivos monospóricos en diluciones 1/1000 a 1/10000 p/v mediante barridos en placas Petri con agar agua (AA). A las 24 h desde la siembra se transfirieron esporas individuales germinadas a placas con agar malta (AM), de acuerdo al método de Cañedo y Ames (2004). Para asegurar la viabilidad e integridad morfológica, fisiológica y genética de las cepas, se conservaron a través de métodos de corto plazo (placas Petri con AM), mediano plazo (tubos rectos con AM y vaselina esterilizada) y largo plazo (liofilización).

Se corroboró la identidad de cada cepa por PCR (Polymerase Chain Reaction), llevándose a cabo con el par de primers ITS1/ITS4 siguiendo el protocolo de White, Bruns, Lee y Taylor (1990). Se amplificó, el factor de elongación de la transcripción (*tef1*) con el par de primers Ef-728M/Ef2 siguiendo la metodología de Chaverri, Castlebury, Samuels, y Geiser (2003). Las amplificaciones de la región *tef1* se llevaron a cabo con Taq 2X Master Mix (New England Biolabs, Estados Unidos) y para las reacciones con ITS1/4 se utilizó Taq Polymerase (INVITROGEN). Para ITS (espaciadores internos transcritos), en un volumen de reacción de 50 µl se agregaron 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KC1, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM primers ITS1 e

ITS4, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unidad TAQ polimerasa (Invitrogen life technologies, Brasil) y 10 a 100 ng de ADN. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 1 ciclo de 1 min a 94 °C seguido de 30 ciclos de 15 s a 94 °C, 15 s a 58 °C y 15 s a 72 °C. En cuanto a *tef1* (factor de elongación de la transcripción) en un volumen de reacción de 20 µl con buffer 1xMaster Mix (New England Biolabs), 1,25 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 a 100 ng/µl de ADN genómico. El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo de 1 min a 94 °C durante 1 min, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C con un paso final de elongación de 3 min a 72 °C (Barrera, 2012).

Las determinaciones por PCR se realizaron en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, Argentina. Las secuencias de ITS fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para confirmar los agrupamientos observados.

### **Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de aislados de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* Kühn**

Se estableció el efecto antagónico de cada aislado de *Trichoderma* spp. al enfrentarse a *Rhizoctonia solani* Kühn (CBga3) proveniente del cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA), Universidad Nacional de Córdoba (UNC). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo al método para el cultivo dual modificado al propuesto por Martínez y Solano (1995). En placas de Petri de 9 cm de diámetro, que contenían papa dextrosa agar (PDA) marca Britania, se colocó en cada extremo un disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio de *Rhizoctonia solani* y en el extremo opuesto otro disco de agar de cada aislado de *Trichoderma* spp.

Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento incluyendo testigos de *Rhizoctonia solani* y *Trichoderma* spp., en un diseño completamente aleatorizado. Las cajas se mantuvieron en cámara de incubación a 25 +/- 2 °C y 12 h de luz blanca. Las determinaciones se realizaron cada 24 h para evaluar los siguientes mecanismos:

Competencia por el sustrato: las evaluaciones en cultivos duales, se realizaron en dos etapas de 96 y 120 horas. La clasificación como antagonista de los aislamientos se llevó a cabo teniendo en cuenta la escala de clase de cinco grados propuesta por Bell, Wells y Markham (1982).

Micoparasitismo: para establecer el tipo

de interacción hifal (adhesión, enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación del citoplasma, lisis) se tomaron tres muestras de la zona de interacción de ambos hongos por cada réplica en los cultivos duales y se colocaron en portaobjetos sobre una gota de lactofenol. Las observaciones se realizaron en microscopio óptico binocular a aumento 400x. Además, se realizaron observaciones en el microscopio electrónico de barrido (MEB) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC).

El parasitismo de los aislamientos de *Trichoderma* spp. medido como el sobrecrecimiento sobre el patógeno, se evaluó a los 5 días desde la siembra del antagonista y se estableció la superficie ocupada (Infante, Martínez, Peteira, Reyes y Herrera, 2013). Los resultados se expresaron como porcentaje del área ocupada por *Trichoderma* sobre el área del patógeno.

Antibiosis: para la comprobación del efecto antibiótico de los aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre el agente patógeno, se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivo dual desde las 24 h hasta el momento en que se estableció contacto físico entre el antagonista y el patógeno (Pérez Torres *et al.*, 2017). Se empleó la fórmula  $PICR = [(R1-R2)/R1] \times 100$ ; donde R1 es el crecimiento radial del testigo y R2 el crecimiento radial del patógeno en los tratamientos (Samaniego Fernández, Harouna, Corbea, Rondón Castillo y Placeres Espinosa, 2018).

### **Diseño y análisis estadístico**

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado. Los valores porcentuales se transformaron mediante el cálculo de  $\sqrt{\arcsin(p)}$ . Con el procesador estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014) se realizó el análisis de varianza y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para la identificación de grupos funcionales se realizó el análisis de conglomerados por el método de encadenamiento jerárquico de Ward. Se utilizaron como atributos funcionales la actividad antagónica medida como el porcentaje de sobrecrecimiento de *Trichoderma* sobre el patógeno, la antibiosis en términos de PICR y el micoparasitismo de acuerdo al número y tipo de interacciones hifales.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De la prospección realizada se obtuvieron 18 aislamientos de *Trichoderma* de las áreas

geográficas muestreadas. De acuerdo a la comparación de las secuencias ITS obtenidas con las depositadas en la bases de datos del NCBI se identificaron las cepas aisladas por especie (Tabla 1). La mayor cantidad de cepas correspondieron a *T. koningiopsis* (seis cepas), seguidas de *T. harzianum* (cuatro cepas) y *T. atroviride* (tres cepas).

### Competencia por el sustrato

La respuesta del crecimiento de *Trichoderma* en cultivos duales al enfrentarse a *R. solani*, se presenta en la Figura 1.

A las 96 h de crecimiento *in vitro* (Tabla 1), el 88 % de las cepas en estudio mostraron un crecimiento sobre el patógeno, cubriendo entre el 75 % al 100 % de la superficie de la caja (Clase 2 y Clase 1 respectivamente) de acuerdo a la escala de Bell *et al.* (1982). La detención del crecimiento de ambos hongos (Clase 3) solo se detectó en el caso de *T. gamsii* cepa CBg1. Mientras que *T. virens* cepa CBvs1 no mostró efecto control (Clase 4) ante el avance de *R. solani* que se extendió sobre toda la superficie del medio de siembra. A las 120 h desde la siembra, el 88,8 % de las cepas se identificaron como Clase 1 y 2, manteniendo su bajo nivel de competencia *T. gamsii* CBg1 (Clase 3) y *T. virens* CBvs1 (Clase 4). Cabe destacar

que el testigo de *Rhizoctonia* alcanzó su máximo crecimiento a las 96 h, iniciando la formación de esclerocios a partir de las 48 h desde la siembra.

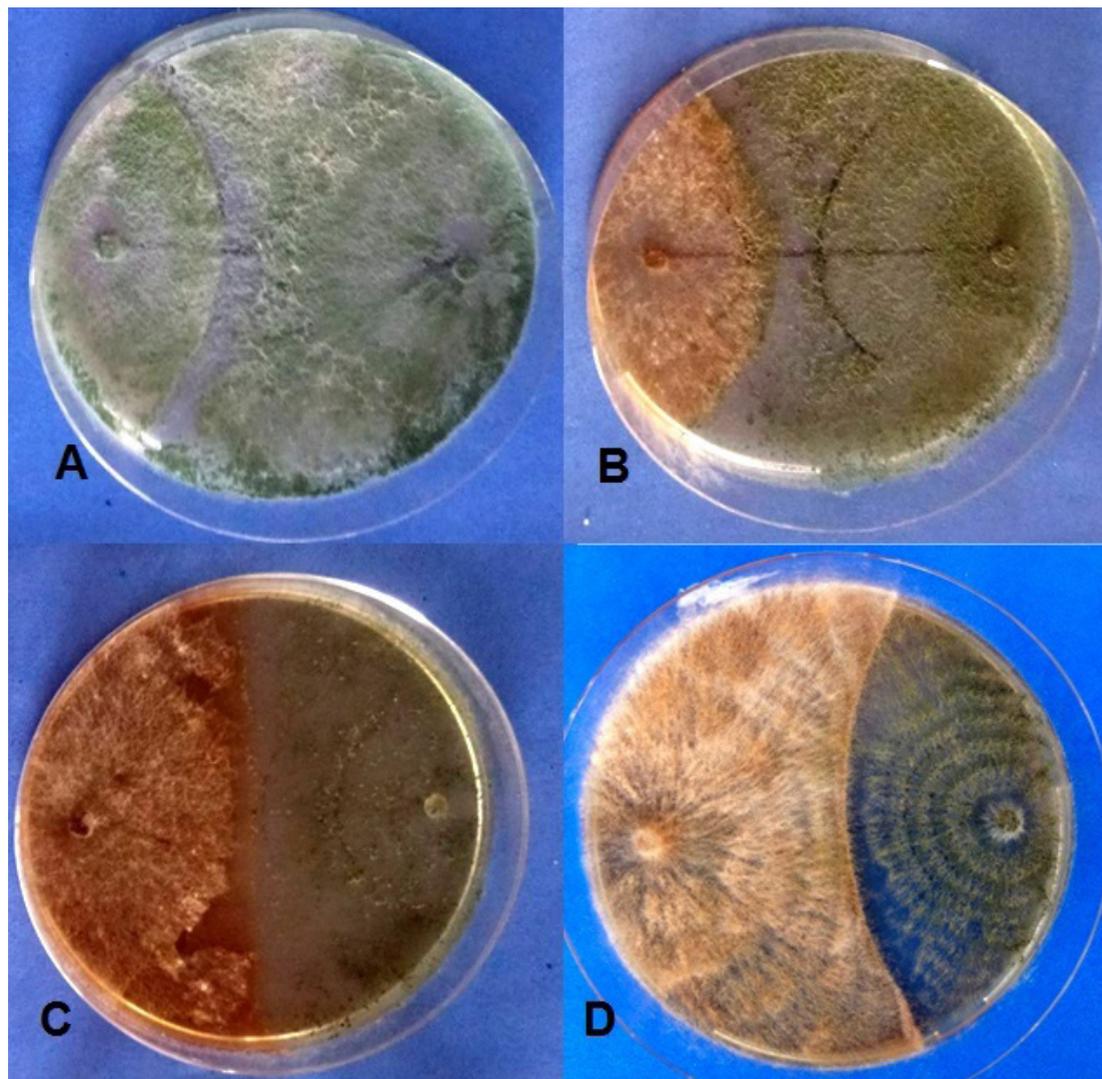
Estos resultados demuestran que la capacidad de competencia en las cepas evaluadas se mantiene, aún cuando requieran de más tiempo para alcanzar el mismo efecto, de acuerdo a lo propuesto por Martínez *et al.* (2008). Además, se puso en evidencia el gran potencial de competencia que presenta *Trichoderma* dado fundamentalmente por su velocidad de crecimiento que es superior a la del patógeno en las cepas evaluadas, a excepción de los aislamientos identificados como *T. virens* CBvs1 y *T. gamsii* CBg1.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los informados por diferentes autores, quienes han establecido el comportamiento de *Trichoderma* como Clase 1. De este modo, el alto grado de competencia de las cepas de *T. harzianum* sobre patógenos asociados a semillas, fue informado por Siameto, Okoth, Amugune y Chege (2011) quienes observaron un crecimiento rápido sobre *Pythium* sp. Por su parte, Bell *et al.* (1982), registraron como Clase 1 a diferentes aislados de *Trichoderma* spp. frente a los grupos AG-3 y AG-2 de *R. solani*. También Reyes, Martínez e Infante (2008) en su trabajo con hongos perjudiciales en arroz, identificaron 47 aislamientos de *Trichoderma* spp. en las Clases 1

**Tabla 1.** Evaluación *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn. Valores en una misma columna seguidos de diferente letra difieren significativamente según Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Especie de <i>Trichoderma</i>	Cepa	Escala de Bell		PICR (%)	Sobrecrecimiento sobre el patógeno (%)	Interacción hifal
		96 hs	120 hs			
<i>T. harzianum</i>	CBh1	2 b	1 a	28,69 a	100	L-V
	CBh2	1 a	1 a	40,53 e	100	E-P-V-G-L
	CBh3	2 b	1 a	22,54 c	100	L-V
	CBh4	1 a	1 a	30,56 d	100	E-V
<i>T. atroviride</i>	ACp8	1 a	1 a	41,76 e	100	E-P-V-G-L
	CBa2	2 b	1 a	25,93 c	100	E-L-V
	CBa3	2 b	1 a	56,47 f	85	E-V-G-L
<i>T. koningiopsis</i>	CBk1	2 b	1 a	25,17 c	100	E-L-V
	CBk2	1 a	1 a	38,61 e	100	E-P-L-V
	CBk3	2 b	1 a	30,52 d	100	E-L-V
	CBk4	1 a	1 a	36,58 e	100	E-P-L-V
	CBk5	1 a	1 a	34,05 d	100	E-L-V
	CBk6	1 a	1 a	34,61 d	100	E-L-V
<i>T. viride</i>	CBv1	2 b	2 b	28,77 d	100	L-V
<i>T. virens</i>	CBvs1	4 d	4 d	5,96 a	0	Sin interacción
<i>T. longibrachiatum</i>	CBi1	2 b	2 b	31,32 d	75	L-V
<i>T. clado-koningii</i>	CBck1	1 a	1 a	29,28 d	70	L-V
<i>T. gamsii</i>	CBg1	3 c	3 c	12,85 b	20	L-V

PICR: porcentaje de inhibición del crecimiento radial. E: enrollamiento, P: penetración, V: vacuolización, G: granulación, L: lisis



**Figura 1.** Competencia por el sustrato *in vitro* de *Trichoderma* y *R. solani*. A: Clase 1; B: Clase 2; C: Clase 3; D: Clase 4 de acuerdo a Escala de Bell

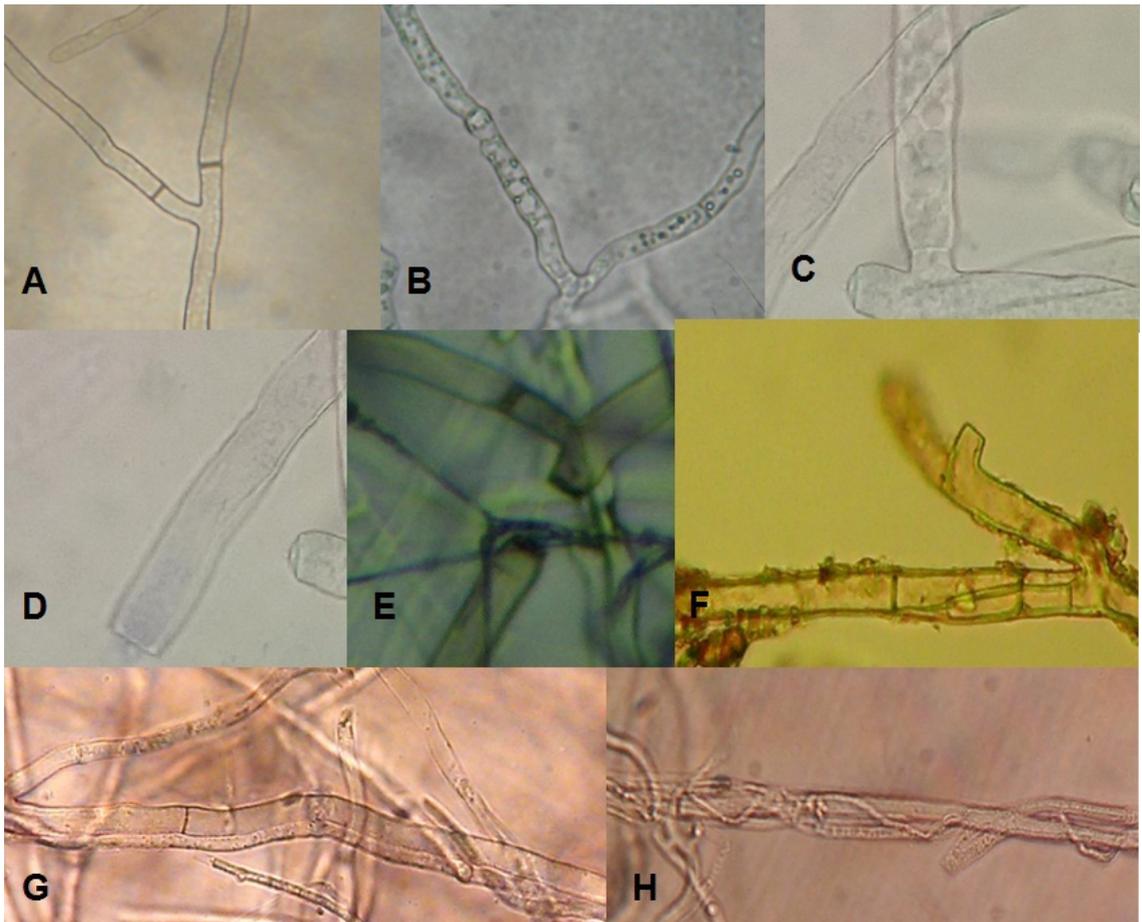
y 2 lo que refleja su gran potencial de competencia establecido por su alta velocidad de crecimiento que supera al de los patógenos. Mientras que Sánchez García, Espinosa Huerta, Villordo Pineda, Rodríguez Guerra y Mora Avilés (2017) informaron como Clase 1 a las cepas de *Trichoderma* evaluadas al enfrentarlas a *R. solani* en poroto.

### Micoparasitismo

En la Figura 2 se presentan las fotografías correspondientes a los preparados microscópicos realizados. Es de destacar las características

morfológicas en cuanto a la integridad y compartimentalización de las estructuras de hifas de *R. solani* en el testigo respecto a lo observado en el cultivo dual. Mientras que, al enfrentarse se pudo identificar, en la zona de contacto de los microorganismos, adhesión, enrollamiento hifal y con la penetración de hifas de *Trichoderma* en las hifas del patógeno, se detectó degradación parcial o total (lisis), granulación y vacuolización del contenido citoplasmático.

En la Figura 3 se muestran las interacciones hifales de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* mediante MEB, donde se observó con mayor detalle la adhesión, penetración, enrollamiento y



**Figura 2.** Interacciones hifales ejercidas por *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* detectadas con microscopio óptico (400X). A: hifa normal de *Rhizoctonia solani* (Testigo); B: granulación del citoplasma; C: vacuolización; D y E: lisis; F y G: adhesión; H: enrollamiento

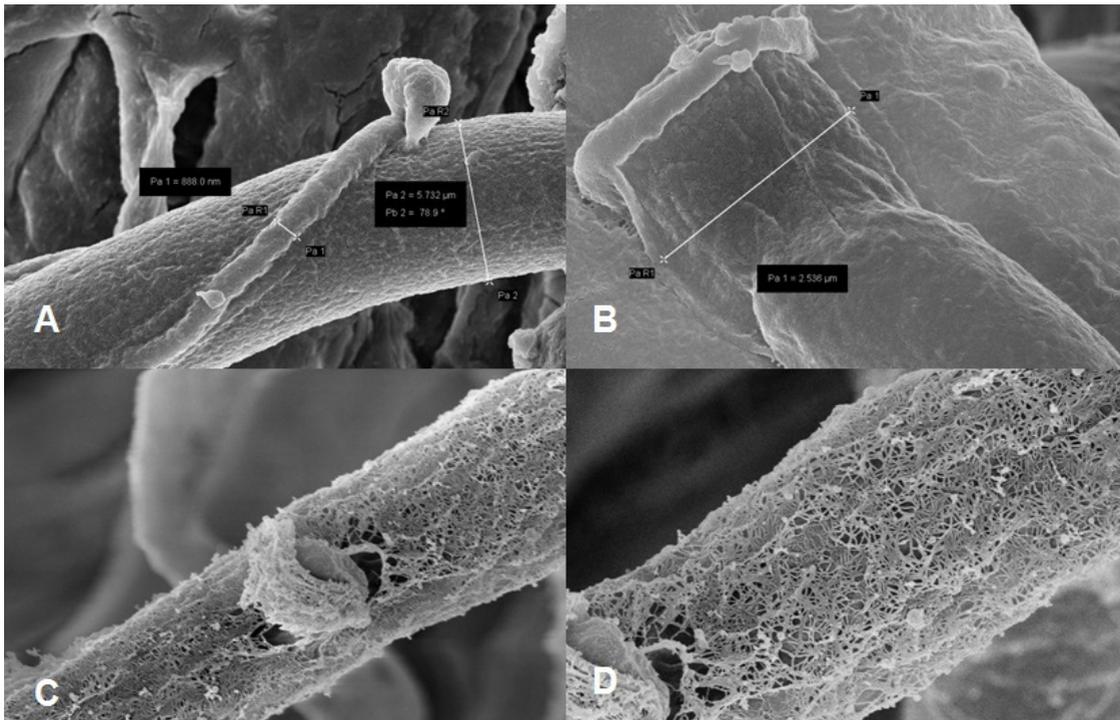
procesos líticos a nivel del citoplasma.

Los resultados de interacción hifal con *R. solani* presentados (Tabla 1), indican que el 94,4 % de las cepas en estudio mostraron al menos dos tipos de mecanismos. Solo *T. harzianum* CBh2 y *T. atroviride* ACp8 presentaron los cinco tipos de interacción hifal detectados: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación del citoplasma y lisis. Mientras que *T. atroviride* CBa3, *T. konigiopsis* CBk2 y CBk4, exhibieron cuatro tipos de interacción hifal. Solo *T. virens* CBvs1 no evidenció ningún tipo de interacción con el patógeno, en concordancia con la ausencia de crecimiento sobre *R. solani*. Se ha descrito que la multiplicidad de mecanismos con relación al micoparasitismo, favorece la acción de biocontrol sobre el fitopatógeno (Pérez Torres *et al.*, 2017; Companioni González *et al.*, 2019). Sin embargo, no todos las formas de interacción se manifiestan, ya que depende de la cepa de *Trichoderma* evaluada y de las condiciones

ambientales (Martínez Coca, 2017).

Según investigaciones previas (Guédez, Cañizalez, Castillo y Olivar, 2012; Martínez *et al.*, 2013) el proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se inicia al ponerse en contacto con la hifa del hospedante, formándose apresorios que permiten la penetración. Sobre la base de las observaciones realizadas en nuestro trabajo, solo en cuatro cepas de las evaluadas se detectó la mencionada estructura.

El fenómeno de enrollamiento se presentó en más de la mitad de las cepas evaluadas (61 %). Este aspecto es relevante, ya que la adhesión y posterior enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* sobre el patógeno provoca su debilitamiento, de acuerdo a lo sugerido por Eraso Insuasty, Acosta Rodríguez, Salazar González y Betancourth García (2014) en el control de *Fusarium* en arveja y Garrido y Vilela (2019) en arroz.



**Figura 3.** Interacciones hifales ejercidas por *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani* detectadas con microscopioelectrónico de barrido. A: adhesión, lisis y penetración, B: enrollamiento, C: penetración y lisis, D: lisis

Por su parte, el fenómeno de lisis fue observado en todos los aislamientos, a excepción de *T. harzianum* CBh4 y *T. virens* CBvs1. Estos cambios estructurales pueden ser atribuidos a la acción de enzimas hidrolíticas que actúan debilitando y desintegrando las paredes del patógeno (Martínez, Infante y Reyes, 2013; Companioni González *et al.*, 2019; Infante y Martínez, 2019). Es importante destacar que la capacidad lítica desarrollada por *Trichoderma* depende más de la cepa y el hospedante que de la especie (Martínez *et al.*, 2013).

En investigaciones realizadas en banana y poroto Golam y Llag (1999) y Gonzales (2001) informaron cambios morfológicos (acortamiento y/o deformaciones) en las hifas de *R. solani* micoparasitadas por *Trichoderma*, sin embargo en este trabajo tales cambios no fueron observados.

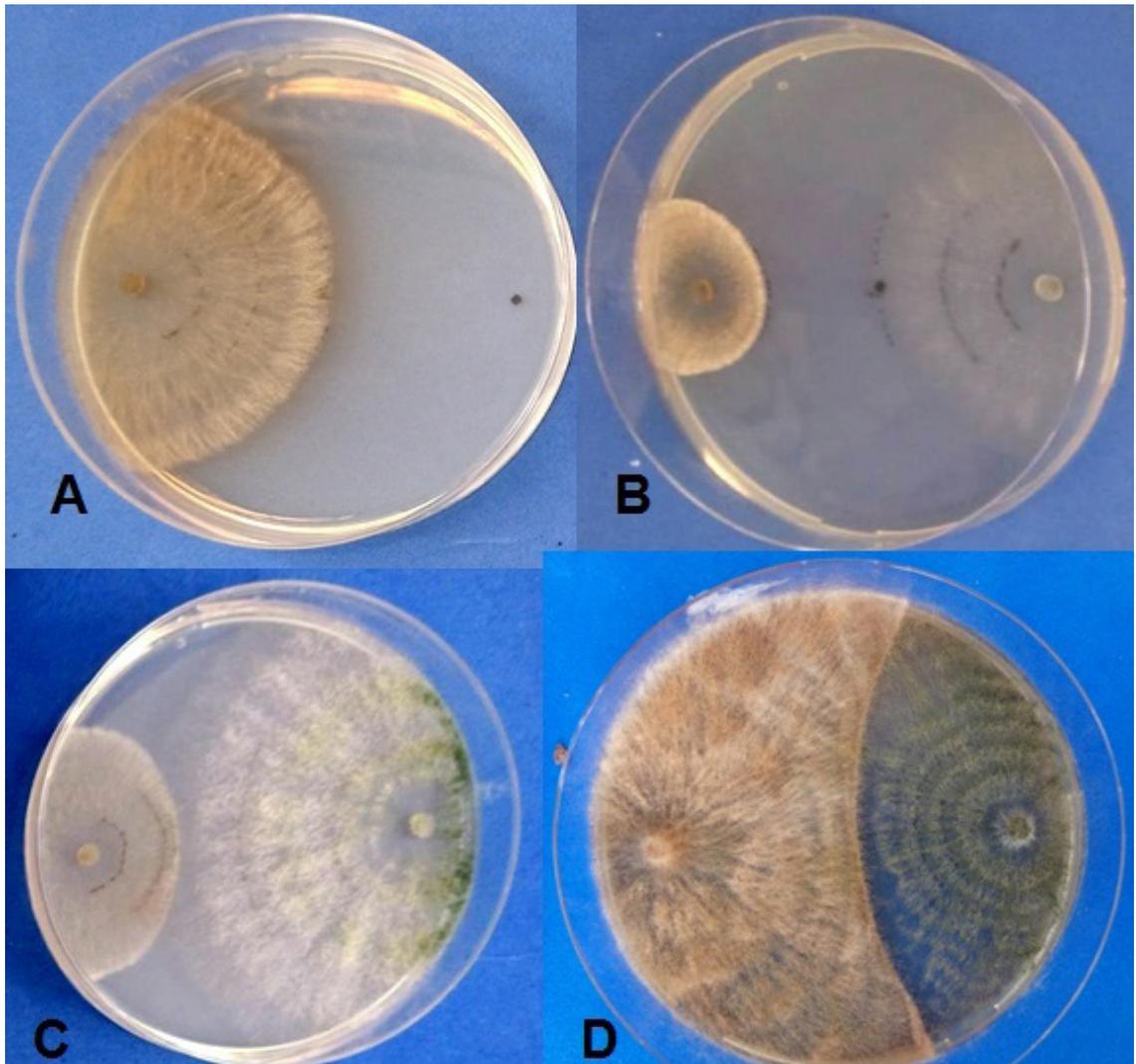
Cabe destacar que las cepas en estudio mostraron diferencias en su capacidad de sobrecrecimiento sobre *R. solani* (Tabla 1) como indicador de su actividad antagónica. Todas las cepas pertenecientes a *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. konigopsis*, *T. viride* y *T. longibrachiatum* alcanzaron Grado 1 (crecimiento superior al 75 % del área cubierta por el patógeno), observándose

Grado 2 en el caso de *T. clado-koningii* CBck1 (70 %) y Grado 4 para *T. gamsii* CBg1 (20 %). Mientras que solo para *T. virens* CBvs1 se asignó Grado 5, ya que no hubo crecimiento sobre el patógeno.

### Antibiosis

La evaluación de la antibiosis a las 24 h, cuando aún no había contacto entre ambos hongos medido en términos de PICR se presenta en la Figura 4. La respuesta observada fue diferente entre las cepas evaluadas en cultivo dual (Tabla 1). Así, *T. atroviride* CBa3 alcanzó el mayor valor de PICR (56,47 %); mientras que para *T. virens* CBvs1 se determinó el menor porcentaje (5,96 %). Entre las cepas agrupadas en Clase 1 según la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), el 22 % de ellas alcanzaron un valor de PICR cercano a 40 (39,38 %) lo que las destaca en su acción antibiótica frente a *R. solani*, de acuerdo lo propuesto por Osorio Hernández *et al.* (2016).

Los porcentajes establecidos en este trabajo no se acercan a los informados por Pérez Torres *et al.* (2018) al confrontar *T. harzianum* A34 con *R. solani*



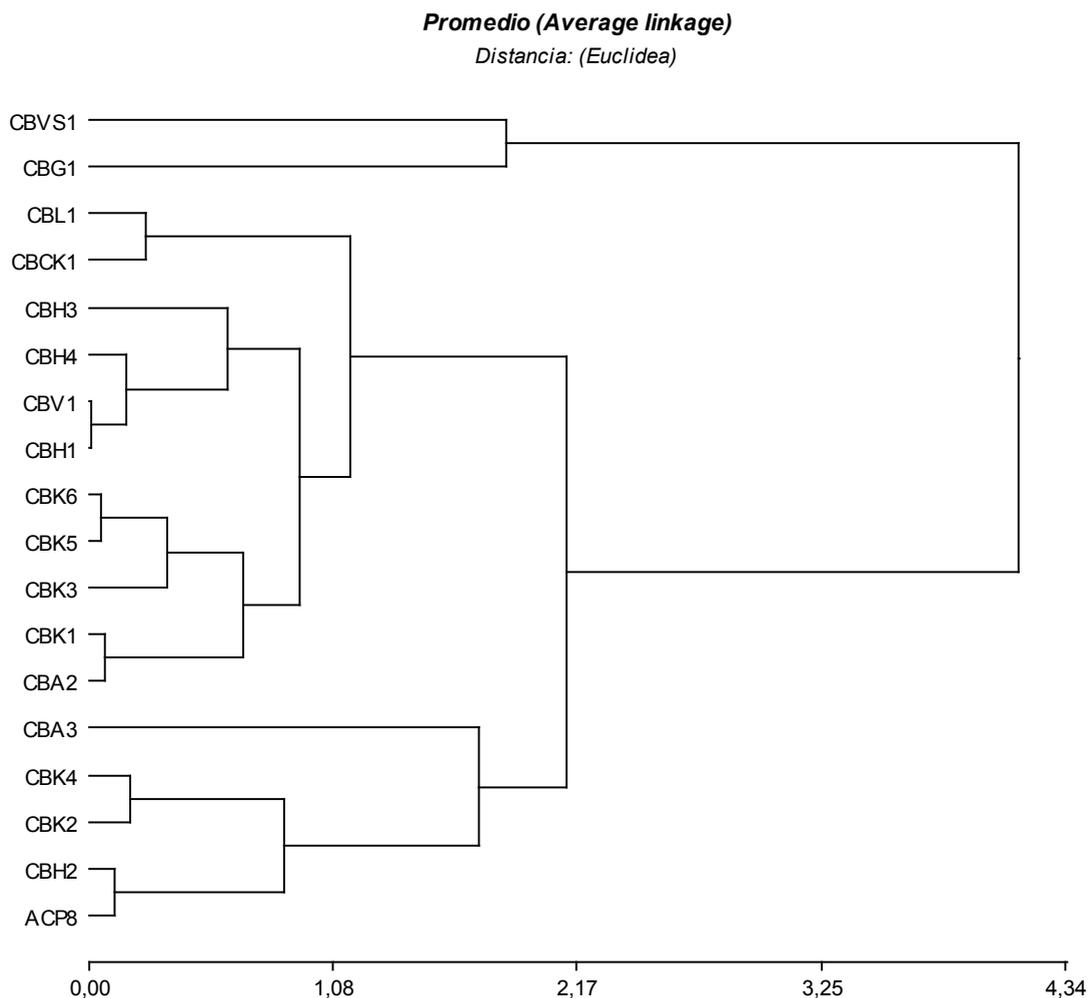
**Figura 4.** Antibiosis medida como PICR de *Trichoderma* en cultivo dual con *Rhizoctonia solani*. A: Testigo *R. solani*, B: inhibición de *Rhizoctonia* sp. mayor al 50 % al enfrentarse a la cepa Cba3, C: inhibición de *Rhizoctonia* sp. cercano al 40 % al enfrentarse a la cepa Cbh2, D: inhibición de *Rhizoctonia* sp. menor al 5 % al enfrentarse a la cepa CBvs1

en arroz (PICR=70 al 90 %); ni a los registrados por Rodríguez y Flores (2018) quienes evaluaron *T. crosem* 06142 y *T. koningii* Santa Lucía en maíz (PICR=50 %); como tampoco a lo reportado por Santander (2012) en mango (PICR=70 %). De lo que se deduce la importancia de la evaluación de cepas nativas para poder establecer el control efectivo de *R. solani* en condiciones locales y así diseñar formulaciones de amplia aplicación en la producción de papa.

De acuerdo a las observaciones y resultados presentados (Figura 3 y Tabla 2) se infiere que las cepas evaluadas de *Trichoderma*, que han demostrado capacidad de antibiosis, han excretado

al medio metabolitos con acción fungistática sobre el patógeno inhibiendo su crecimiento de acuerdo a lo sugerido por Infante *et al.* (2013) y Reyes *et al.* (2008). Al respecto, Osorio Hernández *et al.* (2016) proponen que el antagonista excreta antibióticos volátiles antimicóticos, que debilita al patógeno y lo hace más sensible a los metabolitos solubles. Con relación a ello, se puede comentar que la cepa *T. atroviride* ACp8, produjo un marcado aroma a coco, lo que ha sido relacionado a la producción de alfa pirona o seis pentil pirona, compuesto que inhibe el crecimiento de hongos (Rocha Valadez *et al.*, 2005; Vinale *et al.*, 2014).

El dendrograma derivado del análisis de



**Figura 5.** Dendrograma de clasificación de 18 cepas nativas de *Trichoderma* sobre la base de variables indicadoras de actividad antagónica (sobrecrecimiento sobre el patógeno), antibiosis (PICR) y micoparasitismo (interacción hifal), utilizando el algoritmo Ward y la distancia métrica Euclidiana

conglomerados elaborado en base a la actividad antagónica (porcentaje de sobrecrecimiento), antibiosis (PICR) y micoparasitismo (interacciones hifales) permitieron la identificación de tres grupos, tomando como base la distancia euclidiana de 2,15. El primer grupo quedó compuesto por *T. atroviride* ACp8 y CBA3, *T. konigiopsis* CBk2 y CBk4 y *T. harzianum* CBh2 cepas que demostraron alta actividad antagónica, valores PICR mayores al 35 % y al menos cuatro mecanismos de interacción hifal. El tercer grupo representado por *T. virens* CBvs1 y *T. gamsii* CBg1, fue identificado como el menos eficiente en el control de *R. solani*, ya que estas cepas mostraron bajos valores de sobrecrecimiento (0 y 20 %) y PICR (5,96 y 12,85 % respectivamente) y en el caso de *T.*

*virens* CBvs1 ausencia de interacción hifal. Como grupo intermedio se ubicaron 11 aislamientos con excelente actividad antagónica (100 % de sobrecrecimiento sobre el patógeno), de respuesta variable en cuanto a su capacidad de antibiosis (22,54 a 34,61 %), exhibiendo entre dos y tres mecanismos de micoparasitismo. En este grupo se ubicó *T. viride* CBv1, aún cuando este género ha sido propuesto como de alta eficiencia (Verma, Brar, Tyagi, Surampalli y Valero, 2007).

Mediante el análisis de conglomerados se logró establecer la mayor homogeneidad dentro de cada grupo identificado y la mayor diferencia entre grupos, lo que permitió la selección de aquellas cepas más eficientes en el control de *R. solani* para lograr una formulación exitosa y poder ser utilizada

en el campo. Los resultados encontrados indicaron que las cepas nativas de *T. atroviride* ACp8 y CBa3, *T. harzianum* CBh2, *T. koningiopsis* CBk2 y CBk4 fueron las más eficientes en el control de *R. solani*, con máxima potencialidad en su actividad antagónica y de antibiosis. Su activo crecimiento y su probable capacidad de producir metabolitos antifúngicos, se combina con los mecanismos de interacción hifal lo que favorece su acción sobre *R. solani*.

Disponer de estas cepas nativas de mayor especificidad y mejor adaptación edafoclimática, no solo beneficiará su persistencia en el suelo sino que además, contribuirán al desarrollo de bioformulados para mejorar el sistema sustentable de producción de papa de mejor calidad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba por el interés constante en el funcionamiento de los Centros de Transferencia Tecnológica y el apoyo económico brindado a través del Programa PROIINDIT.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón Flor, G. A. (2019). *Evaluación de tres dosis de Trichoderma harzianum para el control de costra negra (Rhizoctonia solani) en papa en Huarí- Ancash*. Tesis de grado no publicada. Facultad de Ingeniería Agraria, Industrias Alimentarias y Ambiental. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/UNJFSC/3596>
- Argenpapa (2018). *Nutrición: propiedades, beneficios y valor nutricional de la patata*. Recuperado de <https://www.argenpapa.com.ar/noticia/6623-nutricion-propiedades-beneficios-y-valor-nutricional-de-la-patata>
- Barrera, V. A. (2012). *El género Hypocrea Fr. (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico Trichoderma*. Tesis doctoral no publicada, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Recuperado de: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5226\\_Barrera.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5226_Barrera.pdf)
- Bell, K., Wells, D y Markham, R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72 (4), 379-382. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Beltrán Acosta, C. R., Moreno Velandia, C. A. y Cotes Prado, A. M. (Eds.). (2011). *Trichoderma koningiopsis* Th003, alternativa biológica para el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). Recuperado de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Castro Gómez, R. 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 doctoral, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Recuperado de: <https://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/7000>
- Companioni González, B., Domínguez Arizmendi, G. y García Velasco, R. (2019). *Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. Biotecnología Vegetal*, 19 (4), 237-248.
- Cotes, A. M. (2018). *Aislamiento, selección y mecanismos de acción de Trichoderma koningiopsis*. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Recuperado de [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/1780/77672\\_66468.pdf?sequence=1](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/1780/77672_66468.pdf?sequence=1)
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J. y Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27 (2), 302-313. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00400-1)
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. Infostat (versión 2014) [Software] Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Eraso Insuasty, C., Acosta Rodríguez, J., Salazar González, C. y Betancourth García, C. (2014). *Evaluación de cepas de Trichoderma spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por Fusarium oxysporum*. Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria, 15 (2), 237-249. DOI: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol15\\_num2\\_art:363](https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num2_art:363)
- Gakegne, E. R. y Martínez Coca, B. (2019). Eficacia de dos biofungicidas para el manejo en campo del Tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer) de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 34,1-9.
- Golam, M. y Ilag, L. (1999). Potential for biocontrol of *Lasioidiplodia thebromae* (Pat.) Griff. & Maubl in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biological*

- Control*, 15 (3), 235-240. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0716>
- Gams, W. y Bisset, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. En: C. P. Kubicek y G. E. Harman, (Eds.) *Trichoderma and Gliocadium: basic biology, taxonomy and genetics (3-34)*. Londres, Reino Unido: Taylor and Francis Ltd.
- García Crespo, R. G., Arcia Montesuma, M. A., Pérez Tortolero, M. R. y Riera Tona, R. F. (2012). Efecto de *Trichoderma* sobre el desarrollo de papa y el biocontrol de *Rhizoctonia* bajo tres tiempos de inicio de aplicación. *Agronomía Tropical*, 62 (1-4), 077-096. Recuperado de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X201200010007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X201200010007&lng=es&tlng=es)
- Garrido, M. y Vilela, N. (2019). Capacidad antagonista de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia*, *Nakateia sigmoidea* y *Sclerotium rolfsii* y su efecto en cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de cultivos de arroz. *Scientia Agropecuaria*, 10 (2), 199-206. DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.05>
- Gonzales, M. (2004). *Utilización de Trichoderma spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y del suelo en el cultivo del frijol*. Tesis de Maestría no publicada, Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. y Olivar, R. (2012). Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32, 44 - 49. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199424929012.pdf>
- Infante, D., Martínez, B., Peteira, B., Reyes, Y. y Herrera, A. (2013). Molecular identification of thirteen isolates of *Trichoderma* spp. and evaluation of their pathogenicity towards *Rhizoctonia solani* Kühn. *Biotecnología Aplicada*, 30, 23-28. Recuperado de: <https://elfoscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2013/30/1/BA003001OLO23-028.pdf>
- Infante Martínez, D. y Martínez Coca, B. (2019). Actividad antagonista de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre aislados de diferentes grupos anastomóticos de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista de Protección Vegetal*, 34(2), 1-7. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522019000200008&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522019000200008&lng=es&tlng=pt)
- Mantecón, J. D. (2015). Fungicidas aplicados al suelo como estrategia de manejo integrado de enfermedades en papa, bajo escenarios de elevada infestación inicial y residual. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 19, 29-39. DOI: <https://doi.org/10.37066/ralap.v19i1.224>
- Martínez Coca, B., Infante Martínez, D., Reyes Duque, Y., González Marquetti I., Peteira Delgado-Oramas B., Arias Vargas Y., . . . González Fuentes E. (2017). 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. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 7, 1-7. Recuperado de: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/470>
- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*, 28, 1-11. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tlng=es)
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H. y Cruz, A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista Protección Vegetal*, 23 (2), 118-125. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522008000200009&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522008000200009&lng=es&tlng=pt)
- Martínez, B. y Solano, T. (1995). Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. *Revista de Protección Vegetal*, 10 (3), 221-225.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. (1983). *Fusarium species, an illustrated manual for identification*. Pennsylvania, Estados Unidos: The Pennsylvania State University Press.
- Osorio Hernández, E., Hernández Castillo, F. D., Rodríguez Herrera, R., Varela Fuentes, S. E., Estrada Drouaillet, B. y López Santillán, J. A. (2016). Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. *Investigación y Ciencia*, 24 (67), 5-11. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67446178001.pdf>
- Pérez Torres Jr., E., Bernal Cabrera, A., Milanés Virelles, P., Leiva Mora, M., Sierra Reyes, Y. y Cupull Santana, R. (2017). Actividad antagonista de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Centro Agrícola*, 44 (3), 13-19. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852017000300002&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852017000300002&lng=es&tlng=pt)
- Pérez Torres, E., Bernal-Cabrera, A., Milanés Virelles, P., Sierra Reyes, Y., Leiva Mora, M., Marín Guerra, S. y Monteagudo-Hernández, O. (2018). Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro*, 30, 17-26. Recuperado de: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612018000100002&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100002&lng=es&tlng=es)
- Reyes, Y., Martínez, B. e Infante, D. (2008). Evaluación de la actividad antagonista de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista de*

- Protección Vegetal*, 23 (2), 112-117. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522008000200008&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522008000200008&lng=es&tlng=pt)
- Rocha Valadez, J. A., Hassan, M., Corkidi, G., Flores, C., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. (2005). 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 54-61. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.20489>
- Rodríguez, I. C. y Flores, J. (2018). Capacidad antagónica in vitro de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro*, 30, 49-58. Recuperado de: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612018000100005&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100005&lng=es&tlng=es)
- Samaniego Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón Castillo, A. J. y Placeres Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 33 (3), e02. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522018000300003&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522018000300003&lng=es&tlng=pt)
- SánchezGarcía, B. M., EspinosaHuerta, E., VillordoPineda, E., Rodríguez Guerra, R. y Mora Avilés, M. A. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia*, 51, 63-79. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952017000100063&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000100063&lng=es&tlng=es)
- Siameto, E., Okoth, S., Amugune, N. y Chege, N. C. (2011). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma harzianum* from Embu District, Kenya. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 81-90.
- Santander, A. J. (2012). Uso de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* Pens. causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de Maestría no publicada, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Verma, M., Brar, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. y Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8, 127-139. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874437001408010127>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (315 – 322). Nueva York, Estados Unidos: Academic Press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>