

DESARROLLO Y UTILIZACIÓN DE *TRICHODERMA VIRIDE* Y *GLIOCADIUM VIRENS* COMO ANTAGONISTAS DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Lino Jorge Soto, María de los Ángeles Pérez, Eddy Perera, Rafael Castañeda, 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. E-mail asdir@inifat.esihabana.cu

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 aparece 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 más 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 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. 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.

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.

Características de los antagonistas

La cepa 2684 aislada de la parte inferior del tallo de una planta de tomate y la 1731, aislada a partir de un hongo Basidiomiceto de la familia Poriaceae, ambas 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, las cuales fueron sometidas a una serie de pruebas para lograr su identificación taxonómica resultando ser *Trichoderma viride* y *Gliocladium virens* y conocer algunas características primarias.

Influencia de la temperatura sobre el desarrollo in vitro.

Trichoderma viride.

El desarrollo óptimo se obtuvo entre 25 y 28 °C y un comportamiento similar se evidenció respecto a la esporulación y en ambos casos los valores observados a 28 °C fueron superiores. (Tabla 1)

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 difirió significativamente del resto de las temperaturas probadas. (Tabla 1)

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 cultivo 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)
pH 7	57.5 a	8.86 a	60.70 a	11.85 a
pH 5	56.0 a	8.45 a	58.20 a	8.70 b
pH9	53.6 b	9.36 a	49.9 b	8.83 b
pH11	20.0 c	0.07 b	36.6 b	4.60 c

Determinación de la viabilidad de los conidios del biopreparado.

Trichoderma viride.

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 cuatro muestras, la germinación de los conidios fue satisfactoria disminuyendo ligeramente a partir de los 90 días de incubación. (Tabla 3)

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 10⁸ 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.

En las imágenes se pueden observar el comportamiento marcado del antagonismo con los hongos fitopatógenos, *Sclerotium. rolfsii*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*

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.

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.

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.

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 preinóculo que puede ser líquido o sólido incubado durante 7 a 10 días.

Los preinóculos 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 óptima 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.

El empleo de biopreparados de *T. viride* y *G. virens*, pueden disminuir 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.

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 ntenidas en las mismas par 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.

REFERENCIAS

- 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.