

ARTICULO ORIGINAL

Actividad antagónica de aislados cubanos de *Trichoderma* spp. sobre *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curt.) C. TWei

Antagonistic activity of Cuban isolates of *Trichoderma* spp. against *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curt.) C. T. Wei

✉ Amaia Ponce de la Cal*, Yaremis Ulloa Martín, Enrique Ponce Grijuela, Yamilé Baró Robaina

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5ta. B y 5ta. F, Playa, Cuba.

* Autor para correspondencia: aponce@inisav.cu

RESUMEN

Corynespora cassiicola es responsable de enfermedades foliares como la mancha anillada o tizón de fuego. En Cuba ocasiona elevados índices de infección en cultivos como frijol, pepino y tomate. El manejo de la enfermedad ha sido abordado con fungicidas químicos; sin embargo, en la búsqueda de alternativas de control se reconocen las potencialidades del género *Trichoderma*. Se evaluó el antagonismo *in vitro* de 20 aislados cubanos de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de *C. cassiicola*. Se utilizó el método de cultivo Dual y se evaluaron los modos de acción competencia por sustrato, antibiosis y micoparasitismo. Se utilizó la Escala de Clases descrita por Bell et al., 1982. El 95 % de los aislados presentaron alta capacidad antagónica *in vitro* frente a *C. cassiicola*, nueve con valores de porcentaje de inhibición del crecimiento radial a las 72 h superiores al 50 %. Se destacaron T.904, T.910 y T.918 con inhibición superior al 80 %. Se observó antibiosis, a las 24 h, en los aislados T.910, T.912 y T.918 con valores superiores al 50 %. El último limitó en 100 % el crecimiento del fitopatógeno. Los aislados T.909, T.910, T.912, T.918 y T.949 mostraron al menos tres tipos de interacción hifal. Teniendo en cuenta la presencia de múltiples mecanismos, T.910, T.912 y T.918 fueron los más promisorios en el control de *C. cassiicola*; sin embargo, se requiere su evaluación *in vivo*. La selección de aislados de *Trichoderma* con buenos niveles de control sobre *C. cassiicola* es una opción para el manejo del patógeno.

Palabras claves: Patógeno foliar, ACB, antibiosis, micoparasitismo

ABSTRACT

Corynespora cassiicola is responsible for foliar diseases, such as the target spot or *Corynespora* leaf spot. In Cuba, causes high level of infections on crops such as bean, cucumber and tomato. Disease management has been addressed with chemical fungicides; however, in the search for control alternatives the potentials of the genus *Trichoderma* are recognized. The *in vitro* antagonism of 20 Cuban isolates of *Trichoderma* spp. for the biocontrol of *C. cassiicola* was assessed. Dual Culture method was used and the mechanisms of action evaluated were competition for nutrients, antibiosis and mycoparasitism. The Class Scale described by Bell et al. (1982) was used. The 95 % of the isolates showed high *in vitro* antagonistic capacity against *C. cassiicola*, nine with radial growth inhibition percentage values at 72 hours over 50 %. Standing out T.904, T.910 and T.918 with inhibition higher than 80 %. Antibiosis was observed, at 24 hours, in the T.910, T.912 and T.918 isolates with values higher than 50 %; the last one limited in 100 % the growth of the phytopathogen. Isolates T.909, T.910, T.912, T.918 y T.949 showed at least three types of hyphal interactions. According to the presence of multiple mechanisms, T.910, T.912 y T.918 were the most promising to control *C. cassiicola*, although, *in vivo* evaluation is required. The selection of *Trichoderma* isolates with good control levels of *C. cassiicola* is an option for the management of this pathogen.

Key words: Foliar pathogen, BCA, antibiosis, mycoparasitism

Recibido: 11 de mayo de 2020

Aceptado: 03 de junio de 2020

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

El hongo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curt.) C. T. Wei. es un fitopatógeno foliar con un amplio rango de hospedantes en regiones tropicales y subtropicales (Smith, 2008; Hernández-Morales et al., 2017). Es el agente causal de las enfermedades tizón de fuego o mancha anillada y el marchitamiento gomoso del tallo en una serie de plantas dicotiledóneas, además de la “caída de la hoja” en el árbol de caucho (Silva et al., 1998).

Los síntomas de la enfermedad causada por *C. cassiicola* están relacionados a la producción de la toxina cassiicolina (Déon, 2012), y aunque los daños que se le atribuyen son típicamente foliares, también puede causar pudriciones en frutos, tallos y raíces. Se han observado pérdidas sustanciales en más de 70 países en numerosos cultivos de importancia económica como caucho (*Hevea brasiliensis* L.), papaya (*Carica papaya*), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annum* L.), soya (*Glycine max* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Shimomoto et al., 2011; Rendón, 2014; Ortega-Acosta et al., 2019).

En Cuba, *C. cassiicola* ocasiona elevados índices de infección en diferentes cultivos de alta demanda como frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y en hortalizas como pepino y tomate. En la actualidad es una de las enfermedades fúngicas que está afectando la producción de tomate en el territorio, y en pepino se ha identificado como el patógeno de mayor importancia en sistemas de organopónicos con un 100 % de incidencia, y afectaciones de un 85 %. Las temperaturas máximas entre 28 y 30 °C, unido a una humedad relativa media superior al 80 % resultan favorables para el desarrollo de esta enfermedad en nuestro país (Ferrer, 2006; Ruiz y Echemendía, 2015; Ruiz, 2016).

El manejo de la enfermedad ha sido abordado a través del uso de cultivares tolerantes, semillas tratadas con fungicidas, uso de prácticas culturales y la aplicación foliar de fungicidas químicos convencionales, los cuales se aplican con resultados favorables sobre bases preventivas. Sin embargo, si la aplicación se realiza tardía, llevará a un mayor número de aplicaciones, dando como resultado menor eficiencia de control y un aumento de los costos, además de la aparición de resistencia e hipervirulencia en algunos aislados del patógeno (Godoy et al., 2016; Hernández-Morales et al., 2017; Ortega-Acosta et al., 2019).

Por esta razón es necesario incluir diferentes alternativas de control como parte de un manejo integrado de la enfermedad. En este sentido se han realizado estudios utilizando fungicidas químicos alternativos, extractos vegetales y agentes de control biológico (ACB) con resultados favorables a nivel de laboratorio y en la reducción de la severidad de la enfermedad (Ferrer, 2006; Ruiz, 2015; Ortiz et al., 2016).

El género *Trichoderma* está catalogado entre los ACB más eficientes debido al amplio espectro antagonista que

presentan, las enzimas extracelulares que producen con actividad antibiótica, el micoparasitismo y por la habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas, entre otros mecanismos de acción (Al-Ani, 2018; Keswani, 2019). Su aplicación en la agricultura es una de las alternativas más prometedoras al empleo de fungicidas químicos (El-Sharkawy et al., 2018). Ferrer (2006) obtuvo una eficacia del 42 % en el control de *C. cassiicola* al utilizar *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) a dosis de 10,0 kg/ha en tratamientos foliares con un incremento de los rendimientos en un 50 % en el cultivo del pepino. Igualmente, Choudhary et al. (2014), con aspersiones a semillas de *Trichoderma viride* formulada (10⁷ conidios/g) controlaron la enfermedad en sésamo.

Considerando lo anterior, la selección de nuevos aislados cubanos de *Trichoderma* spp. con elevada capacidad antagonista es una alternativa con potencial para el control de *C. cassiicola* en el país. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el antagonismo *in vitro* de 20 aislados cubanos de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de *C. cassiicola*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se emplearon 20 aislados de *Trichoderma* spp. (Tabla 1) conservados en la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (Inisav) y la cepa del fitopatógeno *C. cassiicola* C10/6, proporcionada por la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (Inifat).

Los aislados fúngicos fueron transferidos a placas Petri (90 mm de diámetro) con Agar Papa Dextrosa (PDA, BioCen) e incubados durante siete días a 28 ± 1 °C. Los inóculos utilizados en todos los ensayos consistieron en discos de 5 mm de diámetro tomados a partir de la periferia de las colonias fúngicas.

Determinación de la capacidad antagonista in vitro de los aislados de Trichoderma

Se utilizó el método de Cultivo Dual (Redda et al., 2018) con modificaciones, en placas de Petri con PDA. Se sembraron discos de los aislados de *Trichoderma* y del fitopatógeno en extremos opuestos de las placas Petri (40 mm de distancia) y se incubaron a 28 ± 1 °C en oscuridad durante 10 días. Estos experimentos contaron con un total de cuatro réplicas por cada aislado estudiado y se incluyeron placas testigos del fitopatógeno, sembrado en la misma posición que en el enfrentamiento.

Se midió el crecimiento radial del fitopatógeno en dirección al antagonista y en las placas testigos con una regla graduada cada 24 h. Se evaluaron diferentes modos de acción de los aislados de *Trichoderma*: competencia por sustrato, antibiosis y micoparasitismo.

Tabla 1. Datos de los aislados de *Trichoderma* utilizados en este estudio**Table 1.** Details of *Trichoderma* isolates used in the present study

Código del aislado	Sustrato	Procedencia	Identificación
T.801	Fruto de <i>Theobroma cacao</i>	Baracoa, Guantánamo	<i>Trichoderma harzianum</i>
T.903	Suelo	Plaza de La Revolución, La Habana	<i>Trichoderma</i> sp.
T.904	Suelo	Arroyo Naranjo, La Habana	<i>Trichoderma</i> sp.
T.905	Suelo	La Lisa, La Habana	<i>Trichoderma viride</i>
T.906	Rizosfera de <i>Nicotiana tabacum</i> (rubio)	San Antonio de los Baños, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.907	Rizosfera de <i>Nicotiana tabacum</i>	San Antonio de los Baños, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.908	Rizosfera <i>Zea mays</i>	San Antonio de los Baños, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.909	Rizosfera de <i>Parthenium hysterophorus</i>	San Antonio de los Baños, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.910	Rizosfera de <i>Nicotiana tabacum</i>	San Antonio de los Baños, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.911	Suelo	San Antonio de los Baños, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.912	Rizosfera de <i>Parthenium hysterophorus</i>	San Antonio de los Baños, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.916	Semilla de <i>Zea mays</i>	Maríel, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.918	Rizosfera de <i>Persea americana</i>	Güira de Melena, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.920	Suelo	Viñales, Pinar del Río	<i>Trichoderma</i> sp.
T.949	Tubérculo de <i>Xanthosoma</i> sp.	Alquízar, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.950	Tubérculo de <i>Xanthosoma</i> sp.	Alquízar, Artemisa	<i>Trichoderma</i> sp.
T.951	Ecomic B-1	San José de las Lajas, Mayabeque	<i>Trichoderma</i> sp.
T.1056	Sobre <i>Phellinus</i> sp.	Ciénaga de Zapata, Matanzas	<i>Trichoderma</i> sp.
T.1057	Sobre <i>Phellinus</i> sp.	Ciénaga de Zapata, Matanzas	<i>Trichoderma</i> sp.
T.1059	Suelo	Ciénaga de Zapata, Matanzas	<i>Trichoderma</i> sp.

a) Competencia por sustrato

Se utilizó la Escala de Clases de antagonismo descrita por Bell *et al.* (1982) para clasificar los aislados de *Trichoderma* y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) mediante la fórmula de Samaniego *et al.* (1989).

$$PICR = \left[\frac{(R1 - R2)}{R1} \right] \times 100$$

donde:

R1: Crecimiento radial (mm) del fitopatógeno en el testigo

R2: Crecimiento radial (mm) del fitopatógeno en los enfrentamientos.

Los aislados de *Trichoderma* que inhibieron el crecimiento del patógeno en al menos 50 % se consideraron como antagonistas efectivos.

b) Antibiosis

Se determinó el efecto antibiótico de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre el fitopatógeno a través de los valores de PICR en cultivo dual a las 24 h (momento donde el antagonista y el patógeno no tenían contacto físico).

c) Micoparasitismo

Para evaluar la interacción entre nueve aislados de *Trichoderma* y el fitopatógeno se utilizó un bisturí para tomar dos muestras por réplica de la zona de contacto según Kuzmanovska *et al.* (2018). Se colocaron sobre portaobjetos con una gota de solución lactofenol-azul algodón y se realizaron

observaciones al microscopio óptico (Olympus) de contraste de fase con aumento de 400x. Se observaron diferentes tipos de interacciones hifales (penetración, vacuolización, lisis y/o enrollamiento).

Análisis estadístico

Los resultados de la inhibición del crecimiento radial se procesaron mediante un ANOVA seguido de la prueba de Scott-Knott con un nivel de significancia de 0,05. Los análisis fueron realizados con el paquete estadístico InfoStat versión 2008.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN*Determinación de la capacidad antagónica in vitro de los aislados de Trichoderma*

a) Competencia por el sustrato

Los 20 aislados de *Trichoderma* spp. fueron evaluados contra *C. cassiicola*. Luego de 10 días de enfrentamiento, según el criterio de Bell *et al.* (1982), se obtuvo que 19 aislados mostraron un alto grado de antagonismo (Clase 1 y 2) frente al patógeno (Tabla 2). Estos aislados cubrieron al menos dos tercios del medio de cultivo y, en el caso de T.904, T.910, T.912 y T.918, crecieron por encima del fitopatógeno cubriendo todo el espacio disponible, por lo que se ubicaron en la Clase 1 (Fig. 1). Solo un aislado (T.920), que representa el 5 %, fue ineficiente en el control de *C. cassiicola* (Clase 5).

Tabla 2. Inhibición del crecimiento radial de *C. cassiicola* por aislados de *Trichoderma* a las 24 y 72 h en cultivo dual y clasificación del grado de antagonismo, según la escala de Bell et al. (1982)

Table 2. Inhibition of radial growth of *C. cassiicola* by *Trichoderma* isolates at 24 and 72 hours on dual culture test and classification of degree of antagonism, according to the scale by Bell et al. (1982)

Aislados	Clase*	PICR ₂₄	PICR ₇₂	Aislados	Clase*	PICR ₂₄	PICR ₇₂
T.801	2	6,25a	45,46d	T.912	1	50,00b	65,79 c
T.903	2	43,75b	60,23 c	T.916	2	25,00a	50,00 d
T.904	1	37,50a	81,58 f	T.918	1	100,00b	89,47 f
T.905	2	25,00a	42,05d	T.920	5	12,50a	-1,31a
T.906	2	6,25a	53,41 d	T.949	2	25,00a	52,27 d
T.907	2	6,25a	38,64d	T.950	2	17,50a	44,50d
T.908	2	25,00a	51,14 d	T.951	2	32,50a	28,00c
T.909	2	25,00a	51,32 d	T.1056	2	32,50a	34,00c
T.910	1	62,50b	86,84 f	T.1057	2	2,50a	25,00c
T.911	2	0,00a	14,47b	T.1059	2	25,00a	17,50b
Testigo		0,00a	0,00a	Testigo		0,00a	0,00a

Medias con letras distintas, en una misma columna, indican diferencias significativas (ANOVA y prueba de Scott-Knott, $p \leq 0,05$)

Means with different letters, in the same column, indicates significative difference statistically (ANOVA and Scott-Knott's tests, $p \leq 0,05$)

PICR: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (%)

PICR: Radial growth inhibition percentage (%)

(*) Clase 1: *Trichoderma* spp. crece completamente sobre el patógeno y cubre toda la superficie del medio de cultivo.

Class 1: *Trichoderma* spp. grows completely over the pathogen and cover the entire surface of the culture medium; Clase 2: *Trichoderma* spp. crece al menos sobre 2/3 de la superficie del medio de cultivo / Class2:*Trichoderma* spp. grows on at least 2/3 of the surface of the culture medium; Clase 3: *Trichoderma* spp. y el patógeno colonizan aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo / Class 3:*Trichoderma* spp. and pathogen colonize approximately half the surface of the culture medium; Clase 4: El patógeno crece al menos sobre 2/3 de la superficie del medio de cultivo/ Class 4: Pathogen grows on at least 2/3 of the surface of the culture medium; Clase 5: El patógeno crece completamente sobre *Trichoderma* spp. y ocupa toda la superficie del medio de cultivo / Class 5: The pathogen grows completely over *Trichoderma* spp. and occupies the entire surface of the culture medium.

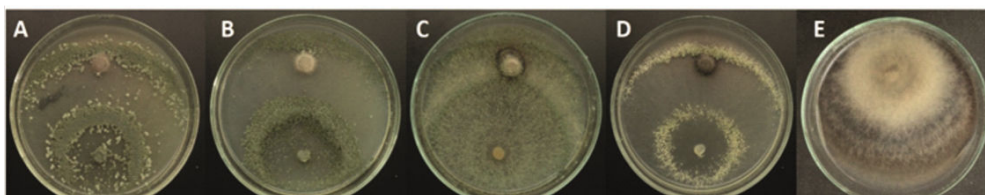


Figura 1. Cultivo dual *in vitro* de *C. cassiicola* y aislados de *Trichoderma* spp. a los 10 días.

Figure 1. *In vitro*, dual culture of *C. cassiicola* and *Trichoderma* spp. isolates after 10 days. A-T.904, B-T.910; C-T.912; D- T.918; E-Control de *C. cassiicola*/C. cassiicola control.

La competencia evaluada bajo condiciones *in vitro* se ejerce principalmente por espacio, y en ella intervienen la velocidad de crecimiento de los aislados antagonistas y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros (Martínez-Coca et al., 2018; Silva et al., 2019). Con respecto a la velocidad de crecimiento, los aislados de *Trichoderma* evaluados tienen ventajas sobre el patógeno foliar *C. cassiicola* que presentó una menor velocidad (resultados no mostrados), característica que facilita su control en adición a la alta competencia de los aislados antagonistas por espacio y nutrientes.

Otros autores (Steffen et al., 2016; Martínez-Coca et al., 2018; Filizola et al., 2019; López et al., 2019) obtuvieron

resultados similares al ubicar cepas de *Trichoderma* spp. en la Clase 1 y 2, por presentar mayor velocidad de crecimiento y colonizar mayor espacio en Cultivo Dual frente a varios fitopatógenos.

Todos los aislados presentaron efecto inhibitorio del crecimiento radial a las 72 h con diferencias significativas con respecto al testigo de *C. cassiicola* ($p \leq 0,05$), a excepción de T.920 (Tabla 2). Este comportamiento era de esperar si se relaciona con el grado de antagonismo, según la escala de Bell, presentado por los aislados al finalizar los enfrentamientos. Se corresponde que los aislados que ocasionaron porcentajes de inhibición diferentes del testigo fueron clasificados como Clase 1 y 2.

Ruiz (2016) demostró el efecto antagónico de dos cepas de *Trichoderma*, *T. harzianum* (T20) y *T. viride* (T4) sobre *C. cassiicola*, y ambas se clasificaron en la Clase 1. Consideró la cepa T20 como la más efectiva, pues logró inhibir el crecimiento micelial al 100 % en 72 h sobre este fitopatógeno.

En nuestro estudio se destacaron los aislados T.903, T.904, T.906, T.908, T.909, T.910, T.912, T.918 y T.949, con valores superiores al 50 % del PICR. El mejor comportamiento lo presentó el aislado T.918 con un valor del 89,47 % de inhibición del micelio de *C. cassiicola* a las 72 h, seguido por T.910 y T.904, con el 86,84 y 81,58 %, respectivamente. Los tres con diferencias significativas con respecto al control y al resto de los aislados evaluados.

Valores inferiores de PICR sobre *C. cassiicola* fueron obtenidos por Cuervo-Parra *et al.* (2011), al evaluar el efecto antagonista de la cepa *T. harzianum* VSL291, 74,81 % de inhibición, y por Manju *et al.* (2014) con valores del 65 % utilizando *T. viride* y *T. harzianum* a los siete y ocho días, respectivamente. Esta afirmación es válida si tenemos en cuenta que nueve de los aislados en estudio presentaron PICR superiores al 50 % a los tres días de enfrentamiento, incluso algunos por encima del 80 %.

Teniendo en cuenta lo anterior, los aislados T.903, T.904, T.906, T.908, T.909, T.910, T.912, T.918 y T.949 limitaron el crecimiento de *C. cassiicola* en un corto período de tiempo, demostrando así su eficiencia para controlar este patógeno *in vitro*.

b) Antibiosis

Con respecto al efecto antibiótico evaluado a las 24 h, se obtuvo que los aislados T.903, T.904, T.910, T.912, T.918, T.951 y T.1056 presentaron valores superiores al 30 % de inhibición del crecimiento de *C. cassiicola*, mientras el resto mostró valores por debajo del 25,0 % (Tabla 2).

En este caso, el aislado T.918 destaca por encima del resto al presentar la mayor inhibición del micelio de *C. cassiicola* 100,0 %, con diferencias significativas con respecto al testigo del patógeno ($p \leq 0,05$). Este aislado limitó completamente el crecimiento de *C. cassiicola* en un momento del enfrentamiento donde no existió contacto físico entre los dos hongos. Le siguen los aislados T.910, T.912 y T.903, causando inhibiciones del 62,50; 50,00 y 43,75 % sin diferir significativamente entre ellos y el aislado anterior, pero sí con respecto al testigo de *C. cassiicola* y al resto de los aislados. Estos resultados sugieren que la acción de cada aislado de *Trichoderma* depende del tipo de compuestos liberados, tales como antibióticos o compuestos volátiles que se mezclan con el medio, limitando el crecimiento normal del patógeno, aun sin haber contacto físico entre ellos (De la Cruz-Quiroz *et al.*, 2018).

Martínez *et al.* (2008) observaron que en tres de 13 aislamientos de *T. asperellum* la alta capacidad antagónica se expresó en el PICR desde las primeras 24 h. Por su parte, Pérez *et al.* (2017), utilizando la cepa de producción

nacional *T. harzianum* (A-34) sobre *P. grisea*, obtuvieron efecto antibiótico a las 24 h del enfrentamiento con un porcentaje de inhibición de solo el 14,3 %.

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diversos en cuanto a estructura y función, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y lo hacen más sensible a los antibióticos solubles (Martínez-Coca *et al.*, 2018).

Los resultados para los aislados T.910, T.912 y T.918, con más del 50 % de inhibición se pudieran deber a la capacidad de especies de *Trichoderma* de incorporar al medio de cultivo metabolitos sintetizados como trichodermin, trichodermol, harzianum A y viridin con efecto inhibitorio sobre otros hongos (Zeilinger *et al.*, 2016).

c) Micoparasitismo

Se realizó la evaluación del micoparasitismo a los aislados de *Trichoderma* que resultaron efectivos contra el patógeno *C. cassiicola* en Cultivo Dual. La Tabla 3 muestra los resultados en los enfrentamientos de los nueve aislados seleccionados. Las observaciones demostraron que todos los aislados presentaron micoparasitismo, con uno o más tipos de interacciones hifales con el patógeno, donde predominaron la vacuolización del contenido citoplasmático, en la totalidad de los aislados y la lisis, seguido en menor medida por el enrollamiento alrededor de las hifas del fitopatógeno y la penetración (Fig. 2).

Tabla 3. Interacciones hifales entre aislados de *Trichoderma* spp. y *C. cassiicola*

Table 3. Hyphal interactions between isolates of *Trichoderma* spp. and *C. cassiicola*

Aislados	Tipo de interacciones hifales con <i>C. cassiicola</i>
T.903	V
T.904	V-E
T.906	V-L
T.908	V-L
T.909	V-L-E-P
T.910	V-L-E-P
T.912	V-L-E-P
T.918	V-L-P
T.949	V-L-E-P

V: Vacuolización/Vacuolization; L: Lisis/Lysis; E: Enrollamiento/Coiling; P: Penetración/Penetration.

Los aislados T.909, T.910, T.912 y T.949 manifestaron la presencia de los cuatro tipos de interacciones estudiadas, lo que resulta una característica significativa y deseada a la hora de seleccionar mejores ACB. En el aislado T.918 se observaron tres tipos de interacciones con las hifas del patógeno y en el resto dos, a excepción T.903, que solo ocasionó la vacuolización del micelio de *C. cassiicola*.

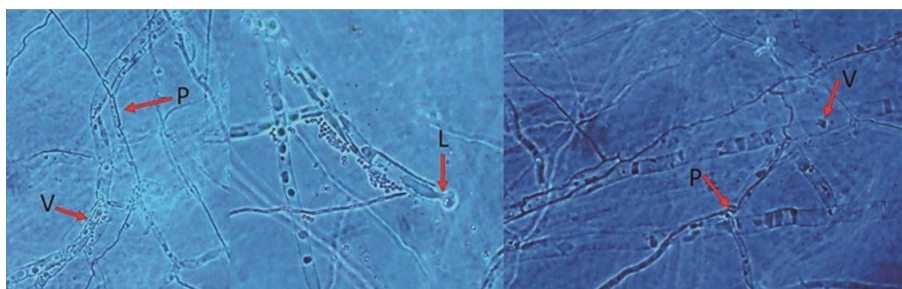


Figura 2. Interacciones hifales entre el aislado T.949 de *Trichoderma* sp. y *C. cassiicola* (400x)

Figure 2. L: Hyphal interactions between isolate T.949 of *Trichoderma* sp. and *C. cassiicola* (400x).

Nuestros resultados confirman una vez más la potencialidad de *Trichoderma* y coinciden con estudios realizados por Pérez et al. (2017) y López et al. (2019), que obtuvieron micoparasitismo directo por enrollamiento en hifas del patógeno con vacuolización y lisis. De igual manera, Martínez-Coca et al. (2018) obtuvieron en la mayoría de las cepas de *Trichoderma* que presentaron dos o más tipos de interacción hifal, donde predominó igualmente la vacuolización.

El micoparasitismo es un proceso complejo que involucra el crecimiento de *Trichoderma* hacia el hongo diana, el enrollamiento de sus hifas sobre el patógeno y el ataque y disolución de la pared celular del hongo diana por la actividad de enzimas, que pueden estar asociadas a la penetración de la pared celular (Harman, 2006).

En experimentos de estimulación del micoparasitismo, Cuervo-Parra et al. (2011) detectaron actividad β -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa, xilanasa y lipasa en *T. harzianum* VSL291 crecida en medio mínimo con pared celular de *C. cassiicola* como única fuente de carbono, aunque en un rango de valores de intermedio a bajos con respecto a otros fitopatógenos utilizados. Con otro experimento, Mathiyazhagan et al. (2004) obtuvieron una mayor actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa en plantas previamente tratadas con PGPR al inocularlas de manera artificial con *C. cassiicola*, lo que pudo haber resultado en la lisis del patógeno invasor. Estas enzimas hidrolíticas pudieran haber sido liberadas por los aislados de nuestro estudio al entrar en contacto con el patógeno, ya que todos presentaron micoparasitismo en diferentes medidas.

En un estudio similar al nuestro realizado por Ortiz et al. (2016) al utilizar la misma cepa de *C. cassiicola* (C10/6) para determinar la actividad fungicida de tres cepas del género *Cladobotryum* (*C. pinarensis*, 1789; *C. semicircularis*, 1698; y *C. virescens* (C10/110)), obtuvieron efecto antagonista causado por micoparasitismo (vacuolización). Este efecto estuvo favorecido por la mayor capacidad de las cepas para competir por el sustrato. Sin embargo, no evidenciaron la excreción al medio de algún metabolito con acción fungistática significativa sobre el patógeno, pues los valores de PICR que obtuvieron no sobrepasan, en ningún caso, el 25 % de inhibición.

La capacidad como antagonista de *Trichoderma* es altamente variable, depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción; es decir, pueden existir aislados que sean más eficientes para el control de un patógeno. Por tal motivo, la especificidad debe ser evaluada (Martínez et al., 2008). Esto se evidenció en los resultados, pues se obtuvieron diferencias en los mecanismos de acción empleados por los 20 aislados para el control de *C. cassiicola*. A pesar de que 19 resultaron altamente antagonistas, no todos mostraron inhibición por el mismo mecanismo.

En las interacciones antagonistas pueden estar involucrados diferentes mecanismos de acción. La multiplicidad de estos en un aislado es una característica importante para su selección como ACB (Hernández-Melchore et al., 2019). Al integrar todos los resultados de los modos de acción de los aislados de *Trichoderma* spp. frente al patógeno foliar *C. cassiicola*, se determinó que los aislados T.910, T.912 y T.918 fueron los más promisorios por su competencia por sustrato, antibiosis y micoparasitismo frente a este patógeno *in vitro*.

Teniendo en cuenta que *C. cassiicola* es un patógeno foliar y que las especies de *Trichoderma* frecuentemente son habitantes del suelo, se debe mencionar que ciertas cepas han sido identificadas como endófitas, tanto de raíces como de hojas (Mukherjee et al., 2013). Se ha informado que como consecuencia de la colonización de las raíces por *Trichoderma* se producen cambios significativos en el proteoma de las plantas, dando lugar a mecanismos de defensa, como la activación de la resistencia sistémica inducida (RSI) y/o la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Mendoza-Mendoza et al., 2018). La activación de resistencia ocasionada por este hongo frecuentemente involucra la liberación de elicitores a la rizosfera, los cuales son posteriormente detectados por la planta y comprenden una amplia gama de metabolitos con diversas naturalezas químicas como proteínas, peptídeos, metabolitos secundarios (MS) o compuestos orgánicos volátiles (Estrada-Rivera et al., 2019).

En un estudio, Yuan et al. (2019) demostraron que la inoculación de *T. longibrachiatum* H9 en raíces de pepino desencadenó un aumento en la resistencia al patógeno foliar *Botrytis cinerea*, lo cual se caracterizó por la reducción de la incidencia de la enfermedad. *T. longibrachiatum* H9 penetró las

células corticales de la raíz del pepino y estuvo restringido a las capas externas de la epidermis luego de 96 h, tiempo suficiente para la germinación de esporas, colonización de las raíces e inducción de respuesta en la planta.

De igual manera, es un hecho demostrado que no solo el organismo biológico es empleado para el control, sino también los extractos, enzimas y MS obtenidos a partir de este, que juegan un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos para la protección de cultivos (EPA, 2016). A pesar del amplio espectro de aplicación agrícola de este género, hasta hace algunos años eran pocos los estudios basados en la producción de sus metabolitos activos como una base para su explotación biotecnológica (Harman y Kubicek, 2014). Estos mecanismos se han propuesto dada la expresión de enzimas y MS que actúan mediante distintos mecanismos como inhibidores de crecimiento, elicitores o inductores de mecanismos fisiológicos en la planta y detoxificación de toxinas excretadas por patógenos, entre otros.

La importancia que actualmente está adquiriendo *C. cassiicola* debido al cambio climático, y principalmente al uso de variedades susceptibles, proporcionan

mayor relevancia a estos resultados, por lo que se hace necesario la evaluación de otros mecanismos de control en estos aislados (liberación de metabolitos volátiles y no volátiles) y la realización de ensayos en condiciones *in vivo* para validar estos efectos.

CONCLUSIONES

- El 95 % de los aislados nativos evaluados presentaron alta capacidad antagónica *in vitro* (Clase 1 y 2) frente a *C. cassiicola*, de los cuales nueve presentaron valores de PICR a las 72 horas superiores al 50 %. Se destacaron T.904, T.910 y T.918 con valores superiores al 80 %.
- Se observó antibiosis a las 24 h en los aislados T.910, T.912 y T.918 con valores superiores al 50 %. El último inhibió en un 100 %.
- Los aislados T.909, T.910, T.912, T.918 y T.949 presentaron al menos tres tipos de interacción hifal con el fitopatógeno.
- Los aislados T.910, T.912 y T.918 evidenciaron la presencia de múltiples mecanismos de acción, siendo los más promisorios en el control de *C. cassiicola*.

REFERENCIAS

- Al-Ani L. K. T. y Albaayit S. F. A. 2018. Antagonistic of some *Trichoderma* against *Fusariumoxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (FocTR4). *The Eurasia Proceedings of Science, Engineering & Mathematics (EPSTEM)*. 2:35-38.
- Bell K., Wells D. y Markham R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72:379-382.
- Choudhary C. S., Arun A. y Prasad S. M. 2014. Management of *Corynespora* blight of sesame through fungicides and antagonists. *Internat. J. Plant Protec.* 7(1):267-269.
- Cuervo-Parra J.A., Ramírez-Suero M., Sánchez-López V. y Ramírez-Lepe M. 2011. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *Afr. J. Biotechnol.*10(52):10657-10663.
- De la Cruz-Quiroz R., Roussos S., Rodríguez-Herrera R., Hernández-Castillo D. y Aguilar C. N. 2018. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*. doi. org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002.
- Déon M. 2012. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant. Sci.* 185-186:227-237.
- El-Sharkawy H. H. A., Rashad Y.M. y Ibrahim S.A. 2018. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 103:84-91.
- EPA (United States Environmental ProtectionAgency). 2016. Integrated Pest Management (IPM) Principles. Disponible en <https://www.epa.gov/safepestcontrol/integrated-pest-management-ipm-principles>. Consultado el 10 de mayo de 2018.
- Estrada-Rivera M., Rebolledo-Prudencio O. G., Pérez-Robles D. A., Rocha-Medina M. C., Gonzalez-Lopez, M. C. y Casas-Flores S., 2019. Histone deacetylase HDA-2 is essential in *Trichoderma* to modulate multiple responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 179 (4):1343-1361.
- Ferrer C. A. 2006. Comportamiento y control de la enfermedad tizón de fuego causada por el hongo *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. en el cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.) en sistemas de organopónicos en la provincia de Camagüey y su relación con otros patógenos fúngicos presentes en el cultivo. *Fitosanidad*. 10(4):1.
- Filizola P. R., Cavalcanti M. A., Ferreira de Souza A., Lima I., Laranjeira D. y Campos Takaki G. M. 2019. Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains *Microb Cell Fact.* 18:89.
- Godoy C. V., Utiamada C. M., Meyer M. C., Campos H. D., Pimenta B. C., Miguel-Wruck S. D. y Borges E. P. 2016. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na Safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. *Circular Técnica*. Embrapa Soja, Londrina, Brazil. 120:1-6.
- 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(1):44-49.

- Harman G. 2006 Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96(2):190-194.
- Harman G. E y Kubicek C. P., editores. 2014. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Vol. 1. Boca Raton (USA): CRC Press. doi:10.1201/9781482295320
- Hernández-Melchor D. J., Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*. 35(1): 98-112.
- Hernández-Morales J., Ochoa-Martínez D. L., Ortega-Acosta S. A. y Vega-Muñoz R. 2017. Survey on alternative hosts of *Corynespora cassiicola*, the cause of the leaf and calyx spot, in the surroundings of roselle fields in Mexico. *Tropical Plant Pathology*. 43:263-270.
- Keswani C., Singh H. B., Hermosa R., García-Estrada C., Caradus J., He Y.-W., Mezaache-Aichour S., Glare T. R., Borriess R., Vinale F. y Sansinenea E. 2019. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2>.
- Kuzmanovska B., Rusevski R., Jankulovska M. y Oreshkovikj K. B. 2018. Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. *Chil J Agr Res*. 78(3):391-399.
- López A. C., Alvarenga A. E., Zapata P. D., Luna M. F. y Villalba L. 2019. *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Mycology*. DOI:10.1080/21501203.2019.1606860.
- Manju M. J., Benagi V. I., Shankarappa T. H., Kuruvilla-Jacob C. y Sabu P. I. 2014. Antifungal activity of some biological agents against *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* leaf fall disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *IJAPR*. 1(6):30-32.
- 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. *Rev. Protección Veg.* 23(2):118-125.
- Martínez-Coca B., Infante D., Caraballo W., Duarte-Leal Y. y Echevarría-Hernández A. 2018. Antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo. *Rev. Protección Veg.* 33(2):13.
- Mathiyazhagan S., Kavitha K., Nakkeeran S., Chandrasekar G., Manian K., Renukadevi P., Krishnamoorthy A. S. y Fernando W. G. D. 2004. PGPR mediated management of stem blight of *Phyllanthus amarus* (Schum and Thonn) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 37:183-199.
- Mendoza-Mendoza A., Zaid R., Lawry R., Hermosa R., Monte E., Horwitz B. A. y Mukherjee P. K. 2018. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal. Biol. Rev.* 32, 62-85.
- Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Herrera-Estrella A., Schmoll M. y Kenerley C. M. 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:105-129.
- Ortega-Acosta S. Á., Ochoa-Martínez D. L., Leyva-Mir S. G., Velasco-Cruz C., Mora-Aguilera J. A. y Hernández-Morales J. 2019. Control químico del manchado de hojas y cálices de Jamaica en Guerrero, México. *Summa Phytopathologica*. 45(1):38-43.
- Ortiz Y., Ramos García B., Álvarez Valdés M. E., Valdés López R., Lorenzo Rodríguez Y., Plana Pérez L., Marrero Granados I., García Vázquez D., Aguado Rodríguez Y., Ruenes Figueroa M. E., Bacallao Escudero A. y Castañeda Ruiz R. F. 2016. Actividad fungicida de cepas del género *Cladobotryum* sobre *Corynespora cassiicola*. *Agrotecnia de Cuba*. 40(1):71-83.
- Pérez E. J., Bernal A., Milanés P., Leiva M., Sierra Y. y Cupull 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.
- Redda E. T., Ma J., Mei J., Li M., Wu B. y Jiang X. 2018. Antagonistic Potential of Different Isolates of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*. *Eur. Exp. Biol.* 8(2):12.
- Rendón B. 2014. Calidad sanitaria y microorganismos antagonistas a *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. en cálices frescos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Tesis presentada en opción al título de Máster en Ciencias, Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Ruiz J. 2016. Bioecología y control de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) en *Solanum lycopersicum* (L.). *Rev. Protección Veg.* 31(2):148.
- Ruiz J. y Echemendía M. 2015. *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. A. Curtis) en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Disponible en <https://www.monografias.com/trabajos104/corynespora-cassiicola-berk-m-a-curtis-cultivo-del-tomate-solanum-lycopersicum-l/corynespora-cassiicola-berk-m-a-curtis-cultivo-del-tomate-solanum-lycopersicum-l.shtml>. Consultado el 6 de abril de 2017.
- Samaniego G. J. A., Ulloa S. M. y Herrera S. T. 1989. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 8:86-95.
- Schirmbock M., Lorito M. y Wang Y. L. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol.* 60:4344-4370.
- Shimamoto Y., Sato T., Hojo H., Morita Y., Takeuchi S., Mizumoto H., Kiba A. y Hikichi Y. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathol.* 60:253-260.

- Silva W. P. K., Deverall B. J. y Lyon B. R. 1998. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology*. 47:267-277.
- Silva, R. N., Monteiro V. N., Steindorff A. S., Vieira E., Ferreira E. y Ulhoa C. J. 2019. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010>.
- Smith L. J. 2008. Host range, phylogenetic and pathogenic diversity of *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Disertación de para optar por el título de Doctor en Ciencias (Ph. D.)*. Universidad de Florida, Gainesville, EUA:102.
- Steffen G. P. K., Maldaner J., Steffen R. B., Mezzomo R., Heinz B. B., Antonioli Z. I., Muniz, M. F. B. y Dahmer S. F. B. 2016. Antagonism of *Trichoderma* isolates against plant pathogens of agricultural interest. *International Journal of Current Research*. 8(12):44465-44469.
- Yuan M., Huang Y., Ge W., Jia Z., Song S., Zhang L. y Huang Y. 2019. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC Genomics*. 20:144
- Zeilinger S., Gruber S., Bansal R. y Mukherjee P. K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma*-Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>.