



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS



UNIVERSIDAD DE CAMAGÜEY
"IGNACIO AGRAMONTE LOYNAZ"

EFFECTO DE *Trichoderma harzianum* Rifai (CEPA A-34) Y SUS
FILTRADOS DE CULTIVO EN EL CONTROL DE TRES HONGOS
FITOPATÓGENOS FOLIARES EN ARROZ

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS

ERNESTO JUNIORS PÉREZ TORRES

SANTA CLARA
2015



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS



UNIVERSIDAD DE CAMAGÜEY
"IGNACIO AGRAMONTE LOYNAZ"

**EFFECTO DE *Trichoderma harzianum* Rifai (CEPA A-34) Y SUS
FILTRADOS DE CULTIVO EN EL CONTROL DE TRES HONGOS
FITOPATÓGENOS FOLIARES EN ARROZ**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

Autor: Ing. Ernesto Juniors Pérez Torres

Tutores: Profesor Titular, Ing. Pausides Milanés Virelles, Dr. C

Profesor-Investigador Auxiliar, Ing. Alexander Bernal Cabrera, Dr. C

**SANTA CLARA
2015**

AGRADECIMIENTOS

A mi hija Adriana que a pesar de ser tan pequeña y no entender porque su padre está tan lejos, me recibe con una sonrisa y con el amor más grande del mundo.

A mis padres Ada y Ernesto, por darme tantas alegrías en la vida y por permitirme tener la familia con la que siempre soñé. Papi y mami, les debo todo y si hoy escribo estas líneas es gracias a ustedes.

A mi hermanito Alejandro y a mi abuelita Aida, por darme siempre su apoyo, el cariño y amor que me brindan.

A mi esposa Yurisandra por compartir mis insomnios y darme su ayuda incondicional en todo momento; y a mi niño Darielito por sacarme con sus ocurrencias de los momentos más tensos y estresantes.

A mi tutor de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV) Dr. C Alexander Bernal Cabrera, por sus sabios consejos, su paciencia y dedicación. Por hacerme participe de sus investigaciones y compartir conmigo su laboratorio y sobre todas las cosas por convertirse en mi mejor amigo y acogerme en su familia como un hermano. Ale, gracias por todo y por llevar bien en alto la responsabilidad de ser mi TUTOR.

A mi tutor de la Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz” (UC) Dr. C Pausides Milanés Virelles, por su amistad, formación y sus aportes prácticos para el desempeño de esta tesis.

A mi amigo y consultante Dr. C Michel Leiva Mora, por contribuir a mi formación como científico, a sus sabios consejos cuando tenía alguna duda y a su apoyo con la tecnología informática. Amigo, sin tu ayuda la redacción de este documento no sería posible.

A la Dra. C Gladys Casas Cardoso por su tiempo y dedicación para la selección del mejor método estadístico.

A los Doctores en Ciencias Lidcay Herrera Isla y Horacio Grillo Ravelo por sus consejos y por darme la oportunidad de conocer sus vivencias científicas y personales.

Al Dr. Cs Benedicto Martínez Coca por acogerme en su laboratorio del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) y enseñarme con total modestia, las técnicas para observar micoparasitismo endofítico.

A los trabajadores del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) y de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UCLV, por acogerme como un miembro más de la familia y por su ayuda en las investigaciones.

A los investigadores de la Estación Experimental del Arroz en Vertientes y del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) por permitir el montaje de los experimentos en sus instalaciones.

A mis queridos compañeros de la Facultad y del Departamento de mi Universidad de Camagüey por su preocupación.

A los Doctores Amilcar Arenal Cruz y Dariel Cabrera Mederos por participar en la revisión del documento.

A la Dra. C Hilda Oquendo Ferrer por su contribución como Vicerrectora a mi estancia en la UCLV.

Al MSc. Sabás Álvarez Montalvo por todo su apoyo con la logística.

A mi compañero de beca en la UCLV Jorge Pérez Pérez por las largas horas de debate científico.

A todos gracias por su ayuda y me disculpan si omití a alguien que en estos momentos no recuerde.

Muchas gracias por su colaboración.

DEDICATORIA

A mi hija Adriana por ser mi razón de ser.

A mis padres por llevar la peor parte en los momentos difíciles.

Lista de abreviaturas

Simbología	Descripción
PICR	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial del agente fitopatógeno
h	horas
min	minutos
xg	Velocidad de centrifugación
mL	mililitros
μ L	microlitros
μ m	micrometro
mm	milimetro
m	metro
d	días
MC	Medio de cultivo
TI	Tiempo de incubación
CC	Condición de cultivo
UCLV	Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
IBP	Instituto de Biotecnología de las Plantas
PDA	Medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar
CPG	Medio de cultivo Caldo de Papa Glucosado
M	Molar
ddg	Días de germinado el cultivo
AFA	Área Foliar Afectada
ET	Eficacia Técnica
ABCPE	Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad
Rend.	Fórmula del rendimiento agrícola del arroz al 14% de humedad

SÍNTESIS

En el presente trabajo se propuso estudiar el efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo como alternativa de control de los hongos fitopatógenos foliares del arroz *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae* y *Pyricularia grisea*; así como determinar las condiciones de cultivo para la obtención de filtrados con actividad antifúngica sobre estos agentes fitopatógenos. Se manifestó la capacidad antagónica de esta cepa a través de los mecanismos de acción de competencia, antibiosis y micoparasitismo. Por otra parte, se determinó que con el microorganismo antagonista incubado durante 20 días, a una temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$ en medio de cultivo Czapek, con pH de 5,5 y bajo agitación se obtuvo los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de estos tres hongos patógenos del arroz, siendo el primer informe de la aplicación de filtrados de *T. harzianum* (A-34) en el control de los mismos. Los experimentos en condiciones semicontroladas afirmaron que el antagonista y sus filtrados de cultivo ejercieron un control sobre las tres enfermedades estudiadas, con niveles de eficacia entre 70,0% y 90,0%, además se logró una disminución del Área Bajo la Curva del Progreso de las Enfermedades superior al 67,5%, con la aplicación de las alternativas de control biológico. En condiciones de campo el agente de biocontrol manifestó eficacias por encima del 80,0% y se obtuvo los valores más elevados del rendimiento con la concentración de 10^{11} conidios mL^{-1} , por lo que se recomienda como alternativa para el control de estos hongos fitopatógenos del arroz.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Mancha parda del arroz. Agente causal <i>Bipolaris oryzae</i> (Breda de Haan) Shoemaker	5
2.1.1. Distribución e importancia	5
2.1.2. Taxonomía	5
2.1.3. Sintomatología	7
2.1.4. Epifitiología	7
2.1.5. Daños	9
2.2. Pudrición de la vaina del arroz. Agente causal <i>Sarocladium oryzae</i> (Sawada) W. Gams & D. Hawksw	11
2.2.1. Distribución e importancia	11
2.2.2. Taxonomía	12
2.2.3. Sintomatología	12
2.2.4. Epifitiología	13
2.2.5. Daños	15
2.3. Añublo o tizón del arroz. Agente causal <i>Pyricularia grisea</i> Sacc. Estado perfecto (teleomorfo) <i>Magnaporthe grisea</i> (Hebert) Barr	16
2.3.1. Distribución e importancia	16
2.3.2. Taxonomía	17
2.3.3. Sintomatología	18
2.3.4. Epifitiología	19

2.3.5. Daños	21
2.4. Prácticas de control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz	21
2.4.1. Control agronómico	21
2.4.2. Control químico	23
2.4.3. Control con sustancias naturales	23
2.4.4. Control biológico	24
2.5. <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico	24
2.5.1. Distribución e Importancia	24
2.5.2. Clasificación taxonómica	24
2.5.3. Mecanismos de acción	25
2.5.3.1. Competencia	25
2.5.3.2. Micoparasitismo	26
2.5.3.3. Antibiosis	27
2.5.3.4. Otros mecanismos de acción	28
2.6. Acción de <i>Trichoderma</i> spp. y sus filtrados de cultivo en el control de hongos fitopatógenos	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Evaluación de la capacidad antagónica de <i>T. harzianum</i> (cepa A-34) sobre <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i>	31
3.2. Determinación de las condiciones para la obtención de filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i> con actividad antifúngica sobre <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i>	34

3.2.1. Efecto del tiempo de incubación, medio y condición de cultivo en la obtención de filtrados de <i>T. harzianum</i> con actividad antifúngica	34
3.2.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> por filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	35
3.2.1.2. Inhibición de la esporulación de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> por filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	37
3.2.1.3. Inhibición de la germinación conidial de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> por filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	37
3.2.2. Efecto del pH y la temperatura en la obtención de filtrados de <i>T. harzianum</i> con actividad antifúngica	39
3.2.2.1. Efecto del filtrado de cultivo de <i>T. harzianum</i> sobre la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i>	40
3.3 Eficacia de <i>T. harzianum</i> (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> en condiciones semicontroladas	40
3.4 Eficacia de <i>T. harzianum</i> (cepa A-34) sobre <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> en condiciones de campo	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Evaluación de la capacidad antagónica de <i>T. harzianum</i> (cepa A-34) sobre <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i>	49
4.2. Determinación de las condiciones para la obtención de filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i> con actividad antifúngica sobre <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i>	55

4.2.1. Efecto del tiempo de incubación, medio y condición de cultivo en la obtención de filtrados de <i>T. harzianum</i> con actividad antifúngica	55
4.2.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> por filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	55
4.2.1.2. Inhibición de la esporulación de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> por filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	62
4.2.1.3. Inhibición de la germinación conidial de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> por filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	69
4.2.2. Efecto del pH y la temperatura en la obtención de filtrados de <i>T. harzianum</i> con actividad antifúngica	74
4.2.2.1. Efecto del filtrado de cultivo de <i>T. harzianum</i> sobre la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i>	74
4.3 Eficacia de <i>T. harzianum</i> (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> en condiciones semicontroladas	84
4.4 Eficacia de <i>T. harzianum</i> (cepa A-34) sobre <i>B. oryzae</i> , <i>S. oryzae</i> y <i>P. grisea</i> en condiciones de campo	91
4.5 Discusión general	96
5. CONCLUSIONES	99
6. RECOMENDACIONES	100
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.), alimento básico de más de la mitad de la población mundial, ocupa el segundo lugar de importancia entre los cereales en el planeta después del trigo (*Triticum aestivum* L.) y es considerado la principal fuente de empleo, ingresos y nutrición de muchas regiones pobres y con una alimentación precaria (Alfonso, 2011). No obstante, la diferencia entre el aumento de la producción y el rápido crecimiento de la población en los países consumidores de arroz es notable, lo que trae consigo la misión consagrada de investigadores para obtener mayores rendimientos de este grano (Rodríguez *et al.*, 2010).

Según estadísticas de WASDE-USDA (2011), la producción mundial fue de 725 millones de toneladas de arroz paddy y 451 millones de arroz elaborado, en una superficie de más de 158 millones de hectáreas con un rendimiento promedio de 4,3 t ha⁻¹. Para ODEPA-USWHEAT (2011), el precio por tonelada en el 2011 alcanzó los 609,4 USD y FAS-USDA (2011), registró exportaciones en ese mismo año superiores a 31 millones de toneladas. La producción en Cuba fue de 275 mil toneladas con una demanda de 700 mil toneladas, por lo que el grueso aún se importa, con un promedio del rendimiento nacional en el año 2013 de 3,4 t ha⁻¹ (ONEI, 2014).

Las pérdidas del rendimiento en el arroz por la incidencia de plagas desempeñan un papel determinante en las restricciones productivas de este cultivo. Dentro de este amplio grupo de agentes nocivos, las enfermedades fúngicas son una causa de la inestabilidad del rendimiento en muchas áreas agrícolas (Rivero *et al.*, 2009). La mancha parda y el tizón del arroz, ocasionadas por los hongos *Bipolaris oryzae*

(Breda de Hann) Shoemaker y *Pyricularia grisea* Sacc, son consideradas enfermedades de importancia económica a nivel mundial y para el país, al reducir los rendimientos entre un 25,0% y 90,0%, respectivamente (Boletín de Vigilancia Fitosanitaria, 2011; Manimegalai *et al.*, 2011).

Cabrera *et al.* (2010) y Martínez *et al.* (2010) consideraron que *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw, agente causal de la pudrición de la vaina del arroz, es una de las enfermedades más importantes que atacan al cultivo en el mundo, con reducciones del rendimiento en más de un 20,0%, corroborado en países como China, Corea, Filipinas, India y más reciente en Colombia, República Dominicana y Panamá.

Entre los métodos de control más utilizados se encuentran las variedades resistentes y la lucha química. Este último, ha sido el más difundido y su uso indiscriminado ha provocado resistencia a estos hongos fitopatógenos (presencia de nuevas razas y linajes), disminución de los enemigos naturales, toxicidad en granos, así como un incremento en los costos de producción (Almaguer *et al.*, 2008).

Una vía para atenuar su aplicación es la utilización de alternativas ecológicas como medidas culturales, etológicas y el uso de microorganismos antagonistas como agentes de biocontrol. Entre estos se encuentran las especies del género *Trichoderma* Persoon ex Gray (Hernández *et al.*, 2009a; Infante *et al.*, 2009).

Entre los mecanismos de acción de este microorganismo antagonista se encuentran: competencia por el sustrato, antibiosis y micoparasitismo, que permiten establecer un control sobre las estructuras vegetativas y reproductivas de

los hongos (Guédez *et al.*, 2012). Durante la ocurrencia de los dos últimos mecanismos, se producen sustancias bioactivas de naturaleza volátil o no volátil. Dentro de estas sustancias, la producción de enzimas hidrolíticas tiene un efecto sinérgico con los antibióticos, debido a que la acción antifúngica es superior cuando actúan ambos compuestos (Norte, 2006).

La aplicación de *Trichoderma* en el arroz ha sido poco estudiada. En la última década se han obtenido resultados satisfactorios en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* (Alarcón *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2006a; González *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2014). Todos ellos mediante la interacción *in vitro* entre estos hongos fitopatógenos del arroz y especies de *Trichoderma*. Sin embargo, no existe información sobre el efecto de *T. harzianum* Rifai (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz provocado por estos agentes causales, que permita disminuir las aplicaciones de fungicidas.

Sobre la base de estos antecedentes se consideró la siguiente **hipótesis**:

El efecto de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*, podría ser una alternativa a utilizar en arroz.

Para comprobar la veracidad de la hipótesis se definieron los siguientes objetivos.

Objetivo general: Evaluar el efecto de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo, como alternativa de control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en arroz.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad antagónica *in vitro* de *T. harzianum* (cepa A-34) frente a *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.

2. Determinar las condiciones de cultivo para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) con actividad antifúngica sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.
3. Evaluar la eficacia de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en condiciones experimentales.

La NOVEDAD CIENTÍFICA de esta investigación, está dada por la evaluación por primera vez en Cuba de la actividad antagónica *in vitro* de *T. harzianum* Rifai (cepa A-34) a través de los mecanismos de acción de competencia, micoparasitismo y antibiosis sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*. De igual manera, se determinan las condiciones de cultivo para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) con actividad antifúngica en la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de estos hongos fitopatógenos del arroz. Además se evalúa el efecto de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz por primera vez en Cuba en condiciones experimentales *in vivo*.

Desde una visión PRÁCTICA sienta las bases para el uso de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo como una alternativa de control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz.

Este trabajo permite además la confirmación y justificación, con el conocimiento TEÓRICO, de los mecanismos de acción que ejerce *T. harzianum* Rifai (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en arroz.

*2. REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mancha parda del arroz. Agente causal *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

2.1.1. Distribución e importancia

La mancha parda del arroz ha causado epifitias en muchas regiones de África, Asia y América, ubicadas en tierras del trópico, como en las zonas subtropicales y templadas, al reducir los rendimientos de 6,0% al 90,0% (Shabana *et al.*, 2008). En regiones tropicales, provoca pérdidas muy severas, al asociarse con hongos y bacterias en la enfermedad conocida como manchado de grano (Rivero, 2008a; Rivero *et al.*, 2010). Es una enfermedad ampliamente distribuida y es considerada como endémica de las zonas arroceras (Meneses *et al.*, 2008; FAO, 2012). Las afectaciones en plantas cultivadas son más comunes en suelos con baja fertilidad, aspecto que se acentúa en los suelos tropicales con un inadecuado suministro de agua para el riego (Bayer S. A., 2008).

2.1.2. Taxonomía

La identificación de las especies del género *Bipolaris* ha sido controvertida. Ellis (1976), ubica a todas las especies graminícolas de *Helminthosporium* en el género *Drechslera*. Breda de Hann informó por primera vez al agente causal de esta enfermedad y lo denominó *Helminthosporium oryzae* (Gangopadhyay y Padmanabhan, 1987).

Otros autores como Shoemaker (1962) y Sivanesan (1987), segregaron esas especies a los géneros *Bipolaris*, *Drechslera sensu stricto* y *Exserohilum* basado en sus colonias, morfología de los conidios y del conidióforo, tipo de germinación conidial y estructura de su hilo, quienes argumentaron que el estado teleomorfo de

estos géneros provienen de la clase Ascomycetes y los denominaron *Cochliobolus*, *Pyrenophora* y *Setosphaeria*.

Aunque el trabajo de Sivanesan (1987) ha esclarecido la problemática de los géneros *Drechslera* y *Exserohilum*, todavía existen dificultades para la delimitación genérica de *Bipolaris* y *Curvularia* a partir de las afinidades morfológicas que poseen las especies de ambos géneros al compartir el mismo estado sexual o teleomorfo (Mena, 2004; Manamgoda *et al.*, 2012).

Estos últimos autores reconocieron a 16 especies del género *Bipolaris*, entre ellas *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, cuyo estado perfecto es *Cochliobolus miyabeanus* (Lto & Kuribayashi) Drechs ex Dastur.

La especie *B. oryzae* tiene conidióforos rectos o flexuosos, multiseptados, pequeños, macronemáticos, geniculados y cilíndricos; con células conidiogénicas politétricas, integradas y de proliferación simpodial. Conidios fusiformes, obpiriformes, naviculares, cilíndricos, obclavados, clavados, ovoides, solitarios, curvados o rectos, raramente equinulados, de color marrón claro a oscuro, oliváceos, de germinación bipolar, con el primer septo formado medianamente y con un segundo delimitando la célula basal (Sivanesan, 1987).

Esta especie se ubica en el Reino *Fungi*, Phylum Hongos mitospóricos, División *Ascomycota*, Subdivisión *Deuteromycotina*, Clase *Hyphomycete* (*Dothideomycete*), Orden *Pleosporales*, Familia *Pleosporaceae* (*Dematiaceae*), Género *Bipolaris* y Especie *Bipolaris oryzae* (Shabana *et al.*, 2008).

2.1.3. Sintomatología

Este hongo ataca a las semillas, el coleótilo, las hojas, las ramificaciones, raquis y brácteas de las panículas y granos. En las hojas los síntomas son circulares u ovoides, de color marrón con centro blanquecino y con márgenes pardos o rojos (Guzmán, 1997). En los granos las lesiones son de color marrón oscuro, las que llegan a penetrar las glumas y dan un aspecto negruzco al endospermo (Bayer S. A., 2008; Ojeda y Subero, 2012).

En una fase más avanzada de la enfermedad se presentan manchas negras sobre los tallos y las glumas de las inflorescencias maduras, con una reducción del crecimiento de la planta y de la formación del fruto. En semilleros infectados las plántulas se marchitan y mueren (Manamgoda *et al.*, 2011).

2.1.4. Epifitiología

Entre las causas que propician el desarrollo de la enfermedad mancha parda se encuentran la siembra de variedades susceptibles, la baja fertilidad del suelo y la escasez de agua en el cultivo. Estas condiciones en el cultivo del arroz favorecen la ocurrencia de la infección primaria, proveniente del inóculo primario (conidios del hongo), que se realizan a través de los granos, residuos de cosecha, agua, plantas hospedantes, viento o en ocasiones del suelo (Guzmán, 1997). La infección secundaria es causada por las esporas que se diseminan a través del viento (Mena, 2004). Una vez depositadas en el tejido superficial y si las condiciones climáticas son favorables, el hongo forma conidióforos y conidios sobre las manchas de color café (Bayer S. A., 2008).

El proceso de germinación consiste en la aparición del tubo germinativo que desarrolla un apresorio; éste posee una clavija de infección que el conidio usa para penetrar directamente en las células de la epidermis. El hongo penetra además por los estomas de la superficie adaxial y abaxial de las hojas. Una vez dentro de la célula, inicia el proceso de invasión por medio de las hifas y con ayuda de toxinas (polifenoles) que debilitan la pared celular de las células contiguas (Franco y Zavatela, 2011). Los síntomas aparecen de cuatro a seis días (d) después de la llegada del inóculo a las hojas, proceso que ocurre en todas las fases fisiológicas del cultivo y los conidios que se forman sobre las hojas, infectan las inflorescencias al ser diseminadas por el viento (Guzmán, 1997).

La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25°C y 30°C, ideal para la germinación de los conidios sobre las lesiones, durante la ocurrencia del rocío o con una humedad relativa superior al 90%. Este hongo permanece viable en restos de cosecha y en el suelo hasta 70 d, mientras que en semillas infectadas, almacenadas a temperatura ambiente, su viabilidad llega hasta 12 y 18 meses con temperaturas entre 8°C y 9°C (Martínez *et al.*, 2007). La alta humedad relativa y una baja humedad del suelo, incrementa la susceptibilidad de la planta al agente patógeno, por limitarse la absorción de silicio y potasio, por lo que el desarrollo de la enfermedad se favorece si la temperatura del aire es alta en la noche y la intensidad luminosa es también alta (Guzmán, 1997).

Este último autor hizo referencia a un amplio rango de hospedantes de *B. oryzae*, entre los que se destacan 23 géneros de pastos susceptibles. Muchas de las plantas arvenses del arroz son hospedantes de este hongo fitopatógeno, entre los

que se encontraron *Cynodon dactylon* (L.) Pers (pasto bermuda), *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. (pata de gallina), *Leersia hexandra* Sw (arroz bravo), *Panicum maximum* Jacq (hierba guinea), *Ischaemun rugosum* Salisb. (mazorquilla) y el arroz rojo (*O. sativa*, L.). Entre los cultivos comerciales ataca a *Zea mays* L. (maíz), *Sorghum bicolor* L. (sorgo), *T. aestivum* L. (trigo), *Saccharum* sp. híbrido (caña de azúcar) y *Hordeum vulgare* L. (cebada). Investigadores como Zhang y Li (2009) y Ordoñez (2012), registraron afectaciones de *B. oryzae* en *Panicum virgatum* L. (cortadera) y *Sesuvium portulacastrum* L. (verdolaga de playa).

2.1.5. Daños

Autores como Kamal y Mia (2009) sustentaron que los daños por *B. oryzae* en Tailandia ascendieron al 25,0% de pérdidas en los rendimientos y Anacker *et al.* (2010), señalaron como la principal causa de reducción de las producciones en Brasil, al uso de variedades productivas, pero susceptibles a este agente fitopatógeno.

Esta enfermedad es capaz de limitar el poder germinativo de semillas de arroz (20,5% a 84,5%) al provocar la muerte de las plantas trasplantadas (2,5% a 14,1%) con pérdidas en los rendimientos (17,7% a 22,5%), producidas por afectaciones en el crecimiento de las raíces y del tallo, número de panículas por planta, la masa y el número de granos, al disminuir la calidad industrial por un incremento de granos partidos, debido a la prolongación del proceso de secado por un mayor porcentaje de humedad (Bayer S. A., 2008; Kamal y Mia, 2009). Además, afecta el crecimiento de las plántulas en especies poáceas que sirven como hospedante, al causar daños severos en el follaje. Las pérdidas han

desencadenado hambrunas en regiones afectadas; en Bélgica en 1942, destruyó del 50,0% al 90,0% de las áreas cultivadas de arroz (Mena, 2004).

Una de las principales causas de las afectaciones por *B. oryzae* se debe a su alta variabilidad, al encontrar varios patotipos en una misma región, elemento que dificulta su control mediante el empleo de variedades resistentes (Safari y Anvari, 2010). Daños provocados por *Bipolaris* sp. Shoemaker, se han registrado en varias regiones de América. Rabelo (2007) hizo referencia a graves lesiones en las hojas de las especies de plantas ornamentales *Heliconia angusta* Laranja Vell y *Tapeinochilus ananasse* (Hassk) Schum en Brasil. En Guatemala, provocó afectaciones por encima del 70,0% de incidencia y una severidad del 50,0%, con una reducción de un 33,0% del rendimiento agrícola (Solares, 2007).

Guzmán (1997) informó afectaciones en un 50,0% de los rendimientos en Colombia, al destacar como vía de transmisión el traslado de los conidios por el viento y el agua de riego. Estudios posteriores realizados por Cardona y González (2008) y Ojeda y Subero (2011) en Venezuela, confirmaron más de un 60,0% de severidad, con una disminución del 50,0% del rendimiento agrícola. Dallagnol *et al.* (2011a) investigaron las alteraciones fisiológicas y bioquímicas en las hojas de arroz provocadas por la infección de *B. oryzae*, al disminuir el contenido de clorofila a y b, la concentración de pigmentos carotenoides, la asimilación neta de carbono y la transpiración, e induce daños en la célula a nivel de membrana.

En Cuba, Cruz y Heredia (2000), hicieron referencia a la alta representatividad de *B. oryzae* en semillas de tres variedades con un alto nivel de deterioro del fruto, lo que ocasiona pérdidas en la viabilidad. Su incidencia se registró en todas las

regiones donde se cultiva el arroz (Neninger *et al.*, 2003). Autores como Rivero *et al.* (2008b), indicaron que *B. oryzae* es considerado uno de los principales hongos fitopatógenos en el occidente del país, por provocar limitaciones en el rendimiento agrícola e industrial. Almaguer *et al.* (2008, 2012) demostraron a través de estudios aeromicológicos la diseminación de los conidios por el viento y Hernández *et al.* (2009b) informaron daños severos en la variedad Perla de Cuba.

2.2. Pudrición de la vaina del arroz. Agente causal *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw

2.2.1. Distribución e importancia

Esta enfermedad se informó por primera vez en Taiwán y sus afectaciones se han registrado en todas las regiones a nivel mundial (Katsuya, 2004). Sus lesiones se informaron por primera vez en Australia con una reducción de las producciones de arroz (Lanoiselet *et al.*, 2012). A finales de los años ochenta y principios de los noventa del siglo pasado, era considerada en América Latina y el Caribe como una enfermedad de menor importancia. Sin embargo, a finales de los noventa del siglo XX, comenzaron las pérdidas en los rendimientos dadas por la susceptibilidad de las variedades que se cultivaban (Martínez *et al.*, 2006).

La primera publicación en Cuba sobre sus síntomas y daños la realizaron Sandoval *et al.* (1999), al presentarse de forma epifitótica en septiembre de 1997 en la Empresa de Semillas Nueva Paz en la provincia La Habana y en el Complejo Agroindustrial Arrocero Los Palacios en Pinar del Río, con afectaciones en las variedades Perla de Cuba, Jucarito-104, IAC-14, Amistad-82 y Bolito. Este hongo fitopatógeno se encontró asociado con el ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley,

al provocar graves pérdidas en los rendimientos (MINAGRI, 1998; Almaguel y Botta, 2005a). Está distribuido en todas las áreas arroceras y se considera la tercera enfermedad fúngica en importancia (Sandoval *et al.*, 2002; Cárdenas *et al.*, 2005; Correa, 2007; Cruz *et al.*, 2009a; Cabrera *et al.*, 2010).

2.2.2. Taxonomía

La enfermedad mancha parda del arroz fue descrita por primera vez por Sawada en 1922 y se denominó a su agente causal *Acrocyldrium oryzae*. Posteriormente Gams y Hawksw en los años 1975 y 1976 respectivamente, lo llamaron *Sarocladium oryzae*. Estos mismos autores en 1956 identificaron a la especie *Sarocladium attenuatum*, la que provocaba una sintomatología similar a la producida por *S. oryzae*. Sin embargo, estudios bioquímicos y morfogenéticos realizados años después concluyeron que ambas especies eran una sinonimia y no dos agentes causales diferentes (Species Fungorum, 2012).

Esta especie se ubica en el Reino *Fungi*, Phylum Hongos mitospóricos de la División *Ascomycota*, Subdivisión *Deuteromycotina*, Clase *Hyphomycete*, Orden *Pleosporales*, Familia *Moniliaceae*, Género *Sarocladium* y Especie *Sarocladium oryzae* (Species Fungorum, 2012). El hongo produce un micelio blanco y conidióforos verticales con una o dos ramificaciones que se forman a partir del micelio ligeramente engrosado y en sus extremos se forman los conidios, de forma cilíndrica y en ocasiones curvos, hialinos y unicelulares (Cruz *et al.*, 2009a).

2.2.3. Sintomatología

El hongo *S. oryzae* incide desde la etapa de cambio de primordio hasta la emergencia de la panícula y llenado del grano. Los síntomas aparecen principalmente en la vaina de la hoja bandera, manifestación que provoca su

putrefacción y restringe la emergencia de la panícula. Las lesiones comienzan con manchas blandas verdes amarillentas de forma elíptica e irregular de 0,5 cm a 1,6 cm que se funden para cubrir las nervaduras de la hoja hasta tomar una coloración gris a marrón (Ou, 1985; Katsuya, 2004; Lanoiselet *et al.*, 2012). La humedad alta incrementa la producción de micelios y conidios los que toman una coloración blanco-algodonosa con un ligero tono rosáceo de apariencia a un polvillo blanco-rosado en la vaina (Correa, 2007).

La intensidad del ataque resalta entre los 80 y 90 días de germinado el cultivo en la variedad de ciclo corto Perla de Cuba (Sandoval *et al.*, 1999) y cercano a los 120 días de germinado en la variedades de ciclo medio (Sandoval y Bonilla, 2001). Este hongo fitopatógeno se puede encontrar en la cubierta seminal, endospermo y embrión del grano; el que causa decoloración, manchas pardo rojizas, pardo oscuras que llegan a converger hasta formar una necrosis total (Rivero *et al.*, 2010, 2012).

2.2.4. Epifitiología

El micelio y los conidios son capaces de sobrevivir en residuos de cosecha y en la semilla (Sandoval y Bonilla, 2001; Sandoval *et al.*, 2002; Nenínger *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2009a; Cristo *et al.*, 2012). Investigadores como Deka y Phookan (1992) informaron como hospedantes a las especies *Echinochloa colonum* (L) Link (metebravo), *Eleusine indica* (L.) Gaertn. (pata de gallina) y *Oryza rufipogon* Griff (arroz colorado) y Francis (1993) registró ataques severos en *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl. Años más tarde, Almaguel *et al.* (2008) evaluaron a *P. maximum* (hierba guinea) como suscepto y Cruz *et al.* (2009b) mencionaron al

cultivo del sorgo (*Sorghum vulgare*, Pers.) y a la especie arvense *Echinochloa crus galli* (L.) Beauv. (arrocillo) como hospedantes secundarios de este hongo.

Correa (1997), hizo referencia a infecciones secundarias debido al inóculo transportado por el viento, aspecto que se agudiza en regiones con desórdenes nutricionales por aplicación excesiva de nitrógeno.

Este agente fitopatógeno se encuentra por primera vez en Cuba asociado al ácaro *S. spinki* (Socorro y Almaguel, 1997; Ramos *et al.*, 1998), lo que propició que numerosos investigadores estudiaran la bioecología, hospedantes y métodos de control de este tarsonemido (Almaguel y Botta, 2005b; Gamboa, 2006; Hernández, 2006; Riverón *et al.*, 2008), aspecto indispensable por su amplia distribución en todo el país. En investigaciones realizadas por Vinod *et al.* (2009) y Nalini y Manickavasagam (2011) confirmaron que las chinches *Brevennia rehi* Lindinger y *Leptocorisa acuta* Thumb diseminan los conidios del hongo.

S. oryzae se ha encontrado asociado a más de treinta especies de hongos y bacterias que transmiten la enfermedad conocida como manchado del grano (Rivero, 2008a; Cristo *et al.*, 2012; Rivero *et al.*, 2012), lo que propicia la esterilidad y el vaneado de los frutos (Hernández *et al.*, 2011). Correa (2007) alegó la importancia del complejo ácaro-hongo-bacteria en la sucesión de un conjunto de síntomas provocados por *S. spinki*, *S. oryzae* y *Burkholderia glumae* (Kurita y Tabei) Urakami, quien propuso el estudio de los síntomas por separado. Investigadores como Silva *et al.* (2011) demostraron la capacidad de un grupo de aislados de *S. oryzae* y sus filtrados de cultivo en la inhibición del crecimiento de *Magnaporthe oryzae* Cavara y *Rhizoctonia solani* Kühn.

Investigaciones realizadas por Sandoval *et al.* (2002) refirieron que este hongo tiene una mayor incidencia entre los meses de mayo a julio, con temperaturas óptimas entre 25°C y 35°C para el crecimiento micelial, esporulación y germinación de los conidios, al comprobar su presencia en las socas después del corte del campo con una intensidad de ataque en las vainas del 30,0%, un 32,0% de panículas afectadas por el manchado del grano, con un 90,0% de distribución. Para Pérez (2008), los mayores daños en las siembras ocurrieron a partir de la segunda quincena de abril y la menor en enero. Las lesiones por ácaros e insectos favorecieron su desarrollo, así como altas densidades de siembra y una humedad relativa superior al 70% (Sandoval *et al.*, 2008).

2.2.5. Daños

La pudrición de la vaina del arroz provocó afectaciones en la germinación de las variedades cubanas en un 32,7%, al retardar la germinación entre siete y once días (Ramírez *et al.*, 2008). Estudios realizados por Cruz *et al.* (2008) notificaron reducciones de la germinación (8,0% al 15,0%), de la longitud de la raíz y el tallo en plántulas (1,5 cm y 1,3 cm) con afectaciones hasta el 100% en las variedades INCA LP-5 y Jucarito-104. Gajre *et al.* (2013) anunció una disminución de la masa de la semilla de arroz en un 41,4% por *S. oryzae* en el cultivar Gurjari.

Se han registrado daños severos en cultivares en trece localidades productoras de arroz en Venezuela (Jayaro *et al.*, 2008); García *et al.* (2008) enmarcaron sus estudios en La Habana con una incidencia en la variedad Perla de Cuba del 70,0% y el 57,5% en la vaina y la panícula respectivamente, con un 80,0% del manchado del grano y una disminución en el rendimiento de 1,2 t ha⁻¹. Otros registros sobre

la susceptibilidad de esta variedad a este hongo patógeno lo realizaron Sandoval *et al.* (2008) durante las siembras en frío y primavera con infecciones en la vaina de la hoja bandera entre 48,0% y 60,0%, las que pueden llegar al 80,0% o más en los meses de mayo a julio. Investigaciones realizadas por Pérez (2008) hicieron hincapié en las afectaciones severas en las etapas de floración y fructificación en trece variedades en Camagüey, entre las que se incluye Perla de Cuba.

2.3. Añublo o tizón del arroz. Agente causal *Pyricularia grisea* Sacc. Estado perfecto (Teleomorfo) *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr

2.3.1. Distribución e importancia

El tizón del arroz se considera la enfermedad más destructiva y de mayor diseminación a nivel mundial, registrada en todos los países donde se cultiva este grano (Jo, 2005; Cárdenas *et al.*, 2009). Fue la principal causa de la reducción de los rendimientos en los estados Paraná, São Paulo y Mato Grosso del Sul en Brasil (Montan *et al.*, 2009) y en Portuguesa, Venezuela (Pieters *et al.*, 2011).

En Asia, ha provocado afectaciones en los últimos 300 años, con su primera incidencia en Japón en 1704, con pérdidas de más de 55 billones de dólares anuales, razones que propiciaron los primeros estudios de secuenciación de su genoma (Dean *et al.*, 2005). En la India, ha provocado reducciones del 50,0% de las producciones (Archana y Prakash, 2013).

El añublo del arroz es una enfermedad criptogámica compleja, debido a la variabilidad patogénica y a la rapidez con que el hongo vence la resistencia de la planta (Infoagro, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012). En Cuba, es considerada la principal enfermedad fúngica (Cárdenas *et al.*, 2010) e incide en todas las épocas de siembra y provincias (Rodríguez *et al.*, 2010). En Pinar del Río, Cristo *et al.*

(2012), destacaron la alta variabilidad de las variedades tolerantes o resistentes a las razas de este hongo fitopatógeno, lo que confirma que en Cuba no existen cultivares resistentes a todos sus patotipos, sino resistentes a determinadas razas, al constituir patodermos verticales para el fitomejoramiento.

2.3.2. Taxonomía

Los estudios taxonómicos del agente causal del tizón del arroz son controvertidos, Couch y Kohn (2002) refirieron que *M. grisea* forma parte de un complejo de especies que contiene al menos dos organismos biológicos que tienen claras diferencias genéticas y no se han cruzado, identificados como *M. grisea* y *M. oryzae*. Sin embargo, Index Fungorum (2012) hizo alusión a estos dos agentes causales como una sinonimia, además de clasificarlos anteriormente con otros nombres científicos como *Ceratosphaeria grisea* Hebert, *Dactylaria grisea* (Cooke) Shira, *Dactylaria oryzae* (Cavara) Sawada, *Phragmoportha grisea* (Hebert) Monod, mientras que en su estado imperfecto (anamorfo) se identifica como *Pyricularia grisea* Sacc o por su sinonimia *Pyricularia oryzae* Cavara.

Su fase imperfecta se ubica en el Reino *Fungi*, Phylum Hongos mitospóricos, División *Ascomycota*, Subdivisión *Pezizomycotina*, Clase *Sordariomycetes*, Orden *Magnaporthales*, Familia *Magnaporthaceae*, Género *Pyricularia* y la Especie *Pyricularia grisea* Sacc (Index Fungorum, 2012). Las investigaciones de Jo (2005), Santamarina *et al.* (2005) y Zhang (2012) refirieron que en la naturaleza el estado perfecto (teleomorfo) no se desarrolla y solo se logra su multiplicación a nivel de laboratorio, por lo que en condiciones de campo solo provoca la enfermedad el agente patógeno *P. grisea*.

Esta especie posee conidióforos simples, tabicados y de color parduzco. Estos nacen solitarios o en grupos de tres y llevan en sus extremos los conidios con formación simpodial. Estos son hialinos, piriformes y están divididos en forma equidistante por dos septos que dan lugar a tres células. El estado perfecto se produce en un medio de cultivo artificial por cultivo doble de aislados heterotálicos. El peritecio es lustroso de color oscuro con un largo cuello y con un gran número de ascas que normalmente contienen ocho ascosporas. La ascospora es fusiforme, de 21,0 μm x 6,0 μm y posee cuatro células (Correa, 1997).

2.3.3. Sintomatología

El hongo afecta todas las partes aéreas de la planta (hojas, nudos y entrenudos del tallo, el cuello de la panícula y los granos) e incide en dependencia de las condiciones ambientales desde los 15 días de germinado hasta el momento de la cosecha (Rodríguez *et al.*, 2006).

Las lesiones varían desde pequeños puntos de color café hasta rombos o diamantes de color verde oliva o gris, rodeados por un halo más claro con bordes de color pardo. Estas pueden crecer hasta unirse y cubrir toda la hoja, hasta causar la muerte de la planta. La forma, color, tamaño y número de las lesiones varían según las condiciones ambientales, la edad de la planta y el grado de susceptibilidad de la variedad. Alrededor de los nudos y entrenudos de los tallos se extienden manchas de color café oscuro en forma de anillo que pueden producir un estrangulamiento de los primeros. Cuando este se infecta, el pulvínulo de la vaina foliar se pudre y se parte, al quedar unido a la vaina por el septo (Katsuya, 2004; Prabhu *et al.*, 2009; Bayer S. A., 2010).

Esta enfermedad ataca al cuello de la hoja y panícula (Catalá *et al.*, 2011), con lesiones que provocan el vaneamiento total de la inflorescencia. Si el ataque se presenta durante la floración y la agresión persiste en el estado lechoso del grano, la maduración se anticipa y se forman granos vanos (Hernández *et al.*, 2010).

2.3.4. Epifitiología

La enfermedad se ha encontrado en todos los agroecosistemas arroceros y su presencia está favorecida por periodos de alta humedad relativa y de rocío, lluvias prolongadas, una excesiva fertilización nitrogenada y por la susceptibilidad de las variedades. Para Bedendo (1997), la temperatura óptima para la esporulación de *P. grisea* es 28°C, aunque a temperaturas entre 10°C y 35°C se ha manifestado este proceso. Este autor refiere que la producción de conidios y el desarrollo del micelio es favorecido cuando la humedad relativa es elevada (>90%) y la infección se acentúa cuando existe una alternancia de noches frías (20°C) y días calurosos (32°C - 35°C), con altos porcentajes de humedad relativa (>90%).

Por otro lado, Castejón (2008) obtuvo altos valores de infección y expulsión de conidios con un 95% de humedad relativa a una temperatura media entre 26°C y 27°C. La intensidad de la luz solar influyó en el crecimiento micelial, germinación conidial y la formación del tubo germinativo, procesos que se afectan al ser esta elevada y favorecidos cuando existe una alternancia de luz y oscuridad (Correa, 1997), el ataque se agudiza por la aplicación o retraso de la fertilización nitrogenada (Meneses *et al.*, 2008).

Correa (1997), señala que una vez depositado el inóculo (conidios) en la superficie de la planta y si las condiciones climáticas son favorables, el conidio forma el tubo

germinativo y el apresorio penetra en el interior de la planta a través de la cutícula, epidermis y por los estomas, al colonizar las hifas a los tejidos vegetales, lo que trae consigo la muerte de las células por las acción de las fitotoxinas. La producción de conidios se ve favorecida por un incremento del periodo de rocío.

Investigaciones realizadas por Neninger *et al.* (2003) refirieron que la enfermedad se transmite por semillas y por restos de la planta de arroz, a través de medios mecánicos y especies de plantas susceptibles. La diseminación de las estructuras infectivas ocurre principalmente a través del viento (Almaguer *et al.*, 2008; 2012), además los conidios y micelios se transportan en el agua y por los insectos.

El hongo fitopatógeno *P. grisea* posee una amplia gama de susceptibles en especies de plantas poáceas (Boletín de Vigilancia Fitosanitaria, 2012), como *Setaria italica* (L.) P.B. (millo menor), *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze (pasto colchón), *E. crus galli*, *Brachiaria extensa* Chase (césped blanco), *Bromus catharticus* Vahl (pasto de perro), *D. sanguinalis*, *E. colonum*, *L. hexandra*, *Paspalum acuminatum* Raddi (lengua de pavo), *Panicum dichotomiflorum* Michx (pasto bruja), *Pennisetum purpureum* Schumacher (pasto elefante), *Setaria glauca* (L.) P.B. (rabo de zorro) y *Lolium perenne* L. (pasto centeno perenne) (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Se ha informado daños severos en *Eleusine coracana* (L.) Gaertn (millo africano) (Talbot, 2003) y cebada (Pontes, 2004). Felipe *et al.* (2005) observaron síntomas en *Paspalum fimbriatum* H.B.K. (paspalum panameño), *Festuca arundinacea* L. (festuca cañosa) (Jo, 2005) y *Cenchrus ciliaris* L. (pasto buffel) (INIFAP, 2006). Además, se encontró en semillas y en la filosfera del trigo (Seiiti *et al.*, 2007; Kobayashi y Pellozo, 2011).

2.3.5. Daños

Los daños provocados por el tizón del arroz han sido publicados por Álvarez (2008) al hacer referencia a una alta sensibilidad de cultivares isogénicos ante la raza 003 de *P. grisea* en Japón. Ese mismo año, Cárdenas *et al.* (2008a) informaron afectaciones de 43,4% en más de 11 mil hectáreas sembradas en Pinar del Río durante los años 2004 al 2006 y Cárdenas *et al.* (2008b) hicieron alusión a un 48,8% de vaneado del grano en variedades de ciclo corto.

En esta misma región, Cristo *et al.* (2006) informaron la susceptibilidad de la variedad Perla de Cuba a este agente patógeno y Hernández *et al.* (2009b) obtuvieron resultados similares con esta variedad en Camagüey, con índices de vaneado que superan el 15,0% y una disminución del rendimiento en más de 1,0 t ha⁻¹. Alves *et al.* (2011) confirmaron pérdidas en los rendimientos del 100% y Gómez (2011) demostró la alta correlación entre la densidad de población y la incidencia de este hongo fitopatógeno, con un incremento por encima del 40,0% de esta última a medida que aumenta el marco de plantación. Padrón (2011) informó un 17,9% de intensidad severa en el ataque de esta enfermedad.

2.4. Prácticas de control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz

2.4.1. Control agronómico

Almaguer *et al.* (2008, 2009), señalaron la aplicación de estudios aeromicológicos de los conidios de estas tres especies de hongos como método preventivo de control. Castejón (2008) hizo alusión a la temperatura y humedad relativa como elementos que permitieron deducir las afecciones de *P. oryzae* y Gutiérrez *et al.* (2010) enfatizaron en el manejo de estos hongos a través de los estudios

epifitológicos. Bregaglio *et al.* (2013) demostraron el uso de modelos matemáticos que predicen las variaciones del clima y las afectaciones de agentes fitopatógenos como *B. oryzae* y *P. grisea* en un rango de 20,0% a 100%.

Otro elemento es el manejo del agua, debido a que el estrés hídrico en las fases vegetativa, reproductiva y de maduración en el arroz provocaron susceptibilidad (Cristo *et al.*, 2012). La fertilización es fundamental en la tolerancia de las plantas a estas enfermedades. Zanão *et al.* (2010) y Moreira *et al.* (2013) refirieron que las plantas en suelos con desbalances nutricionales son más propensas al ataque de *B. oryzae* y Muhammad *et al.* (2009) obtuvieron bajos índices de la enfermedad al aplicar estiércol. Dallagnol *et al.* (2011b) señalaron la activación de mecanismos de defensa por la aplicación de silicio en plantas infectadas.

Las plantas en siembra directa, son más vulnerables que las plantadas por trasplante, al ataque de estas enfermedades en la fase de maduración, con un mayor porcentaje de granos vanos (Torres y Alcántara, 2009). Otra alternativa importante a nivel mundial para su control es el uso de variedades resistentes en países como Venezuela, Nicaragua e India (Arnao *et al.*, 2008; Oviedo y Treminio, 2008; Palacios y Pauth, 2008; Revathy *et al.*, 2009; Narayana *et al.*, 2011; Pieters *et al.*, 2011). En Cuba, se emplearon metabolitos de *S. oryzae* para discriminar cultivares de arroz (Cruz *et al.*, 2009a) y se evaluó la respuesta de variedades ante *B. oryzae* y *S. oryzae* asociados al manchado del grano (Rivero *et al.*, 2011). Esta variante la aplicaron científicos que estudiaron la resistencia varietal contra *P. grisea* (Cárdenas *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2011; Padrón *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2011; Suárez *et al.*, 2011).

2.4.2. Control químico

Entre los fungicidas más empleados se encuentran Azoxistrobina, Azoxistrobina+Ciproconazol, Procloraz, Triadimenol+Tebuconazol (Yamashita *et al.*, 2010; Kunova *et al.*, 2012). Los agentes fitopatógenos *B. oryzae* y *P. grisea* están listados como resistentes a fungicidas lo que obliga al uso de nuevas alternativas de control menos agresivas a los agroecosistemas arroceros (FRAC, 2006). Pérez *et al.* (2009a) refirieron a Triadimenol+Tebuconazol, Azoxistrobina, como los más eficientes sobre *S. oryzae* y *P. grisea* y Hernández *et al.* (2011) y Arshad *et al.* (2013) recomendaron a Procloraz+Cloruro de Manganeso y Metalaxil como los más efectivos contra *B. oryzae*.

2.4.3. Control con sustancias naturales

Los compuestos bioactivos de plantas han sido probados en el control de agentes nocivos por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antimutagénicas (Díaz, 2011). Shabana *et al.* (2008) revelaron el uso del ácido salicílico, ácido benzoico e hidroquinona en el control de la mancha parda del arroz. Cruz y Rivero (2009) utilizaron una emulsión del aceite extraído de semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) contra *S. oryzae*. Rivero *et al.* (2010) y Gómez y Reis (2011) emplearon ácido jasmónico y quitosana en el control de *B. oryzae* y *P. oryzae*. Inagaki *et al.* (2013) demostraron la inhibición de *B. oryzae* y *P. grisea* por saponinas de *Avena sativa* L. y Plodpai *et al.* (2013) los controlaron con diclorometano de las hojas de *Desmos chinensis* Lour.

2.4.4. Control biológico

Anacker *et al.* (2010) hicieron referencia al uso de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn y rizobacterias en el control de *B. oryzae*. Otros autores como Acebo (2008), Bag *et al.* (2010) y Hernández *et al.* (2014) utilizaron *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula en el control de *P. grisea* y *S. oryzae*. Sin embargo, el género más empleado contra hongos fitopatógenos de cultivos es *Trichoderma* Persoon ex Gray, debido a su alta plasticidad y a su amplio espectro de mecanismos de acción (Infante *et al.*, 2009), aunque solo existen antecedentes de la aplicación de *Trichoderma* spp. en el control de *P. grisea* en viveros de arroz en Venezuela (Núñez y Pavone, 2014) y su estudio en Cuba solo se limita al control *in vitro* de *P. grisea* (Alarcón *et al.*, 2005) y *B. oryzae* y *S. oryzae* (Martínez *et al.*, 2013).

2.5. *Trichoderma* como agente de control biológico

2.5.1. Distribución e Importancia

Trichoderma es un hongo antagonista, que se ha encontrado de manera natural en numerosos sistemas agrícolas, ampliamente distribuido en diferentes hábitat, de comportamiento oportunista capaz de establecer simbiosis no virulenta con las plantas (Harman *et al.*, 2004). Su control eficaz radica en la capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y su acción como inductor de la resistencia sistémica en plantas (Infante *et al.*, 2009)

2.5.2. Clasificación taxonómica de *Trichoderma harzianum* Rifai

Esta especie fue descrita por primera vez por Rifai (1969) quien propuso otras como *T. piluliferum* Webster & Rifai, *T. polysporum* (Link ex Pers) Rifai, *T. hamatum* (Bon) Bain, *T. koningii* Rifai, *T. aureoviride* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai y *T. viride* Pers ex S. F Gray. Sin embargo, los

estudios de biología molecular de Druzhinina *et al.* (2006) refieren que el taxa en *Trichoderma* se ha incrementado de nueve a más de cien especies.

Para Samuels (2006), su estado teleomorfo es muy poco frecuente y se ubica en el Género *Hypocrea*. Su estado asexual se encuentra en la División *Ascomycota*, Subdivisión *Pezizomycotina*, Clase *Sordariomycetes*, Orden *Hipocreales*, Familia *Hypocreaceae*, Género *Trichoderma*, Especie *T. harzianum* Rifai (Guilcapi, 2009).

2.5.3. Mecanismos de acción

Según Martínez *et al.* (2013), *Trichoderma* ha mostrado efecto sobre hongos fitopatógenos a través de varios mecanismos de acción, los que no son mutuamente excluyentes y pueden variar según el patógeno y la cepa a utilizar.

2.5.3.1. Competencia

El mecanismo de acción de competencia fue definido como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (Vega, 2001) y su efectividad se debe a la alta velocidad de crecimiento y desarrollo (Fernández – Larrea, 2001). *Trichoderma*, establece competencia por el nitrógeno, hierro, carbohidratos no estructurales como almidón, celulosa, quitina, pectina y microelementos. Su aplicación se ha generalizado contra hongos fitopatógenos del suelo, sin embargo se ha demostrado su eficacia sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet agente causal de la Sigatoka Negra (Arzate *et al.*, 2006).

A nivel mundial existen más de cincuenta productos biológicos en base a *Trichoderma*, de ellos un 68,0% actúa por competencia y antibiosis, un 15,0% por competencia, 8,0% por competencia, antibiosis y lisis y un 5,0% por hiperparasitismo. Algunos incluyen la resistencia inducida y la promoción del

crecimiento, de éstos un 68,0% va dirigido a hongos fitopatógenos de suelo, solo un 20,0% a enfermedades aéreas y el resto a enfermedades postcosecha (Rangel *et al.*, 2010).

2.5.3.2. Micoparasitismo

El micoparasitismo ha sido definido como el ataque directo de un hongo sobre otro. Este mecanismo se presenta en cuatro etapas: La primera como quimiotropismo y consiste en el crecimiento positivo del antagonista sobre el susceptible por la exudación de sustancias de este último. Entre estas sustancias se han encontrado enzimas hidrolíticas, aminoácidos y azúcares, composición química que depende del tipo de hospedante, lo que demostró que *Trichoderma* pueden detectar a distancia a sus posibles susceptibles (Harman *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 2006; Woo y Lorito, 2007; Reyes, 2011).

La segunda etapa es el reconocimiento, que está determinada por el tipo de agente patógeno y la cepa del antagonista. Autores como Guédez *et al.* (2012) y Domínguez (2013) evaluaron aislamientos de *Trichoderma* sobre especies de *Rhizoctonia* con un resultado diferencial en su control. Conclusiones similares obtuvieron Reyes *et al.* (2006a), Martínez *et al.* (2010) y Rivero *et al.* (2010) sobre diversos hongos fitopatógenos del arroz.

Asimismo, López *et al.* (2011) argumentaron que el micoparasitismo está relacionado con la expresión génica, dado por diversos genes que codifican la producción de las enzimas quitinasas, proteasas y β -glucanasas. A esta etapa le precede la de adhesión y enrollamiento, que ocurre cuando el reconocimiento es positivo y las hifas del antagonista se adhieren a las del hospedante a través de la

formación de ganchos y apresorios, facilitado por la producción de carbohidratos por el antagonista y de lectinas por el patógeno lo que favorece la asociación (Harman *et al.*, 2004).

La cuarta etapa corresponde a la actividad lítica y consiste en la producción de enzimas que degradan la pared celular del patógeno y facilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma*. En los últimos 20 años se han purificado enzimas que forman parte de los grupos principales nombrados en la etapa anterior (Viterbo *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2005; Harman *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2013).

2.5.3.3. Antibiosis

Se considera como el mecanismo de acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo con acción sobre otro y está ligada a enzimas propias del proceso de micoparasitismo, que disuelven polímeros estructurales de la pared celular de los hongos (Singh *et al.*, 2002).

Las especies de *Trichoderma* secretan enzimas hidrolíticas como glucanasas, quitinasas y proteasas que hidrolizan componentes de la pared celular de hongos como *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pythium* sp, (González *et al.*, 2011). Las glucanasas degradan los β -glucanos y son clasificadas en dos grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, identificados como exo- β -glucanasas y hongos patógenos contienen quitina, compuesto hidrolizado por las enzimas quitinasas producidas por *Trichoderma* (Martínez *et al.*, 2008).

Los metabolitos fueron sólo materia de interés para los químicos orgánicos que se ocupaban de su aislamiento, identificación y síntesis, pero no de aspectos como el

metabolismo del hongo o sus interacciones ecológicas (Cardoza *et al.*, 2005). Estas moléculas se clasificaron por su origen biosintético y su estructura química y se encontraron dos grupos principales. El primero incluye a metabolitos de alto peso molecular que encierran a peptaiboles (Szekeres *et al.*, 2005) y el segundo a metabolitos de bajo peso molecular y volátiles que incluyen compuestos aromáticos sencillos, algunos poliquétidos como pironas y butenólidos, terpenos volátiles de tipo isociano y sustancias relativamente no polares como la 6-pentil- α -pirona (Vinale *et al.*, 2008; Daoubi *et al.*, 2009).

2.5.3.4. Otros mecanismos de acción

Entre otros mecanismos de *Trichoderma* se encuentran su capacidad como promotor del crecimiento vegetal por la secreción de compuestos entre ellos se encuentran el ácido glucónico, cítrico o fumárico que participan en el metabolismo de fuentes de carbono como la glucosa, que alternadamente pueden solubilizar fosfatos, hierro, magnesio, manganeso, con un efecto en numerosos cultivos (Harman *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2009b; Bécquer *et al.*, 2013).

Este antagonista induce mecanismos de defensa, fundamentados en el incremento de enzimas y metabolitos como la fenil-alanina y la amonio-liasa implicados en la biosíntesis de fitoalexinas, las que se producen al establecerse en las raíces y hojas de las plantas (Gómez y Reis, 2011; Simbaqueba, 2011). Entre estos mecanismos de defensa se encuentran las resistencias sistémica inducida y sistémica adquirida; basadas en la producción de elicitores como xilanasas, peptaiboles, cerato-plataninas entre otros, que inducen señales de transducción como vía para la producción de fitohormonas tales como ácido salicílico, ácido

jasmónico, etileno y ácido abscísico (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010; Druzhinina *et al.*, 2011; Hamidreza *et al.*, 2013).

La desactivación de los factores de patogenicidad de los hongos fitopatógenos por *Trichoderma* constituye un mecanismo indirecto poco estudiado, basado en anular el modo de acción del agente patógeno. Shanmugan *et al.* (2001) informaron la excreción de la enzima α -glucosidasa por *T. viride* que degrada una fitotoxina asociada *R. solani* en el arroz.

2.6. Acción de *Trichoderma* y sus filtrados de cultivo en el control de hongos fitopatógenos

El uso de *T. harzianum* (cepa A-34) tiene su inicio en la última década del siglo XX, en el control de hongos fitopatógenos en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y hortalizas (Stefanova y Fernández, 1995). A partir de 1990, investigaciones que tuvieron como base a este biopreparado (Tricosave A-34), demostraron los mecanismos de acción de adherencia y enrollamiento, fragmentación a nivel de septo, con introducción interna posterior en los micelios. Los metabolitos de este antagonista afectaron el desarrollo micelial y provocaron deformaciones, desplazamiento del contenido citoplasmático, afinamiento y lisis de la pared celular (Stefanova *et al.*, 1999), y se profundizó en los métodos de aplicación (Stefanova 2007a, 2007b).

El estudio de las condiciones que favorecen la producción de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34) con actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos foliares del arroz no ha sido estudiado. Para ello es necesario experimentar en un conjunto de factores como el tiempo de incubación, medio y condición de cultivo,

pH, temperatura, entre otros, que le permitan a la cepa del antagonista las condiciones óptimas para producir estas sustancias.

Autores como Martínez y Solano (1995) estudiaron los filtrados de cultivo de seis aislados de *Trichoderma* en interacción con cuatro medios de cultivo en el control de *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout incubados a 28°C por 30 d, bajo condición estática a un pH de 5,5 con el mejor resultado para el medio de cultivo Caldo de Papa Dextrosa. Lorito *et al.* (2010) caracterizaron enzimas a partir de filtrados de *T. harzianum* incubados a 25°C en medio de cultivo Richard Modificado bajo agitación, sobre la esporulación y el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* Pers.

Por su parte, Reyes *et al.* (2007) obtuvieron taninos y polifenoles de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo Melaza-Levadura bajo estático+agitado contra *Aspergillus flavus* Link ex Fr. y Magdama (2010) obtuvo un 100% de control de *Moniliophthora roreri* Ciferri & Parodi en cacao (*Theobroma cacao* L.).

Diversos autores utilizaron a *Trichoderma* spp. en el control *in vitro* de los agentes patógenos del arroz *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en Cuba, sin embargo, no existen estudios que refieran al uso de *T. harzianum* (cepa A-34) *in vivo*, así como la determinación de las condiciones de cultivo para la obtención de sus filtrados con actividad antifúngica sobre el crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de estos hongos fitopatógenos foliares del arroz, aspectos que sientan las bases para su aplicación futura en campo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Microbiología Agrícola y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias; en la casa de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), ambos centros pertenecientes a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV) en Villa Clara, Cuba; y en la Unidad Científica y Tecnológica de Base “Ruta Invasora” en el municipio Vertientes, provincia Camagüey, estación experimental adscripta al Instituto de Investigaciones de Granos, en el periodo comprendido entre 2009 y 2013.

Los aislados monospóricos de *B. oryzae* (Bo 35-09), *S. oryzae* (So 11-09) y *P. grisea* (Pg 27-09) altamente patogénicos, provinieron del cepario del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey e identificados de acuerdo con las claves micológicas correspondientes (CMI, 1983). Como antagonista se utilizó la cepa A-34 de *T. harzianum* perteneciente al Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

3.1. Evaluación de la capacidad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

El inóculo de *B. oryzae* y *S. oryzae* se preparó con siete días de antelación en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)-Biocen a un pH 5,5 e incubado a 27±1°C en oscuridad. Para *P. grisea* se obtuvieron inóculos con 15 d en medio de cultivo Agar Salvado de Arroz (ASA) estéril en el mismo rango de temperaturas de los hongos fitopatógenos mencionados. El antagonista *T. harzianum* se obtuvo con 72 horas (h) de crecimiento en medio de cultivo (PDA)-Biocen.

Para evaluar el efecto antagónico se tomaron discos de 10,0 mm de los aislamientos de cada hongo fitopatógeno y del antagonista y se depositaron en placas Petri de 90,0 mm de diámetro, con medio de cultivo (PDA)-Biocen a pH 5,5 e incubados a una temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Las siembras se realizaron por el método de cultivo dual (Bell *et al.*, 1982) y se siguieron las indicaciones de Rincón *et al.* (1992).

Se evaluaron los mecanismos de acción de competencia por espacio, micoparasitismo y antibiosis ejercidos por *T. harzianum* (cepa A-34) sobre los agentes fitopatógenos *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.

Para el mecanismo de acción por **competencia** se utilizó un diseño completamente aleatorizado para cada hongo fitopatógeno, en el que se ensayaron los tratamientos 1. Interacción *T. harzianum* – hongo patógeno y 2.-Control (hongo patógeno), replicados cinco veces cada uno. Se midió con una regla graduada el crecimiento radial de las colonias de cada hongo fitopatógeno en interacción con el antagonista y de los controles a partir de las 24 h, hasta que uno de los microorganismos en enfrentamiento cubriera toda la placa.

La capacidad antagónica se determinó a través de la escala de cinco grados de Bell *et al.* (1982) (Tabla 1) y el efecto del agente de biocontrol sobre el crecimiento micelial de cada hongo fitopatógeno se comprobó a través del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) mediante la fórmula de Samaniego *et al.* (1989), $\text{PICR} = [(R1-R2)/R1] \times 100$. Donde R1 es el crecimiento radial del control y R2 es el crecimiento radial del hongo patógeno en interacción con el antagonista.

Tabla 1. Escala para la determinación de la capacidad antagónica de los microorganismos

GRADO	CAPACIDAD ANTAGONICA
1	El antagonista crece completamente sobre el patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo
2	El antagonista crece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	El antagonista y patógeno colonizan la mitad de la superficie del medio de cultivo y ninguno de los dos domina sobre otro
4	El patógeno coloniza al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
5	El patógeno crece por encima del antagonista y ocupa casi toda la superficie del medio de cultivo

Para evaluar el mecanismo de acción por **micoparasitismo** se tomaron fragmentos de micelio de la zona de interacción a partir de que existiera contacto entre las hifas de *T. harzianum* y las de cada agente fitopatógeno. Se observó el tipo de interacción hifal (enrollamiento, penetración, vacuolización y/o lisis) al microscopio óptico marca Motic con aumento de 400x, mecanismo que fue documentado gráficamente por medio de una cámara digital marca Canon.

Se evaluó el efecto **antibiótico** de *T. harzianum* sobre los agentes fitopatógenos a través del PICR en cultivo dual a las 24 h, momento donde no existía contacto físico entre las hifas del antagonista y de los agentes patógenos.

3.2. Determinación de las condiciones para la obtención de filtrados de cultivo de *T. harzianum* con actividad antifúngica sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

3.2.1. Efecto del tiempo de incubación, medio y condición de cultivo en la obtención de filtrados de *T. harzianum* con actividad antifúngica

Para la realización de estos experimentos se utilizaron Erlenmeyer estériles de 250,0 mL en los que se vertió 100 mL de los medios de cultivo líquidos Caldo de Papa Glucosado, Czapek, Richard y Fries (Anexo 1) a un pH de 5,5 con la utilización de NaOH_(ac) y HCl_(ac) a 0,1 M. En cada frasco se inoculó un disco de 10,0 mm de diámetro de cultivos de 72 h de crecimiento micelial de *T. harzianum* (cepa A-34) y se sometió a un proceso de incubación en oscuridad durante 10, 20 y 30 d a 28±1°C. La incubación se realizó bajo dos condiciones de cultivo: estático y agitado, esta última mediante una zaranda orbital marca Gerhardt a una velocidad de agitación de 120xg y temperatura de 28±1°C.

Pasado cada tiempo de incubación, los cultivos de *T. harzianum* obtenidos de las 24 combinaciones de los factores tiempo de incubación, medio y condición de cultivo (Figura 1), fueron filtrados al vacío, para ello se utilizó papel de filtro Whatman # 1 colocados en el interior de embudos de porcelana, los que se acoplaron a quitasatos y estos a una bomba de vacío marca SCOLI. El resultado final del filtrado de cada combinación se centrifugó en tubos Vortex (VF2) con una centrífuga (Heal Force) a una velocidad de 16 000xg durante 30 minutos (min) a 28°C, se desecharon las estructuras del hongo y se utilizó el sobrenadante; el

fluido fue filtrado con el empleo de filtros milipore a través de membranas de 0,22 μm en un flujo laminar de tipo vertical (FASTER Bio 60), los que fueron refrigerados a 4°C.

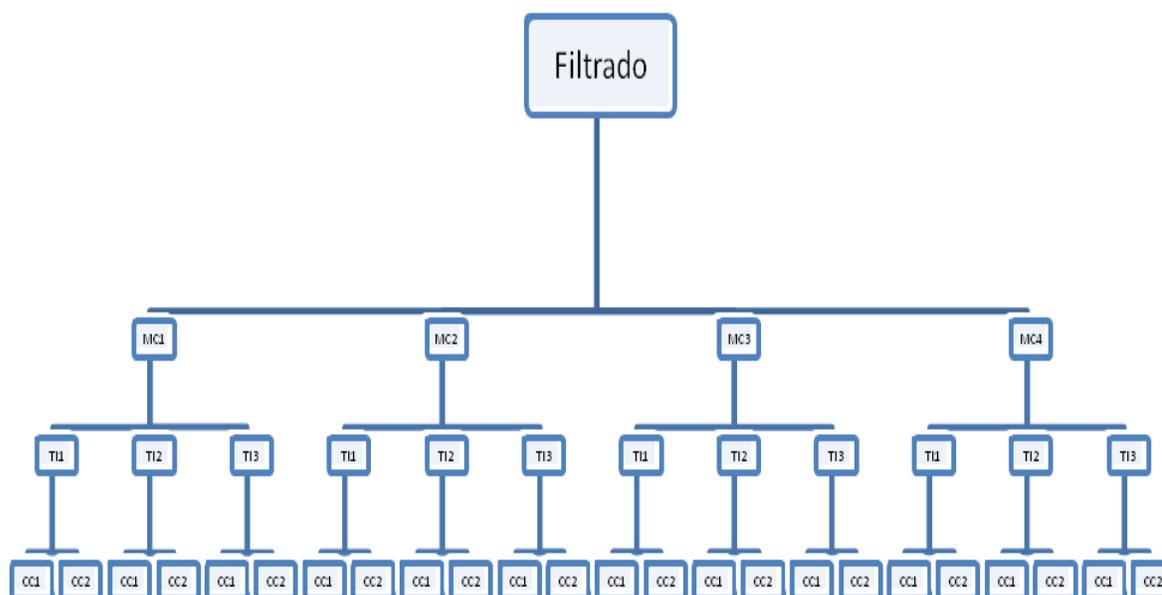


Figura 1. Esquema de obtención de filtrados de *Trichoderma harzianum* (A-34) a través del estudio de los factores medio de cultivo, tiempo de incubación y condición de cultivo

Factor Medio de cultivo: MC1-Caldo de Papa Glucosado; MC2-Czapek; MC3-Richard; MC4-Fries
 Factor Tiempo de incubación: TI1-10 d; TI2-20 d; TI3-30 d
 Factor Condición de cultivo: CC1-Estático; CC2-Agitado

3.2.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por filtrados de cultivo de *T. harzianum*

Se emplearon placas Petri de 90,0 mm de diámetro, contentivas con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA)-Biocen, con cuatro discos de 5,0 mm de diámetro de cada hongo patógeno en los extremos (se siguió el procedimiento descrito en el epígrafe 3.1. referente a las condiciones de obtención del inóculo) y en el centro un disco de papel de filtro estéril (del mismo diámetro) embebido con

filtrados obtenidos de cada cultivo según lo descrito en el epígrafe 3.2.1. Se probaron para cada hongo patógeno por separado diluciones de filtrados al 25,0%, 50,0%, 75,0% y 100% (filtrado bruto) (v/v) y un control con agua destilada estéril, replicados 20 veces (Cercós, 1957). Las placas Petri se incubaron a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad; y se midió el radio de las colonias de cada agente fitopatógeno a las 24, 72, 120 y 168 h con el empleo de una regla graduada; con los datos obtenidos de las mediciones se determinó el PICR según Samaniego *et al.* (1989).

Los experimentos se montaron a través de un diseño completamente aleatorizado y el procesamiento estadístico se cometió con el paquete SPSS versión 15,0 para Windows, a través de un experimento factorial (Factor 1: Tiempo de incubación, Factor 2: Medio de cultivo, Factor 3: Condición de cultivo, Factor 4: Dilución de filtrados de cultivo) para cada hongo patógeno en estudio. Se efectuó un análisis descriptivo a través de una comparación individual de cada uno de los factores.

Los datos obtenidos del PICR de cada agente patógeno al no cumplir con las condiciones de las pruebas de Normalidad y de Homogeneidad de Varianza, se realizaron análisis de los datos de cada factor para determinar la mejor respuesta de cada uno de sus niveles.

Para ello se utilizaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis a un 5,0% de significación. Los niveles que manifestaron significación estadística del factor analizado fueron escogidos mediante la técnica de selección de casos para determinar el mejor comportamiento en el siguiente factor. Proceso que se siguió hasta calcular las mejores variantes de los cuatro factores estudiados.

3.2.1.2. Inhibición de la esporulación de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por filtrados de cultivo de *T. harzianum*

Para el cumplimiento de este objetivo se siguió el diseño y tipo de experimento descrito en el epígrafe anterior. La inhibición de la esporulación de *B. oryzae* y *S. oryzae* por los filtrados de *T. harzianum*, se determinó a partir de transcurridos siete días de iniciados los experimentos de inhibición del crecimiento micelial, bajo condiciones de oscuridad continua durante el periodo de incubación. En el caso de *P. grisea* las placas Petri se sometieron a alternancia de luz fluorescente-oscuridad de 12 h y se evaluaron a partir de los 15 d.

Posteriormente a cada placa Petri con los micelios de cada agente patógeno se añadieron 10,0 mL de agua destilada estéril y se removió con una espátula de Drigalsky, se montaron tres réplicas y se determinó la concentración de conidios mediante la cámara de Neubauer.

Los datos obtenidos se transformaron a través de la expresión $\text{Log}_{10}(x+10)$ (Lerch, 1977) y se procesaron de acuerdo al procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1.1.

3.2.1.3. Inhibición de la germinación conidial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por filtrados de cultivo de *T. harzianum*

Para determinar la inhibición de la germinación conidial se tomaron placas Petri de 90,0 mm de diámetro con medio de cultivo PDA-Biocen con *B. oryzae* y *S. oryzae* de siete días de crecimiento y *P. grisea* con 15 d. A cada placa se le añadió 10,0 mL de agua destilada estéril, las que fueron barridas con una espátula de Drigalsky flameada y la suspensión conidial se vertió en un beaker de 250,0 mL, se realizaron diluciones seriadas para efectuar el conteo de conidios mediante

cámara de Neubauer, la suspensión se ajustó a 10^3 conidios mL^{-1} para los tres hongos fitopatógenos estudiados.

Se evaluaron los filtrados de *T. harzianum* al 25,0%, 50,0%, 75,0% y 100% (v/v) y un control con agua destilada estéril (Tabla 2). Para el filtrado al 100% se añadieron a las placas Petri de cada agente patógeno 10,0 mL del filtrado de cultivo bruto, siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior. Del volumen de 1000,0 μL de cada variante, se tomaron 5,0 μL para un total de 50 conidios para los factores estudiados en el epígrafe 3.2.1. A las suspensiones se les agregó Tween 80 al 0,01% para dispersar los conidios. Posteriormente se montaron en placas Petri (120,0 x 20,0 mm) porta excavados y se siguió la técnica de la gota colgante (Novo, 1993), replicados tres veces para cada dilución y agente patógeno y se incubaron bajo cámara húmeda a $28\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

Tabla 2. Diluciones de filtrados estudiadas para la germinación conidial de los patógenos

Dilución de filtrados (%)	Suspensión conidial (μL)	Filtrados de cultivo (μL)	Total (μL)
100	-	1000,0	1000,0
75,0	250,0	750,0	1000,0
50,0	500,0	500,0	1000,0
25,0	750,0	250,0	1000,0
Control	1000,0	-	1000,0

Para determinar el momento de evaluación de la germinación conidial de los agentes patógenos se montaron experimentos previos, lo que arrojó que en *B. oryzae* ocurría la germinación a las tres horas, *S. oryzae* a las 12 h y *P. grisea* a

las 16 h (datos no mostrados), momento en que se precedió a evaluar mediante conteo de conidios germinados del total, a través del microscopio óptico con aumento de 400x. El conidio se consideró germinado cuando se observó el tubo germinativo. Los datos se procesaron mediante el procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1.1.

3.2.2. Efecto del pH y la temperatura en la obtención de filtrados de *T. harzianum* con actividad antifúngica

Para evaluar el efecto del pH y de la temperatura en la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) se empleó el tiempo de incubación, medio y condición de cultivo de mejores resultados obtenidos en el epígrafe 3.2.1.

En ambos grupos de experimentos se utilizaron Erlenmeyer estériles de 250,0 mL en los que se vertió 100,0 mL del medio de cultivo líquido seleccionado; el pH se ajustó a los valores de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5 (20 réplicas para cada pH), mediante NaOH_(ac) y HCl_(ac) a 0,1 M, con el empleo de un pHmetro modelo DDSJ-308A y se utilizó la temperatura de 28±1°C durante el proceso de incubación. Para el factor temperatura se estudiaron los niveles de 20, 24, 28 y 32±1°C (20 réplicas para cada temperatura) y el medio de cultivo se ajustó a un pH de 5,5. La preparación del inóculo y el proceso de filtrado del hongo antagonista se realizó según lo descrito en el epígrafe 3.2.1.

La inhibición del crecimiento micelial (radio de la colonia de cada agente patógeno), esporulación y germinación conidial de los agentes patógenos se determinó mediante un experimento factorial: en el caso del pH se estudiaron los factores (factor 1: niveles de pH, factor 2: diluciones de filtrado de cultivo de

T. harzianum) y para la temperatura (factor 1: niveles de temperatura, factor 2: diluciones de filtrado de cultivo de *T. harzianum*), se tuvo en cuenta los datos aportados por cada agente patógeno de manera individual. El diseño experimental, tipo de experimento y el procesamiento estadístico se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1.1., debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de Normalidad ni Homogeneidad de Varianza.

3.2.2.1. Efecto del filtrado de cultivo de *T. harzianum* sobre la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

Los filtrados obtenidos en las condiciones de pH y temperaturas antes descritas se probaron contra los agentes fitopatógenos, según los procedimientos de los epígrafes 3.2.1.1, 3.2.1.2 y 3.2.1.3.

3.3. Eficacia de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en condiciones semicontroladas

La investigación se desarrolló en la casa de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), perteneciente a la Universidad Central Marta Abreu” de Las Villas en el periodo de mayo a septiembre de 2012. Se utilizaron como unidad experimental bolsas de polietileno con 5,0 kg de un suelo Pardo Sialítico (Hernández *et al.*, 1999) esterilizado durante 30 min a 121°C en una autoclave marca Rypa®. La fertilización se realizó según MINAGRI (2005) y se tuvo en cuenta las propiedades químicas del suelo (Anexo 2).

La siembra se efectuó de forma directa a razón de tres semillas por bolsa de la variedad Perla de Cuba (variedad susceptible a los tres agentes fitopatógenos de acuerdo a los resultados obtenidos por Sandoval *et al.* (1999); Cristo *et al.* (2006) y Hernández *et al.* (2009b), con categoría Certificada II provenientes del Complejo Agroindustrial de Granos “Ruta Invasora” del municipio Vertientes, provincia Camagüey. El poder germinativo de las semillas empleadas fue de 95,0%, las que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1,0% y lavadas con agua destilada estéril durante tres minutos.

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

Para cada agente fitopatógeno se realizó un experimento completamente aleatorizado con nueve tratamientos y cuatro réplicas, los que incluyeron la aplicación del agente de control biológico *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo a diferentes diluciones, un control relativo en el que se empleó el fungicida Amistar 250 SC (Azoxistrobina) de Bayer S. A. y un control absoluto (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos de *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo en condiciones semicontroladas

Tratamientos	Concentraciones/Diluciones
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	3,1 x 10 ⁹ conidios mL ⁻¹
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	3,5 x 10 ¹⁰ conidios mL ⁻¹
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	3,9 x 10 ¹¹ conidios mL ⁻¹
Control relativo (Azoxistrobina)	100 mg de i.a L ⁻¹
Filtrados de cultivos de <i>T. harzianum</i>	100%*
Filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	75,0%
Filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	50,0%
Filtrados de cultivo de <i>T. harzianum</i>	25,0%
Control absoluto	-

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

La producción del antagonista se realizó en bandejas de acero inoxidable (0,30 m x 0,40 m) y se utilizó como sustrato cabecilla de arroz previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 30 min según metodología descrita por Márquez *et al.* (2010). El inóculo provino de placas Petri de 168 h en medio de cultivo (PDA)-Biocen bajo oscuridad y el biopreparado se incubó a una temperatura de 28±1°C durante 15 d, luego se determinó las concentraciones (conidios mL⁻¹).

Para la producción de los filtrados de cultivo de *T. harzianum* se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en los factores tiempo de incubación, medio de cultivo y condición de cultivo, pH y temperatura, de acuerdo a su efecto sobre cada hongo fitopatógeno. Para las diluciones de los filtrados de cultivo se siguió el

procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1.1. Su aplicación se realizó una semana después de su obtención para evitar cualquier contaminación o alteración química (Javaid y Adrees, 2009), los que se preservaron en un refrigerador a 4°C.

El inóculo de los tres agentes fitopatógenos provino de placas Petri con medio de cultivo PDA-Biocen incubados a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad, excepto *P. grisea* que se sometió a alternancia de luz – oscuridad cada 12 h. El agente patógeno *B. oryzae* procedió de placas Petri de 15 d de incubación y se inocularon micelios y conidios a los 35 ddg el cultivo (Herrera, 1978) a una suspensión de $4,5 \times 10^8$ ufc mL⁻¹. Las placas Petri con *S. oryzae* se incubaron por 14 d y se aplicaron sus estructuras infectivas (micelios y conidios) en la etapa fisiológica de cambio de primordio o diferenciación de la panícula (60 - 65 ddg) (Sandoval y Bonilla, 2001) con una suspensión de $3,5 \times 10^8$ ufc mL⁻¹. El hongo *P. grisea* se inoculó a los 25 ddg el arroz (Cristo *et al.*, 2006), provenientes de placas Petri con 15 d de incubación y se aplicó a una concentración de $4,5 \times 10^8$ ufc mL⁻¹.

La inoculación de cada agente fitopatógeno se realizó por separado con un micropulverizador manual por la superficie adaxial y abaxial de las hojas a razón de 30,0 mL por planta de las suspensiones antes descritas. Luego el material vegetal se cubrió con bolsas de polietileno transparente durante 72 h para asegurar una alta humedad relativa (cercana al 100%) y facilitar el proceso de infección. Las plantas se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas, con temperatura media de 27,5°C y humedad relativa media de 82%.

Transcurridas las 72 h después de la inoculación de cada hongo fitopatógeno y una vez retiradas las bolsas de polietileno transparente, se aplicaron tres veces

cada 10 d el antagonista y sus filtrados de cultivo. Los tratamientos con Azoxistrobina se realizaron al 5,0% del área foliar atacada, en cambio de primordio y al 5,0% de paniculación para el control de cada agente patógeno, según lo recomendado por Pérez *et al.* (2009a).

En cada experimento según el hongo fitopatógeno en estudio, se muestrearon previo al momento de la aplicación de los tratamientos y con una frecuencia de 10 d, diez hojas por planta (tres plantas) de manera aleatoria para un total de treinta hojas por cada réplica. Para evaluar en cada muestreo el Área Foliar Afectada (AFA) por la mancha parda, pudrición de la vaina y del tizón del arroz, se utilizaron las escalas del Sistema Estándar de Evaluaciones para Arroz propuesto por el International Rice Research Institute (IRRI) (1996) (Anexo 3 y Anexo 4).

Con estos datos se calcularon los porcentajes de infección de cada enfermedad mediante la expresión matemática de Townsend - Heuberger recomendada para los ensayos de campo por CIBA-GEIGY (1981) y con la información de los Índices de infección obtenidos por muestreo se determinó la Eficacia Técnica (ET) mediante la fórmula de Abbott (1925).

El Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) se calculó por la fórmula de Shaner y Finney (1977):

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

donde y_i = expresa el Índice de infección de cada enfermedad por muestreo acorde a la escala descrita en los anexos 3 y 4, t_i = tiempo (días) a la *i*-ésima observación y n = número total de observaciones. Se utilizaron los datos obtenidos en el primero y en los dos últimos muestreos realizados a las plantas infectadas por los hongos fitopatógenos; en *B. oryzae* se utilizaron los datos obtenidos en los

muestreos de los 45, 85 y 95 ddg, para *S. oryzae* las evaluaciones realizadas a los 75, 85 y 95 ddg y para *P. grisea* a los 35, 85 y 95 ddg el cultivo.

Los datos de los porcentajes de Eficacia y de Infección de cada enfermedad se transformaron por la expresión $2\arcsen\sqrt{p}$ (Lerch, 1977) y se procesaron a través de un análisis de varianza de clasificación simple y las medias se compararon por la prueba de rangos múltiples de Tukey a un 5,0% de probabilidad. Los datos de ABCPE se analizaron estadísticamente a través de las comparaciones de las medias mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis a un nivel de significación del 5,0%. Para cada análisis se comprobaron los supuestos de distribución Normal y Homogeneidad de Varianza mediante el paquete estadístico SPSS versión 15,0 para Windows.

3.4. Eficacia de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en condiciones de campo

Los experimentos se condujeron en las terrazas 2, 6 y 9 de la Unidad Científica y Tecnológica de Base “Ruta Invasora”, estación experimental ubicada en el municipio Vertientes, provincia Camagüey, perteneciente al Instituto de Investigaciones de Granos de Cuba; en la campaña de primavera en el periodo comprendido entre mayo a septiembre de 2013 sobre un suelo Vertisol Pélico Gleyzoso (Hernández *et al.*, 1999). La labranza se realizó por la tecnología de fangueo y para ello se utilizó un tractor marca Yanmar con un rotobator acoplado, ambos de tecnología japonesa.

La fertilización se realizó de acuerdo con lo recomendado por MINAGRI (2005) para este tipo de tecnología de preparación del suelo acorde a la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Anexo 2) y a la demanda de la variedad Perla de Cuba. La siembra se efectuó a voleo con semilla pregerminada a una densidad de 200 plantas m⁻² según lo recomendado por el Instructivo Técnico del cultivo del arroz (MINAGRI, 2005), con un poder germinativo del 95,0% y con categoría de Certificada II (segunda generación). En el riego se mantuvo la lámina de agua de 10,0 cm a partir de los 20 ddg el cultivo hasta tres días antes de la culminación de su ciclo biológico.

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar para cada agente fitopatógeno con cinco tratamientos (Tabla 4) y cuatro réplicas; cada réplica consistió en parcelas de 15,0 m² (3,0 m x 5,0 m) con una separación entre las unidades experimentales de un metro. Se evaluaron diez plantas por cada réplica de acuerdo con las escalas propuestas para cada enfermedad por el IRRI (1996).

Tabla 4. Tratamientos de *T. harzianum* (cepa A-34) en campo

Tratamientos	Concentraciones
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	3,5 x 10 ⁹ conidios mL ⁻¹
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	2,3 x 10 ¹⁰ conidios mL ⁻¹
<i>T. harzianum</i> (cepa A-34)	2,1 x 10 ¹¹ conidios mL ⁻¹
Control relativo (Azoxistrobina)	120 g de i.a L ⁻¹
Control absoluto	-

Las suspensiones conidiales del biopreparado se aplicaron tanto por la superficie adaxial y abaxial de las hojas a baja altura con una asperjadora manual marca MATABI de 16 L y con boquilla de cono. Durante la investigación no se aplicaron plaguicidas para el control de agentes nocivos.

El método de muestreo, el momento de aplicación del antagonista y del fungicida Azoxistrobina, así como el cálculo del Índice de infección y de la Eficacia se realizaron según lo descrito en el epígrafe 3.3. Se empleó como fondo de provocación, plantas con síntomas de cada enfermedad en campos colindantes a las terrazas en que se montaron los experimentos.

El rendimiento agrícola al 14,0% de humedad se determinó a través de la fórmula propuesta por el Sistema Estándar de Evaluaciones del Arroz del IRRI (1996) donde:

$$\text{Rend. (t ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{panículas m}^{-2} \times \text{granos panícula}^{-1} \times \text{porcentaje de granos llenos} \times \text{masa 1000 granos}}{10\ 000}$$

Los componentes del rendimiento agrícola se determinaron al realizar el conteo del número de panículas m⁻² en cada réplica. Se muestrearon 40 de estas inflorescencias y se cuantificó de cada una de ellas el número de granos llenos, granos vanos y granos totales panícula⁻¹, lo que permitió calcular el porcentaje de estos indicadores. La masa de mil granos llenos se comprobó con una balanza digital marca HL-2000i.

Las panículas cosechadas en un metro cuadrado fueron secadas a temperatura y humedad relativa del ambiente en el Laboratorio de Industria de la Unidad Científica y Tecnológica de Base “Ruta Invasora” y para comprobar la humedad del grano se utilizó un determinador de humedad digital marca SS-6.

Los datos de porcentajes de Ínfección y de Eficacia se transformaron por la expresión $2\arcsen\sqrt{p}$ (Lerch, 1977). Estos indicadores y el rendimiento agrícola se procesaron estadísticamente con previa comprobación de los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Varianza a través del paquete estadístico SPSS versión 15,0 para Windows, mediante análisis de varianza y para denotar significación estadística se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey para un 5,0% de probabilidad.

Las variables climáticas temperatura y humedad relativa media se registraron interpolando los datos obtenidos de las estaciones meteorológicas de los municipios Santa Cruz del Sur, Florida y Camagüey (Anexo 5).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la capacidad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

La presencia de conidios de la cepa A-34 de *T. harzianum* sobre el micelio del hongo fitopatógeno en cultivo dual, se hace evidente a partir de las 96 h de ocurrido el enfrentamiento; lo que demuestra el efecto hiperparásito del antagonista por el sobrecrecimiento de sus hifas sobre las de *B. oryzae* (Figura 2). El crecimiento del agente patógeno se detiene a partir de las 24 h, evento que continúa hasta alcanzar a las 96 h el grado 1 de la escala (Tabla 5). Aspecto que resulta importante en la capacidad que tiene un agente de biocontrol para ejercer un efecto sobre determinado microorganismo parásito de plantas (Martínez *et al.*, 2013; Astorga *et al.*, 2014).

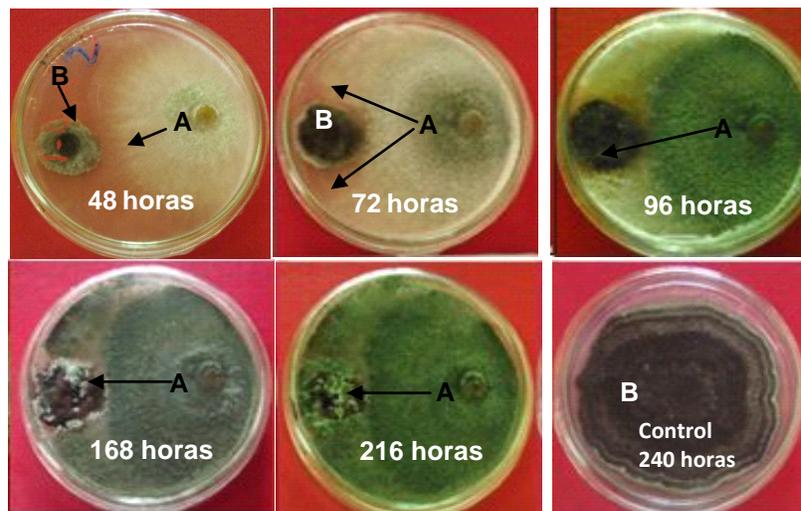


Figura 2. Competencia en cultivo dual entre *T. harzianum* (cepa A-34) (A) y *B. oryzae* (B)

La inhibición del crecimiento micelial del agente fitopatógeno alcanza valores superiores al 67,0%, resultados que se corresponden con los informados por Elham *et al.* (2012) y Guédez *et al.* (2012); al obtener un Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) entre 50,0% y 80,0% de 18 aislamientos de *T. harzianum* provenientes de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Aunque los aislamientos estudiados por estos autores solo logran los grados 2 y 3 de capacidad antagónica (Bell *et al.*, 1982) frente a los hongos fitopatógenos del suelo *R. solani*, *S. rolfsii* y *Fusarium oxysporum* Schlecht.

Tabla 5. Capacidad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *B. oryzae*

Indicadores	Tiempo (h)									
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
PICR (%)*	6,3	7,4	25,6	35,0	46,8	53,2	58,9	62,0	64,2	67,1
Grado de capacidad antagónica	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Antibiosis	+									

*PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno (+). Presencia del mecanismo de acción

Para *S. oryzae*, el agente biocontrolador cubre las tres cuartas partes de la placa en cultivo dual (Figura 3), por lo que se ubica en el grado 2 de la escala, con PICR que alcanzan más del 60,0% de inhibición del crecimiento micelial (Tabla 6). Resultados que coinciden con los obtenidos por Martínez *et al.* (2010) y Lone *et al.* (2012), al evaluar los primeros autores a dos aislados de *Trichoderma* spp. sobre *S. oryzae* y los últimos hacen referencia a la capacidad antagónica de *T. harzianum* sobre especies de los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, con valores de inhibición de 25,0% a 70,0% y grados 1 y 3 de capacidad antagónica.

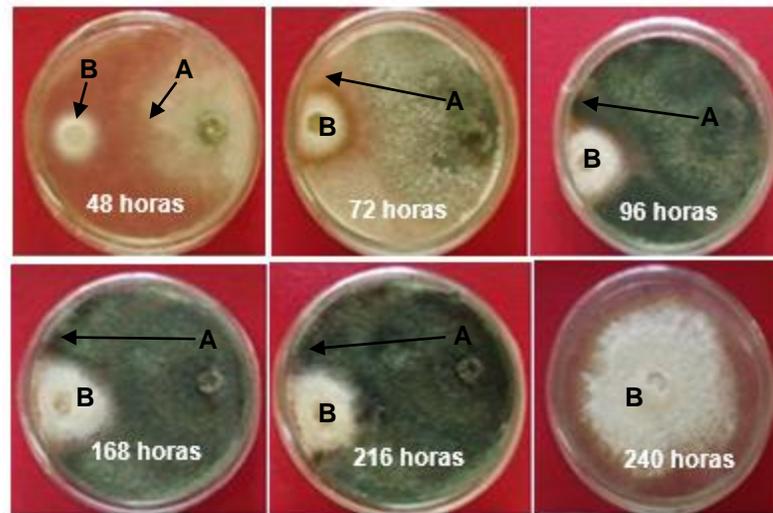


Figura 3. Competencia en cultivo dual entre *T. harzianum* (cepa A-34) (A) y *S. oryzae* (B)

Tabla 6. Capacidad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *S. oryzae*

Indicadores	Tiempo (h)									
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
PICR (%)*	6,2	6,7	23,6	32,1	46,1	50,8	56,3	59,6	62,6	64,4
Grado de capacidad antagónica	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Antibiosis	+									

*PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno
(+): Presencia del mecanismo de acción

El antagonismo de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *P. grisea* manifiesta a las 96 h una inhibición del crecimiento del micelio de 93,1% y a partir de las 120 h la capacidad antagónica se incrementa hasta alcanzar valores del 100% (Figura 4, Tabla 7), resultados que ubican al agente de control biológico en el grado 1 de la escala, y lo clasifica como hiperparásito.

Las investigaciones sobre la evaluación de especies de *Trichoderma* en el control *in vitro* de *P. grisea* son muy escasas. Autores como Alarcón *et al.* (2005) hacen referencia a la utilización de la cepa A-34 de *T. harzianum* en enfrentamiento con este agente patógeno, los que obtienen resultados alentadores aunque no evalúan la inhibición de mismo por la fórmula de Samaniego (1989), aspecto que no permite comparar sus resultados con los obtenidos en esta investigación.

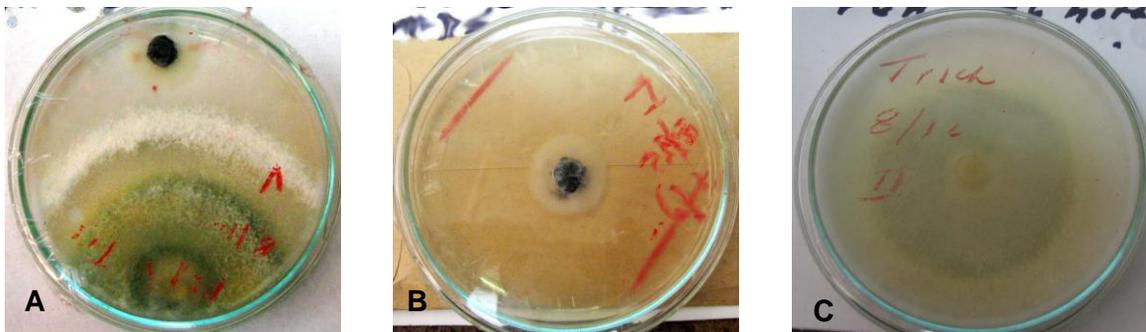


Figura 4. Competencia de *T. harzianum* frente a *P. grisea* a las 48 h. Interacción *T. harzianum* - *P. grisea* (A). *P. grisea* (B). *T. harzianum* (C)

Tabla 7. Capacidad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *P. grisea*

Indicadores	Tiempo(h)									
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
PICR (%)*	14,3	14,6	47,9	93,1	100	100	100	100	100	100
Grado de capacidad antagónica	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1
Antibiosis	+									

*PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno (+): Presencia del mecanismo de acción.

El antagonista *T. harzianum* en interacción con los tres hongos patógenos muestra los eventos de micoparasitismo por enrollamiento, penetración, vacuolización y lisis, proceso que se evidencia en las figuras 5, 6 y 7. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Guédez *et al.* (2009) quienes comprueban los fenómenos de micoparasitismo por enrollamiento, penetración y lisis en interacción con hongos que afectan al cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.).



Figura 5. Micoparasitismo por enrollamiento (A) y penetración (B) de *T. harzianum* sobre *B. oryzae*

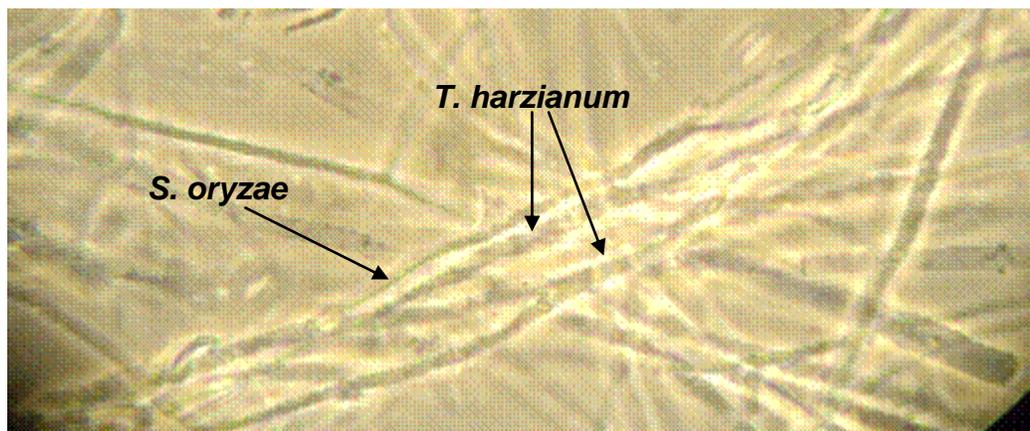


Figura 6. Micoparasitismo por penetración de *T. harzianum* sobre *S. oryzae*

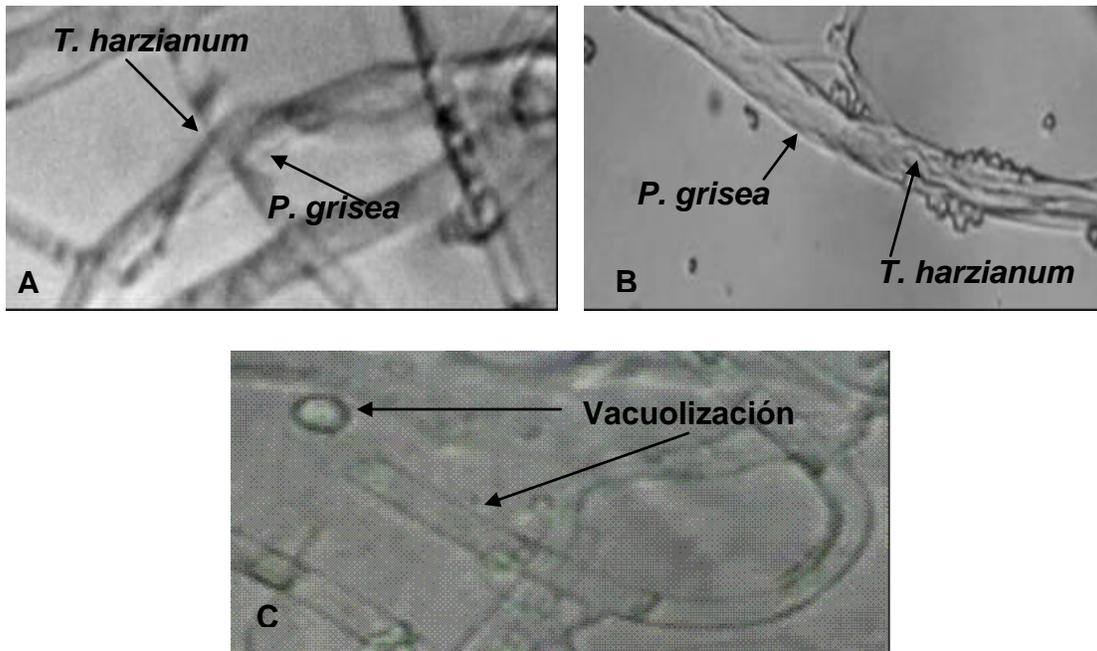


Figura 7. Micoparasitismo por enrollamiento (A), Penetración (B) y vacuolización (C) de *T. harzianum* sobre *P. grisea*

El efecto antibiótico se manifiesta a las 24 h del enfrentamiento con porcentajes de inhibición del crecimiento micelial entre 6,2% y 14,3%, cuando no existe interacción entre las hifas del agente de biocontrol y de los hongos fitopatógenos *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* (Tablas 5, 6 y 7). Esta respuesta puede estar dada por la presencia de sustancias bioactivas de naturaleza volátil y no volátil producidas por la cepa A-34 de *T. harzianum* (Stefanova *et al.*, 1999). Resultados que se corresponden con los de Villarroel (2014), quien hace referencia a la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de cepas de *T. harzianum* mejoradas por fusión de protoplastos en enfrentamiento con *Fusarium* spp. Ruiz (2011) indica la presencia de sustancias bioactivas, entre la que resalta a Trichodermin como el antibiótico que inhibe la actividad ribosomal de los hongos fitopatógenos.

4.2. Determinación de las condiciones para la obtención de filtrados de cultivo de *T. harzianum* con actividad antifúngica sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

4.2.1. Efecto del tiempo de incubación, medio y condición de cultivo en la obtención de filtrados de *T. harzianum* con actividad antifúngica

4.2.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por filtrados de cultivo de *T. harzianum*

En la figura 8, se observa que con el tiempo de incubación de 20 d se obtienen porcentajes de inhibición del crecimiento de los micelios de *B. oryzae* que oscilan entre 54,0% y 71,0%; valores que difieren significativamente a los de 10 y 30 d en los tres agentes patógenos. Los filtrados obtenidos a los 10 d contra *B. oryzae* muestran una disminución de la inhibición al alcanzar una media de 37,6%, con un porcentaje intermedio a los 30 d (44,3%). Para *S. oryzae* y *P. grisea* se obtiene menor crecimiento micelial a los 30 d con inhibiciones de 24,5% y 32,4% respectivamente; en estos dos hongos fitopatógenos los valores intermedios de significación estadística se alcanzan a los 10 d (45,6% y 56,3%).

Diversos autores enfatizan en la importancia del tiempo de incubación en la producción de sustancias bioactivas producidas por microorganismos antagonistas. Derbalah *et al.* (2011) hacen referencia a 15 d para la obtención de filtrados de *T. harzianum* y *T. viride* en el control del agente causal del mildio polvoriento (*Erysiphe cichoracearum* DC.). Puño *et al.* (2011), con el tiempo de 30 d reducen en condiciones *in vitro* el crecimiento de los micelios de *Phytophthora infestans* (Mont) Dby. por la acción de *Trichoderma inhamatum*

Veerkamp y Gams, resultados que no se corresponden con los logrados en esta investigación.

Por otra parte, Ceballos *et al.* (2014) constatan con 15 d de incubación, una inhibición entre el 84,0% y el 87,0% de *Ralstonia solanacearum* (Smith). Otro informe indica una reducción del 70,0% del crecimiento de los micelios de *Fusarium* spp. con filtrados de cepas de *T. harzianum* cultivadas durante siete días; especie de antagonista que consigue valores de PICR superiores a las de *T. asperellum* Samuels (Villarroel, 2014).

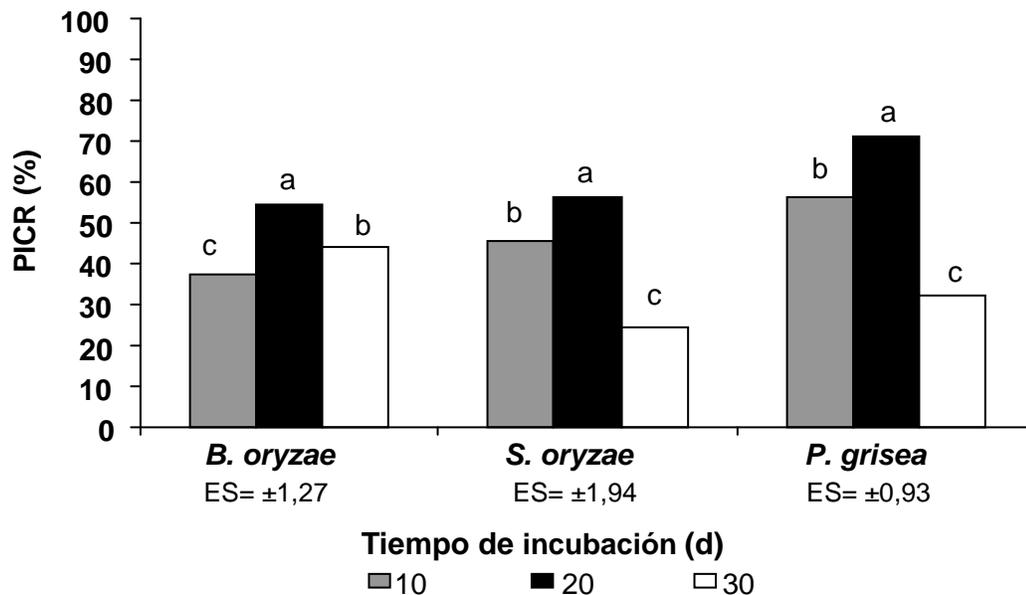


Figura 8. Efecto de filtrados de *T. harzianum* obtenidos bajo diferentes tiempos de incubación sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del arroz

PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno
Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

El comportamiento del factor medio de cultivo a los 20 d de incubación, arroja una mayor inhibición del crecimiento de los micelios en cada uno de los agentes patógenos con el medio de cultivo Czapek, con porcentajes que oscilaron entre

50,3% y 64,2% (Figura 9). En el caso de *B. oryzae* no se presentan diferencias estadísticas significativas entre Czapek (50,3%) y Richard (48,9%), con una disminución de los niveles de PICR entre Fries con 43,0% y Caldo de Papa Glucosado (CPG) de 39,3%. Sin embargo, en *S. oryzae* los valores se manifiestan de manera descendente en los medios de cultivo CPG, Richard y Fries con 40,9%, 37,6% y 35,3%, respectivamente. En *P. grisea*, no se observan diferencias significativas entre Richard (51,3%) y Fries (55,4%) y sí con CPG que obtuvo la media más baja de un 46,0%.

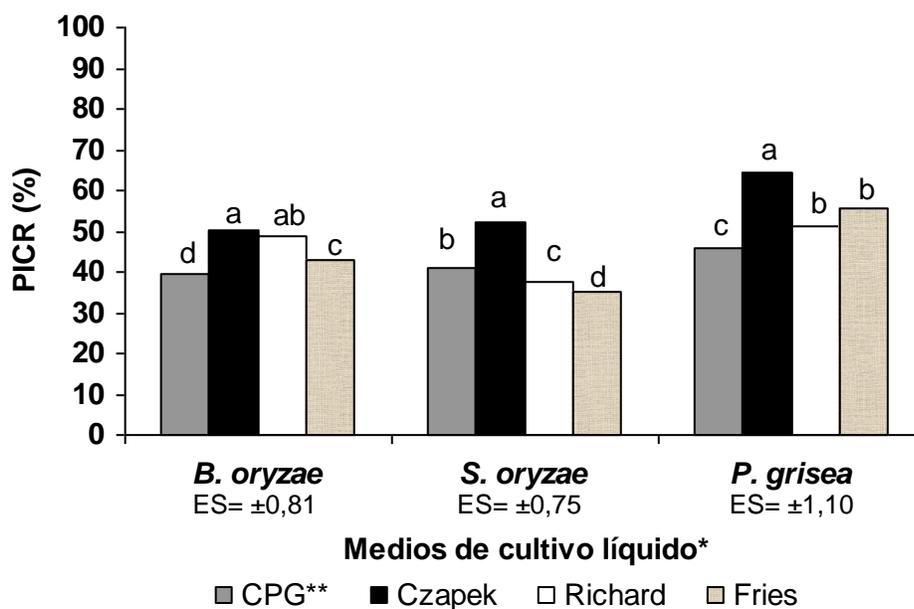


Figura 9. Efecto del medio de cultivo en la producción de filtrados de *T. harzianum*, con actividad inhibitoria del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del arroz

*Medios de cultivo incubados durante 20 d para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno

**CPG. Medio de cultivo Caldo de Papa Glucosado

Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

El potencial inhibitorio de los filtrados de cultivo depende del medio de cultivo a utilizar para su obtención. El antagonista puede desarrollarse bajo condiciones limitantes de nutrientes, con una disminución de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo, lo que conlleva a que el microorganismo entre en un periodo de crecimiento lento con alteraciones morfológicas y cambios en el metabolismo, este proceso se conoce como metabolismo secundario (Zhang *et al.*, 2001).

Otro informe refiere un resultado contrario, al argumentar que el medio de cultivo CPG carece de elementos minerales que le permitan a un agente biológico una adecuada producción de metabolitos. Argumentos que se basan en el empleo de los medios de cultivo CPG, Richard y Czapek, en la producción de fitotoxinas de *Fusarium subglutinans* (Wolentz y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas para evaluar resistencia en piña (*Ananas comosus* (L.) Morrill), con un comportamiento destacado de Czapek (Borrás, 1999).

Es necesario resaltar que en todas las variantes estudiadas en esta investigación, se logra producir metabolitos con actividad biológica inhibitoria de las estructuras vegetativas de estos hongos fitopatógenos foliares del arroz. El factor medio de cultivo es el más estudiado en la obtención de filtrados de microorganismos con actividad antifúngica sobre determinados agentes patógenos. Sobre esta temática, se hace referencia a la obtención de filtrados de *T. harzianum* en medio de cultivo Caldo Extracto de Malta con actividad inhibitoria del crecimiento de *Avena fatua* L. (Javaid y Ali, 2011).

En este sentido, la producción de metabolitos de seis aislamientos de *Trichoderma* spp. en el medio de cultivo Caldo de Papa Dextrosa, alcanza el valor más elevado de inhibición de *Alternaria solani* (Elis y Martin) Jones y Grout; sin embargo, Czapek, Richard y Fries muestran inhibiciones inferiores del crecimiento de los micelios (Martínez y Solano, 1995), resultados que discrepan de los alcanzados en esta investigación.

Michel *et al.* (2005), informan de una alta producción de las enzimas quitinasas y glucanasas por cinco especies de *Trichoderma* en medio de cultivo caldo V-8, que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. Terna *et al.* (2013) hacen referencia a el empleo de los medios de cultivo De Marco y Felix (MDF), Kucuk y Kivanc (KK) y Mendels y Weber (MW) con el objetivo de evaluar la producción de proteasas, quitinasas y celulasas por dos especies de *Trichoderma* y su efecto sobre *Aspergillus niger* P. E. L. Van Tieghem, *A. flavus* y *F. oxysporum*, con inhibición del crecimiento de los micelios por encima del 67,9% para las especies de *Aspergillus* y de un 46,9% para *Fusarium*.

En la Figura 10 se observa que los filtrados obtenidos bajo la condición de cultivo agitado, detienen el crecimiento de los micelios de los hongos fitopatógenos estudiados al alcanzar valores de inhibición de un 55,8% para *P. grisea*, un 42,9% en *S. oryzae* y un valor intermedio del 51,0% para *B. oryzae*; con significación estadística sobre el cultivo estático.

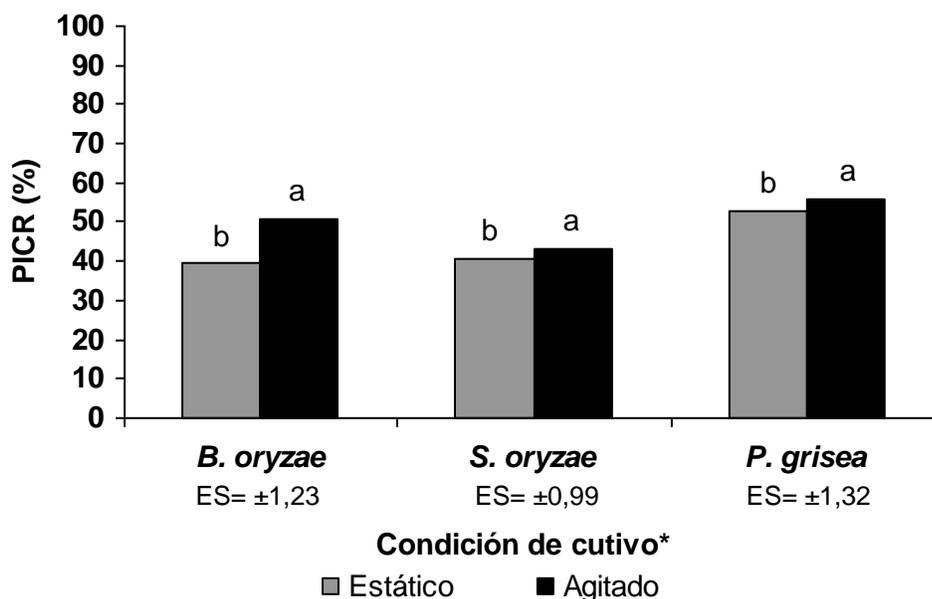


Figura 10. Efecto de la condición de cultivo en la producción de filtrados de *T. harzianum*, con actividad inhibitoria del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del arroz

*Condición de cultivo utilizado en el medio Czapek durante 20 d de incubación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno

Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Ortuño *et al.* (2013) resaltan la importancia de la velocidad de agitación del cultivo durante la incubación, al afirmar que velocidades por encima de las 120xg puede provocar la ruptura de los micelios y reducir la producción de metabolitos secundarios. Estos autores mantuvieron en agitación a una velocidad de 120xg a 35 cepas nativas de especies de *Trichoderma* durante siete días, lo que favoreció la producción de filtrados con actividad antimicrobiana.

Los filtrados de *T. harzianum* obtenidos a los 20 d de incubación, en el medio de cultivo Czapek y en condiciones de agitación muestran inhibición del crecimiento de *B. oryzae*, al no existir diferencias significativas entre las diluciones de 50,0%, 75,0% y el filtrado bruto (100%), con niveles de inhibición micelial de 45,0%,

46,6% y 48,1%, respectivamente (Figura 11). Esta respuesta permite optimizar a nivel práctico la aplicación de las sustancias con propiedades antifúngicas en condiciones semicontroladas o de campo, dado que admite hacer diluciones al 50,0% del filtrado bruto. En los restantes agentes nocivos del arroz, se evidencia en el 100% un mayor efecto sobre los micelios con 48,5% y 56,3% para *S. oryzae* y *P. grisea*, respectivamente; por lo que todas las variantes muestran una reducción del crecimiento micelial en los tres agentes patógenos con valores de PICR que oscilaron entre 35,2% y 56,3%.

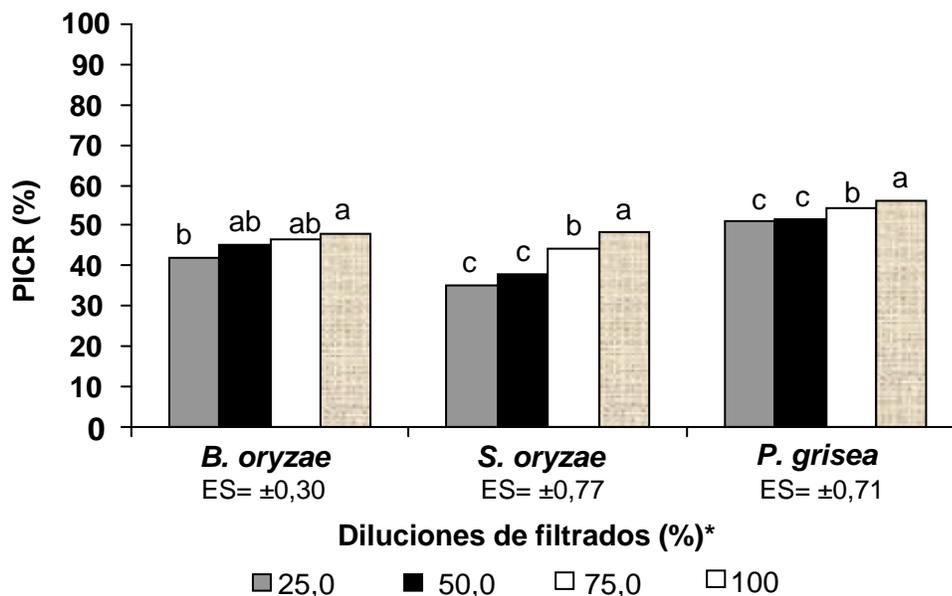


Figura 11. Efecto de diluciones de filtrados de *T. harzianum* en la actividad inhibitoria del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del arroz

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos en agitación durante 20 d de incubación en el medio de cultivo Czapek

PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno

Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

La aplicación de filtrados o de metabolitos de *T. harzianum* (cepa A-34) en el control de hongos fitopatógenos foliares de arroz ha sido poco estudiado. En Cuba no se presentan antecedentes de investigaciones relacionadas con la inhibición

del crecimiento micelial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por la aplicación de estos compuestos de naturaleza biológica. Los resultados alcanzados en esta investigación confirman lo planteado por Dumas *et al.* (1996), quienes obtienen un incremento de la inhibición de *Cylindrocladium floridanum* Sobers y C.P. Seymour, a medida que aumentaron las concentraciones de 6 pentil- α -pirona producida por *Trichoderma* spp.

Otras investigaciones que corroboran los resultados del presente trabajo reflejan que en evaluaciones de diluciones de filtrados de *Trichoderma* spp. al 5,0%, 6,6%, 10,0% y 20,0% sobre *A. flavus*, se logra un incremento de la inhibición del crecimiento de los micelios a medida que las sustancias bioactivas estaban menos diluidas, por la presencia de taninos y polifenoles en cada dilución, metabolitos secundarios que refuerzan la acción sobre el agente patógeno (Reyes *et al.*, 2006b). También se obtienen a partir de filtrados de este agente de biocontrol, cinco compuestos pertenecientes al grupo lactona, al probarse las concentraciones de 0, 1, 5, 10 y 20 mg L⁻¹ sobre *Rosellinia necatrix* Prill, con resultados alentadores a partir de 10 mg L⁻¹ (Arjona *et al.*, 2012).

4.2.1.2. Inhibición de la esporulación de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por filtrados de cultivo de *T. harzianum*

La inhibición de la esporulación de hongos fitopatógenos por sustancias bioactivas es una alternativa que limita su diseminación, lo que permite reducir la carga infectiva del agente patógeno. En esta variable, no se obtienen diferencias significativas entre el tiempo de incubación de 20 y 30 d en *B. oryzae* y *S. oryzae* (Tabla 8). A pesar de no mostrar significación se alcanza a los 20 d los niveles más

bajos de concentración de conidios de estos dos hongos fitopatógenos del arroz con $3,6 \times 10^4$ y $3,3 \times 10^4$ conidios mL^{-1} . En *P. grisea* a los 20 d se logra una reducción significativa de la esporulación con $3,1 \times 10^3$ conidios mL^{-1} , valor más significativo de las concentraciones de estas estructuras infectivas para los tres hongos patógenos, elemento importante si se tiene en cuenta que *P. grisea* provoca una de las enfermedades fúngicas más devastadoras en el arroz.

La producción de filtrados del agente de biocontrol en los tres tiempos de incubación, logran reducir la concentración de conidios de los agentes patógenos; aspecto que indica la necesidad de considerar a este factor como elemento esencial en la reducción de la carga de inóculo.

Tabla 8. Efecto del tiempo de incubación en la producción de filtrados de *T. harzianum* con inhibición de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

Tiempo de incubación (d)	Esporulación (conidios mL^{-1})					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
10	$5,6 \times 10^4$	157,5 b	$7,6 \times 10^4$	160,6 b	$5,3 \times 10^4$	155,3 b
20	$3,6 \times 10^4$	127,8 a	$3,3 \times 10^4$	129,0 a	$3,1 \times 10^3$	121,4 a
30	$4,1 \times 10^4$	143,9 ab	$5,7 \times 10^4$	145,2 ab	$4,0 \times 10^4$	140,7 b
ES		$\pm 0,89$		$\pm 1,13$		$\pm 1,54$

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

En Cuba existen reducidas investigaciones referentes al efecto de filtrados o metabolitos de *T. harzianum* (cepa A-34) en la esporulación de hongos patógenos de plantas y no se tiene antecedentes de su uso en la reducción del número de conidios de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*. Al respecto, se logran descensos en la producción de conidios de *Fusarium moniliforme* (Booth) con el tiempo de

incubación de 15 d (Reyes *et al.*, 2007). Asimismo, hacen referencia a la disminución de la concentración de esporas de *R. necatrix*, agente causal de la pudredumbre blanca del aguacate, por el efecto de cinco metabolitos de *Trichoderma* spp. (Arjona *et al.*, 2012).

Sobre este aspecto, Camarena (2012) evalúa la producción de metabolitos de los antagonistas *T. harzianum*, *T. viride* y *Trichoderma* R6 (cepa mejorada genéticamente) en los tiempos de 8, 10, 14, 18 y 22 d, en los que obtiene los valores más significativos en la reducción del número de conidios de *Alternaria alternata* (Fr.) a los 14 d. Los tiempos evaluados en nuestra investigación no coinciden con los utilizados por el autor; sin embargo, si existe correspondencia en la obtención de los niveles más altos de inhibición de la producción de conidios en sus resultados con un tiempo de incubación intermedio (14 d) al que se logra en la presente tesis con 20 d.

Los filtrados obtenidos a los 20 d de incubación logran una reducción de la concentración de conidios, con diferencias significativas entre los sustratos empleados (Tabla 9). Los valores más bajos se alcanzan con el medio de cultivo Czapek para los tres hongos patógenos del arroz. Sin embargo, las concentraciones de conidios obtenidos con los filtrados en este medio de cultivo, varían entre los agentes nocivos, con los valores de $3,6 \times 10^3$ y $3,2 \times 10^3$ conidios mL⁻¹ para *B. oryzae* y *P. grisea*. La inhibición en *S. oryzae* no manifiesta diferencias significativas entre el medio de cultivo Czapek y Richard con $3,1 \times 10^4$ y $4,7 \times 10^4$ conidios mL⁻¹, respectivamente.

Tabla 9. Efecto del medio de cultivo en la producción de filtrados de *T. harzianum*, con actividad inhibitoria de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

Medios de cultivo*	Esporulación (conidios mL ⁻¹)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
CPG**	6,2 x 10 ⁴	153,5 b	7,3 x 10 ⁴	157,8 b	5,4 x 10 ⁴	142,4 b
Czapek	3,6 x 10 ³	120,2 a	3,1 x 10 ⁴	114,5 a	3,2 x 10 ³	109,1 a
Richard	5,7 x 10 ⁴	150,3 b	4,7 x 10 ⁴	143,3 ab	4,5 x 10 ⁴	142,2 b
Fries	6,3 x 10 ⁴	154,0 b	7,6 x 10 ⁴	161,7 b	5,8 x 10 ⁴	152,3 b
ES		±1,52		±1,26		±1,67

*Medios de cultivo incubados durante 20 d para la obtención de filtrados de *T. harzianum* cepa A-34)

**CPG. Medio de cultivo Caldo de Papa Glucosado

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Autores como El-Hassan *et al.* (2013), consiguen una reducción del crecimiento micelial y de la esporulación de *F. oxysporum* f. sp. Lentis. por la acción de sustancias inhibitoras producidas por *T. hamatum* en medio de cultivo Czapek. Sin embargo, en la literatura científica consultada, no existen referencias sobre la influencia del medio de cultivo en la producción de filtrados o metabolitos de *T. harzianum* (cepa A-34) con actividad inhibitoria de la esporulación de los hongos fitopatógenos foliares del arroz antes mencionados. En este sentido, el trabajo aporta elementos para la obtención de filtrados con actividad antifúngica sobre la esporulación, basado en la selección del medio de cultivo.

Aunque algunos investigadores prefieren utilizar medios de cultivo que dispongan en su composición de sales como fosfatos, sulfatos y los nitratos de hierro y magnesio que favorezcan el desarrollo del microorganismo aparejado a la producción de compuestos biológicamente activos (Borrás, 1999). El medio de

cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa (PDB), es ampliamente utilizado para la obtención de filtrados de *Trichoderma* spp. (Ezziyani *et al.*, 2004; Mata, 2012).

Poveda (2006) hace alusión a una mayor producción de extractos fúngicos de *Trichoderma* con el medio de cultivo caldo Czapek-Dox al reducir el número de conidios de *Botrytis cinerea* Pers, agente causal del Moho gris del tomate (*S. lycopersicum*). Por su parte, Lorito *et al.* (2010) informan que la producción de metabolitos primarios y secundarios de agentes de biocontrol, está sujeto no sólo a las condiciones del medio de cultivo donde se desarrolle *Trichoderma* sino también a la especie que se utilice. Además, estos autores consideran a estas sustancias bioactivas como antibióticos al argumentar que su producción se relaciona con la capacidad que tiene el antagonista de contrarrestar al patógeno.

La condición de cultivo en la variable inhibición de la esporulación tiene un comportamiento similar al crecimiento micelial, debido a que la obtención de sustancias bioactivas en condiciones de agitación, manifiesta los niveles más bajos en la producción de conidios de los agentes fitopatógenos foliares con diferencias significativas con el cultivo estático (Tabla 10). En la primera condición, los filtrados logran reducir el número de conidios en *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* a concentraciones de $3,7 \times 10^4$; $4,8 \times 10^4$ y $4,2 \times 10^3$ conidios mL⁻¹, respectivamente. Este resultado permite disminuir la carga infectiva de estos agentes patógenos, si se tiene en cuenta que la diseminación de las estructuras reproductivas constituye el inóculo primario para que ocurra el proceso infectivo de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y el tizón del arroz (Cárdenas *et al.*, 2010).

Tabla 10. Efecto de la condición de cultivo en la producción de filtrados de *T. harzianum* sobre la inhibición de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

Condición de cultivo*	Esporulación (conidios mL ⁻¹)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
Estático	4,5 x 10 ⁴	152,0 b	6,3 x 10 ⁴	154,0 b	4,3 x 10 ⁴	150,2 b
Agitado	3,7 x 10 ⁴	134,0 a	4,8 x 10 ⁴	139,3 a	4,2 x 10 ³	128,8 a
ES		±0,95		±1,27		±1,54

*Condición de cultivo utilizado en el medio Czapek durante 20 d de incubación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Autores como Carissimi *et al.* (2009) obtienen bajo las condiciones de agitación, un control de *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoemaker con filtrados provenientes de aislamientos de *Bacillus* sp. También Núñez y Pavone (2014), consiguen inhibiciones de *P. grisea* Sacc (anamorfo de *M. grisea*) por metabolitos extracelulares y volátiles de *T. harzianum* y *T. asperellum* obtenidos bajo estas mismas condiciones a 100xg, e incubados por un periodo de siete días. La acción combinada de estas sustancias bioactivas logra una inhibición entre el 51,9% y 52,7%, pero cuando se evalúan los filtrados por separado (metabolitos volátiles y no volátiles) no sobrepasan el 23,2%.

Las diluciones de filtrados de *T. harzianum* sobre la esporulación de los agentes patógenos tuvieron un marcado efecto, sin diferencias estadísticas significativas entre las sustancias biológicas en bruto (100%) y los metabolitos diluidos al 75,0% en *B. oryzae* (Tabla 11). Sin embargo, la inhibición de la producción de conidios en *S. oryzae* y *P. grisea* no manifiesta significación con las diluciones de 50,0%,

75,0% y el filtrado al 100%. Los resultados alcanzados demuestran que los filtrados con mayor actividad en la inhibición de la esporulación de los tres agentes patógenos, se obtienen al incubar el medio de cultivo Czapek durante 20 d, bajo la condición de cultivo agitado y con los filtrados menos diluidos.

Tabla 11. Efecto de diluciones de filtrados de *T. harzianum* en la actividad inhibitoria de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

Dilución de filtrados (%)*	Esporulación (conidios mL ⁻¹)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
25,0	5,7 x 10 ⁴	159,62b	7,9 x 10 ⁴	160,4 b	7,9 x 10 ⁴	157,5 b
50,0	4,8 x 10 ⁴	153,6 b	5,3 x10 ⁴	150,4 ab	4,6 x 10 ⁴	141,3 ab
75,0	4,3 x 10 ⁴	136,5 ab	4,4 x 10 ⁴	143,3 ab	4,1 x 10 ⁴	133,1 ab
100	3,9 x 10 ⁴	121,5 a	4,1 x 10 ⁴	130,7 a	3,6 x 10 ⁴	120,1 a
ES		±0,92		±0,60		±0,41

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos en agitación durante 20 d de incubación en el medio de cultivo Czapek
Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Es reducida la literatura científica referente al empleo de diluciones de filtrados obtenidos de *Trichoderma* sobre la esporulación de hongos fitopatógenos. Poveda (2006) evalúa diluciones al 50,0% de extractos fúngicos de cuatro especies de hongos antagonistas sobre el agente causal del moho gris del tomate. Núñez y Pavone (2014), utilizan el filtrado bruto de *T. harzianum* y *T. asperellum* en la reducción de las colonias de *P. grisea*. Sin embargo, estos autores no realizaron estudios de los filtrados de cultivo sobre la esporulación de este hongo del arroz.

4.2.1.3. Inhibición de la germinación conidial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por filtrados de cultivo de *T. harzianum*

De igual manera que la inhibición de la esporulación, el efecto de los filtrados de cultivo de *T. harzianum* sobre la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz ha sido poco estudiado. Los filtrados a los 20 d consiguen los valores más significativos en la inhibición de la germinación con 79,2% (*B. oryzae*), 73,6% (*S. oryzae*) y 83,5% (*P. grisea*), con diferencias estadísticas con el tiempo de 10 y 30 d en los tres agentes patógenos (Tabla 12). En *B. oryzae* se obtiene la inhibición más baja a los 30 d con una media de 56,2%; sin embargo en los restantes hongos fitopatógenos no se evidenciaron diferencias significativas entre los 10 y 30 d de incubación.

Tabla 12. Efecto del tiempo de incubación en la obtención de filtrados de *T. harzianum* con actividad inhibitoria sobre la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz

Tiempo de incubación (d)	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
10	63,5	142,1 b	59,8	144,8 b	60,9	132,8 b
20	79,2	159,4 a	73,6	151,9 a	83,5	168,7 a
30	56,2	132,0 c	55,9	136,8 b	56,4	131,9 b
ES		±0,73		±0,94		±0,87

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Los filtrados obtenidos a los 20 d manifiestan los mejores resultados de inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial en los tres agentes patógenos. Este efecto puede facilitar la producción de metabolitos de este antagonista en un proceso de escalado, debido a que con estos filtrados se garantizaría la inhibición de las estructuras que llevan a cabo el proceso infectivo de los agentes causales de estas enfermedades foliares en el cultivo del arroz.

Los resultados referentes a la inhibición de la germinación de los conidios de los tres agentes patógenos, difieren de los obtenidos por Poveda (2006) quien logra una inhibición de la germinación de los conidios entre 59,3% y 93,7%, con ocho días de incubado el antagonista.

Otros autores como Bernardi *et al.* (2013) aluden al tiempo de nueve días para obtener filtrados de hongos endofíticos de soya (*Glycine max* L.), con actividad inhibitoria de microorganismos patógenos en este cultivo. El tiempo de incubación de nueve días utilizado por estos autores no coincide con ninguno de los niveles evaluados para este factor en la investigación.

Se obtiene una mayor inhibición de la germinación de los conidios con los filtrados en el medio de cultivo Czapek, con diferencias estadísticas significativas con el resto de los sustratos empleados para los tres hongos fitopatógenos (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto del medio de cultivo en la producción de filtrados de *T. harzianum* sobre la inhibición de la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz

Medios de cultivo*	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
CPG**	60,9	135,1 bc	54,3	139,8 b	58,2	132,0 b
Czapek	79,2	169,1 a	73,6	169,5 a	84,1	173,6 a
Richard	55,2	137,0 c	52,8	129,6 b	57,3	129,7 b
Fries	64,2	136,8 b	54,6	142,0 b	59,4	142,7 b
ES		±0,89		±0,76		±0,94

*Medios de cultivo incubados durante 20 d para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

**CPG. Medio de cultivo Caldo de Papa Glucosado

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Los resultados del presente trabajo no coinciden con los obtenidos por Carissimi *et al.* (2009) y Bernardi *et al.* (2013) con el empleo del medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa, aspecto que puede estar dado por la composición del medio de cultivo, la especie de antagonista y el agente patógeno a controlar.

En la Tabla 14 se aprecia como los metabolitos obtenidos en agitación muestran una mayor inhibición de la germinación conidial con significación estadística en los tres hongos de arroz. Para esta condición de cultivo, el porcentaje más elevado se alcanza en *P. grisea* con un 86,5%, con una reducción de la germinación de los conidios por encima del 60,8% para las dos condiciones en los tres agentes fitopatógenos. Los metabolitos producidos en agitación manifiestan los más altos porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial en el control de los agentes causales de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz.

Todos los resultados obtenidos por los autores antes citados en este epígrafe, se logran bajo la condición de agitado.

Tabla 14. Efecto de la condición de cultivo en la producción de filtrados de *T. harzianum* con actividad inhibitoria de la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz

Condición de cultivo*	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
Estático	65,2	144,2 b	60,8	135,3 b	75,6	140,2 b
Agitado	79,2	168,7 a	73,6	153,7 a	86,5	148,8 a
ES		±0,65		±0,94		±0,87

*Condición de cultivo utilizado en el medio Czapek durante 20 d de incubación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Al evaluar el efecto de las diluciones de los metabolitos de *T. harzianum* (cepa A-34) en medio de cultivo Czapek, con la condición de agitación e incubado durante 20 d; se obtienen los valores más elevados de inhibición de la germinación de los conidios en el filtrado al 100% con un 84,2% para *S. oryzae* y 91,5% en *P. grisea* (Tabla 15). En el caso de *B. oryzae* no existen diferencias significativas entre el filtrado bruto (79,2%) y la dilución al 75,0% con un porcentaje de inhibición de 70,8%. A pesar de obtener las diluciones al 25,0% los valores más discretos en la reducción de la germinación de las estructuras reproductivas de los tres agentes patógenos, se alcanzan porcentajes superiores al 50,0%, lo que resulta alentador si se tiene cuenta que se rebaja en cuatro partes el filtrado bruto.

Tabla 15. Efecto de diluciones de filtrados de *T. harzianum* en la actividad inhibitoria de la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz

Dilución de filtrados (%)*	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
25,0	59,1	124,5 c	65,9	132,0 c	74,8	126,2 d
50,0	60,9	130,2 bc	67,2	133,1 c	81,9	137,7 c
75,0	70,8	154,6 ab	76,8	154,9 b	88,3	148,1 b
100	79,2	158,7 a	84,2	167,0 a	91,5	171,1 a
ES		±0,36		±0,74		±0,83

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos en agitación durante 20 d de incubación en el medio de cultivo Czapek
Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Los resultados de inhibición de la germinación de los conidios por diluciones de filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34), corroboran los obtenidos por Bernardi *et al.* (2013), al evaluar filtrados brutos de hongos endofíticos de soya (*Trichoderma* spp.), en el control de agentes nocivos de este cultivo. De igual manera, Bannach (2013) obtiene una reducción del 50,0% de la germinación de los conidios de *M. oryzae*, por la aplicación de extractos cada vez más concentrados de *Ruta graveolens* L.

Además, se ha encontrado una reducción del 52,7% de la germinación de los conidios de *Alternaria porri* Ellis, agente causal de la enfermedad mancha púrpura de la cebolla; por la aplicación de concentraciones elevadas de las enzimas quitinasas y glucanasas producidas por los antagonistas *T. harzianum* y *T. asperellum* (Camacho, 2014).

4.2.2. Efecto del pH y la temperatura en la obtención de filtrados de *T. harzianum* con actividad antifúngica

4.2.2.1. Efecto del filtrado de cultivo de *T. harzianum* sobre la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

Los filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34) producidos en el medio de cultivo Czapek e incubados durante 20 d en agitación, obtienen a pH 5,5 el valor más elevado de inhibición del crecimiento micelial en *B. oryzae* con 44,9%. Sin embargo, en *S. oryzae* se alcanza a pH 4,5 un 50,1%, aunque no manifiesta significación estadística con 4,0 (42,2%) y 5,5 (42,7%). En *P. grisea* no existen diferencias entre los pH 4,5; 5,0; 5,5 y 6,0 con la mayor inhibición de 65,7% a pH 5,0 (Figura 12).

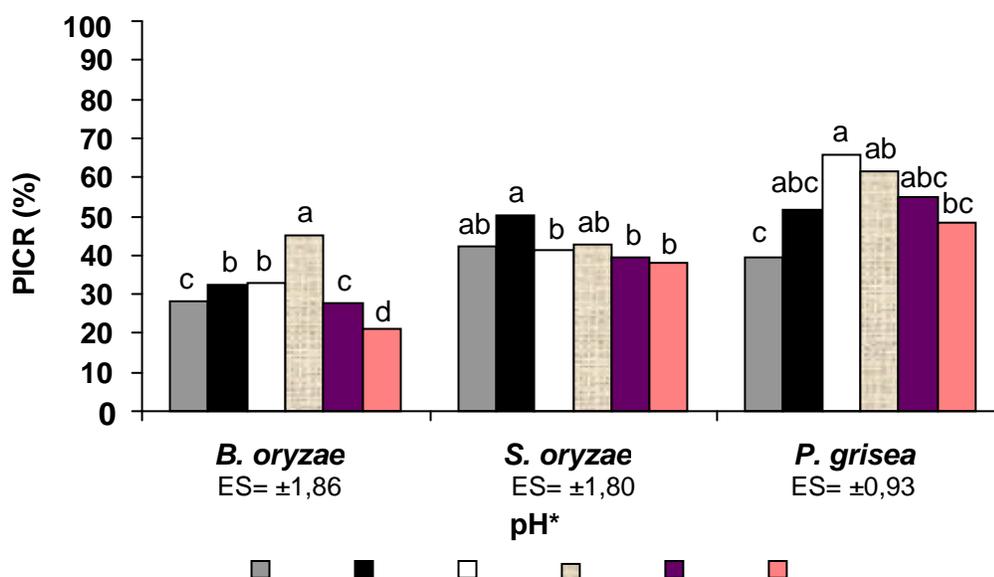


Figura 12. Efecto del pH en la producción de filtrados de *T. harzianum* con actividad inhibitoria del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del arroz

*pH utilizado en el medio Czapek durante 20 d de incubación bajo agitación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno

Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Las diluciones de 75,0% y el filtrado bruto (100%), muestran la mayor inhibición del crecimiento de los micelios en los agentes causales de la mancha parda y pudrición de la vaina del arroz. En *P. grisea* no se manifiestan diferencias significativas entre 50,0%, 75,0% y 100% (Figura 13).

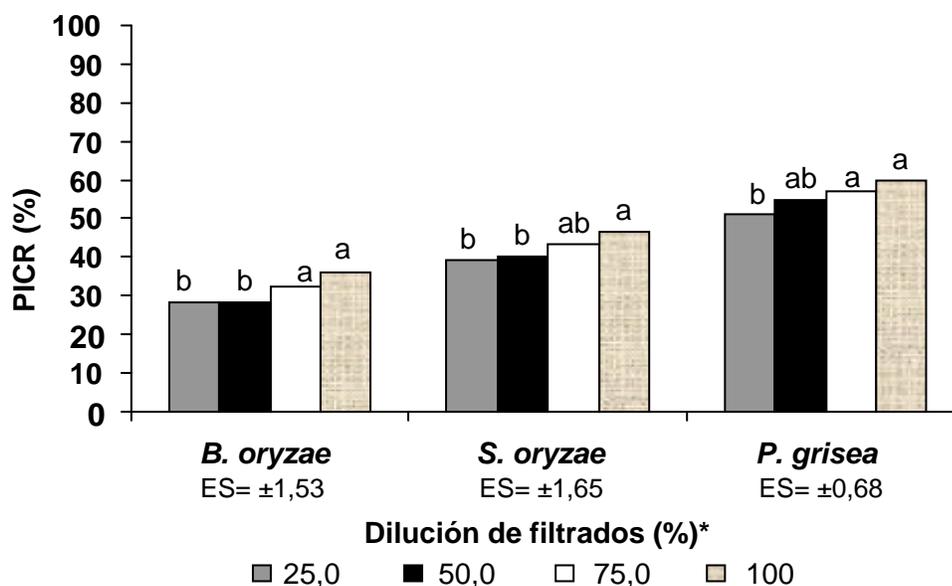


Figura 13. Inhibición del crecimiento micelial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por diluciones de filtrados de *T. harzianum*

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos a los 20 d de incubación en agitación, en el medio de cultivo Czapek a pH 5.5

PICR. Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial del micelio de cada agente fitopatógeno

Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Estos resultados profundizan el criterio de que *Trichoderma* spp. no es un microorganismo exigente al pH en el sustrato, con un rango que varía de 5,5 a 6,5 (Páez, 2006); aunque en la presente investigación esta condición se mueve en un rango de pH 4,0 a 6,0 para la inhibición del crecimiento micelial de los agentes patógenos del arroz. A conclusiones similares llegan González *et al.* (2012), al evaluar la producción de las enzimas quitinasas y glucanasas de *T. asperellum*, en medios de cultivo con pH que coinciden con los utilizados en nuestros estudios.

La temperatura de incubación es un factor indispensable para la producción de filtrados de *Trichoderma*. La inhibición del crecimiento micelial se comporta con niveles de significación estadística para 28°C en los tres agentes patógenos, con un rango de inhibición de los micelios entre 49,8% y 69,8%, este último valor se obtiene con el hongo fitopatógeno *P. grisea*. En *B. oryzae* solo existen diferencias significativas entre los filtrados obtenidos a 28 y 32°C (Figura 14).

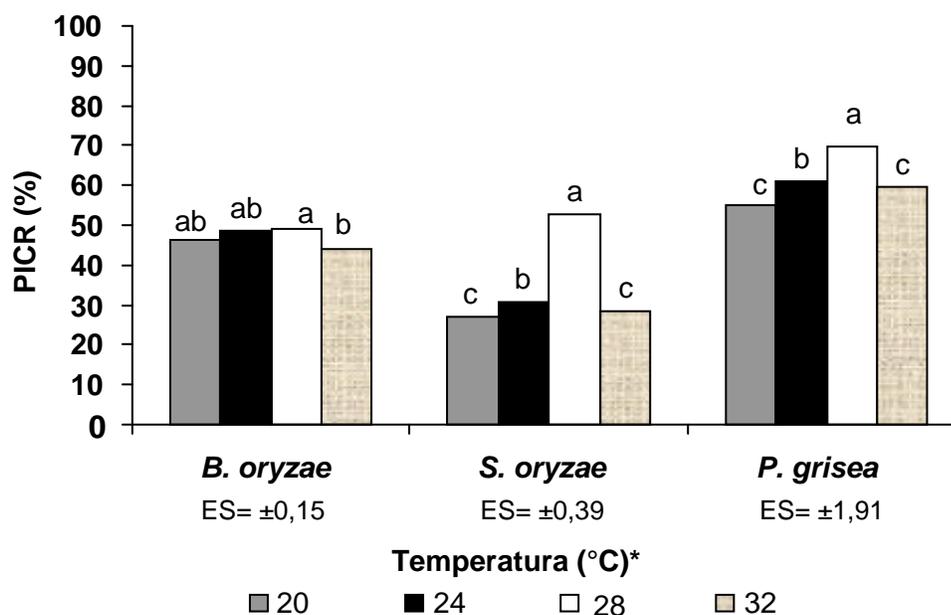


Figura 14. Efecto de la temperatura en la producción de filtrados de *T. harzianum* con actividad inhibitoria del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del arroz

*Temperatura de incubación utilizada en el medio Czapek durante 20 d bajo agitación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

En los filtrados de *T. harzianum* obtenidos a 28°C, no se muestran diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial entre las diluciones al 50,0%, 75,0% y el filtrado bruto (100%) en *B. oryzae*. La dilución al 75,0% no manifiesta en *P. grisea* diferencias con el 100%. En el hongo *S. oryzae* no existe significación estadística entre las diluciones estudiadas (Figura 15).

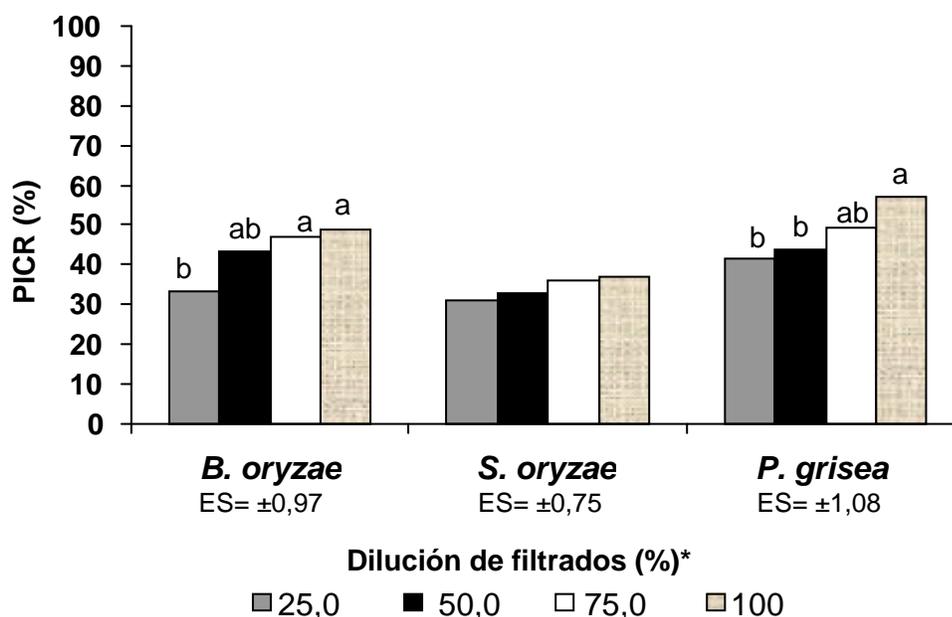


Figura 15. Efecto de diluciones de filtrados de *T. harzianum* sobre la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del arroz

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos a los 20 d de incubación en agitación a 28°C, en el medio de cultivo Czapek

Letras diferentes sobre barras para un mismo agente causal difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Los resultados en el presente trabajo se corresponden con los alcanzados por Martínez y Solano (1995), en el control de *A. solani* por filtrados de seis aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos a 28°C. No obstante, estos autores incuban el hongo antagonista durante 30 d en medio de cultivo Caldo de Papa Dextrosa ajustado a pH 5,5. Otros investigadores utilizan esta temperatura con un tiempo de incubación de 30 d en medio de cultivo V-8, para producir metabolitos de *T. inhamatum* con el objetivo de controlar cepas nativas de *P. infestans* (Puño *et al.*, 2011).

Asimismo, Michel *et al.* (2005) evalúan el efecto antibiótico de las enzimas quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma* spp. bajo las condiciones de agitado, en medio V-8 y a temperatura de 25°C, incubado por ocho días; con un

efecto sobre especies de *Fusarium*, resultados que no se corresponden con los de la presente tesis. Osorio *et al.* (2012) obtienen en medio de cultivo Czapek e incubados a 28°C, filtrados de *Trichoderma* sp. con actividad inhibitoria de *Colletotrichum gloeosporoides* [Penz.] Penz & Sacc.).

La tabla 16 muestra que los promedios más bajos de concentración de conidios se alcanzan con los filtrados producidos a pH 5,5 al presentar diferencias significativas con los niveles de acidez de 4,0 y 6,5 en *B. oryzae*; para *P. grisea* solo se alcanza significación estadística entre el pH 5,5 y 6,5. En *S. oryzae* no se observa significación al evaluar el efecto de diferentes tenores de pH en la obtención de filtrados de cultivo de *T. harzianum* con actividad antifúngica.

Tabla 16. Efecto del pH en la obtención de filtrados de *T. harzianum* con actividad inhibitoria de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

pH*	Esporulación (conidios mL ⁻¹)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
4,0	7,0 x 10 ⁴	48,7 b	1,7 x 10 ⁴	28,5	5,4 x 10 ⁴	43,4 ab
4,5	5,2 x 10 ⁴	41,9 ab	2,2 x 10 ⁴	37,9	4,5 x 10 ⁴	33,1 ab
5,0	1,9 x 10 ⁴	34,0 ab	2,8 x 10 ⁴	38,0	1,3 x 10 ⁴	31,7 ab
5,5	8,9 x 10 ³	20,4 a	1,5 x 10 ⁴	27,5	9,1 x 10 ³	22,9 a
6,0	1,6 x 10 ⁴	29,7 ab	5,6 x 10 ⁴	41,4	5,0 x 10 ⁴	41,6 ab
6,5	6,3 x 10 ⁴	44,2 b	8,9 x 10 ⁴	45,7	6,3 x 10 ⁴	46,3 b
ES	±0,25		±0,26		±0,49	

*pH utilizado en el medio Czapek durante 20 d de incubación bajo agitación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Entre las diluciones de los filtrados de cultivo de *T. harzianum* (cepa A-34) obtenidos a pH 5,5; no se presentan diferencias significativas en la esporulación de los hongos fitopatógenos del arroz *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* (Tabla 17).

Estos resultados corroboran lo planteado por Páez (2006) al referir que este antagonista no es exigente a un determinado pH para producir metabolitos con actividad antifúngica. A pesar de no existir significación entre las diluciones de los metabolitos, en todos los casos se logra reducir la carga infectiva en más de un 50,0%, aspecto a tener en cuenta para una aplicación práctica de esta alternativa de control biológico.

Tabla 17. Efecto de diluciones de filtrados de *T. harzianum* sobre la inhibición de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

Dilución de filtrados (%) [*]	Esporulación (conidios mL ⁻¹)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
25,0	6,5 x 10 ⁴	42,0	5,5 x 10 ⁴	40,0	6,1 x 10 ⁴	42,9
50,0	5,0 x 10 ⁴	38,8	5,3 x 10 ⁴	39,6	4,2 x 10 ⁴	40,4
75,0	4,2 x 10 ⁴	36,4	4,9 x 10 ⁴	34,6	3,7 x 10 ⁴	36,5
100	1,4 x 10 ⁴	28,8	3,7 x 10 ⁴	31,9	1,1 x 10 ⁴	26,2
ES		±0,22		±0,17		±0,27

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos a los 20 d de incubación en agitación, en el medio de cultivo Czapek a pH 5.5

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

La temperatura tiene una marcada influencia en la reducción del número de conidios de los microorganismos patógenos *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por la acción de los filtrados de *T. harzianum*, con los valores más significativos de inhibición de la esporulación a 28°C en los tres agentes patógenos. Sin embargo, no se presentan diferencias entre 24, 28 y 32°C en *B. oryzae*, de igual manera ocurre con 24 y 28°C en el hongo fitopatógeno *P. grisea* (Tabla 18).

Tabla 18. Efecto de la temperatura en la obtención de filtrados de *T. harzianum* con actividad inhibitoria de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

Temperatura (°C)*	Esporulación (conidios mL ⁻¹)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
20	6,4 x 10 ⁴	32,2 b	8,8 x 10 ⁴	30,0 b	1,5 x 10 ⁴	31,0 b
24	1,2 x 10 ⁴	25,7 ab	1,5 x 10 ⁴	28,0 b	8,3 x 10 ³	25,5 ab
28	3,6 x 10 ³	16,5 a	6,4 x 10 ³	11,7 a	5,6 x 10 ³	14,3 a
32	8,3 x 10 ³	23,5 a	1,8 x 10 ⁴	28,3 b	1,1 x 10 ⁴	27,2 b
ES		±1,26		±0,94		±1,83

*Temperatura de incubación utilizada en el medio Czapek durante 20 d bajo agitación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Como se observa en la Tabla 19, el efecto de las diluciones sobre la esporulación solo manifiesta diferencias significativas en *P. grisea*, con una tendencia al aumento en el número de conidios de cada especie de hongo fitopatógeno a medida que los filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) estaban más diluidos, suceso que se evidencia en los factores estudiados anteriormente.

Tabla 19. Efecto de diluciones de filtrados de *T. harzianum* sobre la inhibición de la esporulación de hongos fitopatógenos del arroz

Dilución de filtrados (%)*	Esporulación (conidios mL ⁻¹)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
25,0	5,3 x 10 ⁴	28,1	5,3 x 10 ⁴	30,0	6,4 x 10 ⁴	32,1 b
50,0	5,1 x 10 ⁴	24,7	3,9 x 10 ⁴	23,9	5,1 x 10 ⁴	25,4 b
75,0	1,8 x 10 ⁴	23,0	2,3 x 10 ⁴	22,2	1,8 x 10 ⁴	22,5 b
100	1,7 x 10 ⁴	22,3	1,6 x 10 ⁴	21,9	1,7 x 10 ³	17,9 a
ES		±0,73		±0,29		±0,36

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos a los 20 d de incubación en agitación a 28°C, en el medio de cultivo Czapek

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Los valores de inhibición de la esporulación que se alcanzan en esta investigación por el efecto de la temperatura en la producción de filtrados, difieren de los que obtiene Poveda (2006), en filtrados incubados durante ocho días a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ en medio de cultivo Czapek-Dox con porcentajes de dilución del 50,0% y una reducción del 20,0% de la producción de conidios de *B. cinerea*.

El efecto del pH en la inhibición de la germinación conidial de los microorganismos patógenos del arroz por filtrados de *T. harzianum* manifiesta diferencias significativas para los tres agentes patógenos. Entre los tratamientos que consiguen los mejores resultados se encuentran los pH de 4,5; 5,0 y 5,5 para *B. oryzae* y *S. oryzae*. En *P. grisea* los niveles de acidez señalados anteriormente no difirieron significativamente de pH 6,0; con porcentajes de inhibición de los conidios entre 28,3% y 86,8% en los tres agentes nocivos (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto del pH en la producción de filtrados de *T. harzianum* con actividad inhibitoria sobre la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz

pH*	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
4,0	28,8	15,8 d	28,3	15,5 b	40,0	16,2 c
4,5	76,6	42,7 ab	74,6	47,7 a	80,6	43,2 a
5,0	83,9	47,5 a	73,1	51,7 a	85,1	46,8 a
5,5	84,2	50,1 a	80,8	60,4 a	86,8	52,3 a
6,0	61,4	43,8 bc	50,7	22,3 b	67,2	41,7 ab
6,5	45,8	19,5 cd	48,1	21,6 b	53,9	18,8 bc
ES		$\pm 1,11$		$\pm 1,23$		$\pm 1,37$

*pH utilizado en el medio Czapek durante 20 d de incubación bajo agitación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Los filtrados diluidos provenientes del medio de cultivo Czapek, incubados durante 20 d bajo la condición de cultivo agitado a pH 5,5 no manifiestan diferencias significativas en los agentes causales de las enfermedades mancha parda y pudrición de la vaina del arroz (Tabla 21); comportamiento diferenciado en *P. grisea* al no presentar discrepancias estadísticas entre el 75,0% y 100%.

Tabla 21. Efecto de las diluciones de filtrados de *T. harzianum* sobre la inhibición de la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz

Dilución de filtrados (%)*	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
25,0	59,5	32,9	52,7	29,3	58,3	30,7 b
50,0	60,1	33,2	54,9	31,4	61,9	31,0 b
75,0	66,1	35,2	62,6	39,6	73,4	38,2 ab
100	74,5	44,7	71,9	45,7	82,8	46,1 a
ES		±0,94		±1,03		±0,81

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos a los 20 d de incubación en agitación, en el medio de cultivo Czapek a pH 5.5

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

La disminución del número de conidios y la inhibición de su germinación, reduce la proliferación de enfermedades como el tizón del arroz. Elemento importante si se tiene en cuenta que esta enfermedad se disemina por la transportación de los conidios por el viento, los que pueden llegar a más de 20 km del lugar donde se origina la fuente de inóculo (Almaguer *et al.*, 2008).

Otro informe sobre la aeromicología refieren a monitoreos en España de conidios de *P. grisea* y *B. oryzae* en muestras desde julio hasta octubre. Así como, se obtiene en Estados Unidos, conidios desde principios de julio hasta mediados de octubre, en concentraciones máximas desde agosto hasta septiembre, con una

alta correlación entre las variables temperatura, humedad relativa y la concentración de esporas en el aire (Picco y Rodolfi, 2002).

La temperatura de 28°C presenta en los tres agentes patógenos los valores más altos de inhibición de germinación conidial entre 62,3% y 85,9%, aunque no existen diferencias significativas entre 24, 28 y 32°C en *B. oryzae* y 28°C y 32°C en *P. grisea* (Tabla 22), con resultados favorables en los filtrados diluidos al 75,0% y el filtrado bruto en los tres hongos del arroz (Tabla 23).

Tabla 22. Efecto de la temperatura en la producción de filtrados de *T. harzianum* sobre la inhibición de la germinación conidial de hongos fitopatógenos del arroz

Temperatura (°C)*	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
20	37,8	21,7 b	28,3	8,2 c	39,9	8,83 c
24	50,7	25,9 ab	75,7	24,6 b	77,7	21,4 b
28	62,3	33,4 a	85,9	37,8 a	85,7	35,6 a
32	55,3	30,3 ab	75,6	27,3 b	84,5	32,4 a
ES		±1,36		±1,68		±1,89

*Temperatura de incubación utilizada en el medio Czapek durante 20 d bajo agitación, para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34)

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Tabla 23. Inhibición de la germinación conidial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* por diluciones de filtrados de *T. harzianum*

Dilución de filtrados (%)	Inhibición de la germinación conidial (%)					
	<i>B. oryzae</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>P. grisea</i>	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
25,0	50,0	17,0 b	58,0	18,2 b	61,8	14,5 b
50,0	52,4	20,6 b	58,7	19,2 b	62,1	20,3 b
75,0	67,5	25,9 ab	73,5	27,5 ab	80,8	27,5 a
100	72,4	34,6 a	78,7	33,0 a	83,2	31,7 a
ES		±0,52		±1,24		±1,54

*Filtrados de cultivo de *T. harzianum* (A-34) obtenidos a los 20 d de incubación en agitación a 28°C, en el medio de cultivo Czapek

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

4.3. Eficacia de *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en condiciones semicontroladas

En la variable epifitiológica Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) (Tabla 24), el tratamiento de Azoxistrobina muestra los valores más bajos, al presentar diferencias significativas con el resto de las variantes en las enfermedades pudrición de la vaina y tizón del arroz. Sin embargo, en la mancha parda, el fungicida no expresa significación con el filtrado de cultivo de *T. harzianum* al 100%. Este último tratamiento, no difiere con la dilución al 75,0%, que a su vez no presenta significación con el tratamiento de 10^{11} conidios mL⁻¹ y si con las restantes alternativas de control.

En cada hongo fitopatógeno, se incrementa el ABCPE en la medida en que se usan las menores concentraciones de *T. harzianum* (cepa A-34) y diluciones de los filtrados de cultivo, respectivamente. Así mismo, todas las variantes en que se emplean alternativas para reducir las afectaciones de los agentes patógenos muestran diferencias significativas con el control absoluto. De igual modo, los mejores resultados de las alternativas de control biológico, logran una disminución del área bajo la curva de las enfermedades provocadas por *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* del 67,5%; 83,9% y 79,8%, respectivamente.

Tabla 24. Efecto de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo sobre el Área bajo la curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en la variedad de arroz Perla de Cuba, inoculados artificialmente con *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*

Tratamiento	ABCPE					
	Mancha parda		Pudrición de la vaina		Tizón del arroz	
	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios	Medias reales	Rangos medios
10⁹*	1656,1	63,8 e	395,8	50,3 d	1806,2	72,0 f
10¹⁰*	1552,0	50,2 d	360,0	37,1 cd	1361,1	44,3 d
10¹¹*	1386,7	33,0 c	334,3	32,4 c	941,8	18,4 b
Químico**	1213,1	11,2 a	99,5	5,5 a	138,0	5,5 a
100%	1255,9	16,4 ab	266,0	16,8 b	983,2	22,6 b
75,0%	1319,4	24,9 bc	384,7	41,0 cd	1249,6	36,7 c
50,0%	1539,5	48,9 d	482,4	69,5 e	1501,3	55,6 e
25,0%	2186,9	75,5 f	485,4	71,4 e	1723,1	68,8 f
Control absoluto	3864,1	85,5 g	1656,8	85,5 f	4671,2	85,5 g
ES		±2,39		±3,47		±4,73

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

**Químico. Azoxistrobina

Rangos medios con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Esta variable se utiliza para estudiar la resistencia de cultivares de arroz contra las enfermedades provocadas por *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* (Kamal y Mia, 2009; Bahadur, 2015). Además, se informa en el control de hongos fitopatógenos foliares en cultivos como ajo (*Allium sativum* L.) y *Musa* spp. con microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* (Rojas *et al.*, 2010; Castro, 2015). Sin embargo, en la literatura científica consultada, solo se encuentra un resultado referente a la aplicación del ABCPE sobre los hongos patógenos del arroz con el uso de *Pseudomonas fluorescens* (Prathuangwong *et al.*, 2012).

En la figura 16 se aprecia que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de eficacia de los tratamientos en el control de la enfermedad mancha parda del arroz, con valores por encima del 80,0%. Los filtrados de cultivo presentan eficacias superiores al 90,0% al igual que el fungicida Azoxistrobina y se alcanza un control entre 81,0% y 84,0% con el hongo antagonista.

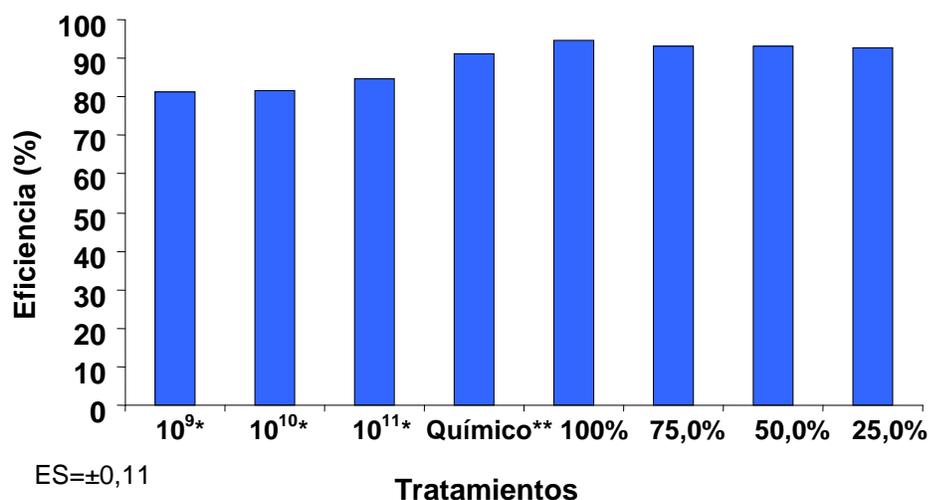


Figura 16. Eficacia de *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo en el control de la mancha parda de arroz (*B. oryzae*)

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

**Químico. Azoxistrobina

Datos procesados según la Prueba de Tukey (p<0,05)

En la enfermedad pudrición de la vaina, el tratamiento con Azoxistrobina obtiene el valor más elevado con un 93,8% de eficacia, al presentar diferencias significativas con el antagonista y con los filtrados (Figura 17). Estas alternativas de control biológico muestran entre un 65,7% y 82,7%, valores que se consideran adecuados para este método de control de enfermedades. A pesar de no existir diferencias significativas entre estas variantes, los controles más elevados se alcanzan con el filtrado al 100% (80,9%) y con la concentración de 10¹¹ (82,7%).

Estos resultados demuestran que los mecanismos de acción del antagonista y los metabolitos, son capaces de ejercer un control superior al 65,0% de eficacia al aplicar los filtrados de cultivo y entre 79,0% y 82,7% de *T. harzianum* (cepa A-34).

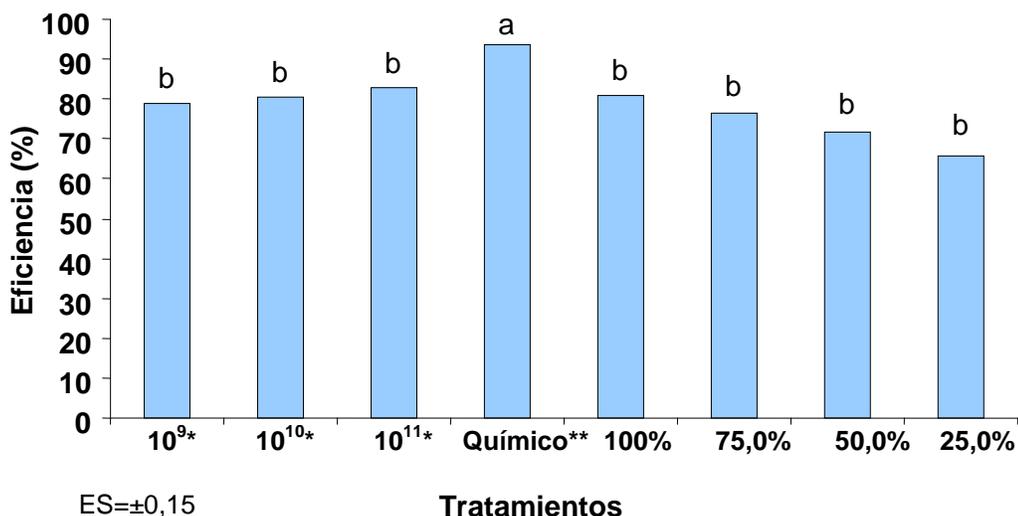


Figura 17. Eficacia de *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo en el control de la pudrición de la vaina del arroz (*S. oryzae*)

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

**Químico. Azoxistrobina

Letras diferentes sobre las barras difieren significativamente por la Prueba de Tukey ($p < 0,05$)

En la enfermedad tizón del arroz, no existen diferencias significativas entre el valor promedio alcanzado por el fungicida y el de las tres variantes en que se aplica el antagonista, así como entre los tratamientos desde el 50,0% de dilución del filtrado al 100% (filtrado bruto). Solo se presenta significación estadística entre Azoxistrobina y el filtrado de cultivo diluido al 25,0% (Figura 18).

Se logran valores de eficacia para *P. grisea* entre un 63,0% y 83,7% con las alternativas biológicas. Porcentajes de control más bajos en relación a las restantes enfermedades estudiadas, aspecto que puede estar dado por las condiciones de inoculación artificial que provocan una alta intensidad de ataque,

aparejado a la alta virulencia del aislado inoculado y a la susceptibilidad que presenta la variedad de arroz utilizada en la investigación.

Durante la conducción de los experimentos se registran temperaturas por encima de 28°C y humedad relativa superiores al 80,0%, lo que favorece la germinación de los conidios del antagonista y el proceso de infección de los agentes fitopatógenos (Infante *et al.*, 2009).

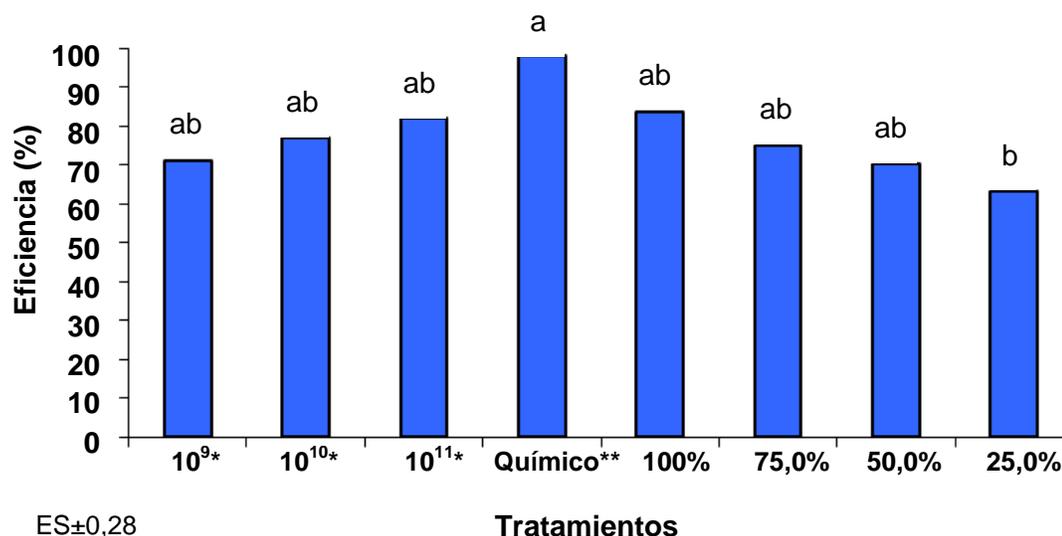


Figura 18. Eficacia de *T. harzianum* y sus filtrados de cultivo en el control del tizón del arroz (*P. grisea*)

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

**Químico. Azoxistrobina

Letras diferentes sobre las barras difieren significativamente por la Prueba de Tukey ($p < 0,05$)

Los resultados obtenidos *in vitro* por *T. harzianum* (cepa A-34) a través de los mecanismos de acción de competencia, antibiosis y micoparasitismo (enrollamiento, penetración, lisis y vacuolización) en la interacción con los agentes patógenos *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* permiten inferir que este antagonista es capaz de ejercer en la planta de arroz el control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz en condiciones semicontroladas.

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

Bajo estas condiciones experimentales, se logran valores de eficacia que oscilan entre el 65,0% y 94,4%; los que se consideran alentadores si se tiene en cuenta que se han obtenido por la aplicación de *T. harzianum* (cepa A-34) como alternativa de control de estas tres enfermedades en el arroz. Aspecto a resaltar por la alta carga infectiva (10^8 ufc mL⁻¹) de los tres agentes patógenos inoculados, aparejado a las condiciones de temperatura y humedad relativa que favorecieron el proceso de infección.

Los estudios realizados en este trabajo, corroboran la obtención de una eficacia superior al 95,0% ante *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) al aplicar en parcelas de *Musa* spp. esta misma cepa de *Trichoderma* (Pérez *et al.*, 2009b). En el cultivo del arroz, solo existen informes de la aplicación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* Kühn, con porcentajes entre 30,0% y 95,0% (Reyes, 2011).

En la literatura científica consultada no existen antecedentes de la aplicación de filtrados de *Trichoderma* en condiciones *in vivo* para controlar hongos fitopatógenos foliares del arroz. En la familia *Poaceae*, se obtiene en el cultivo de

cebada, un efecto fungistático en el control de *B. sorokiniana* por la aplicación de sustancias elicitoras de *Trichoderma* (Antoniazzi, 2005) y en el cultivo de *Musa* spp. se alcanzan valores superiores al 90,0% de reducción de *R. solanacearum*, agente causal de la enfermedad moko de plátano, con dos cepas de *Trichoderma* spp. y los filtrados al 40,0% (Ceballos *et al.*, 2014).

Existe una tendencia al estudio de hongos endofíticos o microorganismos mutualistas en tejidos de la rizosfera y filosfera de las plantas, con capacidad para producir un grupo de sustancias que provocan resistencia contra patógenos de plantas, con énfasis en la estrecha interacción planta-antagonista-patógeno. Estos estudios se obtienen con el efecto de *Trichoderma* spp. aislado de plantas de plátano y banano (*Musa* spp.) en el control de *Rodopholus similis* (Cobb) Thorn (Meneses, 2003; Chaves, 2007) y en plátano como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra, con un alto porcentaje de colonización de especies de *Trichoderma* en el cormo, pseudotallo y en las hojas de las plantas (Arzate *et al.*, 2006; Carr, 2009).

En estudios realizados sobre la interacción *Trichoderma* –Cebolla (*Allium cepa* L.) - *Sclerotium rolfsii*, la aplicación del antagonista favorece la producción en los bulbos de cebolla, de las enzimas ascorbato peroxidasa, catalasa y fenilalanina amonio – liasa, al provocar cambios en el metabolismo del agente patógeno y a la vez, estimula en los órganos de la planta (bulbos), la producción de compuestos con marcado efecto antifúngico como flavonoides y fenoles (Peñaloza, 2014). Este fenómeno descrito anteriormente, pudiera favorecer las reducciones de la intensidad de ataque de los hongos fitopatógenos del arroz estudiados en

condiciones semicontroladas, aspectos que deben ser profundizados en futuras investigaciones.

4.4. Eficacia de *Trichoderma harzianum* (cepa A-34) sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en condiciones de campo

La aplicación del antagonista en campo en el control de la enfermedad mancha parda, no manifiesta diferencias significativas entre las cuatro variantes evaluadas, al incrementar los niveles de eficiencia en el bioproducto a medida que aumentan sus concentraciones, en porcentajes que oscilan entre 84,6% y 87,2%. Además, se logra con el fungicida Azoxistrobina un 95,2% de reducción de las afectaciones, resultado que se corresponde con los alcanzados en el experimento semicontrolado, aunque este indicador es superior en campo (Figura 19).

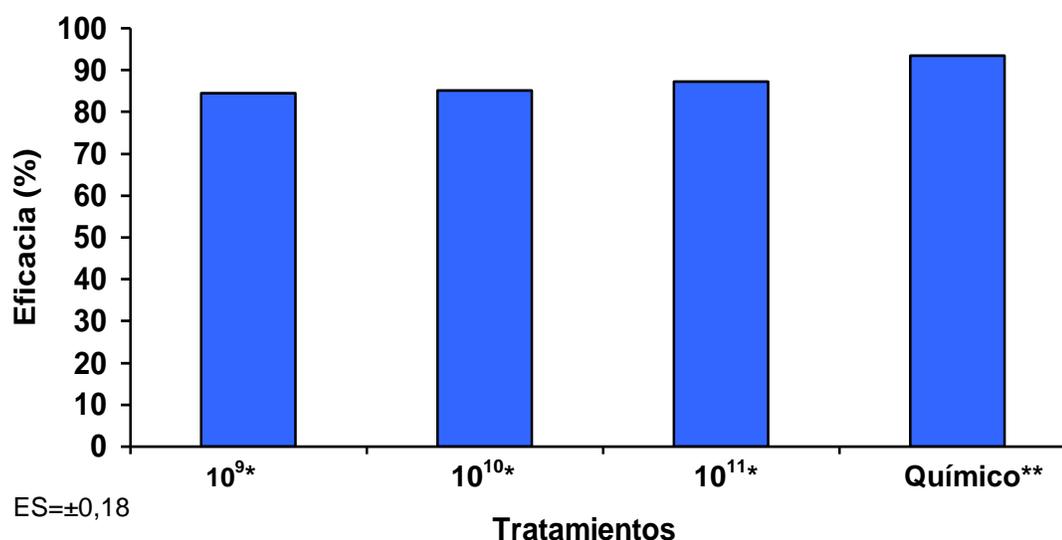


Figura 19. Eficacia de *T. harzianum* en el control de la mancha parda del arroz (*B. oryzae*) en campo

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

**Químico: Azoxistrobina

Datos procesados según la Prueba de Tukey ($p < 0,05$)

En la enfermedad pudrición de la vaina del arroz, se alcanza los valores más elevados de eficacia en el tratamiento Azoxistrobina (94,6%), al mostrar diferencias significativas con las variantes de *T. harzianum* (cepa A-34). Entre los tratamientos donde se aplica el antagonista, solo existe significación estadística entre 10^9 y 10^{11} con eficacias de 77,6% y 81,4%, respectivamente; el nivel intermedio de 10^{10} alcanza un control del 78,9%. Estos valores se encuentran en el rango obtenido por esta enfermedad en los experimentos en condiciones semicontroladas (Figura 20).

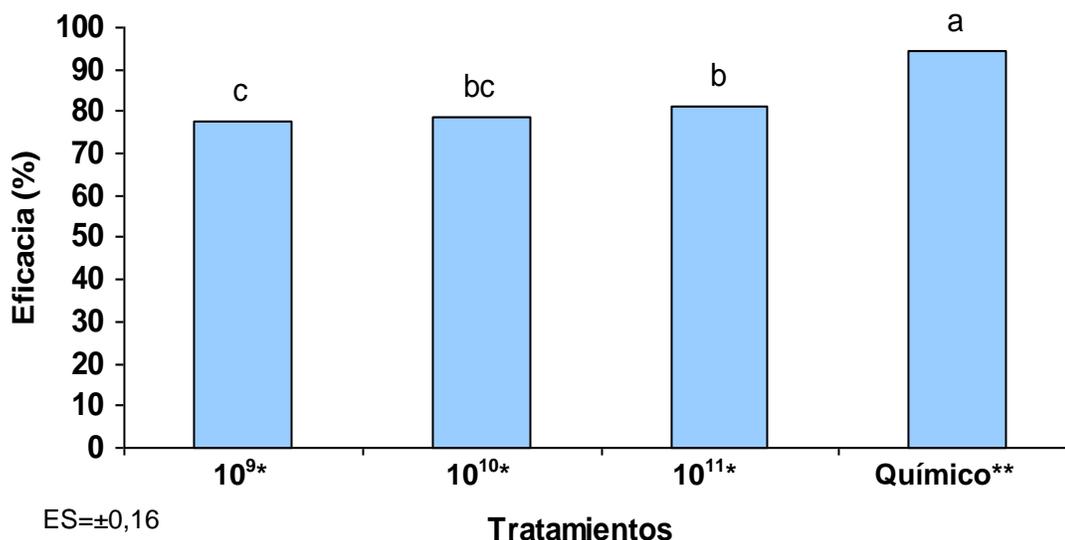


Figura 20. Eficacia de *T. harzianum* en el control de la pudrición de la vaina del arroz (*S. oryzae*) en campo

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

**Químico. Azoxistrobina

Letras diferentes sobre las barras difieren significativamente por la Prueba de Tukey ($p < 0,05$)

En el estudio en campo del tizón del arroz, se alcanzan eficacias por encima del 83,0% para todos los tratamientos donde se aplican suspensiones conidiales del antagonista sin diferencias significativas entre estos; con porcentajes de control que se consideran altos para este tipo de bioproducto en estas condiciones.

El fungicida Azoxystrobina obtiene un 93,8% con significación estadística sobre las variantes donde se aplica el agente de biocontrol (Figura 21).

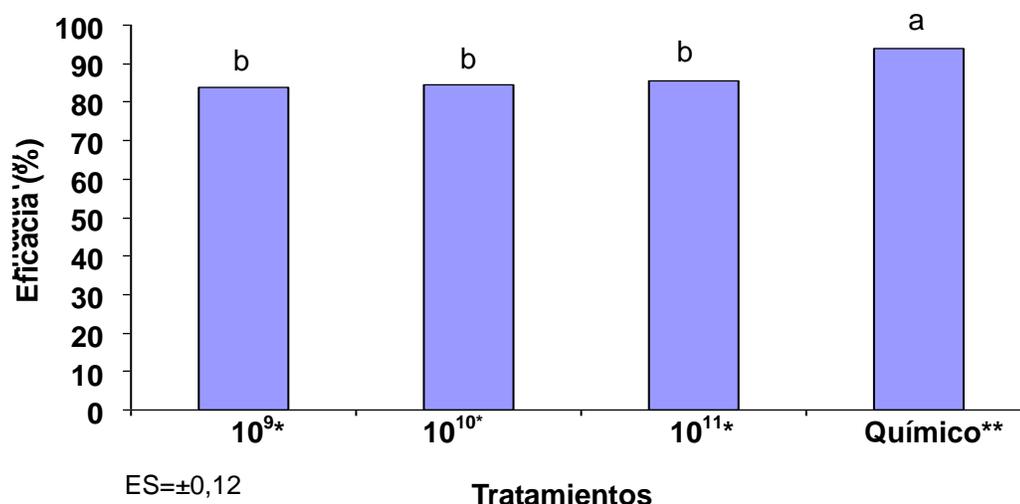


Figura 21. Eficacia de *T. harzianum* en el control del tizón del arroz (*P. grisea*) en campo

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

**Químico. Azoxistrobina

Letras diferentes sobre las barras difieren significativamente por la Prueba de Tukey ($p < 0,05$)

El comportamiento de los tratamientos en las condiciones de campo para el control de cada enfermedad, es similar al obtenido en experimentos semicontrolados. Resultados que corroboran estudios realizados con la aplicación de fungicidas entre los que se encuentra Azoxistrobina, para reducir las afectaciones provocadas por los hongos fitopatógenos del arroz estudiados en esta tesis (Pérez *et al.*, 2009a).

La temperatura media y humedad relativa media durante el desarrollo del experimento se comporta en los rangos de 26,0 – 27,2°C y 78% – 84%, respectivamente (Anexo 5). Estas condiciones climáticas favorecen la infección por los agentes causales de las enfermedades en estudio, lo que coincide con lo publicado en la literatura científica.

En Cuba no existen estudios de la eficacia de *T. harzianum* (cepa A-34) en el control de hongos fitopatógenos foliares del arroz en campo; estos se limitan a evaluar la capacidad antagónica en condiciones *in vitro* (Alarcón *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2006a; Martínez *et al.*, 2010). Por lo que su aplicación en el control de las enfermedades fúngicas provocadas por *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* es una alternativa a considerar para reducir las afectaciones de estas, con la disminución del uso de fungicidas en los agroecosistemas que se dedican al cultivo del arroz.

En experimentos en condiciones semicontroladas y de campo se constata que el fungicida Azoxistrobina obtiene los valores más altos de eficacia en el control de las enfermedades provocadas por *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* y la menor área bajo la curva. Sin embargo, al evaluar el rendimiento agrícola se aprecia significación estadística entre la concentración de 10^{11} y el resto de los tratamientos en las enfermedades mancha parda y pudrición de la vaina del arroz. Con relación al tizón del arroz, no existen diferencias significativas entre la concentración antes mencionada y 10^{10} . En todas las variantes donde se aplican alternativas de control de estos agentes patógenos, se muestran valores de rendimiento superiores al control absoluto (Tabla 25). Estos resultados pueden deberse a la capacidad que tiene *Trichoderma* de estimular el crecimiento en las plantas y de facilitar la absorción de elementos esenciales por los cultivos (Martínez *et al.*, 2013; Villarroel, 2014).

Tabla 25. Efecto de *T. harzianum* en el rendimiento de la variedad de arroz Perla de Cuba frente al ataque de tres hongos fitopatógenos

Tratamientos	Rendimiento agrícola (t ha ⁻¹)		
	<i>B. oryzae</i>	<i>S. oryzae</i>	<i>P. grisea</i>
10 ⁹ *	4,8 b	4,2 c	4,8 c
10 ¹⁰ *	5,2 b	4,8 bc	5,4 ab
10 ¹¹ *	6,0 a	5,7 a	5,9 a
Químico**	4,9 b	5,0 b	5,1 bc
Control absoluto	2,8 c	2,3 d	2,1 d
ES	± 0,19	± 0,23	± 0,42

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

**Químico. Azoxistrobina

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la Prueba de Tukey (p<0,05)

El comportamiento del rendimiento en la variedad Perla de Cuba fue ampliamente estudiado en la última década del siglo XX y en los primeros ocho años del presente siglo (Cárdenas *et al.*, 2005; Cristo *et al.*, 2006). La mayoría de estas investigaciones se basan en la comparación de variedades y líneas de arroz ante la resistencia a factores bióticos, entre los que se encuentran las enfermedades provocadas por *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* (Sandoval y Bonilla, 2001; Hernández *et al.*, 2009b; Cristo *et al.*, 2012); así como experimentos regionales para evaluar la interacción genotipo-ambiente (Almarales, 2011).

En la literatura científica consultada, solo existen antecedentes en el uso de la cepa T-78 de *T. asperellum* en el control del hongo del suelo *R. solani* en esta variedad de arroz, con rendimientos entre 4,63 y 4,84 t ha⁻¹ (Reyes, 2011). Sin embargo, los resultados del presente trabajo no se pueden comparar con los de esta autora, debido a que se estudian tres patosistemas diferentes y el empleo de otra cepa y especie de *Trichoderma*.

4.5 Discusión general

El uso de alternativas en el control de hongos fitopatógenos foliares del arroz, que permitan reducir la carga contaminante de los fungicidas, cumple con las exigencias de la agricultura moderna. Entre estas opciones, el empleo de hongos antagonistas del género *Trichoderma*, solo se ha limitado en Cuba a su aplicación *in vitro* contra los agentes causales de las enfermedades foliares mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz (Alarcón *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2006a; Martínez *et al.*, 2013). En condiciones de campo, solo existen antecedentes de su uso en el control del hongo del suelo *R. solani* (Reyes, 2011).

En la investigación se evalúa la capacidad antagónica de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*, elementos que permiten definir si este antagonista ejerce un efecto controlador sobre estos hongos fitopatógenos.

Los microorganismos antagonistas producen metabolitos considerados compuestos importantes, entre los que se destacan algunos antibióticos y enzimas. Su producción guarda una estrecha relación con las condiciones de cultivo en las que estos se obtienen (Martínez *et al.*, 2008). Estas sustancias de naturaleza fúngica, han demostrado su utilidad en la fitoprotección de cultivos, debido a su efecto directo sobre los hongos fitopatógenos, como al indirecto sobre la planta. Su eficacia se debe a que pueden inhibir el desarrollo de estructuras de infección y penetración del patógeno, o actuar como inductores de respuestas de defensa en el hospedante, con la protección en ambos casos a la planta, de los efectos deletéreos de los agentes patógenos (González *et al.*, 2008).

Basado en informes de la literatura científica referente a la acción de los metabolitos y a la manifestación de los mecanismos de competencia, micoparasitismo y antibiosis de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre estos hongos fitopatógenos del arroz en condiciones *in vitro*, se propone determinar las condiciones de cultivo para la obtención de filtrados con actividad antifúngica sobre los hongos patógenos foliares antes descritos.

Para estas condiciones, se estudia los factores tiempo de incubación, medio y condición de cultivo, pH y temperatura; a partir de los cuales se prueban diluciones de los filtrados, lo que permite obtener por primera vez en Cuba, las condiciones para la producción de sustancias bioactivas de *T. harzianum* (cepa A-34) con actividad inhibitoria del crecimiento micelial, esporulación e inhibición de la germinación conidial de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.

Con la obtención de resultados satisfactorios de estas alternativas de control biológico en condiciones *in vitro*, se evalúa la eficacia de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus metabolitos, así como el comportamiento de la variable epifitiológica Área Bajo la Curva de las Enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz, en condiciones semicontroladas. Lo que constituye el primer informe en Cuba de la aplicación *in vivo* de este antagonista y sus extractos fúngicos, con la obtención de eficacias superiores al 80,0% en el control de estos agentes patógenos.

El control de estas enfermedades bajo las condiciones antes mencionadas, confirma la acción de los filtrados de cultivo en la inhibición de las estructuras infectivas (micelios y conidios) de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P.grisea*; al interrumpir su

ciclo biológico, reducir la carga infectiva y con ello el desarrollo de estas enfermedades en la planta de arroz.

Estos resultados sientan las bases para estudiar en campo, la eficacia de este agente de control biológico sobre las enfermedades anteriormente mencionadas, así como el efecto en el rendimiento del arroz de la interacción planta-antagonista-patógeno. En estos experimentos, se alcanza una eficacia superior al 80,0% y un incremento en más de 2,0 t ha⁻¹ del grano por la aplicación del biopreparado. Lo que constituye el primer registro en el país del control de estas enfermedades con el empleo del antagonista *T. harzianum* (cepa A-34) bajo estas condiciones experimentales.

En la figura 22 se muestra un esquema que puede servir como base para el control de estos agentes patógenos del arroz con el empleo del antagonista *T. harzianum* (cepa A-34).

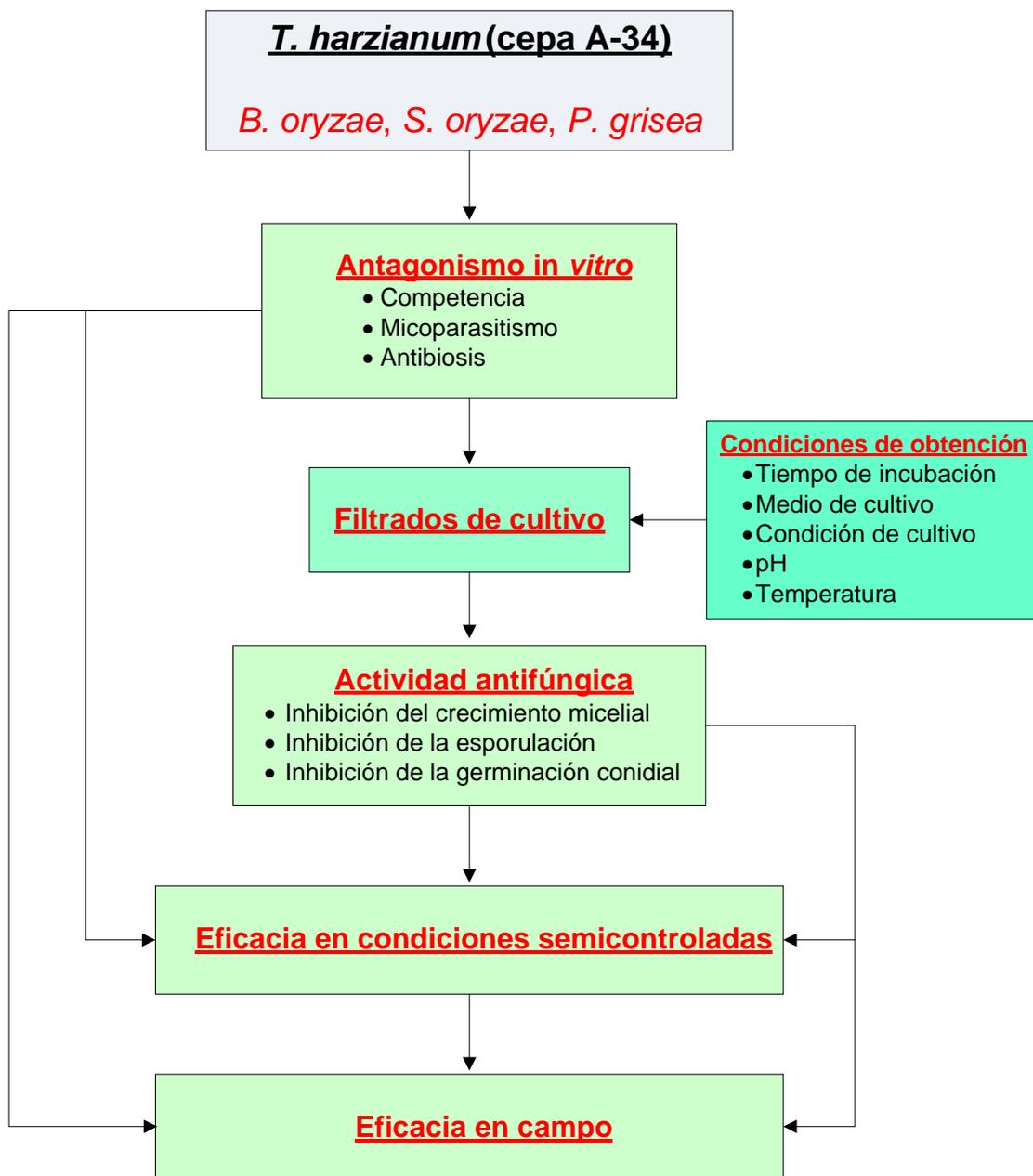


Figura 22. Esquema metodológico de la investigación para el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* con *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo

4. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. *T. harzianum* (cepa A-34) manifestó un efecto marcado de los mecanismos de acción de competencia, micoparasitismo y antibiosis sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.
2. Se determinaron las condiciones de cultivo para la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) con actividad antifúngica sobre *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.
3. Los filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) mostraron los mayores valores de inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial a los 20 días de incubación, en el medio de cultivo Czapek, bajo cultivo agitado, a la temperatura de 28°C y pH 5,5, con las diluciones de 75,0% y 100% (filtrado bruto) en los tres agentes patógenos estudiados.
4. La aplicación de *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados de cultivo redujo entre un 67,9% y 79,8% el Área Bajo la Curva del Progreso de las Enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz.
5. Se obtuvo en condiciones semicontroladas una eficacia entre 60,0% y 90,0% al aplicar *T. harzianum* (cepa A-34) y sus filtrados en el control de *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.
6. Se alcanzó una eficacia por encima del 80,0% en el control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz con rendimientos superiores en 2,0 t ha⁻¹ al aplicar bajo condiciones de campo el antagonista *T. harizanium* (cepa A-34).

5. RECOMENDACIONES

6. RECOMENDACIONES

1. Emplear en la obtención de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) con actividad antifúngica las condiciones de cultivo estudiadas en este trabajo.
2. Identificar y caracterizar los metabolitos de los filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) que ejercen un efecto antifúngico contra los agentes patógenos *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea*.
3. Profundizar en los mecanismos de acción que se establecen en la interacción *T. harzianum* (cepa A-34) – *O. sativa* – *B. oryzae*, *S. oryzae* y *P. grisea* en condiciones *in vivo*.
4. Evaluar el uso de filtrados de *T. harzianum* (cepa A-34) en el control de las enfermedades mancha parda, pudrición de la vaina y tizón del arroz en condiciones de campo.

*6. REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 264-267.
2. Acebo, Y. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas fluorescentes* con actividad antagónica ante *Pyricularia grisea*. Tesis en opción al título de Master en Ciencias. La Habana. Universidad de la Habana. Cuba. 79 p.
3. Alarcón, L.; Reyes, T.; Rodríguez, G.; Pupo, A. 2005. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) *Fitosanidad*. 9(3): 57-60.
4. Alfonso C. R. 2011. El arroz: un cereal imprescindible Entrevistado por Margarita Polo Viamontes. Infomed. La Habana. Cuba.
5. Almaguel, L.; Botta, E. 2005a. Curso de Postgrado de Acarología; Introducción a la Acarología Agrícola; resultados de Cuba y transferencia para la región de Latinoamérica y el Caribe. La Habana. Cuba.
6. Almaguel, L.; Botta, E. 2005b. Manejo Integrado de *Steneotarsonemus spinki* Smiley. Resultados de Cuba y transferencia para la región de Latinoamérica y el Caribe. Editor CEDISAV. La Habana. Cuba. 42 p.
7. Almaguel, L.; Riverón, A.; Sandoval, M. F.; Quirós, E. I.; Ginarte, A.; Vazquez, C. 2008. Aporte al conocimiento del ácaro *Steneotarsonemus spinki* plaga invasora del arroz En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.

8. Almaguer, M.; Rojas, T. I.; Batista, A.; Hernández, A. 2009. Detección de *Pyricularia grisea* Sacc en la atmósfera de un agroecosistema arrocero cubano. Fitosanidad. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología. División Caribe. 13(1).
9. Almaguer, M.; Rojas, T. I.; Dobal, V.; Batista, A.; Rives, N.; Jesús, M.; Hernández, A. N.; Hernández, A. 2012. Aerobiological dynamics of potentially pathogenic fungi in a rice agroecosystem in La Habana, Cuba. Aerobiología. 28(2): 177-183.
10. Almaguer, M.; Rojas, T. I.; Hernández, A. 2008. Perspectivas de los estudios aeromicológicos para la protección del cultivo del arroz. Revista de Protección Vegetal. 23(3): 137-143
11. Almarales, P. 2011. Perla de Cuba: Variedad de arroz con alto valor nutricional y calidad molinera. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
12. Álvarez, I. R. 2008. Identificación de razas fisiológicas del hongo *Pyricularia grisea* y efecto del uso de líneas isogénicas de arroz en su control. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
13. Alves M.; Garcês L.; Corsi M. C.; Abdallah A.; Carvalho V. 2011. Antagonismo *in vivo* de fungos do filoplano de plantas de arroz à *Magnaporthe oryzae*. Universidad Federal de Goiás, CEP 74001-970. Brasil.

14. Anacker, L.; Schafer, J.; Correa, B.; Benedeti, P. R.; Moura, A. 2010. Control biológico da mancha parda en arroz irrigado pelo uso de rizobactérias isolatas e combinadas. XIX CIC y XII ENPOS 41 MOSTRA CIENTÍFICA.
15. Antoniazzi, N. 2005. Desenvolvimento de cevada em resposta ao uso de elicitores para o controle de *Bipolaris sorokiniana*. Disertación presentada para la obtención del título de Maestro en Ciencias. Universidad Federal de Paraná. Curitiba. Brasil.
16. Archana, B.; Prakash, H. S. 2013. Survey of seed borne fungi associated with rice seeds in India. International Journal of Research in Applied Microbiology. 3(1): 25-29.
17. Arjona, I.; Ruano, D.; Vinale, F.; López, C. 2012. Efecto sobre *Rosellinia necatrix* de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* spp. XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Málaga. España. Del 17 al 21 de septiembre.
18. Arnao, E.; González, A.; Jayaro, Y.; Graterol, E.; Borges, O. 2008. Evaluación de la resistencia a *Pyricularia grisea* en algunas variedades de arroz en Venezuela. Fitopatología Venezolana. 21(1): 9-14.
19. Arshad, H. M. I.; Hussain, N.; Ali, S.; Khan, J. A.; Saleem, K.; Babar, M. M. 2013. Behavior of *Bipolaris oryzae* at different temperatures, culture media, fungicides and rice germoplasm for resistance. Pakistan Journal Phytopathology. 25(01): 84-90.
20. Arzate, J.; Michel, A. C.; Domínguez, V. M.; Santos, O. A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. Sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal

- de la Sigatoka Negra del plátano (*Musa sp.*) *in vitro* e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología. 24(002): 98-104.
21. Astorga, K.; Meneses, K.; Zúñiga, C.; Brenes, J.; Rivera, W. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha. 7(2): 82-91.
 22. Ávila, J.; Hernández, R.; Peña, L. R.; Suárez, I.; Jiménez, M.; Hernández, C.; Mirabal, L.; Alfonso, R. 2011. Evaluación de la diversidad genética en variedad de arroz de ciclo corto y medio en la región oriental de Cuba durante los años 2009-2010. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
 23. Bag, M. K.; Roychoudhury, U. K.; Adhikari, B. 2010. Evaluation of botanicals and biopesticides against sheath rot disease of rice. Journal of Crops and Weeds. 6(2): 82-83.
 24. Bahadur, K. 2015. Screening of rice varieties against Brown Leaf Spot disease at Jyotinagar, Chitwan, Nepal. International Journal Applied Sciences Biotechnology. 3(1): 56-60.
 25. Bannach, K. 2013. Extrato padronizado de *Ruta graveolens* L.: avaliação de seu potencial no controle da brusone em arroz. Disertación parcial como requisito para la obtención del título de Master en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Federal de Goiás. Goiânia. Brasil.
 26. Bayer S. A. 2008. *Bipolaris oryzae*. BayercropScience. Disponible en: <http://www.bayercropscience.com.pe/web/index.aspx?articulo=228> (Consultado 1-05-2012).

27. Bayer S. A. 2010. *Pyricularia grisea*. BayercropScience. Disponible en: <http://www.bayercropscience.com.ve/web/index.aspx?articulo=950>.
(Consultado 1-05-2012).
28. Bécquer, C. J.; Lazarovits, G.; Latin, I. 2013. Interacción *in vitro* entre *Trichoderma harzianum* y bacterias rizoféricas estimuladoras del crecimiento vegetal. Revista Cubana de Ciencias Agrícolas. 47(1): 18-25.
29. Bedendo, S. P. 1997. Doenças do arroz. En: Kitami, H.; Amorin, L.; Benjamín, A.; Camargo, I. E. A.; Rezende, J. E. A. Manual de fitopatología. Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. Departamento de Fitopatología, Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidad de São Paulo. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo-SP. 705 p.
30. Bell, K.; Wells, D.; Markham, R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72: 379-382.
31. Bernardi, J.; de Almeida, A. A.; Vilas, E.; Goncalvez, F. A.; Onofre, R. 2013. Actividad enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos aislados de soja. Perspectivas online Ciências Biológicas e da Saúde. 9(3): 1-15.
32. Boletín de Vigilancia Fitosanitaria. 2011. Infección por hongos amenaza el arroz en el Valle del Tila (Nepal). Alerta Fitosanitaria. (49): 2 p. Disponible en: <http://www.promedmail.org>, consultada el 11 de noviembre de 2011.
33. Boletín de Vigilancia Fitosanitaria. 2012. El hongo *Magnaporthe oryzae* causa pérdidas a los agricultores en Pendang. Alerta Fitosanitaria. (53): 25 p. Disponible en: <http://www.promedmail.org>, consultada el 3 de enero de 2012.

34. Borrás, O. 1999. Empleo de fitotoxinas para la selección rápida de la resistencia a la fusariosis en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L.) Morrill). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Ciego de Ávila. Cuba. 96 p.
35. Bregaglio, S.; Donatelli, M.; Confalonieni, R. 2013. Fungal infections of rice, wheat, and grape in Europe in 2030-2050. *Agronomy for Sustainable Development*. 13(2): 38-46.
36. Cabrera, R. I.; Hernández, J. L.; Almaguel, L.; Ramos, M.; Sandoval, I.; Ginarte, A. 2010. Manejo integrado del ácaro *Steneotarsonemus spinki* y el hongo *Sarocladium oryzae* en el cultivo del arroz en Cuba. *Cuadernos de Fitopatología*. (105): 29-33.
37. Camacho, V. 2014. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Alternaria porri* y su efecto en la actividad enzimática de cebolla. Tesis en opción al título de Maester en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec. Morelos. México. 55 p.
38. Camarena, J. A. 2012. Efecto de la actividad metabólica de cepas de hongos antagonistas sobre *Alternaria alternata* (Fr.) Causante de la mancha parda en cítricos. Tesis en opción al título profesional de Biólogo, con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 60 p.
39. Cárdenas, R. M.; Fabrè, L.; Pérez, N.; Cristo, E; Polón, R.; Díaz, E.; Mirabal, M. C. 2009. Análisis y tendencia en la severidad de la Piriculariosis

- (*Pyricularia grisea* Sacc.) del arroz (*Oryza sativa* Lin.). Fitosanidad. 13(1): 63-64.
40. Cárdenas, R. M.; Hernández, J. J.; Fabr , L.; Suárez, J. C.; Pol n, R.; Díaz, E. C.; Mirabal, M. C. 2008a. Caracterización epidemiológica del área afectada por (*Pyricularia grisea* Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* Lin.) en el CAI Arroceros Los Palacios. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
41. Cárdenas, R. M.; Mesa, S.; Pol n, R.; Pérez, N.; Cristo, E.; Fabr , L.; Hernández, J. J. 2010. Relación entre la incidencia de Piriculariosis (*Pyricularia grisea* Sacc) del arroz (*Oryza sativa* Lin.) y diferentes variables climáticas en el Complejo Agroindustrial Arroceros Los Palacios. Cultivos Tropicales. 31(1): 14-18.
42. Cárdenas, R. M.; Pérez, N.; Cristo, E.; González, M. C. 2005. Evaluación del vaneos de los granos en genotipos de arroz (*Oryza sativa* Lin.) sembrados en camas de infección. Revista de Protección Vegetal. 20(3): 179-184.
43. Cárdenas, R. M.; Pérez, N.; Cristo, E.; González, M. C.; Morejón, R. 2008b. Comportamiento del vaneos de los granos de arroz en condiciones de camas de infección por *Pyricularia grisea* Sacc. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
44. Cardona, R.; González, M. S. 2008. Caracterización y patogenicidad de hongos del complejo *Helminthosporium* asociados al cultivo del arroz en Venezuela. Bioagro. 20(2): 141-145.

45. Cardoza, R.; Hermosa, M.; Vizcaíno, J.; Sans, L.; Monte, E.; Gutiérrez, S. 2005. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En *Microorganism for industrial enzymes and biocontrol*. Researchs Signpost. Kerala. India: 1-22.
46. Carissimi, M.; Schipani, M.; Germani, J. C.; Van Der Sand, S. T. 2009. Antifungal activity of *Bacillus* sp. E164 against *Bipolaris sorokiniana*. *BIOCIÊNCIAS*. 17(1): 48-58.
47. Carr, C. 2009. Aislamiento y selección de hongos antagonistas en plantaciones de banana (*Musa AAA*) para el combate biológico de la Sigatoka Negra. Tesis en opción al título de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía. Universidad de San Carlos. Costa Rica. 65 p.
48. Castejón, M. 2008. The effect of temperature and relative humidity on the airborne concentration of *Pyricularia oryzae* spores and the development of rice blast in southern Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6(1): 61-69.
49. Castro, M. del Pilar. 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 presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Villa Clara. Cuba. 100 p.
50. Catalá, M.; Tomás, N.; Marín, J. P.; Amacellas, J.; Reigada, S.; Martínez, M.; Torró, I.; Pla, E. 2011. Relación entre los hongos de la semilla de arroz y el

- establecimiento de planta. PHYTOMA España. Arroz Transferencia Tecnológica. 234: 89-94.
51. Ceballos, G.; Álvarez, E.; Bolaños, M. M. 2014. Reducción de poblaciones de *Rastonia solanacearum* raza 2 (Smith) en plátano (*Musa* AAB Simmods) con la aplicación de extractos de *Trichoderma* sp. (Alexopoulus y Nims) y bacterias antagonistas. Acta Agronómica. 63(1): 80-87.
 52. Cercós, A. P. 1957. Los antibioticos y sus aplicaciones agropecuarias. Salvat. Ed. Barcelona. España. 475 p.
 53. Chaves, N. P. 2007. Uso de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Rodopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis en opción a título de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica. 78 p.
 54. CIBA-GEIGY. 1981. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. Werner Püntener. División Agricultura. CIBA-GEIGY S.A. Basilea. Suiza. 205 p.
 55. CMI. 1983. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey. Inglaterra. pp. 169-409.
 56. Correa, F. 1997. Principales enfermedades del arroz. p. 123-144. En: Pantoja, A.; Fischer, A.; Correa, F.; Sanit. L.; Ramírez. A. (Eds.) MIP en Arroz: manejo integrado de plagas; artrópodos, enfermedades y malezas. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Colombia.

57. Correa, F. 2007. Complejo Ácaro-Hongo-Bacteria del arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). http://www.ciat.cgiar.org/rice/web/esp/pdf/complejo_acaro_costa_rica.pdf.
58. Couch B. C.; Kohn L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*. 94: 683–693.
59. Cristo, E.; González, M. C.; Cárdenas, R. M.; Cabrera, A. 2006. Comportamiento de nuevos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) obtenidos mediante cultivo de anteras para condiciones de bajo suministro de agua. *Cultivos Tropicales*. 27(2): 57- 62.
60. Cristo, E.; Pérez, N. J.; Echevarría, A.; González, M. C.; Cárdenas, R. M.; Ventura, E. 2012. Efectos de bajos suministros de agua en el comportamiento agronómico e industrial de nuevos genotipos de arroz (*Oryza sativa*) obtenidos por diferentes métodos de mejora. *Cultivos Tropicales*. 33(1): 50-56.
61. Cruz, A.; Martínez, B.; Rivero, D. 2009b. Efecto de metabolitos y esporas del hongo *Sarocladium oryzae* Sawada sobre algunas poáceas. *Fitosanidad*. 13(3): 151-153.
62. Cruz, A.; Rivero, D. 2009. Efecto del OleoNim 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa* Lin.). *Fitosanidad*. 13(4): 7-12.

63. Cruz, A.; Rivero, D.; Martínez, B. 2009a. Bases para la selección de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) con diferentes grados de resistencia a *Sarocladium oryzae* (Sawada). *Fitosanidad*. 13(1): 73.
64. Cruz, A.; Rivero, D.; Martínez, B.; Ramírez, M. A.; Rodríguez, A. T. 2008. Metodología para la discriminación de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) con diferentes grados de resistencia a *Sarocladium oryzae* (Sawada). En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
65. Cruz, M.; Heredia, I. 2000. Efectividad de tratamientos químicos y biológicos en el control de hongos asociados a la semilla de arroz (*Oryza sativa* L.). *Centro Agrícola*. 27(1): 63-70.
66. Dallagnol, L. J.; Rodrigues, F. A.; DaMatta, F. M.; Mielli, M. V. B.; Pereira, S. C. 2011a. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice–*Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology*. 101(1): 92-104.
67. Dallagnol, L. J.; Rodrigues, F. A.; Martins, S. C. V.; Cavatte, P. C.; DaMatta, F. M. 2011b. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australian Plant Pathology*. 40(4): 360-365.
68. Daoubi, M.; Pinedo-Rivilla, C.; Rubio, M.; Hermosa, M.; Monte, E.; Aleu, J.; Collado, I. 2009. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. *Tetrahedron*. 65: 4834-4840.

69. Dean, R. A.; Talbot, N. J.; Ebbole, D. J.; Farman, M. L.; Mitchell, T. K.; Orbach, M. J.; Thon, M.; Kulkarni, R.; Xu, J.; Pan, H.; Read, N. D.; Lee, Y.; Carbone, I.; Brown, D.; Oh, Y. Y.; Donofrio, N.; Jeong, J. S.; Soanes, D. M.; Djonovic, S.; Kolomiets, E.; Rehemeyer, C.; Li, W.; Harding, M.; Kim, Soonok.; Lebrun, M. H.; Bohnert, H.; Coughlan, S.; Butler, J.; Calvo, S.; Ma, L.; Nicol, R.; Purcell, S.; Nusbaum, C.; Galagan, J. E.; Birren, B, W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*. 434(21): 980-986.
70. Deka, A. K.; Phookan, A. K. 1992. Some weed hosts of *Sarocladium oryzae* in Assam, India. *India*. 17(6): 25.
71. Derbalah, A. S.; El Kot, G. A.; Hamza, A. M. 2011. Control of mildew in okra using cultural filtrates of certain bio-agents alone and mixed with penconazole. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 44(20): 2012-2023.
72. Díaz, M. 2011. Incidencia de *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Villa Clara. Cuba. 96 p.
73. Domínguez, C. Y. 2013. Caracterización y evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. para el control de la pudrición basal de la lechuga causada por *Rhizoctonia* spp. en la zona agrícola de Timotes, estado Mérida. Universidad Central de Venezuela. Tesis presentada en opción al título de Master en Ciencias. 76 p.

74. Druzhinina I.; Kopchinskiy A.; Kubicek C. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*. 47: 55-64.
75. Druzhinina, I.S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera, A.; Horwitz, B. A.; Kenerley, C. M.; Monte, E.; Mukherjee, P. K.; Zeilinger, S.; Grigoriev, I. V.; Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews*. 9: 749-759.
76. Dumas, M.T.; Strunz, G.M.; Boyonoski, N.W.; Finlay, H.J. 1996. *In vitro* interactions between *Cylindrocladium floridanum* and species of *Trichoderma*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18: 325-329.
77. Elham, K.; Sadravi, M.; Naeimi, S.; Khosravi, V. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal Microbiology*. 43(1): 104-112. Consultado en enero de 2013 y disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000100035>.
78. El-Hassan, S. A.; Gowen, S. R.; Pembroke, B. 2013. Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascular wilt disease: Efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. *Journal of Plant Protection Research*. 53(1):12-26.
79. Ellis, M. B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew.
80. Ezziyyani, M.; Pérez, C.; Ahmed, A. S.; Requena, M. E.; Candela, M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*. 26: 35-45.

81. FAO. 2012. Problemas y limitaciones de la producción de arroz. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y2778S/y2778s04.htm>\Shabana M.Y.
82. FAS-USDA 2011. Comportamiento de las exportaciones de países relevantes Enero /Diciembre. Miles de toneladas."Contrisa comercializador de Trigo S.A.Santiago-Chile.
83. Felipe, M.; Gutiérrez, I. R.; Atahuichi, E.; Daniel, V. I.; Santana, Y.; Casola, C. 2005. Organismos patógenos en especies de arvenses de cuatro cultivares de cítricos en la provincia de Ciego de Ávila. *Fitosanidad*. 9(3): 53-56.
84. Fernández-Larrea, O. 2001 Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*. 62: 96-100.
85. FRAC. 2006. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. Disponible en: <http://www.frac.info>
86. Francis, J. K. 1993. *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl. Common bamboo. SO-ITF-SM-65. New Orleans. LA: U.S. Department of Agriculture and Forest Service. Southern Forest Experiment Station. 6 p.
87. Franco, F.; Zavateła, E. 2011. Estado actual del conocimiento del modo de acción de las toxinas no selectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19(002): 237-244.
88. Gajre, N. K.; Chauhan, H. L.; Patel, K. B.; Prajapati, V. P. 2013. Assessment of weight loss, seed germination and association of pathogenic fungi with discoloured rice seed. *Madras Agricultural Journal*. 100(1/3): 179-182.
89. Gamboa, J. A. 2006. Determinación preliminar de plantas hospedantes de *Steneotarsonemus pinki* en zonas arroceras de Costa Rica. Tesis en opción

- al título académico de Master en Agricultura Ecológica. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). Costa Rica. 79 pp.
90. Gangopadhyay, S.; Padmanabhan, S. Y. 1987. Breeding for disease resistance in rice. Oxford and IHB Publishing Co. Calcutta: 340 p.
 91. García, A.; Hernández, J.; Almaguel, L.; Sandoval, I.; Botta, E.; Arteaga, I. 2008. Influencia del ácaro *Steneotarsonemus spinki* (Acari: *Tarsonemidae*) y del hongo *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams&Hawks sobre el vaneado y manchado de los granos de arroz. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
 92. Gómez, D. E.; Reis, E. M. 2011. Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Revista Química Viva*. 10(1): 6-17.
 93. Gómez, E. S. 2011. Evaluación en el cultivo del arroz de diferentes marcos de plantación en hilera empleando el trasplante manual. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
 94. González, I.; Infante, D.; Martínez, B.; Arias, Y.; González, N.; Miranda, I.; Perteira, B. 2012. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. *Biotechnología Aplicada*. 29(1): 12-15.
 95. González, I.; Infante, D.; Perteira, B.; Martínez, B.; Arias, Y.; González, N.; Miranda, I. 2011. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Revista de Protección Vegetal*. 26(1): 13-17.

96. González, M.; Castellanos, L.; Ramos, M.; Pérez, G. 2008. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. contra patógenos en semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz. Centro Agrícola. 35(1): 11-15.
97. Guédez, C.; Cañizalez L.; Castillo C.; Olivar R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de *Fragaria* spp. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 29(1): 44-49.
98. Guédez C.; Cañizalez L.; Castillo C.; 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(3): 44-49
99. Guilcapi, E. D. 2009. Efecto de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, en la producción de plantas de café (*Coffea arábica*) variedad Caturra a nivel vivero. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Riobamba. Ecuador. 57 p.
100. Gutiérrez, S. A.; Cúndom, M. A.; Cabrera, M. G. 2010. Enfermedades foliares del cultivo de arroz. Conocimiento epidemiológico de las enfermedades parasitarias que afectan al cultivo de arroz en la provincia de Corrientes, Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Proyecto de Investigación A019-2010.
101. Gutiérrez, S. A.; Mazzanti, M. A.; Galmarini, M. R. 2000. Avances del conocimiento de hospedantes espontáneos de *Pyricularia grisea* en

- Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 38 p.
102. Guzmán, P. 1997. Principales enfermedades del arroz. p. 123-146. En: Pantoja, A.; Fischer, A.; Correa, F.; Sanit. L.; Ramírez. A. (Eds.) MIP en Arroz: manejo integrado de plagas; artrópodos, enfermedades y malezas. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Colombia.
103. Hamidreza, A.; Behboudi, K.; Ahmadzadeh, M.; Javan-Nikkiah, M.; Zamioudis, C.; Pieterse, C. M. J.; Bakker, P. A. H. M. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control*. 65: 14-23.
104. Harman, G. 2006. Description of mechanisms and applications of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190–194.
105. Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Review Microbiology*. 2: 43-56.
106. Hernández, A.; Pérez, J. M.; Bosch, D.; Rivero, L. 1999. Nueva Versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR. Ciudad de La Habana: 64.
107. Hernández, A.; Rives, N.; Acebo, Y.; Díaz, A.; Heydrich, M.; Divan, V. L. 2014. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.)

- en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista de Protección Vegetal. 29(1): 1-10.
108. Hernández, F. E.; Limia, J.; Moredo, A.; Aria, L. 2011. Uso de Prochloraz + Cloruro de Manganeso (Octave 50% PH) para la protección del manchado del grano. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
109. Hernández, F. E.; Pérez, Y.; Morell, A.; Hernández, G. 2009b. Alternativas de control fitosanitario de las principales enfermedades fungosas en nuevas líneas y variedades del cultivo del arroz. Unidad Científico Tecnológica de Base Ruta Invasora. Proyecto 0907012. PTCT del Arroz.
110. Hernández, J. J. 2006. Evaluación de cinco variedades de arroz frente al ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley, la pudrición de la vaina (*Sarocladium oryzae* Sawada) y el manchado del grano, en condiciones de producción en el CAI arrocero Los Palacios. Fitosanidad. 10(3): 59-60.
111. Hernández, O.; Herrera, R.; Castillo, H. 2009a. *Trichoderma* spp., una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. Ciencia Cierta (17). Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
112. Herrera, F. L. 1978. Resistencia varietal del arroz a *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan. Centro Agrícola. 5(2): 47-55.
113. Inagaki, Y. S.; Noutoshi, Y.; Fujita, K.; Imaoka, A.; Arase, S.; Toyoda, K.; Shiraishi, T.; Ichinose, Y. 2013. Infection-inhibition activity of avenacin saponins against the fungal pathogens *Blumeria graminis* f. sp. Hordei,

- Bipolaris oryzae*, and *Magnaporthe oryzae*. Journal of General Plant Pathology. 79(1): 69-73.
114. Index Fungorum. 2012. Species Index Fungorum - *Pyricularia grisea*. Consultado el 25 de abril de 2012.
115. Infante D.; Martínez B.; González M.; Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a los hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal. 24(1): 14 - 21.
116. Infoagro. 2012. La *Pyricularia oryzae* en el arroz. Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/pyricularia/oryzaedel%20arroz.htm>. [Consultado: 8 de febrero de 2012].
117. INIFAP. 2006. El Tizón Foliar (*Pyricularia grisea*) del Pasto Buffel en el norte de Tamaulipas. Folleto Técnico No. 38. Septiembre: 40 p.
118. International Rice Research Institute. 1996. *Standard Evaluation System for RICE; INGER* (Genetic Resources Center), (4th edition). [en línea]. Consultado el 9 de febrero de 2006. <http://www.fao.org./arroz.html>
119. Javaid, A.; Adrees, H. 2009. Parthenium management by cultural filtrates of phytopathogenic fungi. Natural Product Research. 23:1541-1551.
120. Javaid, A.; Ali, S. 2011. Alternative management of a problematic weed of wheat *Avena fatua* L. by metabolites of *Trichoderma*. Chilean Journal Agricultural Research. 7(2): 45-51.
121. Jayaro, Y.; Perdomo, M.; Graterol, E.; Lozada, C.; Peña, Z.; Noguera, P.; Mujica, Y.; Figueroa, J.; Cazzulani, A.; López, L.; Criollo, B. 2008. Selección

- participativa de variedades de arroz en Venezuela. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
122. Jo, Y. 2005. Management of dollar spot and gray leaf spot on turfgrass. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Filosofía en la Escuela de Graduados de la Universidad del Estado de Ohio. Estados Unidos de América. 130 p.
123. Kamal, M. M.; Mia, M. 2009. Diversity and pathogenicity of the rice brown spot pathogen, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem. in Bangladesh assessed by genetic fingerprint analysis. Bangladesh Journal of Botany. 38(2): 119-125.
124. Katsuya, K. 2004. Introducción a las enfermedades en las plantas. 42 pp.
125. Kobayashi, L.; Pellozo, A. 2011. Levantamento de fungos em sementes de trigo. Pesquisa Agropecuária Tropical. 41(4). 17-22.
126. Kunova, A.; Pizzatti, C.; Cortesi, P. 2013. Impact of Tricyclazole and Azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Pests Management Sciences. 69(2): 278-284.
127. Lanoiselet, V.; You, M. P.; Li, Y. P.; Wang, C. P.; Shivas, R. G.; Barbetti, M. J. 2012. First Report of *Sarocladium oryzae* Causing Sheath Rot on Rice (*Oryza sativa*) in Western Australia. Plant Disease of American Phytopathological Society Journal. 96(9): 1382.
128. Lerch, G. 1977. La experimentación Agrícola en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Editorial Científico-Técnica. La Habana. Cuba. 452 p.

129. Lone, M. A.; Wani, M. R.; Sheikh, S. A.; Sahay, S.; Suliman, M. 2012. Antagonistic potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2(8): 72-77.
130. López, R.; Ros, M.; Pascual, J. A. 2011. Mycoparasitism related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*. 56(1): 59-66.
131. Lorito, M.; Sheridan, L. W.; Harman, G. E.; Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma* from omics to the field. *Annual Review Phytopathology*. 48:395-417.
132. Lorito, M.; Woo, L.; Laccarino, M.; Scala, F. 2006. Microrganismi antagonisti. p. 146–175. En: Laccarino, M. (Ed.) *Microrganismi Benefici per le Piante*. Idelson-Gnocchi s.r.l. Napoli, Italia.
133. Magdama, F. A. 2010. Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma* sp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones *in vitro*. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politécnica de Loja. Ecuador. Consultado el 15 de octubre de 2012 y disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/11929>
134. Manamgoda, D. S.; Cai, L.; Bahkali, A. H.; Chukeatirote K.; Hyde, K. D. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*. 51(1): 3-42.

135. Manamgoda, D. S.; Cai, L.; McKenzie, E. H. C.; Crous, H.; Chukeatirote, E.; Shivas, R. G.; Tan, Y. P.; Hyde, K. D. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity*. 56(1): 131-144.
136. Manimegalai, V.; Ambikapathy V.; Panneerselvam, A. 2011. Antifungal potentiality of some medicinal plant extracts against *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan). *Asian Journal of Plant Science and Research*. 1(3): 77- 80.
137. Márquez, M. E.; Fernández-Larrea, O.; Jiménez, J.; Elósegui, O.; Gómez, R.; Cabrera, B.; Laguardia, E.; Monzón, S.; Ayala, J. L.; Masó, E.; Veitia, M.; Borges, G.; Baró, Y. 2010. Tecnología de producción artesanal sobre sustratos sólidos del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* (cepa A-34). En: Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del MINAGRI. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Cuba. p. 34-38.
138. Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. 28(1): 14 -18.
139. Martínez, B.; Obret, Y.; Pérez, S.; Reyes, Y. 2014. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth. *Revista de Protección Vegetal*. 29(2): 106-111.
140. Martínez, B.; Reyes, Y.; Infante, D.; González, E.; Baños, H.; Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas

- para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Revista de Protección Vegetal. 23(2): 118-125.
141. Martínez, B.; Reyes, Y.; Infante, D.; González, E ; Baños, H.; Obret, Y.; Cruz, A. 2010. Selección *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* para el control de hongos patógenos en arroz. Fitosanidad. 14(1): 51.
142. Martínez, B.; Solano, T. 1995. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martín) Jones y Grout. Revista de Protección Vegetal. 10: 221-225.
143. Martínez, C. P.; Borrero, J.; Carabalí, S. J.; Duque, M. C.; Correa, F.; Delgado, D.; Tohme, J. 2006. Incorporando genes valiosos de parientes silvestres al arroz cultivado. I Curso de capacitación en mejoramiento genético en arroz. Sancti Spíritus. Cuba. 6 p.
144. Martínez, E.; Barrios, G.; Rovesti, L.; Santos. R. 2007. Manual Práctico de Manejo Integrado de Plagas. Impresión Grup Bou. Tarragona. España: 44-46.
145. Mata, X. 2012. Metabolitos secundarios y enzimas secretadas por aislados nativos de hongos del género *Trichoderma* y efectos sobre el agente que causa la pudredumbre del corazón (*Phytophthora nicotianae* var parasitica) en el cultivo de Piña (*Ananas comosus*). Tesis en opción al título de Master en Biotecnología Agrícola. Alajuela. Costa Rica. 69 p.
146. Mena, J. 2004. Taxonomía del complejo *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* y *Exserohilum* en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Ecología y Sistemática. La Habana. Cuba.

147. Meneses, A. 2003. Uso de hongos endofíticos provenientes de plantas de banano orgánico para el contro biológico del nemátodo barrenador *Rodopholus similis* Cobb, Thorne. Tesis presentada en opción al título de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba. Costa Rica.
148. Meneses, R.; Gutiérrez, A.; García, A.; Antigua, G.; Gómez, J.; Correa, F.; Calvert, L.; Hernández, J. 2008. Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz. Quinta Edición. Instituto de Investigaciones del Arroz. Sancti Spiritus. Cuba. 63 pp.
149. Michel, A. C.; Otero, M. A.; Rebolledo, D.; Lezama, R.; Ochoa, M. E. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp. en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum in vitro*. Revista Chapingo. Serie horticultura. 11(002): 273-278.
150. MINAGRI. 1998. Informe sobre el vaneado de la panícula y la pudrición de la vaina del arroz producido por el complejo del ácaro *Steneotarsonemus spinki* y el hongo *Sarocladium oryzae* Sawada. Biblioteca Nacional Agropecuaria y Forestal (BINAFF-MINAGRI). Cuba. 26 p.
151. MINAGRI, 2005. Instructivo técnico del cultivo del arroz. Instituto de Investigaciones del Arroz. 113 p.
152. Montan, G. A.; Martins, F.; Cunha, J. M.; Silva, M. 2009. Doenças da espiga causam perda de rendimento em trigo nos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, em 2009. Comunicado Técnico online 255, Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento de Brasil. 10 p.

153. Moreira, W. R.; Rodrigues, F. A.; Duarte, H. S. S. 2013. Effect of Zinc on the development of Brown Spot in rice. *Journal of Phytopathology*. 10(11): 121-125.
154. Moreno, C. A.; Castillo, F.; González, A.; Bernal, D.; Jaimes, Y.; Chaparro, M.; González, C.; Rodríguez, F.; Restrepo, S.; Cotes, A. M. 2009. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74: 111-120.
155. Muhammad, F. A. R.; Muhamad, H.; Han, T. S. 2009. Yield loss study of brown spot disease in organic clay muck (OCM). *Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 15(1): 233-241.
156. Nalini, T.; Manickavasagam, S. 2011. Field incidence of rice mealy bug *Brevennia rehi* (Lindinger) (Hemiptera: *Pseudococcidae*) and its gregarious parasitoid *Rhopus nigroclavatus* (Ashmead) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Plant Archives*. 11(2): 809-8012.
157. Narayana, P.; Shibakumar, G. B.; Prasad, P. S.; Surarshan, G. K.; Sundaresha. 2011. Screening of rice genotypes for resistance against Sheath Rot of rice (*Sarocladium oryzae* Sawada). *Trends in Biosciences*. 4(1): 114-115
158. Neningen, L. H.; Hidalgo, E. I.; Barrios, L. M.; Pueyo, M. 2003. Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) en Cuba. *Fitosanidad*. 7(3): 7-11.

159. Norte A. 2006. *Trichoderma*. SpainBonsai. (1). Disponible en <http://www.Spainbonsai.com> [Consultado: 3 de julio de 2012].
160. Novo, R. 1983. Microbiología agrícola: Ejercicios prácticos. ISCAH, 92-95 p.
161. Núñez, L.; Pavone, D. 2014. Tratamiento biológico del cultivo de arroz en condiciones de vivero empleando el hongo *Trichoderma* spp. INTERCIENCIA. 39(3): 185-190.
162. ODEPA-USWHEAT. 2011. Precios FOB de los arroces relevantes para mercado nacional. Contrisa comercializador de Trigo S.A.Santiago-Chile.
163. Ojeda, A.; Subero, L. J. 2011. Un caso de saltación en *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoem. Resúmenes del XV Congreso Venezolano de Botánica. Universidad de Los Andes. Venezuela.
164. Ojeda, A.; Subero, L. J. 2012. El ojo de pájaro (*Bipolaris oryzae* Breda de Haan) en arroz (*Oryza sativa* L.): diagnóstico, epidemiología y control. Universidad Central de Venezuela. Research Gate. Disponible en: <http://www.researchgate.net/directory/publications/html>
165. ONEI. 2014. Anuario estadístico 2014. Rendimiento agrícola por cultivos seleccionados de la agricultura no cañera. República de Cuba. Disponible en: http://www.one.cu/aec2012/esp/20080618_tabla_cuadro.htm
166. Ordoñez, N. F. 2012. Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de *Vanilla planifolia* Jacks. Tesis en opción al título académico de Máster en Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Colombia. 85 p.

167. Ortuño, N.; Miranda, C.; Claros, M. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal of the Selva Andina Biosphere*. 1(1): 16-24.
168. Osorio, J. A.; Martínez, E. P.; Hío, J. C. 2012. Screening of microbial culture filtrates, plant extracts and fungicides for control of mango anthracnose. *Agronomía Colombiana*. 30(2): 222-229.
169. Ou, S. H. 1985. Rice diseases. 2a. ed. Commonwealth. Mycological Institute. Kew. Inglaterra. 380 p.
170. Oviedo, J. A.; Treminio, J. L. 2008. Evaluación agronómica de nueve líneas avanzadas de arroz (*Oryza sativa* L.) de riego, en el valle de Sabaco, Matagalpa. Trabajo de diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Generalista. Universidad Nacional Agraria. Managua. Nicaragua. 51 p.
171. Padrón, J. 2011. Mitigación del cambio climático para el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) con percepción y aviso del riesgo fitosanitario. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
172. Páez, O. 2006. Uso agrícola de *Trichoderma*. 2006. Disponible en: <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml> Consultado: 10 de enero de 2008.
173. Palacios, E. R.; Pauth, M. J. 2008. Evaluación avanzada de nueve líneas de arroz (*Oryza sativa* L.) con resistencia al manchado del grano, valle de

- Sébaco. Trabajo de diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Generalista. Universidad Nacional Agraria. Managua. Nicaragua. 32 p.
174. Peñaloza, S. 2014. Actividad de enzimas antioxidantes y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en la interacción Cebolla - *Trichoderma* spp. – *Sclerotium rolfsii*. Tesis en opción a título de Maestro en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Morelos. México. 69 p.
175. Pérez, L.; Batlle, A.; Chacón, J.; Montenegro, V. 2009b. Eficacia de *Trichoderma harzianum* A-34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá de los bananos en Cuba. Fitosanidad. 13(4): 27-34.
176. Pérez, L.; Cordero, V.; Fabret, L. 2009a. Eficacia de azoxistrobin y diferentes triazoles en el control en campo de las principales enfermedades fúngicas del arroz en Cuba. Centro Agrícola. 36(2): 15-23.
177. Pérez, Y. 2008. Comportamiento del ácaro *Steneotarsonemus spinki* y el hongo *Sarocladium oryzae* en diferentes momentos de siembra y variedades de arroz. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
178. Picco, A. M.; Rodolfi, M. 2002. *Pyricularia grisea* and *Bipolaris oryzae*: a preliminary study on the occurrence of airborne spores in a rice field. Aerobiologia. 18(2): 163-167.
179. Pieters, A. J.; Graterol, E.; Reyes, E.; Álvarez, R.; González, A. 2011. Cincuenta años de mejoramiento genético del arroz en Venezuela. ¿Qué se ha logrado? Interciencia. 36(12): 943-947.

180. Plodpai, P.; Petcharat, V.; Chuenchit, S.; Chaktong, S.; Joycharat, N.; Voravuthikunchai, S. P. 2013. *Desmos chinensis*: A new candidate as natural antifungicide to control rice diseases. *Industrial Crops and Products*. 42: 324-331.
181. Pontes, M. I. 2004. Giberela ou Brusone? Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. Embrapa Trigo. Ministerio de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Brasil. Documentos online 40. diciembre: 56 p. (Acceso el 25 de junio de 2011), disponible en: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40.htm
182. Poveda, D. C. 2006. Selección de Extractos Fúngicos Extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Tesis presentada en opción al título de Microbiólogo Industrial. Bogotá. Colombia. 96 p.
183. Prabhu, A. S.; Filippi, M. C.; Silva, G. B.; Silva-Lobo, V. L.; Morais, O. P. 2009. An unprecedented outbreak of Rice Blast on a newly released cultivar BRS Colosso in Brazil. En: Wang, GL and Valent, B. (eds.) *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast*. Springer Science, Netherlands: 257-267.
184. Prathuangwong, S.; Chuaboon, W.; Chatnaparat, T.; Klatsuwan, L.; Shoorin, M.; Kasem, S. 2012. Induction of diseases and drought resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* SP007s. *CMU. Journal Natural Sciences Special Issue on Agricultural and Natural Resources*. 11(1): 45-55.

185. Puño, R.; Terrazas, E.; Alvares, T.; Giménez, A.; Mendoza, L. H.; Loza, M. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de metabolitos de *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD sobre cepas nativas de *Phytophthora infestans in vitro*. Journal of the Selva Andina Research Society. 2(1): 26-33.
186. Rabelo, C. 2007. Fungos asociados as plantas hornamentais tropicais no Distrito Federal. Tesis en opción al Grado de Maestro en Fitopatología. Universidad de Brasilia. Brasilia. Brasil. 90 p.
187. Ramírez, M. A.; Rodríguez, A. T.; Cárdenas, R. M.; Cruz, A.; Rivero, D.; Remegio, M.; Ipsan, N. 2008. Evaluación de alternativas ecológicas a los tratamientos químicos de protección de semillas de arroz contra plagas y enfermedades. En: IV Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
188. Ramos, M.; Rodríguez, H.; Chico R. 1998. *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: *Tarsonemidae*). Nuevo informe para Cuba en el cultivo del arroz. Revista de Protección Vegetal. 13(1): 25-28.
189. Rangel, A.; Salgado, K.; Saucedo, E.; Márraga, L. 2010. Control Biológico: Una forma efectiva y ecológica para el combate de plagas. INTERCIENCIA. 43(3): 147-156.
190. Revathy, N.; Sethuraman, K.; Muthamilan, M: 2009. Screening of rice cultivars against sheath rot pathogen usin tissue culture technique. Journal of Ecobiology. 25(2): 147-151.

191. Reyes, J.; Pineda, J.; Sanabria, M. E. 2007. Efectividad de filtrados de hongos presentes en frutos de maíz (*Zea mays* L.) sobre *Fusarium moniliforme*. Agroecología. 2: 7-12.
192. Reyes, J.; Pineda, J.; Sanabria, M. E.; Gil, E. 2006b. Efectividad *in vitro* de filtrados de hongos aislados de frutos de maíz contra *Aspergillus flavus*. VII Congreso SEAE Zaragoza. España: 180-185.
193. Reyes, T.; Rodríguez, G.; Pupo, D.; Alarcón, L.; Limonta, Y. 2006a. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Fitosanidad. 10(2):136-140.
194. Reyes, Y. 2011. Aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios para el control biológico de tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn) en arroz. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Mayabeque. Cuba. 94 p.
195. Rifai, A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycology Paper. 116: 1-56.
196. Rincón, A. A.; Leguizamón, J.; Arbeláez, G. 1992. Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Trichoderma* spp. en semilleros de café. Revista Cenicafé. 43(3): 73-83.
197. Rivero, D. 2008a. Identificación y control *in vitro* con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). Resumen de tesis en opción al título académico de Máster en Sanidad Vegetal. Revista de Protección Vegetal. 23(1): 67.

198. Rivero, D.; Cruz, A.; Martínez, B.; Pérez, M. 2011. Hongos asociados al manchado del grano en la variedad de arroz (*Oryza sativa* L) INCA LP-5. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
199. Rivero D.; Cruz, A.; Martínez B.; Ramírez M. Á.; Rodríguez, A. T. 2009. Actividad antifúngica *in vitro* de la quitosana Sigma frente a hongos fitopatógenos causantes del manchado del grano en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Fitosanidad 13(2): 101-107.
200. Rivero, D.; Cruz, A.; Martínez, B.; Ramírez; M. A.; Rodríguez, A. T. 2010. Empleo de *Trichoderma* spp. y Quitosana en el control *in vitro* de hongos patógenos de granos de arroz. Resúmenes del II Taller Latinoamericano de Biocontrol de Fitopatógenos. Fitosanidad. 14(1): 51.
201. Rivero, D.; Cruz, A.; Martínez, B.; Rodríguez, A. T.; Ramírez; M. A. 2008b. Actividad antifúngica *in vitro* de las quitosanas k1 y SIGMA frente a *Bipolaris oryzae* (B. de Haan) Shoem. Revista de Protección Vegetal. 23(1): 49-55.
202. Rivero, D.; Cruz, A.; Rodríguez, A. T.; Echeverría A.; Martínez, B. 2012. Hongos asociados al manchado del grano en la variedad de arroz INCA LP-5 (*Oryza sativa* L.) en Cuba. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 32: 132-138.
203. Riverón, A.; Almaguel, L.; Ginarte, A. 2008. Estudio *in vitro* de sobrevivencia del ácaro *Steneotarsonemus spinki*, sobre las poáceas más importantes asociadas al arroz. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.

204. Rodrigues, G.; Fontana, A. C.; Ignacio, M.; de Castro, M. D.; Rodrigues, M.; de Souza, R. W. 2012. Diversidade de *Magnaporthe grisea* em arroz de terras altas no sul do Estado do Tocantins, na safra 2008/09. Revista Ceres. 59(1): 36-43.
205. Rodríguez, A. T.; Ramírez, M. A.; Cárdenas, R. M.; Falcón, A.; Bautista, S. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología. 24(1): 1-7.
206. Rodríguez, R.; Garcia, J.; Valle J. 2010. Comportamiento del rendimiento en seis materiales de arroz de ciclo corto frente a las enfermedades fungosas. Revista Infociencia. 14 (1): 18-30.
207. Rojas, A.; Escalona, C. N.; González, M.; Cárdenas, R. M.; González, M. C.; Pérez, N.; Díaz, S. H.; Hernández, R.; Peña, L.; Ávila, C.; Torres, J. C.; Cruz, J.; Mang, T. L.; Aleman, L.; Páez, Y.; González, J. 2011. Evaluación agronómica de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) en la provincia de Holguín. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
208. Rojas, V.; Ulacio, D.; Jiménez, M. A.; Perdomo, W.; Pardo, A. 2010. Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk. y la pudrición blanca en ajo. Bioagro. 22(3): 185-192.
209. Ruiz, A. 2011. Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* – *Sclerotium rolfsii*. Tesis on opción al

- grado de Master en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Morelos. México. 86 p.
210. Safari, M. R.; Anvari, M. 2010. Genetic variation in a population of *Bipolaris oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran. African Journal of Biotechnology. 9(36): 5800-5804.
211. Samaniego, G.; Ulloa, S.; Herrera, S. 1989. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. Revista Mexicana de Fitopatología. 8: 86-95.
212. Samuels, G. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology. 96(2):195-206.
213. Sandoval, I.; Bonilla, T. 2001. Comportamiento de la pudrición de la vaina del arroz por *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams y Haswks en variedades de La Habana y Pinar del Río. Fitosanidad 5(1): 3-5.
214. Sandoval, I.; Bonilla, T.; López, M. O.; Estrada, G. 2008. Avances en el estudio de la pudrición de la vaina del arroz por *Sarocladium oryzae* en el cultivo del arroz. En: IV Encuentro Internacional del Arroz. Ciudad de La Habana. Cuba. Del 3 al 5 de junio.
215. Sandoval, I.; Bonilla, T.; López, M. O.; Estrada, G.; Wong, W. 2002. Aspectos bioecológicos de *Sarocladium oryzae* en el cultivo del arroz en Cuba. Revista de Protección Vegetal. 17(3): 169-170
216. Sandoval, I.; López, M. O.; Bonilla, T.; Tomás, Y. 1999. Primer registro en Cuba de la pudrición de la vaina del arroz por *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw. Fitosanidad.3(4): 7-11

217. Santamarina, M. P.; Roselló, J.; Sempere F. E. 2005. Conocer a *Pyricularia oryzae* Cavara. En: 27 Jornadas de Productos Fitosanitarios. Barcelona. España. (172): 108 -112. consultada el 23 de junio de 2012. Disponible en: <http://www.inia.es>
218. Seiiti, A.; Ferreira, S.; Galbieri, R. 2007. Eficiência da disseminação aérea em *Pyricularia grisea*. Summa Phytopathology. 33(3): 275-279.
219. Shabana, M. Y.; Abdel-Fattah, M. G.; Ismail E. A.; Rashad, M. Y. 2008. Controle da macha-parda do arroz (*Bipolaris oryzae*) pelo emprego de antioxidantes fenólicos. Brazilian Journal of Microbiology 39(3): 43-51.
220. Shaner, E.; Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow- mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67: 1051-1056.
221. Shanmugan, V.; Sriram, S.; Babu, S.; Nandakumar, R.; Raguchander, T.; Balasubramanian, P.; Samiyappan, R. 2001. Purification and characterization of an extracellular alpha glucosidase protein from *Trichoderma viride* which degrades a phytotoxin associated with sheath blight disease in rice. Journal Applied Microbiology. 90: 320-329.
222. Shoemaker, R. A. 1962. *Drechslera*. Canadian Journal Botany. 40: 809-836.
223. Shores, M.; Harman, G. E.; Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology. 48: 21–43.
224. Silva, V. L.; Côrtes, M. V.; Silva, L. P.; Filippi; M. C.; Prabhu, A. S. 2011. Inhibition of *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani* by *Sarocladium*

- oryzae*, the causal agent of sheath rot in rice. En: APS-IPPC Joint Meeting. Honolulu. Hawaii. Del 6-10 de agosto.
225. Silveira R. 2011. Identificação, caracterização molecular e avaliação da expressão do gene de uma proteína elicitora de defesa de *Trichoderma* spp. Tesis presentada en opción al título de Master en Biología, mención Biología Celular y Molecular. Goiânia. Brasil. 94 p.
226. Simbaqueba, J. E. 2011. Mapeo de genes involucrados en inducción de resistencia sistémica y promoción del crecimiento por *Trichoderma koningiopsis* (Th003) en tomate. Tesis en opción al título de Magister en Biología Aplicada. Bogotá. Colombia. 98 p.
227. Singh, A.; Rohilla, R.; Singh, U.; Savary, S.; Willocquet, L.; Duveiller, E. 2002. An improved inoculation technique of sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Canadian Journal Plant Pathology. 24: 65-68.
228. Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Wallingford. UK: CAB International Mycological Institute. 261p.
229. Socorro, M.; Almaguel, L. 1997. Informe de la Misión Técnica sobre el cultivo del arroz a la República Popular China. MINAGRI.
230. Solares, A. M. 2007. Evaluación de dieciocho materiales genéticos de arroz (*Oryza sativa* L.), en la localidad de Boloczos, San Luis, Petén. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 132 p.

231. Species Fungorum. 2012. Bibliography of Systematic Mycology. (acceso el 2 de febrero de 2013) en: <http://www.speciesfungorum.org/BSM/bsm.asp>.
232. Stefanova, M.; Fernández, E. 1995. Principales patógenos del Suelo en las hortalizas y su control. En: Producción intensiva de hortalizas en los trópicos húmedos (R. Labrada, Ed.), 111-120. División de Producción y Protección Vegetal. FAO. Roma.
233. Stefanova, M.; Leiva, A.; Coronado, F.; Larrinaga, L. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp., para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 16: 509-516.
234. Stefanova, M. 2007a. Desarrollo, alcances y retos del biocontrol de fitopatógenos en Cuba. Summa Phytopathologica. 33:104 – 160.
235. Stefanova M. 2007b. Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Fitosanidad. 11(3): 75- 79.
236. Suárez, E.; Rodríguez, S.; Almarales, P.; Mesa, H.; Reinoso, J. 2011. Mejoramiento de la variedad de arroz IACuba - 36 mediante inducción de mutaciones. En: V Encuentro Internacional del Arroz y Primer Simposio de Granos. La Habana. Cuba. Del 7 al 10 de junio.
237. Szekeres, A.; Leitgeb, B.; Kredics, L.; Antal, Z.; Hatvani, L.; Manczinger, L.; Vagvolgyi, C. 2005. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A Review Acta Microbiology Immunology Hungary. 52: 137-168.
238. Talbot, N. J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. Annual Review Microbiology. 57: 177-202.

239. Terna, T. P.; Odebode, A. C.; Bemm, A. A. 2013. Growth suppression of some common post harvest rot fungi by cultures filtrates of a soil isolate of *Trichoderma viride*. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. 3(3): 90-96.
240. Torres, D. A; Alcántara, K. 2009. Caracterización de dos sistemas de siembra, trasplante manual y directa, con relación a la tasa de vaneamiento del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad ISA. República Dominicana. 51 p.
241. Vega, O. F. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 64: 96-100.
242. Villarroel, M. E. 2014. Evaluación del control biológico de *Fusarium* spp. mediante fusión de protoplastos de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* e inducción de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Tesis en opción al título de ingeniero en Biotecnología. Sangolquí, Ecuador. 84 p.
243. Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.; Marra, R.; Woo, S.; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil biology and biochemistry. 40: 1-10.
244. Vinod, K.; Awaneesh, C.; Ekhlaq, H.; Kamlesh, K. 2009. Efficacy of different insecticides against gundhi bug (*Leptocorisa acuta* Thumb.) in rice (*Oryza sativa*). Current Advances in Agricultural Sciences. 1(1): 58-59.
245. Viterbo, A. M.; Montero, O.; Ramot, D.; Friesem, E.; Monte, A.; Llobell, E.; Chet, I. 2002. Expression regulation of the endochitinase chit36 from

- Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics*. 42: 114–122.
246. Wang, X. 2000. Development of a specific and reliable molecular marker to detect *Stachybrotrys elegans*, a destructive mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Tesis en opción al título de Master en Ciencias. Montreal. Canada. 94p.
247. WASDE-USDA. 2011. Precios FOB de los Arroces Relevantes para Mercado Nacional. Contrisa comercializador de Trigo S.A.Santiago-Chile.
248. Woo, L.; Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for control. 107–130. En: Vurro, M.; Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Control Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press. Amsterdam. Netherlands.
249. Yamashita, O. M.; Kobayashi, L.; Cassetari, D.; Santi, A.; Peres, W. M.; Carvalho, M. A. C.; Kappes, C. 2010. *In vitro* effect of fungicides on mycelial growth of *Bipolaris maydis*. *Scientia Agraria Paranaensis*. 9(1): 37-44.
250. Zanão, L. A.; Fontes, R. L. F.; Ávila, V. T. 2010. Content of nutrients and silicon in leaf of rice plants infected by *Bipolaris oryzae*. *Scientia Agraria*. 11(1): 87-90.
251. Zeilinger, S.; Omann, M. 2007. *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Registry System Biological*. 1:227-234.
252. Zhang, H.; Tomoda, H.; Tabat, N.; Miura, H.; Namikoshi, M.; Yamaguchi, Y.; Masuma, R.; Omura, S. 2001. Cladospolide D, a new 12-membered

- macrolide antibiotic produced by *Cladosporium* sp. FT-0012. The Journal of Antibiotics. 54: 635-641.
253. Zhang J. Z.; Li, M. J. 2009. A new species of *Bipolaris* from the halophyte *Sesuvium portulacastrum* in Guangdong Province, China. Mycotaxon. 109(12): 289-300.
254. Zhang, N. 2012. *Magnaporthe* or *Pyricularia*? Fungal Genome Initiative at Rutgers University. (Acceso el 2 de mayo de 2012), disponible en: <http://magnaporthe.blogspot.com>

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo líquido utilizados en la obtención de filtrados de *Trichoderma harzianum* Rifai (cepa A-34)

Medio	Reactivos
Caldo de Papa Glucosado	Papa – 400 g
	Glucosa – 20 g
	Agua destilada estéril – 1000 mL
	Nitrato de sodio (NaNO_3) – 2,0 g
	Dihidrogeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) – 1,0 g
Czapek	Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,5 g
	Cloruro de potasio (KCl) – 0,5 g
	Sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0,02 g
	Sacarosa – 30 g
	Agua destilada estéril – 1000 mL
Richard	Nitrato de potasio (KNO_3) – 10 g
	Dihidrogeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) – 5,0 g
	Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 2,5 g
	Cloruro férrico (FeCl_3) – 0,02 g
	Sacarosa – 60 g
Fries	Agua destilada estéril – 1000 mL
	Tartrato de amonio (NH_4NO_3) – 5 g
	Nitrato de amonio (NH_4NO_3) – 1 g
	Dihidrogenofosfato heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0,5 g
	Cloruro de calcio (CaCl_2) – 0,5 g
Fries	Extracto de levadura – 1 g
	Sacarosa – 30 g
	Agua destilada estéril – 1000 mL

Anexo 2. Propiedades químicas de los suelos utilizados en la investigación

Indicadores	Vertientes	Santa Clara
Hernández <i>et al.</i> (1999)	Vertisol Pélico Gleyzoso	Pardo Sialítico
pH KCl	5,83	6,38
pH H ₂ O	6,47	7,08
MO %	2,67	2,32
P ₂ O ₅ (mg 100g ⁻¹)	22,16	35,70
K ₂ O (mg 100g ⁻¹)	25,77	22,60
CIC (cmol kg ⁻¹)	53,38	33,70

Anexo 3. Escala para la evaluación del Índice de infección de *Bipolaris oryzae* en hojas de arroz

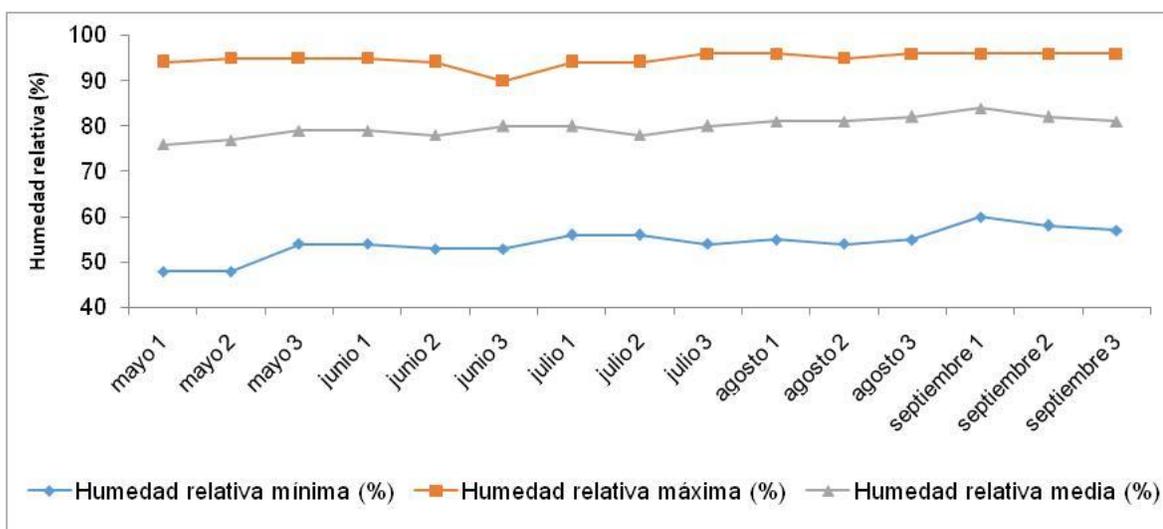
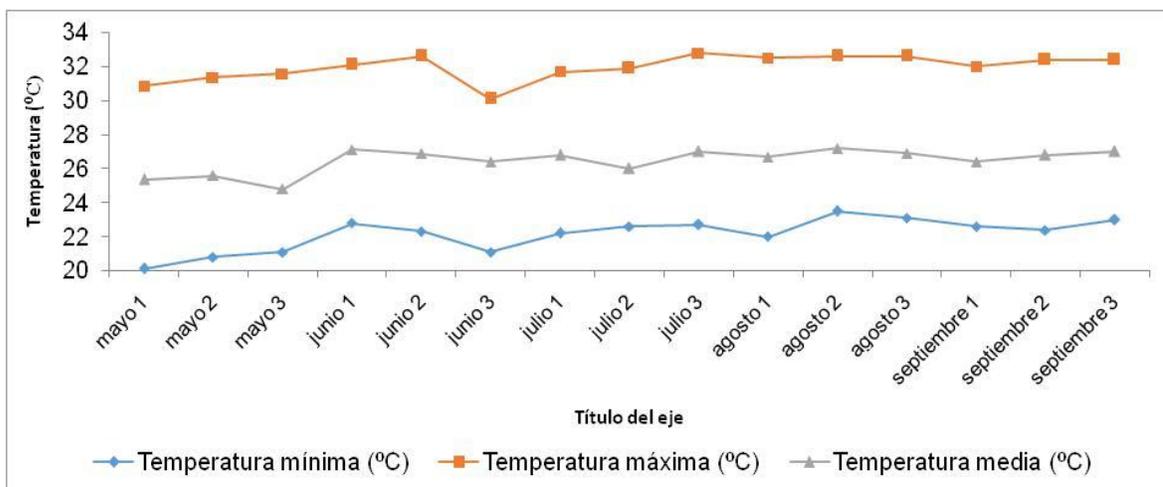
GRADO	ÁREA FOLIAR AFECTADA
0	Ninguna lesión visible
1	Menos del 1%
2	1% - 3%
3	4% - 5%
4	6% -10%
5	11% - 15%
6	16% - 25%
7	26% - 50%
8	51% - 75%
9	76% - 100%

Fuente: Sistema Estándar de Evaluaciones del Arroz del International Rice Research Institute (IRRI) (1996)

Anexo 4. Escala para la evaluación del Índice de infección de *Sarocladium oryzae* y *Pyricularia grisea* en hojas de arroz

GRADO	ÁREA FOLIAR AFECTADA (AFA)
0	Ninguna lesión visible
1	AFA menos del 1%
3	AFA 1% - 5%
5	AFA 6%-25%
7	AFA 26% - 50%
9	Más del 50% de AFA

Fuente: Sistema Estándar de Evaluaciones del Arroz del International Rice Research Institute (IRRI) (1996)



Anexo 5. Registro por decenas de temperatura y humedad relativa mínima, media y máxima de la región donde se condujo las investigaciones de campo