

## **CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Phytophthora cinnamomi* CON *Trichoderma* spp.**

Andrade-Hoyos, Petra<sup>1</sup>; Molina-Gayosso, Eduardo<sup>2</sup>; Isidro-Cortes, Judith<sup>3</sup>;  
Hernández Leal, Enrique<sup>4</sup>; Cortés-González, Yesenia Arlette<sup>4</sup>; Rivera-Sosa, Luis  
Martín<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Intercultural del Estado de Puebla, Correo-e: petra.andrade@uiep.edu.mx <sup>2</sup>Universidad Politécnica de Puebla, <sup>3</sup>Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, <sup>4</sup>Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla.

### **Resumen**

Se evaluó la capacidad antagónica de tres cepas de *Trichoderma* (*Trichoderma Viridae*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma* spp. Cepa C2) para el control de *Phytophthora cinnamomi* causante de la “tristeza del aguacate”. Se realizó un ensayo de antagonismo *in vitro* por triplicado para cada una de las cepas de *Trichoderma* y *P. cinnamomi*. Se realizó ANAVA con diseño experimental completamente al azar con el paquete estadístico SAS. *T. viridae* obtuvo un crecimiento radial de 0.438 mm en comparación a *P. cinnamomi* que obtuvo crecimiento de 0.119 mm. En cuanto a la capacidad antagónica dual entre *T. harzianum* y *P. cinnamomi* fue de 0.493 mm, en comparación con *P. cinnamomi* que creció 0.117 mm, obteniendo un crecimiento *in vitro* a las 8 h de 0.433 mm. Así mismo, tuvieron contacto ambos micelios a las 64 h. El mecanismo de acción que utilizó el antagonista *Trichoderma* fue por el sobrecrecimiento en el patógeno; por último la cepa C2 de *Trichoderma* tuvo ventaja para la colonización en la competencia por espacio.

**Palabras clave adicionales:** antagonista, oomiceto, cultivo dual, aguacate.

## **BIOLOGICAL CONTROL IN VITRO OF *Phytophthora cinnamomi* WITH *Trichoderma* ssp.**

### **Abstract**

The antagonistic capacity of three strains of *Trichoderma* (*Trichoderma viridae*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma* spp. C2 strain) for the control of *Phytophthora cinnamomi* which causes avocado root rot was evaluated. *In vitro* antagonistic test for each of the strains of *Trichoderma* vs. *P. cinnamomi* was performed. A completely randomized experimental design with the SAS computer program was used. *T. viridae* had a radial growth of 0.438 mm compared to 0.119 mm in *P. cinnamomi*. As for the dual antagonistic capacity between *T. harzianum* and *P. cinnamomi* was 0.493 mm in comparison to *P. cinnamomi* that grew 0.117 mm and an *in vitro* growth of 0.433 mm after 8 h. Both mycelia had contact at 64 h. The mechanism of action used by the *Trichoderma* antagonist was by overgrowth on the pathogen; finally, the *Trichoderma* C2 strain had an advantage in colonization for space competition.

**Additional keywords:** antagonist, oomycete, dual culture, avocado.

### **Introducción**

En México, una de las principales limitantes en la producción de aguacate es la pudrición de raíces producida por *P. cinnamomi*. En 1994, esta enfermedad causó la muerte de 100,000 árboles de aguacate ‘Hass’ en Uruapan, Michoacán, disminuyendo la producción con pérdidas

económicas para los productores por más de 32 millones de pesos (Vidales et al., 1999; Newett et al., 2002).

Debido a las grandes pérdidas de plantas o diseminación de la enfermedad en huertos de aguacate el control ha requerido la combinación de prácticas de manejo diseñadas para reducir su actividad e incrementar la tolerancia del hospedero durante los períodos críticos de infección. El manejo incluye la prevención, control químico y biológico y el uso de portainjertos resistentes (Coffey y Guillemet, 1987). Sin embargo, una de las prácticas amigables con el ambiente es el control biológico. El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por fitopatógenos fúngicos del suelo, principalmente contra *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*, por mencionar algunos. Los mecanismos para el desplazamiento de fitopatógenos inducidos por *Trichoderma* son de tres tipos: competición directa por el espacio y nutrientes (Elad y Baker 1985; Elad y Chet 1987; Chet y Ibar 1994; Belanger et al., 1995), producción de metabolitos antibióticos volátiles o no volátiles (Chet et al., 1997; Sid Ahmed et al., 2000; Sid-Ahmed et al., 2003) y parasitismo directo sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia et al., 1999; Ezziyyani et al., 2003). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de tres cepas de *Trichoderma spp.*, contra *Phytophthora cinnamomi*.

## **Materiales y Métodos**

### **Activación y siembra de antagonistas**

Como antagonistas se utilizaron aislamientos de *T. harzianum*, *T. viridae*, el aislamiento de *Trichoderma* sp. denominada Cepa (C2) fue aislada de suelo de un cultivo de alfalfa de la región del Valle del Mezquital, Hidalgo. Posteriormente, se activaron en diversas cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y para su preparación se añadió en un matraz 39 g de PDA aforado a 1000 mL de agua. Se esterilizó por 30 min en autoclave a 120 °C, se vertió el medio en cajas Petri en una cámara de flujo laminar; el medio de cultivo se dejó solidificar durante 5 min. La siembra de las diferentes especies ensayadas de *Trichoderma* se hizo en la cámara de flujo laminar tomando una porción con una aguja de disección estéril para aumentar su inóculo, con tres repeticiones, así mismo, se le agregó ácido láctico con la finalidad de inhibir el crecimiento de bacterias y otros hongos no necesarios para este estudio (Moreno, 1988). Posteriormente se incubaron a 25 °C para estimular su crecimiento.

### Activación del patógeno

El oomiceto *P. cinnamomi* fue donado por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La activación del patógeno *P. cinnamomi* se preparó en medio de cultivo PDA, enseguida se esterilizó el medio de cultivo en una autoclave a 120 °C por 30 m. Posteriormente, se llenaron las cajas Petri y se esperaron 5 m para que solidificara el medio. La siembra se realizó tomando, con una aguja de disección estéril una porción de micelio de *P. cinnamomi* de 3 mm de diámetro, se hicieron tres repeticiones; finalmente se incubó a 28 °C durante 120 h.

### Crecimiento radial de antagonistas

El crecimiento radial e individual del micelio de las tres cepas de *Trichoderma* fue en medio de cultivo PDA + ácido láctico, el crecimiento radial del micelio fue medido con un vernier (Figura 1).



Figura 1. Crecimiento radial de *Trichoderma* spp.

### Crecimiento radial de *P. cinnamomi*

El crecimiento radial del micelio de *P. cinnamomi* desarrolló en medio de cultivo sólido PDA + ácido láctico (Figura 2) donde creció como aislamiento puro durante 10 d. El crecimiento radial fue medido con un Vernier.



Figura 2. Crecimiento radial de *P. cinnamomi* en medio de cultivo PDA.

### **Evaluación del biocontrol antagonista de *Trichoderma Harzianum*, *Viridae* y *Trichoderma* sp. (C2), contra *Phytophthora. cinnamomi***

Para determinar la capacidad inhibidora y colonización de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sobre el patógeno *P. cinnamomi* se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* en el que se evaluó la capacidad antagonista mediante la técnica de cultivos duales, para esta técnica se colocó una rodaja de 3 mm en un extremo de la caja Petri (Bell et al., 1982) del antagonista y en el otro extremo al patógeno. Se mantuvo a 25 °C, y la medición se realizó desde la posición en la que estaba el patógeno y el antagonista, hacia el centro para medir su crecimiento radial individual hasta el enfrentamiento (Figuras 8 A, B y C). Se tomaron lecturas cada ocho horas para determinar el crecimiento hasta el primer contacto entre las hifas de ambos hongos (patógenos y antagonistas), para observar si *Trichoderma* sp. tiene capacidad antagonista para invadir a *P. cinnamomi*.

Para evaluar cómo influye cada uno de los tres aislamientos de *Trichoderma* sobre el crecimiento del aislamiento de *P. cinnamomi* se midió su crecimiento radial en una placa de Petri con PDA. Las mediciones se realizaron cada 8 h, durante 112 h, con tres repeticiones por tratamiento.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El ensayo de antagonismo *in vitro* se realizó por triplicado para cada uno de los tratamientos con un diseño experimental completamente al azar, para el análisis de varianza y comparación de medias se utilizó el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2001).

### **Resultados y Discusión**

El género *Trichoderma* presenta un crecimiento rápido y por resultante permite cubrir en totalidad la superficie de la caja Petri con PDA a los 5 d, así mismo mencionan que el tipo de especie influye en el crecimiento y la velocidad. En la evaluación realizada se encontró que la cepa de *Trichoderma viridae* presentó un crecimiento radial de mayor velocidad para cubrir en un área de 0.43 mm. Por otro lado, las cepas de *Trichoderma* sp. (C2) y *Trichoderma harzianum* presentaron similar comportamiento de crecimiento radial de 0.363 y 0.322 mm (Cuadro 1; Figura 3). Por último, el comportamiento del crecimiento radial de *P. cinnamomi* presentó el valor más bajo ya que cubrió menor superficie de crecimiento micelial, resultado que se atribuye al medio de cultivo PDA, que no aportó los nutrientes necesarios para su crecimiento *in vitro*. (Erwin, 1996), menciona que el medio de cultivo apropiado para el

desarrollo de oomicetes es en un medio ácido, ya que el intervalo permisible de pH para el cultivo *in vitro* de los oomicetes oscila entre 3.5 y 10, con un crecimiento óptimo específico entre 4.5 a 5.5 para la mayoría de las especies.

Cuadro1. Crecimiento radial *in vitro* de *Trichoderma* y *P. cinnamomi*.

Antagonistas	Crecimiento radial
<i>Trichoderma Viridae</i>	0.438 a <sup>z</sup>
<i>Trichoderma sp (C2)</i>	0.363 b
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.322 b
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	0.119 c

<sup>z</sup>Comparación de medias Tukey, diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

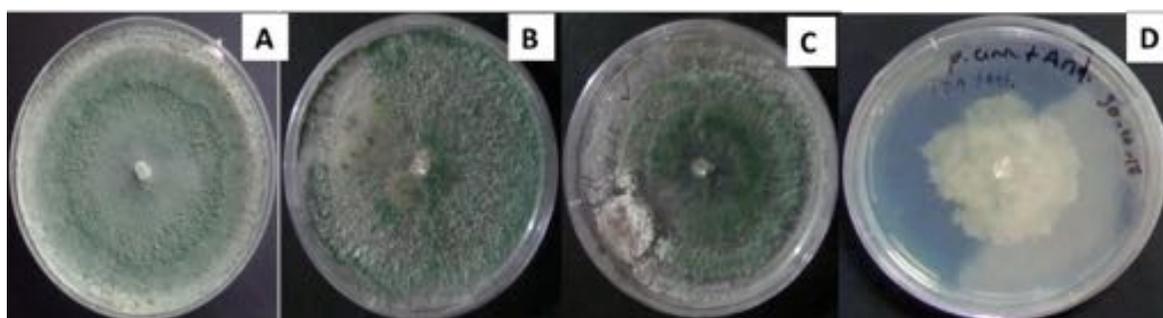


Figura 3. Crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma*. A) *Trichoderma viridae* B) *Trichoderma* sp. C2 C) *Trichoderma harzianum* y D) *P. cinnamomi*.

### Evaluación del antagonista o capacidad de biocontrol

Se ha demostrado que *Trichoderma* es un antagonista prescindible en el biocontrol de enfermedades causantes por muchos fitopatógenos que se encuentran en el suelo. La capacidad antagónica de estos microorganismos con frecuencia inhibe el crecimiento y desarrollo de patógenos que afectan a muchos cultivos de importancia económica (Widham et al., 1986; Chang et al., 1986; Chet, 1987; Baker, 1990).

De acuerdo a Dennis y Webster (1971), las confrontaciones duales de los aislamientos de *Trichoderma* son altamente competitivos para reducir el crecimiento y desarrollo del patógeno *P. cinnamomi*. Considerando que la colonización de *Trichoderma* se realiza por competencia de espacios y nutrientes, además de inhibir el crecimiento del micelio del *P. cinnamomi*, en el

biocontrol, se ha observado con frecuencia que *Trichoderma* es un excelente modelo para el control biológico de patógenos de la raíz, como el oomiceto *P. cinnamomi*.

La capacidad antagónica de *T. viridae* contra *P. cinnamomi* presentó resultados significativos ( $p \leq 0.05$ ). En el crecimiento dual, el micelio de *Trichoderma viridae* fue de 0.493 mm en comparación con *P. cinnamomi* (0.117 mm). Cabe mencionar que 8 h después de la siembra es la mejor hora de crecimiento *in vitro* del antagonista (0.433 mm) en comparación con *P. cinnamomi* que alcanzó 0.1 mm de crecimiento del micelio. En contacto de ambos micelios ocurrió a las 64 h. En la capacidad antagónica entre *Trichoderma sp. (C2)* y *P. cinnamomi* se obtuvo un crecimiento micelial de 0.412 mm por parte de la cepa de *Trichoderma sp. (C2)*, un crecimiento altamente significativo ( $p \leq 0.05$ ), en comparación con *P. cinnamomi* que tuvo un crecimiento micelial de 0.08 mm. Cabe mencionar que obtuvo un incremento del micelio significativo entre las 8 y 16 h con un crecimiento radial de 0.283 y 0.30 mm y un contacto entre micelios del antagonista con el patógeno a las 104 h.

En la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum*, Lanhsen et al. (2001), ha demostrado que *Trichoderma harzianum*, tiene un alta expresión antifúngica a *P. cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*. En la evaluación de la cepa de *Trichoderma harzianum* ante el antagonismo dual de *P. cinnamomi* se obtuvo un crecimiento micelial de 0.371 mm, comparado con el de *P. cinnamomi* (0.111 mm) presentando un contacto micelial a las 112 h.

Los resultados obtenidos de los tres aislamientos de *Trichoderma* concuerdan con los de Soler et al. (1998), quienes observaron efectos excelentes de antagonismo de *Trichoderma* contra *P. cinnamomi* y *Rosellina necatrix* en cultivos duales *in vitro*. Hakizimana et al. (2011) *Trichoderma harzianum* tiene alto potencial para inhibir altos niveles de inhibición *in vitro* como control biológico sobre *P. cinnamomi*. Cabe mencionar que en la evaluación de las pruebas de antagonismo de los aislamientos de *Trichoderma* se observó una invasión total de la colonia de *P. cinnamomi*. El mecanismo de acción que utiliza el antagonismo de *Trichoderma* es por el sobrecrecimiento y el carácter ventajoso para la colonización en la competencia por espacio y nutrientes (Dennis y Webster, 1971).

Cuadro 2 Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *P. cinnamomi* causante de la tristeza del aguacate.

	<i>Trichoderma viridae</i>	<i>Trichoderma C2</i>	<i>Trichoderma harzianun</i>
Antagonista	0.49333 <b>a</b>	0.41228 <b>a*</b>	0.37111 <b>a</b>
<i>P. cinnamomi</i>	0.11778 <b>b</b>	0.08947 <b>b</b>	0.11111 <b>b</b>

Comparación de medias Tukey, diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

## Conclusiones

La capacidad antagónica de las diferentes especies de *Trichoderma* evaluadas mostraron cierto biocontrol al reducir el desarrollo de *P. cinnamomi* en las pruebas *in vitro*. Se observaron mecanismos altamente competitivos por espacio y nutrientes; también, como agente eficaz de biocontrol mostró un rápido crecimiento y desarrollo. La mejor cepa fue *Trichoderma viridae* debido a su facilidad de crecimiento en corto tiempo y por mostrar un efecto antagónico en menor tiempo.

## Literatura Citada

- Alexopoulos C., Mims C. and Blackwell M 1996. Introductory Mycology. John Wiley & Sons Inc. USA.
- Baker, F. and J. Cook. 1982. Biological control of plant pathogens. S. Francisco: Freeman. 433 p.
- Elad. Y., Chet, I., Boyle. P. y 1983 Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73:85-88.
- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, pp. 562.
- Ezziyyani M. 2004. Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Hakizimana, J. D.; Gryzenhout, M.; Coutinho, T.A.; Van Den Berg, N., h. Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings VII World Avocado Congress, Cairns, Australia.
- Moreno M. E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados México. pp. 9-10.
- SAS (2003). Statistical Analysis System. SAS Institute Inc. SAS/STAT User guide version 9.1.3 Cary, North Carolina. USA. 1167p.
- Vidales-Fernández, J. A. y Morales, G. J. L. 1999. Guía para el cultivo del aguacate. Secretaría de Agricultura y recursos Hidráulicos (SARH)- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Guía técnica Núm. 5. 46 p.