

## **PRUEBAS DE ANTAGONISMO CON HONGOS ASOCIADOS AL SÍNTOMA DE MARCHITEZ DE ÁRBOLES DE AGUACATE EN MICHOACÁN, MÉXICO**

Espino-Cerda, Á.; Morales-García, J. L.; Pedraza-Santos, M. E.; Morales-Montelongo, K. L.

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez".  
Paseo Lázaro Cárdenas y Berlín S/N, Colonia Viveros, C.P. 60170, Uruapan, Michoacán. Correo-e:  
j.luciano58@hotmail.com

### **Resumen**

La "Tristeza del Aguacatero" es una enfermedad que representa un problema fitosanitario grave, ocasiona baja producción de fruta y en casos severos muerte total de árboles. En el estado de Michoacán ocasiona daños en plantaciones del 8 al 15%, afectando económicamente a productores. Se ha reportado que esta sintomatología es causada por un complejo de hongos que actúan sobre la raíz, causando la muerte de los árboles en algunos casos. Una manera de suprimir o controlar biológicamente los patógenos que causan enfermedades en las plantas es la utilización de microorganismos antagonistas. El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar los hongos patógenos asociados a la raíz de aguacate con síntomas de tristeza para realizar las pruebas de antagonismo y comprobar posibles hongos antagonistas. En PDA, se obtuvieron 26 cepas, de las cuales 10 se utilizaron para las pruebas de antagonismo: *Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*., *F. moniliforme*, *F. solani*., *F. sporotrichioides*., *Phytophthora cinnamomi*., *Cylindrocarpon* sp., *Verticillium* sp., *Melanospora* sp. y *Trichoderma* sp. Para las pruebas de antagonismo *in vitro* se realizaron mediciones con una regla registrando el diámetro de la colonia del micelio durante 14d para posteriormente realizar un análisis estadístico y evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR). Se concluye que las cepas con capacidad antagónica son: *Trichoderma* sp. y *Melanospora* sp.

**Palabras clave adicionales:** Patógeno, hongo, pudrición de raíz, antagonismo.

## **ANTAGONISM TESTS WITH FUNGI ASSOCIATED TO WILT SYMPTOM OF AVOCADO TREES IN MICHOACAN, MEXICO**

### **Abstract**

The "avocado tree wilt" it is a disease that represents a serious phytosanitary problem causing low fruit production and in more severe cases complete dead of tree. In the state of Michoacán is causing damage to plantations up to 8 to 15%, affecting the economy of farmers, the symptoms had been reported that are caused by a complex of fungus along the roots, causing dead of the tree in some cases. One biological way to control the pathogens that cause disease in plants is using antagonistic microorganisms. The objective of this investigation was to isolate and identify the pathogenic fungus associated to the roots of avocado with symptoms of sadness to do the test of antagonism and proof possible antagonist fungus. With PDA, were obtained 26 strains, which 10 were used for the antagonism test: *Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*., *F. moniliforme*, *F. solani*., *F. sporotrichioides*., *Phytophthora cinnamomi*., *Cylindrocarpon* sp., *Verticillium* sp., *Melanospora* sp. and *Trichoderma* sp. For the antagonism test *in vitro* measures with a ruler were needed saving the data of the diameter of the colony of mycelial for 14 days afterwards do a statistics test and evaluate the percentage of inhibition of radial growth (PIRG). In conclusion the strains with antagonism capacity are: *Trichoderma* sp. and *Melanospora* sp.

**Additional keywords:** Pathogenic, fungus, root rot, antagonism.

### **Introducción**

Los hongos fitopatógenos con origen en el suelo los encontramos ocasionando daño en todos los suelos de los ecosistemas y agroecosistemas del mundo. Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución (Cook y Baker, 1983). Una manera de suprimir o controlar biológicamente los patógenos que causan enfermedades en las plantas es la utilización de microorganismos antagonistas. El control biológico por estos consiste en la utilización de los mismos para disminuir o reducir el crecimiento o desarrollo de fitopatógenos favoreciendo de la misma manera el crecimiento de los antagonistas para la planta, que le permiten a ésta un mejor desarrollo y le brindan protección contra enfermedades y plagas (Ezziyani et al., 2006). Las pruebas de antagonismo permiten conocer e identificar que reacciones tienen estos hongos patógenos entre sí y reconocer con pruebas y métodos más precisos su biología (ciclo de vida, tipo de reproducción y sobrevivencia), además cuales pueden llegar a ser utilizados como hongos antagonistas para desarrollar estrategias que permitan controlar la enfermedad. Los antagonistas utilizados para el control de enfermedades son generalmente saprofitos, debido a su facilidad de adaptación al medio y su alta capacidad de manipulación. Entre estos se halla el género *Trichoderma*, que produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, las cuales son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de la espора hasta la esporulación, además esta reúne una serie de características en su interacción directa con el fitopatógeno que según (Harman, 2000, y Howell, 2006), hace de este organismo un buen agente antagonista de hongos fitopatógenos.

### **Materiales y Métodos**

El presente trabajo se llevó a cabo en una etapa de campo y otra de laboratorio. La primera etapa consistió en la colecta de las raíces de árboles enfermos con síntomas de tristeza de aguacate. La segunda consistió en el aislamiento e identificación de los microorganismos y la realización de pruebas de antagonismo en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La colecta de muestras de tejidos con síntomas de tristeza se llevó a cabo en la huerta "EL SALTO 2" ubicada en Matangarán (San José del Valle) localizado en el Municipio Uruapan, del estado de Michoacán de Ocampo México.

Se colectaron raíces de 75 árboles con los síntomas de tristeza, los cuales se marcaron para su ubicación. Las muestras se tomaron a una distancia de 50 cm del tronco del árbol realizando un bloque de 30 x 30 x 30 cm. las raíces presentaban un color café oscuro de aspecto quebradizo y se descortezaban fácilmente, cada una de las muestras fueron colocadas en bolsas de papel y fueron etiquetadas de acuerdo al orden de colecta, indicando la fecha y número de árbol. Las muestras se transportaron en bolsas de papel, fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología para su posterior procesamiento. El medio de cultivo utilizado para el aislamiento y purificación de los patógenos fue Papa-Dextrosa-Agar (PDA) sintético adicionado con 7 mL de ácido tartárico al 10% para evitar el crecimiento de bacterias, su almacenamiento fue a una temperatura de 4°C previo a su uso. Las raíces colectadas en campo fueron lavadas con jabón y agua corriente, se cortaron secciones de tejido de 2 a 3 mm, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 15 a 30 segundos con agitación permanente, se enjuagaron en agua destilada estéril tres veces para eliminar el exceso de desinfectantes, se secaron y se sembraron en medio de cultivo PDA, 5 secciones de tejido por caja Petri, posteriormente se sellaron los bordes con Kleen-Pack para evitar contaminaciones. Finalmente las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 24°C en la oscuridad, cada uno de los aislamientos fueron purificados 15d después en cajas Petri nuevas e incubadas de acuerdo a las condiciones ya mencionadas. Una vez purificado el material se realizó la identificación morfológica con ayuda de claves especializadas (Figura 1) (Nelson et al., 1983; Barnett y Hunter, 1998).



Figura 1. Identificación morfológica con ayuda de claves especializadas, para la identificación de los hongos aislados de raíces de árboles con síntomas de tristeza.

Para las pruebas de antagonismo se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones de otros patógenos, se removieron discos de agar de cultivos establecidos con los hongos de 7d de crecimiento, se colocó un disco con el del hongo en prueba en el centro de la caja Petri durante el tiempo necesario para que este iniciara su crecimiento micelial. Transcurrido este periodo de acondicionamiento, se sembró en los extremos de cada punto cardinal de la caja Petri cuatro discos de agar con diferentes hongos aislados, a una distancia de 5 cm aproximadamente entre ellos en tres combinaciones de hongos diferentes para cada uno de los 10 hongos en prueba seleccionados y se utilizó un testigo (Figura 2). Las pruebas se realizaron en confrontación 1:4 combinando las cepas al azar, con el fin de elegir aquellos que mostraran actividad antagónica. La evaluación de las pruebas se realizó por la competencia de nutrientes y espacio, la cual se obtuvo con los radios de crecimiento registrando el diámetro del micelio de la colonia de los hongos, las mediciones se hicieron cada 24 h durante 14d y segundo por el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) con la formula por Ezziyyani et al. (2004).  $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$ , donde R1 es el radio mayor (radio del patógeno testigo) R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

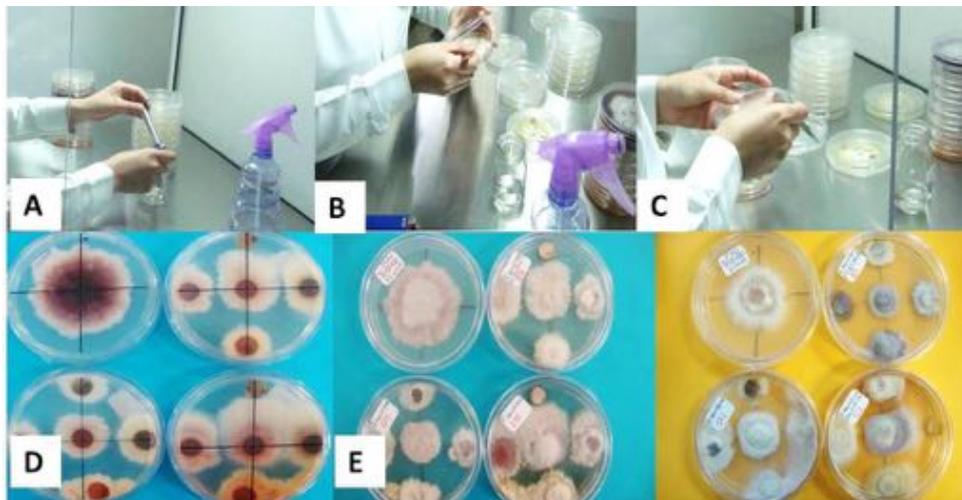


Figura 2. Pruebas de antagonismo A) Con un sacabocados se removieron discos del hongo en prueba. B) Con pinzas estériles se colocaron discos del hongo en prueba en el centro y en cada punto cardinal de la caja Petri diferentes cepas en confrontación 1:4. C) Cajas Petri selladas con Kleen-Pack e incubadas de acuerdo a las condiciones ya mencionadas. D) Cajas Petri marcadas con cada punto cardinal para ubicar a cada hongo puesto en prueba. E) Confrontación de cepas con sus respectivos testigos para posteriormente realizar las mediciones.

## Resultados y Discusión

De los aislamientos de los 75 árboles muestreados se obtuvieron 26 cepas de hongos. Seis presentaron las mismas características macroscópicas y microscópicas de algunas especies de *Fusarium* siendo el hongo que se aisló con mayor frecuencia representando el 60.6% de los aislamientos, encontrándose presente en la mayoría de los árboles seleccionados. Para la realización de las pruebas de antagonismo se seleccionaron 10 cepas incluyendo las seis especies de *Fusarium* sp. y las cuatro siguientes en frecuencia de aparición, dentro de los cuales se encuentran los siguientes: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichioides*, *F. sambucinum*, *Verticillium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Phytophthora cinnamomi*, *Melanospora* sp., *Trichoderma* sp. Con las 10 cepas seleccionadas en medio de cultivo, se obtuvieron tres confrontaciones diferentes para cada cepa. Se evaluó la competencia de nutrientes y espacio realizando un análisis estadístico y por el porcentaje de inhibición de crecimiento radial las mediciones se realizaron durante 14d cada 24 h (Figura 3).

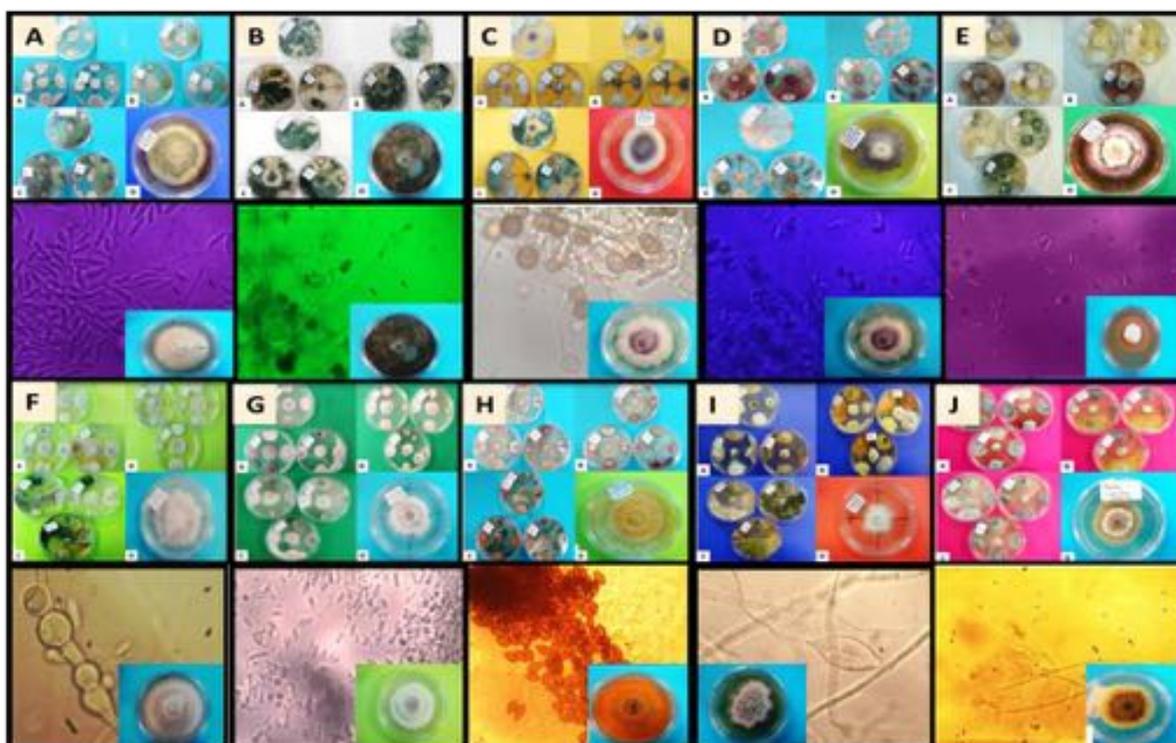


Figura 3. Pruebas de antagonismo, crecimiento micelial en medio de cultivo y Características microscópicas. A) *Cylindrocarpon* sp., B) *Trichoderma* sp., C) *Fusarium oxysporum*. D) *F. solani*. E) *F. sambucinum*. F) *F. sporotrichioides*. G) *F. moniliforme*. H) *Melanospora* sp., I) *Phytophthora cinnamomi*. J) *Verticillium* sp.

En los bioensayos se presentaron los siguientes resultados con las pruebas de antagonismo se comprobó que las cepas aisladas y en enfrentamiento mostraron capacidad antagónica: *Melanospora* sp. es considerado como saprófito de restos vegetales en el suelo o en semillas (Hanlin, 1990), pero también se asocia con varios hongos, sobre todo discomycetes a los que parasita (Kers, 1974) en este caso podría ser que compite por espacio y nutrientes inhibiendo el crecimiento de los demás hongos excepto *Trichoderma* sp. y *Verticillium* sp. Hasta el momento no hay reportes de estudios de bioensayos con este hongo por lo cual sería interesante realizar más bioensayos utilizando otros fitopatógenos de importancia agrícola. Las diferentes especies de *Trichoderma* se consideran por tener un rápido crecimiento micelial y una abundante producción de esporas que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo así mismo pueden producir enzimas extracelulares, antibióticos antifungicos, ser competidores contra hongos patógenos; promover el crecimiento en plantas e inducir resistencia (Zimand et al., 1996) además compiten muy bien por nutrientes, son micoparasitos muy activos y son competidoras muy eficientes de la rizosfera (Papavizas et al., 1985; Ahmad y Baker, 1987). En las confrontaciones con las diferentes cepas, los hongos evaluados que no presentaron capacidad antagónica son los siguientes: *Cylindrocarpon* sp., *P. cinnamomi*, *Verticillium* sp., *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. solani*, *F. sambucinum* y *F. moniliforme*, ya que muchos solo competieron por el espacio y nutrientes y considerados como fitopatógenos, además la importancia de los hongos fitopatógenos del suelo que atacan la raíz, no se limita sólo al daño que ocasionan en las plantas hospedantes, sino también debe considerarse el papel que juegan dentro de las cadenas tróficas y en las diversas relaciones que establecen con otros microorganismos del suelo (Agrios 1988 y Lumsden, 1981). Pocos son los trabajos que se han realizado bajo un enfoque ecológico, sobre la relación fitopatógenos-plantas hospedantes tanto en los sistemas naturales como en los agroecosistemas (Harper et al., 1990), a nivel de poblaciones o de comunidades, y que analicen los cambios en su dinámica temporal y espacial debido a las diferentes actividades de perturbación y manejo de los sistemas (Christensen, 1981). Entre las pruebas de antagonismo que mostraron resistencia en la colonización del antagonista *Trichoderma* sp. cabe destacar los siguientes: *F. moniliforme* que contó con un PICR de 24.6% ya que *Trichoderma* sp. no invadió su micelio completamente. Las cepas utilizadas en confrontación mostraron su capacidad de crecimiento en medio de cultivo *in vitro*, como resultado la mayoría compitieron por nutrientes y espacio porque su crecimiento puede variar en campo ya que intervienen varios factores tanto bióticos como abióticos para su crecimiento y reproducción.

## Conclusiones

Se obtuvieron 26 cepas de hongos asociados a la raíz de aguacate, utilizando 10 cepas en orden de frecuencia de aparición las cuales corresponden a *Fusarium oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *Verticillium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Melanospora* sp., *Phytophthora cinnamomi* y *Trichoderma* sp. La cepa con mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) en las pruebas de antagonismo fue *Trichoderma* sp. colonizó por completo el micelio de los hongos fitopatógenos en confrontación 1:4. La cepa de *Melanospora* sp. mostró resultados importantes ya que su crecimiento micelial fue muy rápido además logró invadir gran parte de la caja Petri inhibiendo el crecimiento de los fitopatógenos excepto *Trichoderma* sp. y *Verticillium* sp. De las cinco especies de cepas de *Fusarium* spp. utilizadas en las pruebas de antagonismo, *F. moniliforme* resultó ser más resistente a la colonización del hongo antagonista *Trichoderma* sp. La gran mayoría de las cepas seleccionadas compitieron por espacio y nutrientes en los bioensayos excepto *Trichoderma* sp. ya que su función como antagonista es fundamental.

## Literatura Citada

- Agrios, G.N. 1988, Plant Pathology. Thad Edition. Academic Press, New York, USA. 803 p.
- Ahmad, J.S., and R. Baker. 1987, Rhizosphera competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopatology 77: 182-189.
- Barnett L. H., and B.B. Hunter. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition. Macmillan. 218 p.
- Christensen, M. 1981. Species diversity and dominance in fungal communities. pp. 201-232. In: Wicklow, D. T., and G.C. Carroll (Eds.). The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. Mycology Series. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Cook, R.J., and K.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn., USA. 539 p.
- Ezziyyani, M., A. Sid Ahmed, C. Pérez-Sánchez, M.E. Requena, y M. E. Candela. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. Revista Horticultura 191:8-15.
- Hanlin RT.,1990. Illustrated genera of Ascomycete. Disponible en: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=36701&Fields=All> (Fecha de consulta mayo 2015).
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84:377–393.
- Harper, J.L. 1990. Pests, Pathogens and Plant Communities: An Introduction. pp 3-14. In: Burdon, J. J., and S. R. Leather (Eds.). Pests, Pathogens and Plant Communities. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Howell, C.R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathology 96(2):178-180.
- Kers, L. 1974. The Swedish Geopora and their Pyrenomycete infections. Svensk Botanisk Tidskrift 68:344-354.
- Lumsden, R.D. 1981. Ecology of Mycoparasitism. pp. 295 318. In: Wicklow, D. T., and G. C. Carroll (Eds.). The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. Mycology Series. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Nelson P. E., T.A. Toussoun, y W. Marasas 1983. *Fusarium* species an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London. 206 p.
- Papavizas, G.C.1985, *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23:23-54.

Zimand G., Y. Elad, and I. Chet. 1996 Effect of *Thricoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86(11):1255-1260.