

## ESTUDIO DE TEMPERATURAS DE CRECIMIENTO *IN VITRO* EN AISLADOS DE *TRICHODERMA* SP. Y DE *ROSELLINIA NECATRIX*. EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO MEDIANTE CULTIVOS DUALES

D. Ruano-Rosa, L. del Moral-Navarrete, C.J. López-Herrera

**Instituto de Agricultura Sostenible., C.S.I.C. Apdo 4084, 14080 Córdoba. España**

**Correo electrónico. [lherrera@cica.es](mailto:lherrera@cica.es)**

### RESUMEN

Se ha estudiado las temperaturas óptimas de crecimiento *in vitro* de 8 aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. y 57 aislados masales de *Rosellinia necatrix*, mediante siembra en placas con PDA e incubación en oscuridad a 15°C, 20°C, 25°C y 30 °C para *R. necatrix* y a 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C y 35°C, para los aislados de *Trichoderma*, obteniéndose 25°C, como temperatura óptima de crecimiento para los distintos aislados de los dos hongos ensayados.

Asimismo se han realizado cultivos duales entre los 8 aislados del antagonista y 13 aislados representativos del patógeno, enfrentando en placa Petri los distintos aislados de ambos hongos e incubándolos a la temperatura óptima de crecimiento obtenida anteriormente. Todos los aislados del antagonista, excepto el CH-252, limitan el crecimiento del patógeno, observándose poca variación en su efecto para cada aislado del antagonista sobre el patógeno.

**Palabras Clave:** Antagonismo, temperatura, *Trichoderma* sp., *Rosellinia necatrix*

### INTRODUCCIÓN

*Rosellinia necatrix* Prillieux (anamorfo *Dematophora necatrix* Hartig) es un hongo ascomiceto patógeno de suelo que produce la podredumbre blanca (PB) afectando alrededor de 170 especies en 63 géneros y 30 familias (Khan, 1959), entre las que destaca el aguacate. En el área de la costa Sur de España es una de las principales enfermedades que afecta a este cultivo (López-Herrera, 1989).

*Trichoderma* es un hongo comúnmente utilizado como agente de biocontrol, con el cual se han conseguido buenos resultados frente a algunos patógenos de suelo bajo condiciones experimentales (Cook and Baker, 1983). Según algunos autores, la eficacia del biocontrol realizado por *Trichoderma* está asociada con la producción de antibióticos no volátiles y otros mecanismos tales como el micoparasitismo (Prokkola, 1992), en el cual posee gran importancia la excreción por parte de *Trichoderma* de quitinasa y proteasas (García et al., 1994; Hayes et al., 1994).

Existe un gran número de factores biológicos y ambientales que dominan las interacciones entre el hongo patógeno y el antagonista, afectando al control biológico de la enfermedad. Uno de los factores ambientales de mayor importancia, en la interacción patógeno-antagonista, es la temperatura. La actividad antagonista de *Trichoderma* puede variar con la temperatura (Tronsmo y Dennis, 1978; Köhl y Schlöser, 1989). La síntesis y la actividad de los antibióticos producidos por *Trichoderma* (Howell, 1998) y la colonización de la rizosfera por algún *Trichoderma*, como es el caso de *T. hazianum* (Ahmad y Baker, 1987), se ve afectada por la temperatura. Podemos encontrar diferencias en la temperatura óptima de crecimiento de *Trichoderma* (Domsch et al., 1980), aunque a juzgar por múltiples estudios realizados en laboratorio ésta se encuentra principalmente en el rango de 25°C-30°C (Klein y Eveleigh, 1998).

Pero no solo el espectro de actividad térmica del antagonista es importante, sino que posee una gran importancia también el del patógeno. Es por ello por lo que en este trabajo se ha realizado un estudio básico de la temperatura óptima de crecimiento tanto del agente de biocontrol como del patógeno con el fin de seleccionar aislados antagonistas de *Trichoderma* sp. a *Rosellinia necatrix*, mediante cultivos duales a las temperaturas óptimas de crecimiento de ambos hongos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se ensayaron 57 aislados masales de *Rosellinia necatrix*, obtenidos de raíces de árboles de aguacate en plantaciones de la costa sur de España, prospectadas entre los años 1988 y 2001. Se ensayaron también 8 aislados monoconídicos de *Trichoderma*, procedentes del rizoplano de árboles de aguacate, en su mayoría árboles escape a la PB.

Los aislados de ambos hongos se repicaron en placas Petri de 9 cm de diámetro con PDA, utilizando discos de 6 mm de diámetro e incubándose 15°C, 20°C, 25°C y 30°C para *R. necatrix* (5 repeticiones por aislado) y a 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C y 35°C para *Trichoderma* (4 repeticiones por aislado). El periodo de incubación fue de 14 días como máximo para todos los aislados. Durante los ensayos se realizaron lecturas diarias del crecimiento lineal de las colonias y los resultados se expresaron como media de las repeticiones de cada tratamiento. Para comparar el efecto de las diferentes temperaturas sobre los diferentes aislados se obtuvo el Area Bajo la Curva del Progreso de Crecimiento Estandarizado (ABCPCE) (Campbell y Madden, 1990), para las diferentes temperaturas ensayadas, considerando un periodo de 4 y 14 días para los aislados del antagonista y patógeno respectivamente.

Una vez determinada la temperatura óptima de crecimiento de ambos hongos, se realizaron ensayos de cultivos duales entre los aislados de *Trichoderma* y 13 aislados representativos de *R. necatrix*. En los cultivos duales se sembraron placas de PDA con discos miceliares de 6 mm del patógeno y antagonista a una distancia de 5 cm uno de otro. Las placas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento determinada anteriormente y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (%ICR) de la colonia de *R. necatrix* en PDA mediante la fórmula de Royle y Rees (1978).

## RESULTADOS

El crecimiento lineal de los aislados del antagonista se refleja en la Tabla 1 y el rango de temperaturas óptimas de crecimiento y el ABCPCE en la Tabla 2. A los 4 días de la siembra el aislado CH-252 es el que tiene mayor capacidad de crecimiento *in vitro* a todas las temperaturas ensayadas, creciendo incluso perfectamente a 35°C y el aislado CH 316 el de menor capacidad. El rango de crecimiento óptimo en la mayoría de ellos oscila entre 20-30°C, excepto el CH-296 que tiene un crecimiento óptimo restringido a 20-25°C. El CH 316 es el que tiene menor capacidad de crecimiento a cualquier temperatura.

Los aislados de *R. necatrix* ensayados crecen bien entre 15 y 25°C con un óptimo de crecimiento a 25°C. A partir de 30°C el crecimiento decrece haciéndose nulo a 35°C (Tabla 3).

Los cultivos duales descritos anteriormente se realizaron a 25°C en oscuridad y los resultados de ICR se reflejan en la Tabla 4. Todos los aislados de *Trichoderma*, excepto el aislado CH-252, ejercen inhibición sobre casi todos los aislados de *R. necatrix* ensayados en algunos casos con %ICR del orden del 35%. Para algunos aislados del antagonista (CH-101 y CH-303) se observa una inhibición similar para los diferentes aislados del patógeno, dentro de cada aislado de *Trichoderma* estudiado.

## DISCUSIÓN

Los resultados del experimento indican que tanto *R. necatrix* como *Trichoderma* tienen la misma temperatura óptima de crecimiento, aspecto importante ya que en los estudios de biocontrol, el antagonista debe tener la misma temperatura óptima de crecimiento y actividad que el patógeno (Mukherjee y Raghu, 1997). Por tanto los estudios de antagonismo, mediante cultivos duales, realizados a esa temperatura han garantizando la máxima actividad por ambos hongos y han permitido una selección preliminar de los aislados del antagonista.

La similar acción que ejerce cada aislado de *Trichoderma* sobre los aislados de *R. necatrix* ensayados, denota que aquellos aislados monoconídicos seleccionados tienen un amplio espectro de acción sobre el patógeno aunque se estén ensayando aislados masales de éste que presentan una gran variabilidad dentro del mismo aislado.

Por tanto excepto el aislado CH-252, el resto de los aislados del antagonista serían susceptibles de ensayos posteriores, especialmente los aislados CH-101 y CH-303 que presentan unos aceptables ICR similares para todos los aislados del patógeno. Estos podrían considerarse en el estudio de control biológico de la enfermedad mediante inoculaciones artificiales en plantas adultas de aguacate para evaluar, su acción antagonista sobre el patógeno o determinar algún otro mecanismo de defensa de la planta a la infección por *R. necatrix*.

## BIBLIOGRAFÍA

CAMPBELL CL, MADEN LV 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. Jhon Wiley and Sons eds. Pag: 192-202.

COOK RJ, BAKER KF 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 539 pp.

GARCÍA I, LORA JM, CRUZ J, BENETEZ T, LLOBELL A, PINTOR-TORO JA 1994. Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Current Genetics 24: 83-89.

HAYES CK, KLEMSDAL S, LORITO M, DI PIETRO A, PETERBAUER C, NAKAS JP, TRONSMO A, HARMAN GE 1994. Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene* 138: 143-148.

HOWELL CR 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman GE and Kubicek CP (eds) *Trichoderma & Gliocladium* Volumen 2. Taylor & Francis Ltd, London, pp 173-184.

KHAN AH 1959. Biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* (hart.) Berll. *Biologia Lahore* 5:199-245.

KLEIN D, EVELEIGH DE 1998. Ecology of *Trichoderma*. In: Harman GE and Kubicek CP (eds) *Trichoderma & Gliocladium* Volumen 1. Taylor & Francis Ltd, London, pp 57-74.

LÓPEZ-HERRERA CJ 1989. Podredumbres radiculares del aguacate en la Costa del Sol. Años 1987-88. En *Estudios de Fitopatología* (J. del Moral, ed.): 172-176. SEF/DGIEA.

MUKHERJEE PK, RHAGU K 1997. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*. *Mycopathologia* 139: 151-155.

ROYSE R, REES SM. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology* 68: 603-607.

**Tabla 1.** Comparación de los diferentes aislados de *Trichoderma* sp. a las diferentes temperaturas ensayadas a los 4 días de la siembra

Aislado	Crecimiento lineal (mm)* ± DS					
	Temperatura					
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
CH 101	3.6±0.25e	8.5±0.00e	8.5±0.00b	8.5±0.00b	8.5±0.00e	1±0.09e
CH 252	2.9±0.19d	7.9±0.19d	8.5±0.00b	8.5±0.00b	8.5±0.00e	8.5±0.00e
CH 273	3.4±0.10e	8.5±0.00e	8.5±0.00b	8.5±0.00b	8.5±0.00e	0.2±0.40ba
CH 296	2±0.05e	3.7±0.09b	8.5±0.00b	8.5±0.00b	7.2±0.53b	0±0.00a
CH 303	1.6±0.03b	4.7±0.16e	8.5±0.00b	8.5±0.00b	8.5±0.00e	5.7±0.65d
CH 304-1	3±0.18d	8.5±0.00e	8.5±0.00b	8.5±0.00b	8.5±0.00e	0.9±0.03e
CH 304-2	3.4±0.16e	8.5±0.00e	8.5±0.00b	8.5±0.00b	8.5±0.00e	0.9±0.06e
CH 316	0.7±0.05a	2.4±0.09a	6.825±0.25a	6.7±0.17a	6.3±0.17a	0.5±0.30b

\* Media de 4 repeticiones en la columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (P>0.05) según el test de la mínima diferencia significativa; DS: desviación estándar

**Tabla 2.** Comportamiento de aislados de *Trichoderma* sp. a los 4 días de la siembra en PDA.

Aislados	Rango de temperatura óptima de crecimiento (°C)	APBCE *
CH 101	15-30	1.45 e
CH 252	20-35	1.56 f
CH 273	15-30	1.43 d
CH 296	20-25	1.14 b
CH 303	20-30	1.35 c
CH 304-1	15-30	1.44 ed
CH 304-2	15-30	1.44 ed
CH 316	20-30	0.91 a

\* Media de 4 repeticiones en la columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P>0.05$ ) según el test de la mínima diferencia significativa.

**Tabla 3.** Comparación de 57 aislados masales de *R. necatrix* a diferentes temperaturas a los 14 días de la siembra en PDA

Temperatura	Rango de crecimiento lineal* (mm) $\pm$ DS	Grupos significativos diferentes
15°C	5.38-8.5	7
20°C	4.92-8.5	5
25°C	7.68-8.5	3
30°C	0.6-0.61	29
35°C	-	-

\* Media de 5 repeticiones

DS: Desviación estándar

**Tabla 4.** Porcentaje de inhibición radial\* de aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. ejercido sobre aislados masales *Rosellinia necatrix*

Aislados de <i>R. necatrix</i>	Aislados de <i>Trichoderma</i> sp.							
	CH 101	CH 252	CH 273	CH 296	CH 303	CH 304 1	CH 304 2	CH 316
CH 320	0a	27.3a	0a	20ab	13b	4.7a	10.7ab	9.3bcd
CH 70	24b	0cd	26.3cde	28.3ab	23.7b	24.7bc	26.3d	23.7a
CH 10	33.3b	0cd	35e	47c	0a	5a	5.3a	0cd
CH 16	24.3b	9.7bc	24.3bcd	34.7bc	14.7b	10.7ab	11ab	22.3a
CH 18	24.3b	0cd	22bcd	28.3ab	23.7b	32.7c	24.7cd	0cd
CH 52	34.7b	12.3b	31.3de	25.3ab	11.3b	27.3bc	15.7abc	18.7ab
CH 71	28.3b	0cd	27cde	15a	17.3b	22.3abc	23.3cd	13.7abc
CH 17	26b	0cd	24bcd	28.7ab	8.3b	20.3abc	24.7cd	18abc
CH 30	24b	0cd	27.7cde	24.7ab	16b	23abc	20.3bcd	14.7abc
CH 33	24b	0cd	27.3cde	25.7ab	9.3b	27.7bc	29.7d	19ab
CH 49	10a	0cd	17.3bc	25.7ab	21.3b	13ab	21.7cd	19ab
CH 12	5.3a	0cd	14.3b	19.3a	16.3b	9.3ab	8a	23.3a
CH 53	27.7b	0cd	27cde	29ab	23.7b	25.3bc	25.3cd	7.3cd

\* Media de 3 repeticiones en la columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P>0.05$ ) según el test de la mínima diferencia significativa.