

## **ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE AISLADOS MONOCONÍDICOS DE *Trichoderma* sp. POTENCIALES AGENTES DE BIOCONTROL DE LA PODREDUMBRE BLANCA DEL AGUACATE**

Y. LeLay, D. Ruano-Rosa y C. López-Herrera

Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C/ Alameda del Obispo s/n CP 14080, Córdoba, España. Correo Electrónico: [lherrera@cica.es](mailto:lherrera@cica.es)

La podredumbre blanca, causada por *Rosellinia necatrix* Prilleux (anamorfo *Dematophora necatrix* Hartig), es una de las principales enfermedades en árboles de aguacate en el área de la costa del Sur de España. Para el control del hongo se han propuesto métodos de control biológico, mediante la utilización de aislados de *Trichoderma* spp., como agentes de biocontrol (ABC). En este trabajo se evaluó las reacciones de incompatibilidad entre seis aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp., y la producción *in vitro* de compuestos volátiles y no-volátiles que inhiben el crecimiento de otros aislados del mismo género, cuando se incubaron a 24<sup>o</sup> C en oscuridad durante 17 días, con lecturas secuenciales de crecimiento de colonias a los 3, 10 y 17 días desde la siembra en placas de Petri con los filtrados de los distintos aislados y en malta-agar, como medio de cultivo. Los cruzamientos entre los diferentes aislados presentaron diferentes líneas de demarcación entre sus colonias con sobrecrecimiento de colonias en algunos cruces y total compatibilidad en los autocruzamientos realizados. No se observó liberación de compuestos volátiles que pudieran producir inhibición del crecimiento entre los aislados. Sin embargo, tres de los aislados estudiados presentaron mayor efecto inhibitorio por liberación de compuestos no-volátiles sobre el resto de los aislados, dependiendo de los tiempos de incubación.

Este trabajo pone de manifiesto la necesidad de estudios previos de compatibilidad de aislados de *Trichoderma* que puedan ser utilizados en combinaciones como agentes de control biológico, puesto que algunos de ellos ejercen poder inhibitorio sobre otros, sobre todo debido a liberación de compuestos no-volátiles.

Palabras clave: antagonista, combinación de aislados, inhibición

## ***IN VITRO* STUDY ON THE COMPATIBILITY OF SINGLE-CONIDIUM *Trichoderma* sp. ISOLATES AS POTENTIAL AGENTS ON AVOCADO WHITE ROOT ROT**

Y. LeLay, D. Ruano-Rosa and C. López-Herrera

Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C/ Alameda del Obispo s/n CP 14080, Córdoba, España. E-mail: [lherrera@cica.es](mailto:lherrera@cica.es)

Avocado white root rot, caused by *Rosellinia necatrix* Prilleux (anamorph *Dematophora necatrix* Hartig), is one of the main diseases detected on avocado trees in coastal areas of southern Spain. Biological methods have been

established for the control of the fungus using isolates of *Trichoderma* spp., as biocontrol agents (BCA's). In this work reactions of mutual incompatibility between six single-conidium isolates of *Trichoderma* spp., and production *in vitro* of both volatile and non-volatile compounds that inhibit the growth of other isolates of same genus, were evaluated. For that reason, these isolates of *Trichoderma* were sown in Petri plates with a growth medium of malt-agar and different filtrates of them, and incubated at 24°C in darkness for 17 days. Sequential measurements of colony growth at 3, 10 and 17 days after sowing were performed. The different crosses between isolates showed different division lines between the fungal colonies with overgrowth of colonies in some crossings and total compatibility in self-crossings performed. No production of volatile compounds that could inhibit the growth between isolates was observed. Nevertheless, three of the isolates studied showed greater inhibition effect, by releasing non-volatile compounds on the rest of the isolates, depending on the duration of incubation. This work suggests the convenience of previous compatibility studies of *Trichoderma* isolates when they are combined as BCA, since some of them may inhibit the growth from other isolates by producing non-volatile compounds.

### Introducción

La podredumbre blanca de raíz de aguacate causada por *Rosellinia necatrix* Prill., es una enfermedad muy extendida en las plantaciones aguacateras del litoral andaluz, sur de España (López Herrera, 1998). Entre las estrategias de control se puede considerar el uso de agentes de control biológico (ACB). Son muchos los antagonistas que se han utilizado para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Uno de los antagonistas más importantes es *Trichoderma* spp., para el que características tales como: el alto grado de adaptabilidad ecológica que presenta, la capacidad de producir una amplia variedad de sustancias con demostrada capacidad antagonista, ser micoparásito de algunos patógenos, y su fácil cultivo para poder ser aplicado, lo han llevado a estar presente en el 90% de las aplicaciones antagonista-patógeno (Benítez *et al.*, 2004). Especies de este género ya han sido anteriormente utilizadas para el control de *R. necatrix* tanto *in vitro* (Ruano Rosa *et al.*, 2003) como *in vivo* sobre aguacate (Freeman *et al.*, 1986; López Herrera *et al.*, 1999) o manzano (Sztejnberg *et al.*, 1987).

La mayoría de las estrategias de control biológico enfocadas a la supresión de patógenos de suelo de plantas, dependen o confían en un solo ACB (Larkin *et al.*, 1998). Desafortunadamente, los ACB aplicados de forma individual no son apropiados para responder consistentemente frente a todos los patógenos de un cultivo o bajo condiciones variables en la rizosfera o el suelo (Roberts *et al.*, 2005). Muchos autores proponen combinaciones de varios aislados para ampliar el rango de control (Cook, 1993; Duffy *et al.*, 1996; Garibaldi *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 1989; Sivan *et al.*, 1984; Spadaro y Gullino, 2005), incluido el control de otras especies del género *Rosellinia* (Mendoza García *et al.*, 2003). Por otro

lado, el uso de microorganismos con diferentes espectros de acción (Guetsky *et al.*, 2001) puede reducir la variabilidad en el control biológico *in vivo* y favorecer el sinergismo entre ACB similares o distintos (diferentes hongos antagonistas, aislados de *Trichoderma* spp. o de hongos con bacterias) (Baker y Scher, 1987; Benítez *et al.*, 2004; Deacon, 1994; Harman *et al.*, 1989; Lutz *et al.*, 2004).

Sin embargo, tal y como sugieren algunos estudios como los de Reaves y Crawford (1994), en *Trichoderma* spp., pueden surgir situaciones de incompatibilidad intra e interespecíficas, por lo que el estudio de la compatibilidad entre especies de *Trichoderma* puede proporcionar información muy importante para el uso combinado de varias especies como ACB.

## Materiales y métodos

### *Material fúngico*

Se ensayaron seis aislados monoconídicos de *Trichoderma*, de los que cuatro eran *T. atroviride* (CH 101, CH 273, CH 304.1 y CH 314), uno *T. virens* (CH 303) y un aislado de *Trichoderma* sin identificar a nivel de especie (CH 252). Todos los aislados procedían de la rizosfera de árboles de aguacate excepto el aislado CH 252, procedente de un invernadero de clavel. Estos seis aislados fueron seleccionados en estudios previos en base a su actividad de control biológico *in vitro* frente a *R. necatrix* (Ruano Rosa, 2006)

Para detectar las posibles incompatibilidades entre estos aislados se realizaron tres tipos de ensayos (cultivos duales, producción de sustancias no-volátiles inhibidoras del crecimiento, producción de sustancias volátiles inhibidoras del crecimiento).

### *Cultivos duales*

Los cultivos duales se realizaron según la metodología Reaves y Crawford (1994), enfrentando dos a dos en placa de Petri con PDA, los seis aislados de *Trichoderma*. El experimento se desarrolló a 24°C en oscuridad (condiciones estándar de crecimiento, CEC). Se observó la existencia de barrera de incompatibilidad entre los aislados enfrentados, utilizando como control el autocruzamiento (discos de micelio del mismo aislado enfrentados). Se utilizaron 5 repeticiones por cruzamiento.

### *Producción de sustancias no-volátiles inhibidoras del crecimiento*

Se obtuvieron filtrados de los seis aislados, cultivando cada uno en erlenmeyer con 200 mL de extracto de malta-extracto de levadura (ML), incubándose en CEC con agitación continua (150 rpm) durante varios días. A los 3, 10 y 17 días se filtraron las suspensiones consecutivamente sobre gasas estériles, papel de filtro y filtros Millipore de 0,45 µm. Posteriormente cada aislado se repicó en placas Petri que contenían 5 mL de cada uno de los filtrados obtenidos y 10 mL de malta-agar al 2%. Se utilizaron dos tipos de control: uno con un filtrado

obtenido a partir de medio ML sin inocular, otro con el filtrado del mismo aislado que inoculamos en la placa. Cada combinación fue repetida tres veces y se midieron diariamente los diámetros de las colonias hasta que la placas control quedaron completamente cubiertas.

Se cálculo el índice de toxicidad según la ecuación propuesta por Abe y Kono (1957) para mostrar el porcentaje de inhibición de cada filtrado sobre cada aislado.  $[(A-B)/A]*100$ , dónde A es la media de crecimiento del aislado testado sobre su propio filtrado (Control), y B la media de crecimiento de este mismo aislado sobre el filtrado testado.

#### *Producción de sustancias volátiles inhibidoras del crecimiento*

En este experimento se siguió el protocolo desarrollado por Dennis y Webster (1971b) para la detección de sustancias volátiles. Se repicó cada uno de los aislados de *Trichoderma* en estudio en placas de Petri con PDA. Se eliminaron las tapas de las placas y se superpusieron dos a dos las bases donde crecía el micelio, uniéndolas entre sí. Cada aislado fue combinado con cada uno de los otros y con él mismo (Control). Cada combinación fue repetida 5 veces. La medida de los diámetros de las colonias se realizó después de 4 días de incubación en CEC.

### Resultados

#### *Cultivos duales*

La compatibilidad o incompatibilidad entre aislados se detectó por la ausencia o presencia de barrera de separación respectivamente entre las colonias de aislados enfrentados (Tabla 1). En algunos autocruzamientos (aislados CH101, CH252 y CH273) se observaron en ocasiones dichas barreras. Para los cruzamientos de los aislados CH252 y CH303 con el resto, destacó la aparición de barreras anchas con una característica tinción del medio de cultivo de coloración amarillenta para CH252 y blanquecina para CH303. Sin embargo, el cruzamiento de CH252 y CH303 con el resto de los aislados no produjo ninguna de las coloraciones observadas presentando sólo una línea blanca bien definida, entre colonias enfrentadas. Se observó sobrecrecimiento del aislado CH303 sobre las otras colonias (excepto sobre CH252).

Tabla 1. Barreras de incompatibilidad formadas entre los distintos cruces realizados.

	CH101	CH252	CH273	CH303	CH304.1	CH314
CH101	BI*	BI	BI	BI	BI	BI
CH252	BI	BI	BI	BI	BI	BI

CH273	BI	BI	BI	BI	BI	BI
CH303	BI	BI	BI	C	BI	BI
CH304.1	BI	BI	BI	BI	C	BI
CH314	BI	BI	BI	BI	BI	C

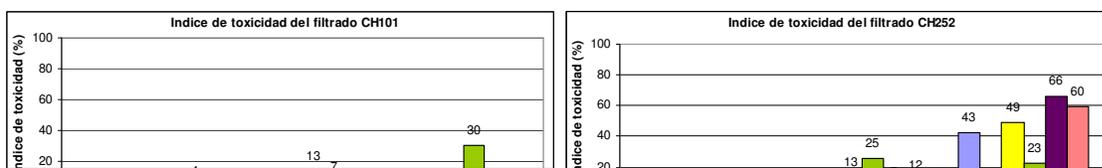
\*BI: barrera de incompatibilidad; C: cruce compatible

### *Producción de sustancias no-volátiles inhibitoras del crecimiento*

Cuando los aislados eran inoculados en placas control en las que el filtrado no había sido inoculado presentaron mayor crecimiento que cuando éstos eran inoculados sobre las otras placas control en las que el filtrado sí había sido inoculado con el mismo aislado. Por ello se utilizaron las inoculaciones de los aislados sobre sus propios filtrados como controles para el análisis, suponiendo que no había producción de metabolitos autoinhibidores. El análisis estadístico de los datos reveló que los seis aislados testados eran significativamente distintos.

Estos índices de inhibición se muestran en la Figura 1. Un índice positivo indica una inhibición por el filtrado estudiado, y un índice negativo una estimulación del crecimiento.

Figura 1. Histogramas con los índices de inhibición para cada filtrado frente a los demás aislados a los 3, 10 y 17 días de incubación.



En general los filtrados de los aislados CH252 y CH303 son los que producen mayor inhibición sobre el resto de los aislados, aunque no al mismo tiempo. La inhibición debida a CH252 se incrementa con el tiempo de incubación mientras que CH303 pierde la capacidad de inhibición después de 10 días, excepto sobre CH101 con el que parece ser constante (25, 27 y 22% de inhibición). El filtrado CH252 estimuló el crecimiento del aislado CH304.1 a los 3 días de incubación (13%), mientras que fue aumentando su inhibición frente a este aislado transcurridos 10 (7%) y 17 días (66%, siendo este el mayor porcentaje de inhibición obtenido en los experimentos). El filtrado CH303 de 10 días de incubación presentó inhibición del resto de los aislados (14 y 27% máximo), aunque con unos índices de inhibición inferiores a los presentados por CH252.

El aislado CH303 se vio afectado por los filtrados de los demás aislados, principalmente cuanto más tiempo de incubación tenía el filtrado. Sin embargo, el aislado CH252 experimentó estimulación del crecimiento cuando crecía en los filtrados de los demás aislados. Los filtrados de los aislados CH101 y CH304.1 dieron lugar a promoción del crecimiento en el resto de aislados.

### *Producción de sustancias volátiles inhibitoras del crecimiento*

Después de 4 días de incubación, no se observó ninguna acción inhibitora de ningún aislado. Todas las colonias crecieron cubriendo toda la placa de Petri. Este resultado sugiere la ausencia de producción de metabolitos volátiles inhibidores de los aislados utilizados.

### Discusión

Los estudios de compatibilidad realizados entre los seis aislados de *Trichoderma* ponen de manifiesto que existe incompatibilidad entre ellos. Cabe destacar la aparición de barreras de incompatibilidad en alguno de los autocruzamientos, como en los experimentos de Reaves y Crawford (1994), al realizar cultivos duales entre aislados de *Trichoderma*, observando unas “crestas de conidias” como respuesta al contacto entre ambos micelios. Dichas “crestas” se formaban tanto al realizar cruces inter e intraespecíficos así como en algunos autocruzamientos. Gómez *et al.* (1997), también encontraron aislados de *T. harzianum* que presentaban incompatibilidad somática entre ellos. En nuestros experimentos, aunque se observó barreras de incompatibilidad entre todos los aislados ensayados, aquellas fueron más definidas e intensas cuando fueron cruces interespecíficos de los aislados CH252 y CH303 con el resto, presentando dichas barreras una coloración característica. Aunque desconocemos la especie del aislado CH252, la fuerte incompatibilidad presentada en todos sus cruces realizados, hace pensar en una reacción interespecífica.

Cuando se estudió la inhibición por sustancias no-volátiles, los aislados crecidos en placas control cuyo filtrado no incluía previamente dicho aislado, tenían un crecimiento mayor que los correspondientes crecidos en filtrados con inclusión previa del aislado, lo que sugiere que una de las causas de inhibición sea la competencia por nutrientes (Lockwood, 1992).

Los aislados CH252 y CH303 tuvieron un comportamiento diferente en función del tiempo que habían estado creciendo en medio líquido. El aislado CH252 dio lugar a la mayor inhibición a los 17 días. En cambio el aislado CH303 presentó una alta inhibición del crecimiento de los demás aislados a los 3 y 10 días. Al mismo tiempo dicho aislado presentó una elevada sensibilidad a los filtrados de los demás aislados. Este tipo de reacciones de inhibición del crecimiento está ampliamente recogida en la bibliografía de *Trichoderma* spp (Dennis y Webster, 1971a; Sid Ahmed *et al.*, 2003; Viterbo *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 1995) aunque siempre para interacciones con patógenos.

Otro hecho característico fue el incremento del crecimiento que presentaron algunas colonias cuando crecieron en determinados filtrados, siendo el aislado CH252 el que se vio más beneficiado de este aumento de crecimiento, y los filtrados de los aislados CH101 y CH304.1 los que promocionaron más el crecimiento del resto de los aislados. Anteriormente se ha registrado esta característica reflejado en un aumento del crecimiento en plantas tratadas con

aislados de *Trichoderma* (Chang *et al.*, 1986; Chet, 1993) aunque no hay estudios previos que indiquen dicha promoción del crecimiento inter e intraespecíficos.

En el estudio de producción de sustancias volátiles no se produjeron sustancias que inhibieran el crecimiento de los aislados entre sí. Cabe la posibilidad de que la metodología seguida no fuera la más apropiada para detectar este tipo de interacciones entre aislados de *Trichoderma*. Sin embargo, este protocolo ha dado buenos resultados cuando se estudió la interacción antagonista-patógeno (Dennis y Webster, 1971b).

De este trabajo se deriva que entre los aislados de *Trichoderma* ensayados, CH252 y CH303, han presentado una alta incompatibilidad con el resto de los aislados, por lo que aquellos no deberían incluirse en combinaciones de ACB para el control de la PB del aguacate. Asimismo se sugiere la necesidad de realizar estudios previos de compatibilidad entre otros aislados de *Trichoderma* antes de ser utilizados combinados para controlar la enfermedad, excluyendo aquellos que presentan incompatibilidades bien sean somáticas o de naturaleza antibiótica.

#### Bibliografía

ABE, T. Y KÖNO, M. 1957. Studies on the White Root-Rot of Tea Bush. IV<sup>\*</sup>. On the toxicity of cultural filtrate of the fungus. Sci. Rep. Fac. Agric. Saiko Univ. 8: 74-80.

BAKER, R., SCHER, F. M. 1987. Enhancing the activity of biological control agents. In: Innovative Approches to Plant Diseases Control. Wile Interscience. New York. pp. 1-17.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A. M., LIMÓN, M. C. Y CODÓN, A. C. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7: 249-260.

CHANG, Y. C., CHANG, Y. C. Y BAKER, R. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 70: 145-148.

CHET, I. 1993. Biotechnology in plant disease control. Willey-Liss. New York, 373 pp.

COOK, R. J. 1993. The role of biological control in pest management in the 21<sup>st</sup> century. In: Pest Management: Biologically Based Technologies. American Chemical Society, Washington, D.C., 539 pp.

DEACON, J. W. 1994. Rhizosphere constraints affecting biocontrol organisms applied to seeds. In: Seed Treatment: Progress and Prospects. BCPC Surrey, UK. 57: 315-326.

DENNIS, C. Y WEBSTER, J. 1971a. Antagonistics properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 25-39.

DENNIS, C. Y WEBSTER, J. 1971b. Antagonistics properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41-48.

DUFFY, B. K., SIMON, A. Y WELLER, D. M. 1996. Combination of *Trichoderma konigii* with fluorescent pseudomonas for control of take-all on wheat. Phytopathology 83: 308-313.

FREEMAN, S., SZTEJNBERG, A. Y CHET, I. 1986. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. Plant and Soil 94: 163-170.

GARIBALDI, A., MINUTO, A., GRASSO, V., GULLINO, M. L. 2003. Application of selected antagonistic strains against *Phytophthora cryptogea* on gerbera in closed soilless system with disinfection by slow sand filtration. Crop Protection 22: 1053-1061.

GÓMEZ, I., CHET, I. Y HERRERA ESTRELLA, A. 1997. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. Mol. Gen. Genet. 256: 127-135.

GUETSKY, R., SHTIENBERG, D., ELAD, Y. Y DINOOR, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce de variability of biological control. Phytopathology 91: 621-627.

HARMAN, G. E., TAYLOR, A. G. Y STASZ, T. E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Disease 73: 631-637.

LARKIN, R. P., ROBERTS, D. P. Y GRACIA GARZA, J. A. 1998. Biological control of fungal diseases. In: Fungal activity-chemical and biological approaches to plant protection. Wiley, New York, pp 141-191.

LOCKWOOD, J. L. 1992. Exploitation competition. In: The fungal community: its organization and role in the ecosystem. 2nd edn.. Marcel Dekker, New York, pp. 243-263.

LÓPEZ HERRERA C.J. 1998. Hongos de suelo en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) del litoral andaluz. V Jornadas andaluzas de frutos tropicales. Congresos y Jornadas 47/98. Consejería de Agricultura y Pesca. 137-152.

LÓPEZ HERRERA, C. J., PÉREZ JIMÉNEZ, R. M., LLOBEL, A., MONTE VÁZQUEZ, E. Y ZEA BONILLA, T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como

agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 261-265.

LUTZ, M. P., WENGER, S., MAURHOFER, M., DÉFAGO, G. Y DUFFY, B. 2004. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. FEMS Microbiology Ecology 48: 447-455.

MENDOZA GARCÍA, R. A., MARTIJN TEN HOOPEN, G., KASS, D. C. J., SÁNCHEZ GARITA, V. A., Y KRAUSS, U. 2003. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. Biological Control 27: 210-227.

REAVES, J. L. Y CRAWFORD, R. H. 1994. *In vitro* colony interactions among species of *Trichoderma* with inference toward biological control. United States Department of Agriculture, Forest Service (Pacific Northwest Research Station), 8 p.

ROBERTS, D. P., LOHRKE, S. M., MEYER, S. L. F., BUYER, J. S., BOWERS, J. H., BAKER, C. J., LI, W., DE SOUZA, J. T., LEWIS, J. A. Y CHUNG, S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. Crop Protection 24: 141-155.

RUANO ROSA, D. 2006. Control biológico, caracterización y detección molecular de *Rosellinia necatrix* Prill, agente causal de la podredumbre blanca del aguacate. Tesis Doctoral, 361 pp.

RUANO ROSA, D., DEL MORAL NAVARRETE, L., LÓPEZ HERRERA, C. J. 2003. Estudio de temperaturas de crecimiento in vitro en aislados de *Trichoderma* sp. y de *Rosellinia necatrix*. Evaluación del antagonismo mediante cultivos duales. Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate) 2003. pp. 525-529.

SID AHMED, A., EZZIYYANI, M., PÉREZ SÁNCHEZ, C. Y CANDELA, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. European Journal of Plant Pathology 109: 633-637.

SIVAN, A., ELAD, Y. Y CHET, I. 1984. Biological control of effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology 74: 498-501.

SPADARO, D. Y GULLINO, M. L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. Crop Protection 24: 601-613.

SZTEJNBERG, A., FREEMAN, S., CHET, I. Y KATAN, J. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and in apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 71: 365-369.

VITERBO, A., RAMOT, O., CHERMIN, L. Y CHET, I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 549-556.

WADA, S., IIDA, A., AKIMOTO, N., KANAI, M., TOYAMA, N. Y FUJITA, T. 1995. Fungal metabolites. XIX Structural elucidation of channel-forming peptides, trichorovins-I—XIV, from the fungus *Trichoderma viride*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 43: 910-915.