

EVALUACIÓN *in vitro* DEL ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Cylindrocarpon* sp. AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN DE LA RAÍZ EN AGUACATE

Venegas-Arroyo, Maria¹; Estado-Aviles, Octavio²; Michua-Cedillo, Jeny¹

¹Laboratorio de Análisis Fitosanitarios (LAFIT), Prolongación Mazatlán 1533, La Magdalena, Uruapan, Michoacán. México

²Agroquímicos La Perla del Cupatitzio S.A. DE C.V., Paseo de La Revolución N°3686, Zumpimito, Uruapan, Michoacán. México. Correo-e: octavio5893@outlook.com

Resumen

Se evaluó la capacidad antagónica de tres cepas de *Trichoderma* nativas de aguacate sobre el agente causal del pie negro del aguacate (*Cylindrocarpon* sp.). Todas las cepas mostraron diferentes grados de control y modos de acción sobre el patógeno, este efecto estuvo estrechamente relacionado con la edad del aislado de *Cylindrocarpon*. De los dos periodos de evaluación, se concluyó que el tiempo es un factor importante para determinar si *Trichoderma* es potencial. 72 h después de la inoculación sobre *Cylindrocarpon*, todas las cepas mostraron una tasa de crecimiento alto, 144 h después de la inoculación se observó el modo de acción del biocontrolador. Las colonias que presentaron mayor susceptibilidad al ataque del antagonista fueron las de cero y cinco días, mientras que las cepas de 10 y 15 días son menos propensas a la invasión por la cepa T1 comparado con la cepa T2 y T3.

Palabras clave: Control biológico, *Persea americana*, Hypocreales, Parasitismo, Enfermedades de suelo.

In vitro ASSESSMENT OF THE ANTAGONISM OF *Trichoderma* spp. TO *Cylindrocarpon* sp. CAUSAL AGENT OF ROOT ROT IN AVOCADO

Abstract

The antagonistic capacity of three native avocado *Trichoderma* strains on the causative agent of avocado black foot (*Cylindrocarpon* sp.) Was evaluated. All the strains showed different degrees of control and modes of action on the pathogen, this effect was closely related to the age of the *Cylindrocarpon* isolate. Of the two evaluation periods, it was concluded that time is an important factor in determining whether *Trichoderma* is potential. 72 h after inoculation on *Cylindrocarpon*, all strains showed a high growth rate, 144 h after inoculation the mode of action of the biocontroller was observed. The colonies that showed greater susceptibility to the attack of the antagonist were those of zero and five days, while the strains of 10 and 15 days were less prone to invasion by the T1 strain compared to the T2 and T3 strain.

Key words: Biological control, *Persea americana*, Hypocreales, Parasitism, Soil diseases.

Introducción

En los últimos años los hongos patógenos pertenecientes a la familia *Nectriaceae* han causado daños significativos en el cultivo de aguacate, sin embargo, los estudios para el control de enfermedades radicales son muy limitados (Ramírez y Morales, 2013; Parkinson et al., 2017). Actualmente existen varias especies involucradas en la marchitez de aguacate, el complejo *Cylindro*, está conformado por los hongos *Cylindrocladium* ssp. y *Cylindrocarpon* ssp., dentro de este último, hay especies patógenas de plantas que previamente se encuentran asociadas a

raíces siendo un habitante común de la rizosfera, es decir, sin causar enfermedad en el hospedante (Besoain y Piontelli, 1999; Crous, 2002; Chaverri et al., 2011). Los daños de este hongo en aguacate se han reportado en Sur África, Israel, España, Chile, Italia y Australia, afectando plantas. En México aún no existen reportes de la presencia de estos patógenos los cuales potencialmente puede causar grandes pérdidas económicas. Los síntomas son caracterizados por marchitez generalizada, estancamiento del desarrollo, pérdida de vigor, color y brillo, así como amarillamiento de las hojas y finalmente en estados avanzados, la muerte de los árboles, afectando plantas en todos sus estados de desarrollo. Este género ocasiona síntomas muy similares a *Phytophthora cinnamomi* en campo (Besoain et al., 1999; Dann et al., 2012; Ramírez y Morales, 2013; Amézquita y Chinchilla 2021). Actualmente se recurre a prácticas de manejo químico, cultural y biológico, para contrarrestar la presencia de algunas de las enfermedades (Tamayo, 2007). El control biológico implica la introducción de poblaciones de enemigos naturales dentro de un ecosistema, para reducir las poblaciones de patógenos (Pal y McSpadden, 2006). Estos biocontroladores pueden desarrollar un antagonismo si tiene las condiciones necesarias para desarrollarse (Pinto, 2014). Diversas investigaciones, fundamentalmente con hongos del género *Trichoderma*, han confirmado tener efectos antagónicos contra diversas especies de hongos patógenos (Bell et al., 1982; Sepulveda, 2012).

En Michoacán, el cultivo de aguacate cuenta con una superficie sembrada de 169,939.45 ha de las cuales en el año 2020 se obtuvo una producción de 1,800,021.42 t (SIAP, 2020). Como muchos cultivos el aguacate presenta problemas fitosanitarios dentro de los cuales destacan las enfermedades radicales, varios microorganismos que producen síntomas que pueden ser confundidos lo que da como resultado que el manejo resulte complejo (Dann et al., 2012). Debido a los antecedentes mencionados, en el presente estudio, se evaluó el potencial antagónico de tres cepas de *Trichoderma* aisladas de aguacate contra *Cylindrocarpon* sp. como alternativa de control biológico.

Materiales y Métodos

Aislados de *Cylindrocarpon* y *Trichoderma*

La cepa de *Cylindrocarpon* se aisló de un huerto comercial de aguacate variedad Hass ubicado en el municipio de Ario de Rosales, Michoacán; se activó y reprodujo en papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco®) al que se le adicionaron 2.5 mg de estreptomina (Sigma®). Las placas sembradas se mantuvieron a temperatura ambiente. Se aislaron tres cepas de *Trichoderma* obtenidos de raíces de aguacate colectadas en Nuevo Zirosto, y Ciudad Guzmán, para el

aislamiento se utilizó el protocolo establecido por Aguín et al. (2004). En total se aislaron tres cepas que se clasificaron por su morfotipo. Todas las cepas utilizadas en este estudio están en proceso de identificación molecular por amplificación del gen ITS.

Confrontación de *Cylindrocarpon* vs. *Trichoderma*

Las pruebas de antagonismo se realizaron en papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco®) con colonias de 0, 5, 10 y 15 días de crecimiento de *Cylindrocarpon* sp., estas cepas se confrontaron con tres colonias diferentes de *Trichoderma* spp. se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990). Para cada tratamiento, se depositó en un extremo de cajas Petri un disco de dos mm de diámetro con micelio activo de colonias fungosas de 8 días de edad. El disco de *Cylindrocarpon* se colocó en un extremo de la caja Petri y posteriormente se inoculó con *Trichoderma* spp. La separación entre estos fue de 5 cm aproximadamente. Por cada fase de crecimiento se realizaron cinco repeticiones, con una confrontación en cada una para un total de 60 cajas. De las especies de *Trichoderma* spp. que se sometieron a la confrontación se hicieron testigos con cinco repeticiones el mismo procedimiento se realizó para *Cylindrocarpon*. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente.

Evaluación de la capacidad antagónica

La capacidad antagónica de las cepas se evaluó midiendo la tasa de crecimiento de las colonias cada 72 h para determinar tiempo en el que las colonias tuvieron el primer contacto entre las hifas, la zona de intersección y al término de la evaluación el tipo de antagonismo se clasificó de acuerdo a las fórmulas de Pinto (2014) y la clasificación basada con las características propuestas por Pal y McSpadden (2006).

Resultados y Discusión

Evaluación de la capacidad antagónica

Se observó un efecto significativo entre todos los tratamientos realizados con las tres cepas de *Trichoderma*. La tasa de crecimiento de antagonista es alta cuando las colonias tienen la misma edad (0 ddi), sin embargo, una vez que *Trichoderma* es inoculado con cepas de *Cylindrocarpon* de cinco días de edad, se observó un efecto de reducción de crecimiento del antagonista cuando se realizó la evaluación 72 h; 144 h después de ser evaluadas, se observó una reducción del crecimiento del patógeno como en el caso de la confrontación de *Trichoderma* sp. contra *Sclerotinium cepivorum* (Astorga et al., 2003). Contrario a esto, en el caso de las colonias

de *Trichoderma* que se confrontaron con cepas del patógeno de 10 y 15 días se observó una competición directa por espacio debido a que el hiperparásito, no superó al patógeno en ninguna de las dos evaluaciones (Figura 1). El análisis estadístico corroboró que existen diferencias significativas entre las tres cepas inoculadas ($P=0.0001$) y los días de crecimiento del patógeno ($P=0.0005$).

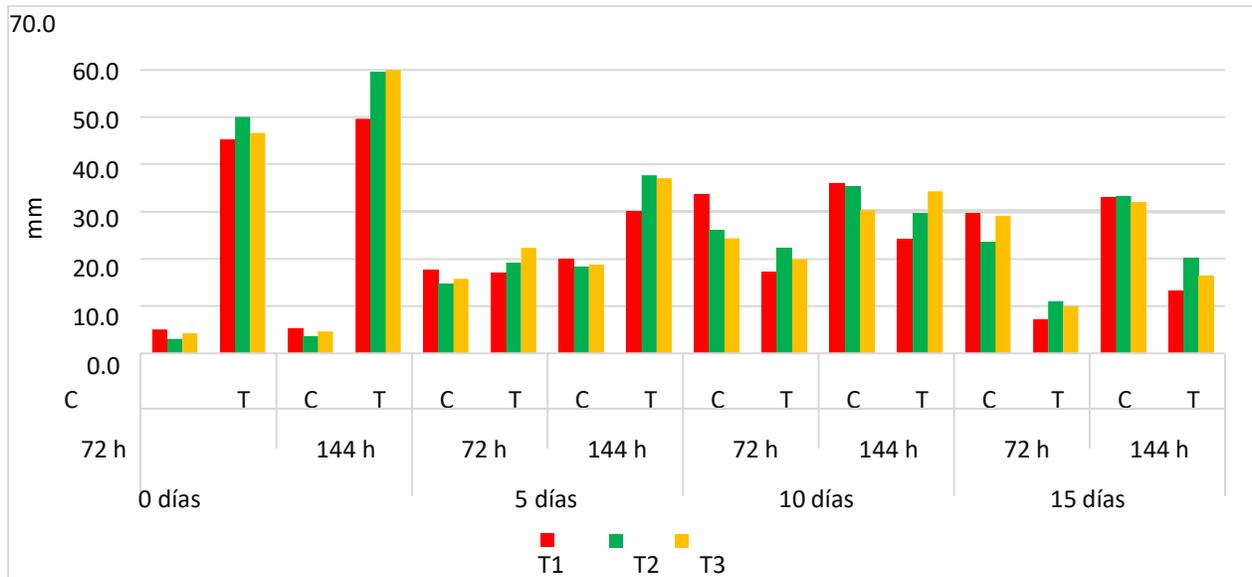


Figura 1. Tasa de crecimiento de tres cepas de *Trichoderma* confrontadas con cepas de *Cylindrocarpon* sp. de diferentes edades.

Respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento radial, se observó que cuando se establecen cultivos duales, el control sobre *Cylindrocarpon* supera el 80 %, una vez que las cepas del patógeno tienen un crecimiento mayor el efecto disminuye 10 % en la cepa uno de *Trichoderma*. De los tres aislados del antagonista el que tuvo una constante sobre el patógeno fue la cepa tres y este resultado está correlacionado con el modo de acción que emplea para inhibir al patógeno (Figura 2). Al respecto, Michel (2001) indicó que entre menor sean los días al contacto, es mayor la agresividad que existe por parte del hongo antagonista y menor la resistencia del fitopatógeno.

Michel et al. (2005) mencionaron que la zona de intersección tiene una importancia significativa puesto que entre mayor sea el área de contacto, mayor será la agresividad del hiperparásito. En el caso de las cepas utilizadas en este estudio se observó un intervalo de 0.8 a 0.90 cm que supera a lo indicado por Michel et al. (2008) con *Trichoderma* y *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum*.

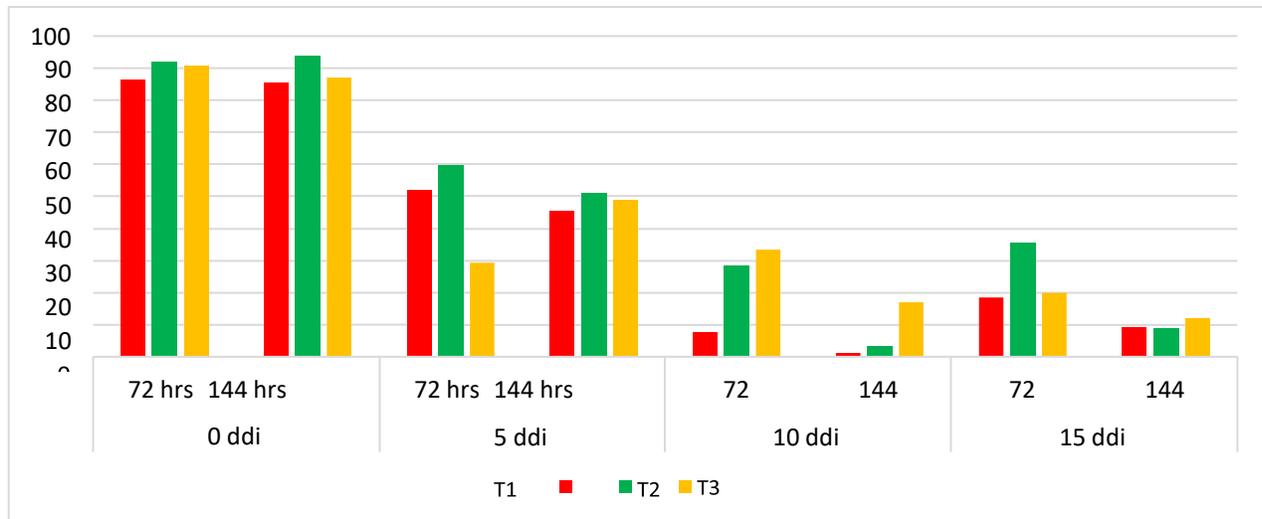


Figura 2. Promedio de porcentajes de inhibición del crecimiento radial (%ICR) para antagonismo de tres cepas de *Trichoderma* sobre *Cylindrocarpon* sp.

Modo de acción de *Trichoderma*

Al término de las evaluaciones, las placas mostraron diferentes reacciones entre el patógeno y el antagonista, de acuerdo a las descripciones realizadas por Howell (2003), el modo de acción se clasificó de la siguiente manera: La cepa del tratamiento uno mostró solo competición por espacio (Figura 3), una vez que hizo contacto con el patógeno, no se observó un parasitismo directo, en las colonias de cero y cinco días este mecanismo fue evidente, sin embargo en las cepas de *Cylindrocarpon* de 10 y 15 días se observó un halo de inhibición que probablemente este asociado a el ciclo péptido citotóxico reportado por Weber et al. (2006) y a la ascoclorina cyndrol A5 encontrada por Kawaguchi et al. (2005). Contrario a lo que indicó Hernández (2005) con la confrontación de *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii* y Michel et al. (2001) entre *Fusarium subglutinans* y *Trichoderma* spp, quienes mencionaron que hay especies del antagonista que tienen contacto a los tres días después de la inoculación.



Figura 3. Modo de acción de la cepa *Trichoderma* T1 sobre colonias de *Cylindrocarpon*: A, colonia de 0 días de crecimiento; B, colonia de cinco días; C, colonia de 10 días; D, colonia de 15 días de crecimiento.

En el caso de las cepas dos y tres, no hay distinción entre la edad del aislado del patógeno se observó parasitismo directo en ambos casos, estas especies probablemente utilicen el mecanismo de competencia por nutrientes como en el caso de *Trichoderma lignorum* sobre *Rhizoctonia solani* (Howell, 2003), no obstante, el mecanismo principal de control biológico es el microparasitismo (Figura 4).

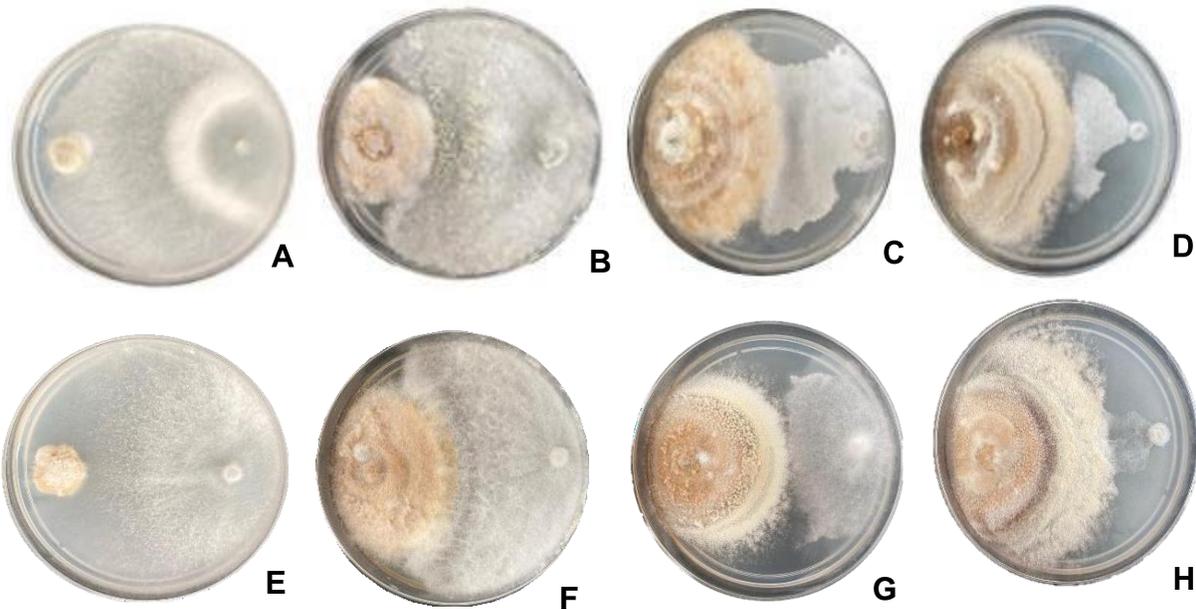


Figura 4. Modo de acción de la cepa T2 y T3 de *Trichoderma* sobre colonias de *Cyllindrocarpon*. A-B. *Cyllindrocarpon* confrontado con *Trichoderma* T2; E-H, *Cyllindrocarpon* confrontado con *Trichoderma* T3 a los 0, 5, 10 y 15 días de crecimiento.

Conclusiones

Existe variabilidad en los modos de acción de las cepas de *Trichoderma* sobre *Cyllindrocarpon* sp.

La edad del patógeno está estrechamente relacionada con la producción de toxinas que inhiben el crecimiento de algunas especies del hiperparásito.

De las tres cepas de *Trichoderma* confrontadas, la cepa T2 y T3 son las que tienen un uso promisorio para la implementación de un manejo integrado en campo, se sugiere realizar aplicaciones para determinar la adaptabilidad y funcionalidad de estos en condiciones ambientales.

Literatura Citada

- Aguín, C. O., J. M. Sainz, & V. P. Mansilla. 2004. *Armillaria* species infesting vineyards in northwestern. Eur. J. Plant Pathol. 683–687.
- Amezquita, J. C., y Chinchilla, K. S. 2021. Ensayo *in vitro* de fungicidas para el control de *Cylindrocarpon* spp., *Cylindrocladium* spp. y *Fusarium* spp. Consultado en <https://www.metroflorcolombia.com/ensayo-in-vitro-de-fungicidas-para-el-control-de-cylindrocarpon-spp-cylindrocladium-spp-y-fusarium-spp/>
- Astorga Q. K., M. K. Meneses, V. C. Zuñiga, M.J. Brenes, and M. W. Rivera. 2013. Evaluation of antagonism of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* against three garlic pathogens. Tecnol. Marcha 27:82-91.
- Bell, D.K., H. D. Well, and C. R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathol. 72:379-382.
- Besoain, X., y E. Piontelli. 1999. Pudrición negra en raicillas de palto (*Persea americana* Mill.) por *Cylindrocarpon destructans*: patogenicidad y aspectos epidemiológicos. Bol. Micol. 14:41-47.
- Chaverri, P., C. Salgado, Y. Hirooka, A. Y. Rossman, and G. J. Samuels. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Stud. Mycol. 68:57-78.
- Cherif, S. S., and C.S. Benhamou. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. Phytopathol. 80:1406-1414.
- Crous, P. W. 2002. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. American Phytopathological Society (APS) Press. St. Paul, MN, USA. 294 p.
- Dann, E. K., A. W. Cooke, L. I. Forsberg, K. G. Pegg, Y. P. Tan, and R. G. Shivas. 2012. Pathogenicity studies in avocado with three nectriaceous fungi, *Calonectria illicicola*, *Gliocladiopsis* sp. and *Ilyonectria lirioidendri*. Plant Pathol. 61(5):896-902.
- Hernández, N.M.M. 2005. Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en el cultivo de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) con *Trichoderma* spp. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Maestría en Ciencias en Producción Agrícola. Iguala, Guerrero, México. 107 p.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87(1):4-10.
- Kawaguchi, M., Fukuda, T., Ryuji, U., Nonaka, K., Masuma, R., and Tomoda, H. 2013. A new scochlorin derivative from *Cylindrocarpon* sp. The Journal of Antibiotics, 66 (1) 23-29 p.
- Michel Aceves A. C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp., (Euascomicetes: Hypocreales), su Antibiosis y Micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (*Hyphomycetes: Hyphales*). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 162 p.
- Michel-Aceves, A. C., O. Rebolledo-Domínguez, R. Lezama-Gutiérrez, M. E. Ochoa-Moreno, J. C. Mesina-Escamilla, y G. J. Samuels. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "Escobade bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Rev. Mex. Fitopatol. 19:154-160.



- Pal, K. K., and McSpadden G, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. Plant Health Instr. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02
- Parkinson, L. E., R. G. Shivas, and E. K. Dann, 2017. Pathogenicity nectriaceous fungi on avocado in Australia. *Phytopathol.* 107(12):1479-1485.
- Pinto Veas, G. F. 2014. Evaluación *in vitro* de antagonistas sobre cepas seleccionadas de *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous, agente causal de la enfermedad del pie negro de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de Profesional. Escuela de Pregrado, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 41 p.
- Ramírez Gil, G., & J. G. Morales Osorio. 2013. Primer informe de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Colombia. *Rev. Protección Veg.* 28(1):27-35.
- Sepulveda, C. 2012. Efecto *in vitro* de antagonistas en cepas de basidiomycotas aislados de vid (*Vitis vinifera* L.) con síntomas de degradación de la madera. Memoria de título de Ing. Agrónomo. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 46 p.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2009. Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA. Consultado en <http://www.oeidrus-portal.gob.mx/agricola-siap/icultivo/index.jsp>
- Tamayo, P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Rev. Politéc.* 4:52-71.
- Weber, D., G. Erosa, O. Sterner, & T. Anke. 2006. Cyliandrocyclin A, a new cytotoxic cyclopeptide from *Cylindrocarpon* sp. *J. Antibiot.* 59(8):495-499.