

1999. Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 261-265.

ESTUDIOS *IN VIVO* DE *Trichoderma* COMO AGENTE DE BIOCONTROL CONTRA *Phytophthora cinnamomi* Y *Rosellinia necatrix* EN AGUACATE

C. J. López-Herrera¹; R. M. Pérez-Jiménez²; A. Llobel³, E. Monte-Vázquez⁴; T. Zea-Bonilla²

¹Estación Experimental La Mayora. C.S.I.C. 29750, Algarrobo-Costa. Málaga. Correo electrónico: clherrera@eelm.csisc.es

²Centro de Investigación y Formación Agraria. 29140, Churriana, Málaga

³Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. C.S.I.C.-Universidad de Sevilla.C/ Americo Vespucio s/n, Isla de La Cartuja, 41092, Sevilla

⁴Dpto. Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Avda. Campo Charro s/n 37007. Salamanca. ESPAÑA.

RESUMEN

Las podredumbres radiculares causadas por *Phytophthora cinnamomi* y por *Rosellinia necatrix* son las enfermedades más importantes en el cultivo del aguacate en el sur de España. La incorporación de agentes de control biológico (antagonistas) al suelo, tales como *Trichoderma* spp., es ampliamente reconocida como método de lucha contra enfermedades causadas por hongos de suelo. Para abordar el control biológico de estas enfermedades se seleccionaron cuatro cepas de *Trichoderma* que presentaron *in vitro* un claro efecto antagonista ante los patógenos mencionados. Se inoculó bajo invernadero plantas de aguacate cv. Topa Topa de nueve meses de edad con suspensiones de conidias (1×10^6 conidias/g suelo) de los distintos aislados de *Trichoderma* junto con un aislado muy virulento de *P. cinnamomi* o de *R. necatrix*. Las plantas evolucionaron durante cuatro meses en los que se realizaron cuantificaciones de la densidad de inóculo de *Trichoderma* en suelo y se anotó síntomas aéreos de las plantas. Al finalizar el experimento, se determinó la densidad de inóculo de cada patógeno en suelo, el porcentaje de aislamiento de éstos en las raíces y el peso seco de raíces. En general, en las inoculaciones conjuntas patógeno-antagonista, la evolución de las poblaciones en suelo de cada uno de los aislados de *Trichoderma* fue variable, observándose una mejor colonización del sustrato por determinados aislados como el TB 1.2. En presencia de *Trichoderma* la densidad de inóculo de *P. cinnamomi* se redujo entre un 86 y 91% y su porcentaje de aislamiento en las raíces de las plantas inoculadas entre un 40 y 60%. Para *R. necatrix*, el aislado de *Trichoderma* TB1.2 fue el único que resultó efectivo reduciendo el porcentaje de aislamiento del patógeno en las raíces de las plantas inoculadas un 37%.

PALABRAS CLAVE: *Persea americana*, hongos de suelo patógenos, microorganismo antagonista, control biológico

SUMMARY

The avocado root rots caused by *Phytophthora cinnamomi* and *Rosellinia necatrix* are the most important diseases of avocado trees in southern Spain. The incorporation of biocontrol agents (antagonistics) to the soil, such as *Trichoderma* spp., is being widely accepted as method to control soilborne diseases. With this objective, four *Trichoderma* isolates, that presented *in vitro* a clear antagonistic effect to the cited pathogens, were previously selected. Nine months old avocado plants of cv. Topa Topa, were inoculated with conidial suspensions (1×10^6 conidias/g soil) of the different *Trichoderma* isolates together with a virulent isolate of *P. cinnamomi* or *R. necatrix*. The plants evolved during four months, in this period quantifications of the *Trichoderma* inoculum density and aerial symptoms of the plants were carried out. At the end of the experiment, inoculums density of each pathogen in soil, isolation percentage of these pathogens in the roots and dry weight of the roots were determined. In general, in the pathogen-antagonistic combined inoculations, the evolution of the populations in soil of each one of the isolates of *Trichoderma* was variable, although a better colonization of the substrate by the isolate TB 1.2 was observed. In all treatments with *Trichoderma* inoculums density of *P. cinnamomi* was reduced between 86 and 91%, and its isolation percentages in the roots of the plants between 40 and 60%. For *R. necatrix*, the isolate of *Trichoderma* TB1.2 was the only one effective in reducing up to 37% the percentage of isolation of the pathogen in the roots of the inoculated plants.

KEY WORDS: *Persea americana*, soilborne pathogen, antagonistic microorganism, biological control

INTRODUCCIÓN

El cultivo del aguacate está muy extendido en el litoral andaluz (sur de España), ocupando una superficie total en la península del orden de 8.000 Has y con una producción de 62.000 Tm en 1998 (Anónimo, 1999). Las podredumbres radiculares del aguacate causadas por *Rosellinia necatrix* y *Phytophthora cinnamomi* son las enfermedades más importantes del cultivo del aguacate en esta zona (López Herrera y García Rodríguez, 1987; López Herrera, 1989).

Los problemas y limitaciones del control de enfermedades fúngicas mediante el uso de fungicidas hacen que el control biológico de los hongos fitopatógenos se presente como un método de control alternativo. En este sentido, el control de *P. cinnamomi* y *R. necatrix* mediante la incorporación al suelo de los denominados agentes de control biológico ha sido abordado por distintos autores. Así, se ha puesto de manifiesto que bacterias presentes en suelo, tales como *Pseudomonas* spp. y *Streptomyces* spp., inhiben el crecimiento de *P. cinnamomi* *in vitro* (Mass y Kotzé, 1990; Finlay y McCracken, 1991; Stirling *et al.*, 1992). Igualmente, existe un gran número de especies fúngicas que manifiestan efecto antagonista hacia *P. cinnamomi* tales como *Trichoderma* spp., *Myrothecium roridum*, *Aspergillus* spp., o *Paecilomyces* spp. (Reeves, 1975; Gees y Coffey, 1989; Casale, 1990; Finlay y McCracken, 1991; Duvenhage y Kotzé, 1993; McLeod *et al.*, 1995).

Existen distintas especies de bacterias de los géneros *Agrobacterium* y *Pseudomonas* aisladas de suelo y de raíces de melocotonero y manzano que presentan un acusado efecto antagonista hacia *R. necatrix* (Yasuda y Katoh, 1989). Adicionalmente, se ha obtenido control de *R. necatrix* por *Trichoderma harzianum* y *Sordaria* spp. (Freeman *et al.*, 1986; Watanabe, 1991). Sin embargo, otros autores encuentran que la incorporación de *Trichoderma* en campo no es efectiva, pudiendo deberse esto a una aplicación inadecuada del antagonista (Sztejnberg *et al.*, 1987).

En este trabajo se ha abordado el control biológico de estos hongos *in vivo* mediante la incorporación al suelo de distintos aislados de *Trichoderma* junto con aislados de *P. cinnamomi* y *R. necatrix* obtenidos de plantaciones aguacateras del sur de España.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de aguacate de semilla cv. Topa Topa con nueve meses de edad sembradas en bolsas de 2.5 litros con un sustrato mezcla de turba:arena:tierra (2:1:1) desinfectado con bromuro de metilo. Las plantas se inocularon con un aislado muy virulento de *P. cinnamomi* (Pc-273) o de *R. necatrix* (Rn-400) y de forma simultánea con un aislado de *Trichoderma*. Los aislados de *Trichoderma* ensayados (T6: *Trichoderma aureoviride*, T9 y T10: *Trichoderma longibrachiatum* y TB1.2 *Trichoderma harzianum*) se seleccionaron previamente *in vitro* por su capacidad para antagonizar a estos patógenos (Soler *et al.*, 1998). La inoculación se realizó incorporando al suelo una suspensión de 10^6 conidias del antagonista/g de sustrato y de 2.5 g de semillas de trigo colonizadas con *P. cinnamomii* por kg de sustrato (Zentmyer y Richards, 1952) o de 1 g de semillas colonizadas con *R. necatrix* por kg de sustrato (Sztejnberg *et al.*, 1987). Se consideraron 15 tratamientos distintos con 20 repeticiones cada uno: Plantas testigo no inoculadas (T), plantas inoculadas con cada uno de los patógenos (Pc, Rn), plantas inoculadas con cada *Trichoderma* (T6, T9, T10, TB1.2) y plantas inoculadas con cada patógeno y cada *Trichoderma* (Pc+T6, Pc+T9, Pc+T10, Pc+TB1.2, Rn+T6, Rn+T9, Rn+T10, Rn+TB1.2).

La duración del experimento fue de cuatro meses, realizándose durante su desarrollo las siguientes determinaciones: a) cuantificación de *Trichoderma* spp., en suelo de las plantas inoculadas, a las 1, 4, 8, 12 y 16 semanas desde la inoculación mediante el método de diluciones seriadas con TSM descrito por Askew y Laing (1993), b) evolución a lo largo del experimento del número de plantas muertas, c) cálculo del incremento de altura de cada planta al final del experimento, d) evaluación del estado del sistema radicular de las plantas al finalizar el experimento determinando el peso seco de raíces y la frecuencia de aislamiento de los patógenos en 10 trozos de raíz por planta elegidos al azar y e) determinación de la densidad de inóculo de cada patógeno en el suelo para cada tratamiento. *P. cinnamomi* se cuantificó siguiendo el método de Gees y Coffey (1989) y *R. necatrix* según el método puesto a punto en nuestro laboratorio para las inoculaciones de invernadero: el sustrato infestado se deja secar a temperatura ambiente; posteriormente se tritura y tamiza y se extiende en bandejas donde se riega a capacidad de campo, éstas se sellan con lámina de plástico negra y se incuban en oscuridad a 24 °C. A los 7 y 14 días se realizan lecturas del número de colonias de *R. necatrix* crecidas sobre el sustrato.

RESULTADOS

En general, la densidad de inóculo de los distintos aislados de *Trichoderma* se presentó similar en los tratamientos con patógeno y sin patógeno. Por otro lado, se observó una reducción de la densidad de inóculo de los distintos aislados de *Trichoderma* entre el inicio del experimento y la cuarta semana de la inoculación. En posteriores cuantificaciones el aislado T9 mantuvo sus niveles por debajo de 60.000 ufc por g suelo y el T6 y T10 entre 100.000 y 200.000 ufc por g suelo, mientras que el aislado TB1.2 destacó por mantener su población en torno a las 400.000 ufc por g suelo hasta la última cuantificación (Figura 1).

Los efectos de la aplicación de los diferentes aislados de *Trichoderma* en las plantas de aguacate inoculadas con *P. cinnamomi* quedan reflejadas en el Cuadro 1. Durante el experimento no se produjo muerte en las plantas inoculadas con *P. cinnamomi*. No se encontró diferencias significativas en el incremento de altura de las plantas. El peso seco de raíz de las plantas inoculadas solo con *P. cinnamomi* resultó similar al de las plantas inoculadas con *P. cinnamomi* y *Trichoderma*, excepto para el aislado T9 que se diferenció claramente del resto. En presencia de *Trichoderma*, el porcentaje de aislamiento del patógeno de raíces siempre fue menor que en el tratamiento sin antagonista. Al finalizar el experimento, se encontró que la densidad de inóculo del patógeno en los tratamiento con *Trichoderma* se redujo significativamente con respecto al tratamiento con *P. cinnamomi*.

El efecto de la aplicación de aislados de *Trichoderma* en las plantas inoculadas con *R. necatrix* se refleja en el Cuadro 2. La muerte de plantas en los tratamientos *R. necatrix* y *Trichoderma* fue igual a la encontrada en las plantas inoculadas solo con *R. necatrix*. Al igual que para *P. cinnamomi*, no se pudo establecer diferencias significativas en el incremento de altura de las plantas. El peso seco de las raíces de las plantas inoculadas con *R. necatrix* y *Trichoderma* spp. no se diferenció de las inoculadas solo con el patógeno, aunque sí se observó un desarrollo significativo de raíces en presencia solo de *Trichoderma*. Tampoco se observó diferencias en cuanto al porcentaje de aislamiento del patógeno en las raíces de las plantas inoculadas con el patógeno y las inoculadas con patógeno y antagonista, excepto para la combinación Rn+TB1.2 que presentó un significativo menor aislamiento del patógeno.

DISCUSIÓN

Los aislados de *Trichoderma* ensayados demostraron un claro efecto antagonista contra *P. cinnamomi* y *R. necatrix* en los cultivos duales realizados previamente *in vitro* (Soler *et al.*, 1998), sin embargo, los resultados de control de estos patógenos con el antagonista en plantas inoculadas de invernadero no han sido tan satisfactorios. Se confirma lo observado por otros autores (McLeod *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1990) respecto a que la selección previa de antagonistas mediante cultivos duales es útil, pero no garantiza el buen comportamiento de éstos en invernadero.

En cuanto al establecimiento y evolución de la población de *Trichoderma* en suelo, la reducción inicial observada en la densidad de inóculo para todos los aislados concuerda con los resultados obtenidos por McLeod *et al.* (1995) quienes, en sus evaluaciones de *P. cinnamomi* con aislados de *Trichoderma*, indican que esta reducción drástica puede

deberse a que el antagonista utiliza su energía en la producción de metabolitos secundarios más que en su propia reproducción.

Al finalizar el experimento, la población de *R. necatrix* en el suelo en el tratamiento Rn fue similar a la encontrada en presencia de los distintos aislados de *Trichoderma*.

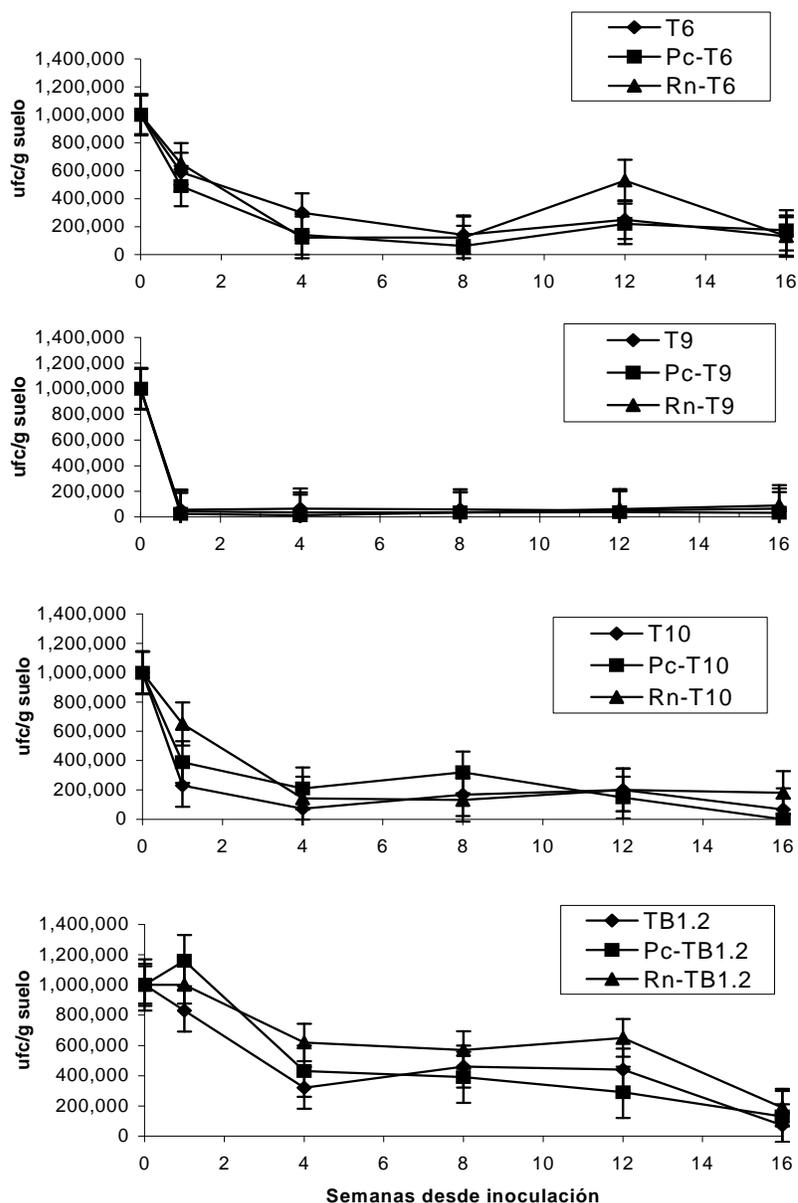


Figura 1. Evolución de la densidad de inóculo (ufc/g suelo) de aislados de *Trichoderma* (T6, T9, T10 y TB1.2) inoculados con *Phytophthora cinnamomi* (Pc) o *Rosellinia necatrix* (Rn).

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de aislados de *Trichoderma* spp. a plantas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*.

Tratamiento	Nº plantas muertas	Incremento Altura (cm)	Peso seco raíces (g) ^z	% aislamineto patógeno ^y	Densidad de inóculo patógeno (ufc por g suelo)
Testigo	0	1.6	4.7 cd ^z	-	-
<i>P. cinnamomi</i> (Pc)	0	1.7	3.8 d	17.5	173.7 a
T6	0	1.3	6.2 b	-	-
T9	0	1.5	5.3 ab	-	-
T10	0	0.5	7.8 a	-	-
TB1,2	0	1.9	5.3 ab	-	-
Pc + T6	0	1.3	3.3 d	10.5	15.8 b
Pc + T9	0	1.9	5.4 ab	6.5	24.0 b
Pc + T10	0	1.9	4.0 cd	10.0	18.2 b
Pc + TB1,2	0	1.9	4.7 cd	7.0	15.3 b

^zsin considerar la raíz principal

^yen 10 trozos de raíces elegidos al azar por planta

^xmisma letra indica que no hay diferencias significativas según test LSD ($P \leq 0.05$)

Cuadro 2. Efecto de la aplicación de aislados de *Trichoderma* spp. a plantas inoculadas con *Rosellinia necatrix*.

Tratamiento	Nº plantas muertas	Incremento Altura (cm)	Peso seco raíces (g) ^z	% aislamineto patógeno ^y	Densidad de inóculo patógenos (ufc por kg suelo)
Testigo	0	1.6	4.7 c ^z	-	-
<i>R. necatrix</i> (Rn)	20	0.6	2.2 d	37.2 a	25.6
T6	0	1.3	6.2 b	-	-
T9	0	1.5	5.3 bc	-	-
T10	0	0.5	7.8 a	-	-
TB1,2	0	1.9	5.3 bc	-	-
Rn + T6	20	1.4	2.0 d	35.0 a	34.4
Rn + T9	20	1.2	2.7 d	39.4 a	19.2
Rn + T10	20	-0.4	2.2 d	38.4 a	38.4
Rn + TB1,2	20	0.3	2.6 d	23.3 b	35.2

^zsin considerar la raíz principal

^yen 10 trozos de raíces elegidos al azar por planta

^xmisma letra indica que no hay diferencias significativas según test LSD ($P \leq 0.05$)

El aumento de vigor observado en las plantas inoculadas sólo con el antagonista, reflejado en el peso seco de raíces, coincide con lo encontrado por otros autores (Chang *et al.*, 1986; Windham *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1990), quienes indican que este efecto puede deberse a una eliminación de patógenos menores de la rizosfera o a la existencia de un factor liberado por especies de *Trichoderma* que regule el crecimiento de las plantas. Igualmente, se confirma que esta estimulación del crecimiento es independiente del efecto del antagonista en el control de los hongos de suelo.

Por otro lado, se encontró que la densidad de inóculo de *Trichoderma* en el suelo no está siempre directamente relacionada con su acción antagonista. Así, en el caso de *P. cinnamomi*, resultó que las plantas inoculadas con el aislado del antagonista que mantuvo

niveles más bajos de inóculo (T9) fueron las que presentaron mayor peso seco de raíces. En cambio, para *R. necatrix*, las plantas inoculadas con el aislado TB1.2, que mantuvo durante todo el experimento una densidad de inóculo alta, presentaron menor aislamiento del patógeno en sus raíces.

Este trabajo pone de manifiesto que la incorporación de aislados de *Trichoderma* al suelo para el control de las podredumbres radicales del aguacate puede ser efectiva, pero que requiere de trabajos posteriores de investigación que clarifiquen los mecanismos de interacción patógeno-antagonista específicos en cada una de las enfermedades estudiadas.

LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO. 1999. Boletín de Información Agraria y Pesquera 136:19. Junta de Andalucía.
- ASKEW, D.J.; LAING, M.D. 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology* 42:686-690.
- CASALE, W. L. 1990. Analysis of suppressive soils and development of biological control methods for *Phytophthora* root rot of avocado. *California Avocado Society Yearbook* 74:53-56.
- CHANG, Y.; CHANG, Y.; BAKER, R.; KLEIFELD, O.; CHET, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70:145-148.
- DUVENHAGE, J.A.; KOTZÉ, J.M. 1993. Biocontrol of root rot of avocado seedlings. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 16: 70-72.
- FINLAY, A.R.; y McCracken, A.R. 1991. Microbial suppression of *Phytophthora cinnamomi*, pp. 383-398. *In: Phytophthora*. Lucas J. A., Hattock, R. C., Shaw, D. S., Cooke, L. R., eds., Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- FREEMAN, S.; SZTEJNBERG, A.; CHET, I. 1986. Evaluation of *Trichoderma* as a biocontrol agent for *Rosellinia necatrix*. *Plant and Soil* 94: 163-170.
- GEES, R.; y COFFEY, M.D. 1989. Evaluation of strain of *Myrothecium roridum* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 79(10): 1079-1084.
- LÓPEZ H., C.J; GARCÍA R., J.C. 1987. Survey of soil fungi associated with avocado crops in Southern Mediterranean coast of Spain (Málaga-Granada). *In: Proceedings of 7th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, 1987. Granada, Spain. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, pp.189-190.
- LÓPEZ H., C.J. 1989. Podredumbres radicales del aguacate en la Costa del Sol. Años 1987-1988, pp 172-176. *In: Estudios de Fitopatología*. J. Del moral, (ed.) S.E.F./D.G.I.E.A. Badajoz, Spain.
- MASS, E.M.C.; KOTZÉ, J.M. 1990. The effect of bacteria on root severity caused by *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 13: 65-66.
- MCLEOD, A.; LABUSCHAGNE, N.; y KOTZÉ, J.M. 1995. Evaluation of *Trichoderma* for biological control of avocado root rot in bark medium artificially infested with *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 18: 32-37.

- REEVES, R.J. 1975. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different soils and water regimes. *Soil Biology & Biochemistry* 7: 19-24.
- SOLER, A.; GRONDONA, I.; MONTERO, M.; LÓPEZ H., C.J.; LLOBELL, A.; MONTE, E. 1998. Selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas de *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* para su aplicación en cultivos de aguacate. Programa y resúmenes del IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Salamanca, España. p. 285.
- SMITH, V.L.; WILCOX, W.F.; y HARMAN, G.E. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- STIRLING, A.M.; HAYWARD, A.C.; PEGG, K.G. 1992. Evaluation of the biological control potencial of bacteria isolated from soil supressive to *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* 21(4): 133-142.
- SZTEJNBERG, A.; FREEMAN, S.; CHET, I.; KATAN, J. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and apple orchard by solarization and *Trichoderma harziarum*. *Plant Disease* 71(4): 365-369.
- WATANABE, T. 1991. Evaluation of *Sordaria* spp. as biocontrol agents against soilborne plant disease caused by *Pythium aphanidermatum* and *Dematophora necatrix*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 57(5): 680-687.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518-521.
- YASUDA, M.; KATOH, K. 1989. Characteristics of bacteria isolated from soil and roots of fruit trees. *Soil Science and Plant Nutrition* 35(4): 501-508.
- ZENTMYER, G.A.; RICHARDS, S.J. 1952. Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* to avocado trees, and the effect of irrigation on disease development. *Phytopathology* 42: 35-37.