

ANTAGONISMO *in vitro* DE *Trichoderma asperellum* CONTRA *Fusarium* sp. AGENTE CAUSAL DE GOMOSIS EN CÍTRICOS

In vitro ANTAGONISM OF *Trichoderma asperellum* AGAINST *Fusarium* sp., CAUSAL AGENT OF CITRUS GUMMOSIS

Silva-Martínez, K.L.¹; Raúl Allende-Molar, R.²; Vázquez-Luna, D.³; González-Cárdenas, J.C.¹; Murguía-González, J.^{4*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Carretera Tuxpan-Tampico Km 7.5. CP 92860. Col. Universitaria. Tuxpan Veracruz. ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) - Unidad Culiacán. Km 5.5 carretera El dorado Campo El diez CP 80110. Culiacán, Sinaloa. ³Facultad de Ingeniería en Sistemas de Producción Agropecuaria. Universidad Veracruzana. Facultad de Ingeniería en Sistemas de Producción Agropecuaria. Carretera Costera del Golfo km. 220. Col. Agrícola y Ganadera Michapan, C.P. 96100, Acayucan, Veracruz, México. ⁴Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Región Orizaba-Córdoba. Universidad Veracruzana. Peñuela Amatlán SN, Centro, 94945 Amatlán de los Reyes Veracruz, Ver.

*Autor de correspondencia: jmurguia@uv.mx

RESUMEN

En esta investigación se evaluó la capacidad antagónica de una cepa de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium* sp., identificado como un agente causal de la gomosis en *Citrus sinensis*. Se estableció un diseño completamente al azar con tres tratamientos (T1=*T. asperellum* contra *Fusarium* sp.; T2=*T. asperellum*; T3=*Fusarium* sp.) y 10 repeticiones. Los datos de antagonismo se obtuvieron mediante la técnica de cultivos duales en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA); y cada 24 horas se obtuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR). Los resultados indicaron el grado de antagonismo de *T. asperellum* (Ta15b), clasificándose en 2 y 1 de la escala de Bell, al enfrentarla contra *Fusarium* sp., el contacto entre hifas se presentó al cuarto día de haberse confrontado. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos, el PICR varió de 71% a 86.6%. *T. asperellum* mostró competencia por espacio y nutrimentos frente a *Fusarium* sp. Los resultados sugieren que el primero podría ser un biocontrol efectivo para reducir el crecimiento radial de *Fusarium* sp.

Palabras clave: Control biológico; inhibición; enfermedades en plantas; cultivos duales.

ABSTRACT

In this study, the antagonistic capacity of a strain of *Trichoderma asperellum* against *Fusarium* sp., was evaluated, which is identified as a causal agent of gummosis in *Citrus sinensis*. A completely random design was established, with three treatments (T1=*T. asperellum* versus *Fusarium* sp.; T2=*T. asperellum*; T3=*Fusarium* sp.) and 10 repetitions. The data for antagonism were obtained through the technique of dual cultures in potato dextrose agar (PDA) culture medium; and root growth inhibition percentages (RGIP) were obtained every 24 hours. The results indicated the degree of antagonism of *T. asperellum* (Ta15b), classifying it as 2 and 1 of the Bell scale, when confronting it against *Fusarium* sp.; the contact between hyphae was evident on the fourth day since being confronted. Significant differences were found ($p \leq 0.05$) between the treatments; the RGIP varied from 71% to 86.6%. *T. asperellum* showed competition over space and nutrients against *Fusarium* sp. The results suggest that the first could be an effective biocontrol to reduce the radial growth of *Fusarium* sp.

Keywords: Biological control, inhibition, plant diseases, dual cultures.

Agroproductividad: Vol. 9, Núm. 6, junio. 2016. pp: 20-25.

Recibido: febrero, 2016. **Aceptado:** abril, 2016.

INTRODUCCIÓN

La citricultura a nivel mundial, representa una oportunidad de ingresos en al menos 50 países, entre los que destacan: China, Brasil, Estados Unidos y México (FEDERCITRUS, 2015). En México, la producción de cítricos está concentrada en 549 mil hectáreas, donde se cultiva naranja (*Citrus sinensis*) (75%), limón (*Citrus sp.* (16%), mandarina (*Citrus x tangerina*) (5%) y toronja (*Citrus x paradisi*) (4%). La citricultura tiene importancia económica y social, debido a que se producen siete millones de toneladas de cítricos al año, con un valor de más de \$16,000 millones de pesos (SAGARPA-SIAP, 2014). En México, el estado de Veracruz es el principal productor con una superficie sembrada de 230 mil hectáreas, en las que se concentra el 45% de la producción total. Los cítricos son afectados por diversos factores que demeritan el valor comercial de la cosecha, incrementando costos y limitando la producción (Timmer *et al.*, 2000). Entre los factores más importantes se encuentran los problemas fitopatológico causadas por hongos debido a su persistencia y amplia distribución (Rocha-Peña y Peña, 2009). La gomosis de los cítricos es una enfermedad que puede ser ocasionada por diferentes patógenos, tales como, *Fusarium spp.*, cuya sintomatología es un exudado de goma en las ramas y en la base del tallo (Klotz, 1950). Para el control de esta enfermedad, se han propuesto diversas alternativas culturales, físicas, químicas y recientemente, mediante el uso de agentes biológicos. Tal es el caso de los organismos antagonistas, que inhiben el desarrollo de otros microorganismos, y los géneros más empleados son *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma* (Ezziymani *et al.*, 2004). Con base en lo anterior, se evaluó la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* frente a un aislado de *Fusarium sp.* proveniente de *Citrus sinensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo: Las muestras fueron tomadas de 20 árboles de 16 años de la variedad valencia (*Citrus sinensis* L.), provenientes de una huerta ubicada en el ejido La Laja de Coloman, en Tuxpan, Veracruz, México. Se seleccionaron árboles con sintomatología típica de gomosis: exudado de goma, agrietamiento, presencia de cancro y exposición de leña (Acosta-Pérez *et al.*, 2014). Con una navaja esterilizada se cortaron pequeños segmentos de tejido vegetal de 2 mm de diámetro hasta alcanzar 2 mm de tejido sano, ubicados en los primeros 60 cm de la base del tronco.

Procesamiento de la muestra. Las muestras se desinfectaron por inmersión en una solución acuosa de hipoclorito de sodio a una relación de 1:3 v/v (10 mL de cloro y 30 mL de agua destilada estéril). Las muestras se sumergieron por 30 s, inmediatamente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Cada fase de lavado fue de 60 s (Acosta-Pérez *et al.*, 2014). Se preparó el medio de cultivo Papa, Dextrosa y Agar (PDA), compuesto por 200 g de papa previamente pelada, 20 g de dextrosa (BDBioxon[®]), 15 g de agar bacteriológico (BDBioxon[®]) y 1000 mL de agua destilada, una vez mezclado se esterilizó en autoclave a una temperatura constante de 120 °C por 20 min. Posteriormente se dejó enfriar por 40 min y se vaciaron 25 mL aproximadamente en cada caja de Petri. hasta su solidificación y posteriormente se colocó un segmento de corteza infectada en cada placa con PDA.

Identificación del patógeno. La identificación del agente causal de la enfermedad se realizó mediante la observación directa de las características del micelio de la colonia y las estructuras reproductivas del hongo en medio de cultivo PDA, con la ayuda de un microscopio óptico, con los objetivos 10x y 40x, utilizando las claves taxonómicas descritas por Barnett y Hunter (1999) y Leslie y Summerell (2006).

Obtención de los microorganismos. La cepa de *Trichoderma asperellum* Ta15b fue proporcionada por AGROBIOL V&R SAC, aislada originalmente de suelos cultivados de aguacate (*Persea americana* Mill.) de la zona de El Porvenir, Perú. Mantenido en piezas pequeñas de papel con sílica gel dentro de un frasco refrigerado a 5 °C hasta su reactivación. La cepa se conservó en medio PDA a 9 °C. Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y tres tratamientos, de los cuales dos representaron los testigos (antagonista y el patógeno por separado). Los tratamientos fueron: T1=*T. asperellum* Ta15b frente a *Fusarium sp.*; T2=*T. asperellum* Ta15b; y TC=*Fusarium sp.* Se utilizaron cajas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro. Cada caja fue considerada como unidad experimental y se sembraron 10 con cada tratamiento.

Evaluación *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium sp.*

En medio PDA se colocó una pieza pequeña de papel impregnado de *Trichoderma asperellum* (Ta15b). Transcurridos nueve días, el micelio cubrió por completo la caja Petri. Caso similar para el caso de *Fusarium sp.*,

llenando por completo la caja de Petri a los 14 días después de haberse reaislado. La evaluación se realizó empleando la técnica de cultivos duales colocando en un extremo un disco (de PDA+micelio de *Fusarium* sp. de 2 mm de diámetro) y en el extremo opuesto (un disco de PDA+micelio de *T. asperellum*) a una distancia de 5 cm aproximadamente entre ellos y a 1 cm del borde. Los controles de crecimiento fueron cada una de las cepas (antagonismo y patógeno) sembradas en cajas separadas. Las cajas Petri fueron incubadas a temperatura de 26 °C a 30 °C y luz ambiente. Se hicieron mediciones cada 24 h del crecimiento radial. El antagonismo de *T. asperellum* se comprobó estudiando las siguientes variables: Actividad antagónica, basado en la escala de Bell *et al.* (1982), Radio de crecimiento del antagonista (RCA), Radio de crecimiento del patógeno (RCP), y Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), determinado por la fórmula utilizada por Ezziyani *et al.* (2004).

$$PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$$

donde $R1$ es el radio patógeno testigo y $R2$ es el radio del patógeno enfrentado con el antagonista. El análisis estadístico fue varianza (Kruskal-Wallis) y medidas comparadas por la prueba estadística R (R CoreTeam, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislamientos obtenidos presentaron crecimiento radial en 72 horas, originando colonias de color blanco cristalino, algodonoso y en algunos casos con crecimiento un poco elevado; transcurridas 96 horas, algunas colonias se tornaron de naranja a color marrón (Figura 1 A, B). Se observaron en el microscopio hifas hialinas, septadas y pálidas, a partir del octavo día se obtuvieron esporas de tipo macroconidios: ligeramente curvas en forma de canoa, con dos o tres septos transversales de 20.93 μm de largo y 3.425 μm de ancho; y microconidios escasos, hialinos con forma elipsoidal, con 7.99 μm de largo y 2.915 μm de ancho (Figura 1 C, D).

Evaluación *in vitro* de cepas de *T. asperellum* contra *Fusarium* sp.

Las observaciones macroscópicas evidenciaron la interacción antagonista-patógeno (Figura 2), todos los aislamientos duales con *T. asperellum* presentaron radios de crecimientos superiores al patógeno de *Fusarium* sp. al cuarto día de haberse sembrado. Fernández y Suarez (2009) reportan 7.42 cm de crecimiento de *T. harzianum* al décimo día confrontado al patógeno: *F. oxysporum* con un crecimiento radial de 1.99 cm, estos resultados coinciden con los presentados por Suarez *et al.* (2008)

quienes encontraron un desarrollo radial de 7.5 cm de *T. harzianum* frente a *F. solani* (1.6 cm), como los obtenidos en este trabajo. Con respecto a la variable días al primer contacto entre hifas, Michel-Aceves *et al.* (2013) reportan que aislamientos de *Trichoderma* spp., frente a *Sclerotium rolfisii* Sacc., que ejercieron contacto a los dos días de haberse sembrado en cultivos duales. En este estudio, las cepas en aislamientos duales entraron en contacto a los cuatro días de haberse sembrado, los resultados coinciden con el tiempo reportado por Ezziyani *et al.* (2004), quienes mencionan que la zona de inhibición de *T. harzianum* frente a *Phytophthora capsici* aumenta con forme transcurre el tiempo y aumenta su capacidad de destrucción sobre el micelio.

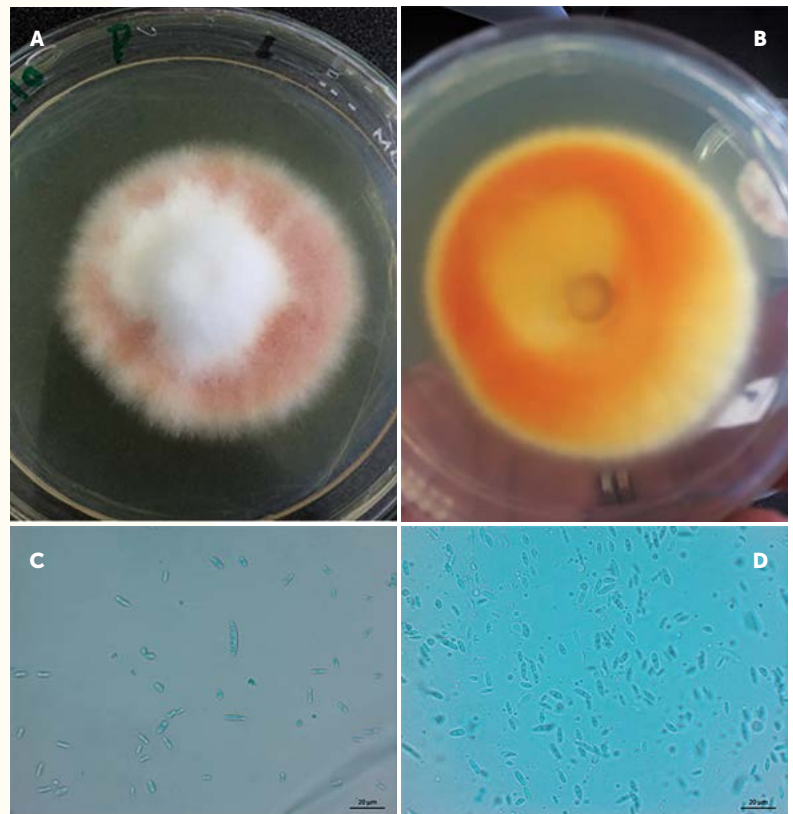


Figura 1. Aislado de *Fusarium* sp. en medios de cultivo PDA, A: vista frontal, B: vista posterior. C-D: Macro y microconidios de *Fusarium* sp. observados en microscopio óptico a 40x.

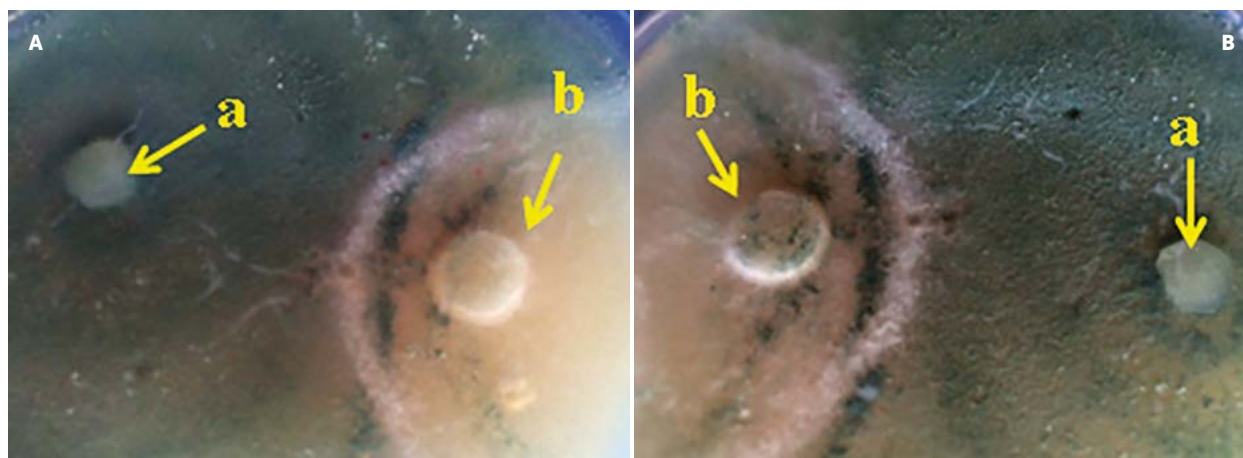


Figura 2. Inhibición del crecimiento radial del antagonista al patógeno en pruebas duales, A) Disco de micelio de *Trichoderma asperellum*, B) Disco de micelio de *Fusarium* sp.

El análisis realizado indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de inhibición obtenido en cada uno de las confrontaciones Patógeno-antagonista. Los resultados obtenidos demuestran que siete de las confrontaciones duales presentaron un PICR superior al 81%; clasificándose con un valor 2 de acuerdo a la escala de Bell *et al.* (1982), lo que representa un alto grado de inhibición (Cuadro 1) aunque sin alcanzar el grado máximo. Estos resultados son considerados con alto grado de inhibición, debido a que el antagonista tiene cualidades micoparasitarias. Guigón-López *et al.* (2010) obtuvieron porcentajes de inhibición de 5% a 14% en confrontaciones duales entre *T. asperellum* y *Fusarium* sp. lo cual pudo deberse a la producción de compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento de *Trichoderma* spp. (Rios-Velsaco *et al.*, 2015). Sin embargo, Sánchez *et al.* (2015) y Rios-Velsaco *et al.* (2015) reportan entre 40% y 43.4% de inhibición de *T. atroviride* y *T. asperellum* respectivamente, contra *F. oxysporum* sugiriendo la presencia de compuestos bioactivos. Fernández y Suárez (2009) indicaron que *T. harzianum* produce el mayor PICR a los 10 días, con

valores superiores a 64% confrontado con *F. oxysporum*; sin embargo, Infante *et al.* (2011) indican que *T. asperellum* inhibe de 80% a 100% a *F. oxysporum*, estos resultados coinciden con los obtenidos por Martínez *et al.* (2013) quienes informan que *T. asperellum* inhibe el crecimiento de *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm en más de 75%, de forma semejante a los registrados en esta investigación. *Trichoderma* spp. ejerce un meca-

nismo de acción antagonica mediante la secreción de proteínas extracelulares (Cheng *et al.*, 2012). Lo anterior, coloca a *T. asperellum* en un grado 2 y 1 en la escala de Bell *et al.* (1982), y son cifras similares a las presentadas en este ensayo.

Al compararse el RCP con el RCA, se observó que el crecimiento radial del patógeno fue lento, alcanzando un promedio de 0.955 cm a

los nueve días en comparación del T3, que en el mismo tiempo alcanzó un crecimiento de 7.68 cm (Cuadro 2).

La evaluación estadística ($p \leq 0.05$), mostró diferencias significativas entre las pruebas duales, donde se detectaron variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *T. asperellum* sobre la esporulación de *Fusarium* sp. (Figura 3).

Cuadro 1. Escala de antagonismo *in vitro* para *Trichoderma* spp. (Bell *et al.*, 1982).

Grados de la Escala	Características de cada grado de la escala
Grado 1	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
Grado 2	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
Grado 3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo
Grado 4	El patógeno crece al menos en dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
Grado 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo

Cuadro 2. Crecimiento micelial, porcentaje de inhibición y grado de antagonismo de *T. asperellum* y *Fusarium* sp. en cultivos duales.

<i>T. asperellum</i> Ta15b frente <i>Fusarium</i> sp. FUV19C (cm)	^a RCA (cm) <i>T. asperellum</i>	^b RCP (cm) <i>Fusarium</i> sp.	^c PICR (%)	Antagonismo clase
7.5 - 1.2	8.22	7.94	73.33 e	2
7.5 - 1.3	8.13	7.86	71.11 f	2
7.5 - 0.8	8.32	7.72	82.22 c	1
7.5 - 0.85	8.32	7.7	81.11 c	1
7.5 - 0.6	8.39	7.5	86.67 a	1
7.5 - 1	8.28	7.7	77.78 d	1
7.5 - 0.6	8.18	7.5	86.52 a	1
7.5 - 1.2	8.14	7.54	72.73 e	2
7.5 - 1.3	8.07	7.68	71.11 f	2
7.5 - 0.7	8.16	7.58	84.09 b	1

a=Radio del crecimiento del antagonico, b=Radio del crecimiento del patogeno, c=Porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

CONCLUSIONES

T. asperellum mostró antagonismo *in vitro* frente al crecimiento de *Fusarium* sp., por lo que el uso de *T. asperellum* puede ser efectivo en reducir daños de gomosis en cítricos.

AGRADECIMIENTOS

A la M. Sc. Fanny I. Varela Rodríguez y al Tc. Jorge L. Huamanchumo Neyra por la donación de *Trichoderma asperellum*, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ConacyT) por el financiamiento a los estudios de Silva-Martínez.

LITERATURA CITADA

Acosta-Pérez J.A., Ortiz-García C.F., Zaldívar-Cruz J.M., Rodríguez-Cuevas M., Bautista-Muñoz C.C., De la Cruz Castillo-Aguilar C. 2014. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 28(3): 245-258.

Barnett H.L., Hunter B.B. 1999. *Illustrated General of Imperfect Fungi*, 4th edition, Burgess Publishing Company, Minnesota, EE. UU. 218 p.

Bell D., Well H., Markham C. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.

Cheng, C.H., Yang, C.A., Peng K.C. 2012. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology*, 102(11): 1054-1063.

Ezziyyani M., Sánchez C.P., Requena M.E., Rubio L., Castillo M.E.C. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. In *Anales de Biología*. 26: 61-68.

Fernández B. R., Suárez M.C. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum*

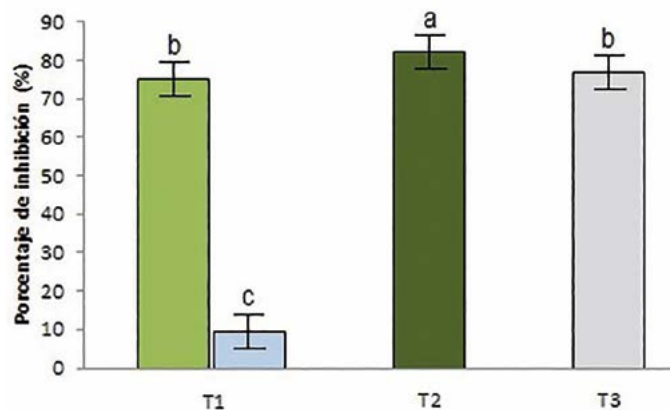


Figura 3. Efecto de tratamientos sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento radial entre *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium* sp. T1=*T. asperellum*-Ta15b frente *Fusarium* sp, T2=*T. asperellum* Ta15b, y T3=*Fusarium* sp. (Medias con letras iguales estadísticamente no difieren entre sí, con la prueba de medias de Tuckey $\alpha=0.05$)

Sch. f.sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 62: 4743-4748.

FEDERCITRUS. 2015. La actividad citrícola Argentina. Federación Argentina del Citrus. Informa Sector Citrícola. Sistemas productivos regionales-CFI. 4 p. http://www.feder citrus.org/noticias/upload/informes/La_Actividad_Citrícola_2015.pdf. Fecha de consulta 2 de enero de 2016.

Guigón-López C., Guerrero-Prieto V., Vargas-Albores F., Carvajal-Millán E., Ávila-Quezada G.D., Bravo-Luna L., Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2): 87-96.

Infante D., González N., Reyes Y., Martínez B. 2011. Evaluación de la efectividad de doce cepas de *Trichoderma asperellum*

- Samuels sobre tres fitopatógenos en condiciones de campo. *Revista de Protección Vegetal*, 26(3): 194-197.
- Klotz L.J. 1950. Gum diseases of *Citrus* in California. Circular. California Agricultural Experiment Station. 396 p.
- Leslie J.F., Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Oxford (England). 387 p.
- Martínez B., Pérez J., Infante D., Duarte Y., Moreno M. 2013. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Revista de Protección Vegetal*, 28(3): 192-198.
- Michel-Aceves A.C., Otero-Sánchez M.A., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A., Alarcón-Cruz N. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 17(3): 89-107.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org>.
- Rios-Velsaco C., Caro-Cisneros J., Berlanga-Reyes D., Ruiz-Cisneros M.F., Ornelas-Paz J., Salas-Marina M., Guerrero-Prieto V. 2015. Identificación y actividad antagónica in vitro de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1): 84-99.
- Rocha-Peña M.A. Padrón-Chávez J.E. 2009. El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León. Libro científico. 325-328 pp.
- Rocha-Peña M.A., Peña del Río M.A. 2009. Prevención y manejo de enfermedades de cítricos. En: Rocha-Peña, M.A., y Padrón-Chávez, J.E. (eds). *EL cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León*. Libro Científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CIRNE. Campo Experimental General Terán. México. 324-356 pp.
- SAGARPA-SIAP 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola. http://reportes.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp. Fecha de consulta 15 de enero del 2016
- Sánchez A.D., Barrera V., Reybet G.E., Sosa M.C. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del "mal de almácigos" en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(1): 61-70.
- Suárez M.C.L., Fernández B.R.J., Osvaldo V.N, Gámez C.R.M., Páez R.A.R. 2008. Antagonism *in vitro* of *Trichoderma harzianum* Rifai on *Fusarium solani* (Mart.) associated with the wilt in maracuyá. *Rev. Colomb. Biotecnol.* X(2): 35-43.
- Sanmartín N.P., López X., Rueda E.A. 2012. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga* 2: 1-21.
- Timmer L.W., Garnsey S.M., Graham J.H. 2000. *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

