



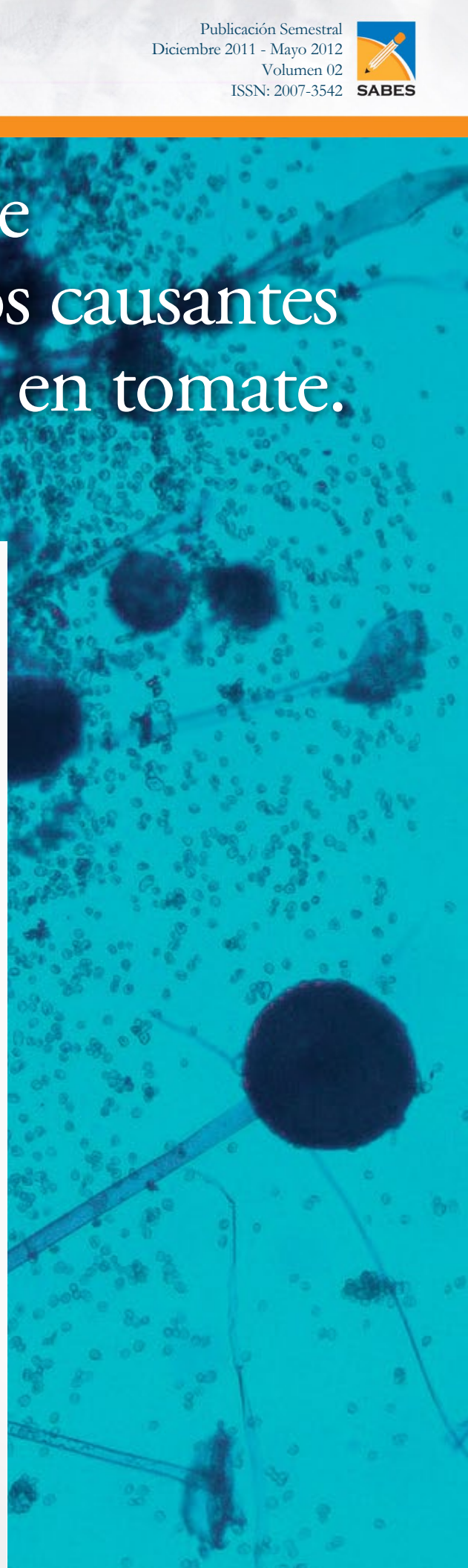
Búsqueda de cepas de Antagonistas a hongos causantes de marchitez vascular en tomate.

**Dra. Rufina Hernández Martínez
Edelweiss Airam Rangel Montoya**

Centro de Investigación Científica
de Educación Superior de Ensenada
Universidad Autónoma De Coahuila

Para evaluar el potencial de biocontrol de diferentes cepas de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae*, aisladas de plantas de tomate con síntomas de marchitez vascular, se llevaron a cabo ensayos de competencia *in vitro*. Para las cepas de *Fusarium*, los ensayos se realizaron por enfrentamiento dual en caja de Petri inoculando ambos hongos al mismo tiempo. Para *Verticillium spp.*, debido a su lento crecimiento, el patógeno se inoculó por dilución en cajas de Petri con medio PDA y 24 horas después se procedió a la siembra de las cepas de *Trichoderma spp.* Los hongos se dejaron crecer durante 7 días a 28°C.

De todas las cepas de *Trichoderma* probadas, la I6 fue la que presentó mayor capacidad antagonista contra ambos patógenos; y la cepa que menor efecto inhibitorio presentó fue L5.





Estos resultados indican el potencial de la cepa de *Trichoderma* I6 para usarse en el biocontrol de la marchitez vascular del tomate causada por *Fusarium* y *Verticillium*.



INTRODUCCIÓN

El tomate cultivado (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, por el gran número de productos que se obtienen de él. La marchitez vascular, causada por especies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y/o *Verticillium dahliae* es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo, disminuyendo en un 60% el rendimiento y afectando la calidad del producto (Ascencio-Álvarez et al., 2007). La marchitez puede aparecer en cualquier época, siempre que las condiciones le sean favorables (Solórzano y Ramírez, 2004)

El control de estos patógenos es difícil debido a su crecimiento endófito y a su persistencia en el suelo. Los métodos más utilizados para su control son la desinfección del suelo con biocidas y el uso de plantas resistentes. Durante los últimos 25 años se viene investigando intensivamente la utilidad de diversos microorganismos para el control biológico de hongos fitopatógenos, dentro de los cuales, las especies de *Trichoderma* han sido los más ampliamente estudiados. *Trichoderma* es un hongo imperfecto perteneciente a la subdivisión Deuteromicete que se caracteriza por no presentar un estado sexual determinado.

Las especies de *Trichoderma* son los microorganismos que con más frecuencia se aíslan en los suelos agrícolas. Este hongo oportunista establece simbiosis avirulentas con la planta, actuando en ciertos casos como antagonista de hongos y bacterias fitopatógenas, invertebrados (insectos y nematodos) e incluso malas hierbas (Sarro et al., 2011). La capacidad antagonista de *Trichoderma* sobre diversos hongos es ampliamente conocida, su modo de acción es mediante hiperparasitismo (producción de enzimas líticas como proteinasas y quitinasas), antibiosis (secreción de metabolitos secundarios como trichodermina, gliovirina y gliotoxina), y/o competencia (por el espacio, substrato y factores de crecimiento) (Michel et al., 2009). El objetivo de este trabajo evaluar el efecto inhibitorio de cepas de *Trichoderma* nativas de Baja California hacia cepas de *Fusarium* y *Verticillium* aislados en plantas de tomate.

Palabras
clave

Fusarium . *Verticillium*
Antagonismo . Biocontrol



Materiales y métodos

Aislamiento y obtención de Cultivos Monospóricos.

El aislamiento de los microorganismos se hizo en medio de cultivo de papa dextrosa (PDA). *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, cepas M3V1 y M2L y *Verticillium dahliae* cepas V1 y V2, fueron obtenidos de plantas de tomate con síntomas de marchitez y caracterizados morfológicamente. Las cepas de *Trichoderma* T2, T3, T4, T5 T6 y L5 fueron aisladas de madera de vid, mientras que las cepas I6, Toro y Twins de rizosfera de plantas de clavel. La cepa de *T. harzianum* fue obtenida del cepario del departamento de microbiología del CICESE.

Para tener una colección confiable de microorganismos fue necesario partir de aislamientos monospóricos, para ello se tomó con un palillo estéril, esporas de cada cepa y se hizo una suspensión en 500 μ l de agua destilada estéril. De cada suspensión se tomaron 50 μ l para hacer una dilución en placa sobre medio de cultivo PDA. Se incubó a 28 °C por 24 h, posteriores a las cuales se observó el crecimiento bajo un microscopio estereoscopio, se buscó una espora individual y con la ayuda de una aguja entomológica, ésta se pasó a medio PDA fresco. Las cajas se incubaron a 28°C durante 24 h.

Suspensión y Concentración de Esporas

Para la realización de los ensayos se hizo primero una suspensión de [X], con una Cámara de Neubauer se contaron las esporas y utilizando la fórmula: Concentración de esporas = (# de esporas) (5) (Factor de Dilución) (Profundidad) se determinó la concentración inicial para posteriormente ajustar a una concentración de 1×10^5 esporas/ml.



Ensayos de Competencia de Trichoderma vs Patógenos.

Para el enfrentamiento dual de Fusarium con Trichoderma, se inocularon placas con PDA casero, preparado con el caldo de 200g de papas peladas y hervidas; 10g de sacarosa y 15 g de Agar. Se colocó un disco micelial de Fusarium en uno de los extremos de la caja y en el otro extremo un disco de Trichoderma. Se inocularon placas control con sólo los patógenos y placas control con sólo el antagonista. El ensayo consistió en 2 cepas de Fusarium con 4 repeticiones cada una. Las cajas se evaluaron periódicamente y a los 7 días se evaluó el porcentaje de inhibición, usando la ecuación siguiente (Royse y Ries, 1978):

$$\% \text{Inhibición} = \left(\frac{r_1 - r_2}{r_1} \right) (100)$$

Donde:

r_1 = distancia máxima alcanzada por el patógeno (cm) siete días después de la inoculación.

r_2 = distancia mínima alcanzada por el patógeno (cm) siete días después de la inoculación.

Para la evaluación de inhibición de Verticillium por cepas de Trichoderma y debido a que el crecimiento de este hongo es muy lento, se utilizó el método de dilución en placa como sigue. Se inocularon placas con PDA casero con una suspensión 10^5 esporas/ml de Verticillium, después de 24 h y para dar lugar a que Verticillium iniciara su crecimiento se colocó en el centro un disco del antagonista Trichoderma. De la misma forma se inocularon placas control con sólo Verticillium y placas control con sólo el antagonista. El ensayo consistió en 2 cepas de Verticillium con 4 repeticiones cada una. Se revisaron las cajas a los 3, 6 y 7 días. En cada tiempo sólo se revisó visualmente la inhibición por Trichoderma.

Análisis estadístico.

Los porcentajes de inhibición obtenidos se transformaron mediante la fórmula $\sqrt{X+0.5}$ y cada uno de los ensayos se sometió a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Fisher (LSD) con un intervalo de confianza de 95 %.



Resultados y Discusión

Enfrentamiento dual de Fusarium y Trichoderma.

Los enfrentamientos duales entre las cepas de Fusarium y Trichoderma dieron como resultado una clara inhibición del crecimiento de la cepa M3V1 ($F_{cal.}=29.053$; $P 0.0001$) y de la cepa M2L3 ($F_{cal.}=18.803$; $P 0.0001$) de Fusarium por todas las diferentes cepas de Trichoderma comparadas con el control. Sin embargo, la cepa I6 fue la que mostró el mayor porcentaje de inhibición, seguida por la cepa T5 y la T6. El resto de las cepas mostraron porcentajes de inhibición por abajo del 50%. La cepa con menor capacidad antagonista fue la Trichoderma L5 (Tabla 1). Los valores de inhibición obtenidos para I6 fueron inferiores a los obtenidos en otros trabajos que reportaron un porcentaje de inhibición de 77.8%, para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Esto puede deberse a que ninguna de las cepas provenía de rizósfera de tomate.

F. oxysporum f. sp. Lycopersici M3V1		F. oxysporum f. sp. Lycopersici	
Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
I6 ^y	65.48a ^z	I6	63.35a ^z
T5	60.29b	T5	52.58b
T6	59.30b	T3	52.15b
T3	49.82c	T6	50.96bc
T. atroviridae	49.76c	Toro	50.00bc
Toro	47.13cd	Twins	47.90cd
Twins	46.88cd	T. atroviridae	46.00d
L5	43.55d	L5	41.84e
control	0.00e	control	0.00f

^y Tratamiento seleccionado para ambos patógenos.

^z Medias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

Tabla 1.
Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de dos cepas de *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* a los 5 días, por cepas de *Trichoderma* spp.

Enfrentamiento dual de Fusarium y Trichoderma.

Aunque no fue posible evaluar el porcentaje de inhibición, los enfrentamientos por dilución en placa entre las cepas de *Verticillium* y *Trichoderma* dieron como resultado una clara inhibición del crecimiento de *Verticillium* por parte de varias cepas de *Trichoderma*, como se



puede observar en la figura 2. La cepa de Trichoderma I6 nuevamente fue la que presentó mayor efecto antagonista sobre la cepa de Verticillium. Mientras que la cepa de Trichoderma L5 también fue la que presentó menor actividad inhibitoria. El orden de inhibición observado de las cepas de Trichoderma sobre Verticillium fue el siguiente: I6 > T6 > T3 > Toro > Twins > T. atroviridae > L5. Estos resultados demuestran el uso potencial de algunas de estas cepas de Trichoderma para controlar Verticillium.

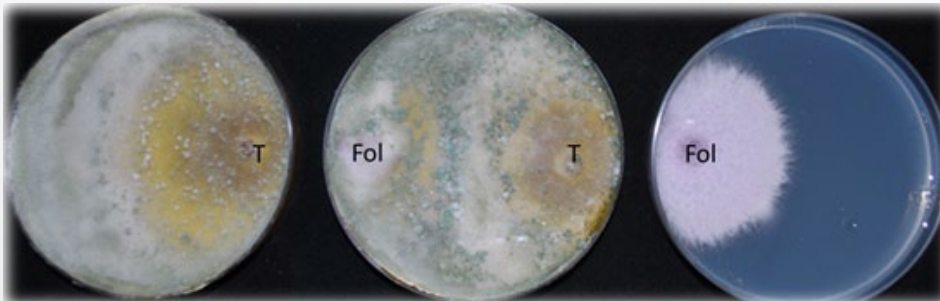


Figura 1.
Ensayo de competencia de
F. oxysporum f. sp. lycopersici V1 (Fol)
por Trichoderma sp. I6 (T).



Figura 2.
Inhibición del crecimiento
de Verticillium dahliae V2
por Trichoderma spp. Toro.



Conclusiones

La evaluación de Trichoderma como antagonista en el biocontrol de Fusarium y Verticillium causantes de la marchitez vascular del tomate resultó en una clara inhibición de todos los patógenos por diferentes cepas de Trichoderma. La cepa I6 fue la que mayor porcentaje de inhibición presentó en los enfrentamientos duales con Fusarium con un valor arriba del 63%. Otras cepas que también presentaron un alto efecto inhibitorio fueron las Trichodermas T5 y T6. Lo mismo fue válido para los ensayos con Verticillium. Por lo cual, las cepas I6, T6 y T3 fueron las que presentaron mayor capacidad antagonista. Estos resultados indican que se tienen cepas de Trichoderma que pueden ser agentes potenciales en el biocontrol de la marchitez vascular de tomate.

Dra. Rufina Hernández Martínez

Estancia Posdoctoral en Bacteriología. Universidad de California, Riverside, 2005-2007.
Doctorado en Fitopatología. Universidad de California, Riverside, 2005.

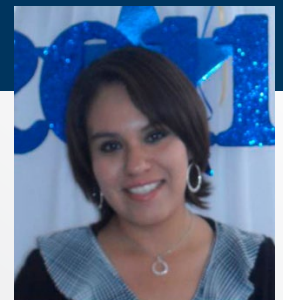
Centro de Investigación Científica de Educación Superior de Ensenada.

Departamento de microbiología. Investigación en microbiología, biotecnología y fitopatología.



Edelweiss Airam Rangel Montoya

Estudiante de Ing. Bioquímico escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.





BIBLIOGRAFÍA

Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Alfredo Rodríguez-Herrera, S., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F. y Gámez-Vázquez A. J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 114-120.

Michel, A., Otero, M., Rebolledo, O., Lezama, R. 2009. Producción y Actividad antibiótica del 6 pentil- α -pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium*. *Revista mexicana de fitopatología* 22:14-21.

Royse ,D. J. y Ries S. M. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Pyhtopathology* 68: 603-607.

Sarro, Á., Lara, J., Fernández, C. 2011. Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEEP TL0601 frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Futureco Bioscience* SL 1:1-5.

Solórzano, O., Ramírez, M. 2004. Manejo integrado de plagas y enfermedades del tomate Comité de Innovación Tecnológica 10: 1-20.