

**CONTROL IN VITRO DE *Trichoderma harzianum* CONTRA *Elsinoe* sp. CAUSANTE
DE LA SARNA EN CÍTRICOS**

**CONTROL IN VITRO OF *Trichoderma harzianum* CONTRA *Elsinoe* sp. CAUSE OF
SNAIL IN CITRUS**

Julio C. González-Cárdenas¹, José M. Escobar-Castro¹, Miguel A. González-Cadenas¹,
Quirino Hernández-Santiago², Karla L. Silva-Martínez^{2,*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Carrera Tuxpan-Tampico km 7.5 CP 92860. Col. Universitaria Tuxpan, Veracruz. ²*Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Desv. Lindero Tametate s/n Col La morita. CP 92100. Tantoyuca, Veracruz.*klsilmzt@msn.com

Resumen

Se determinó la efectividad de *Trichoderma harzianum* frente a *Elsinoe* sp. mediante cultivos duales, se utilizaron 10 aislamientos de *T. harzianum* y 10 aislamientos del patógeno colectados de plantas jóvenes de *Citrus sinensis*. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, bajo los siguientes indicadores: velocidad de crecimiento de *T. harzianum* y *Elsinoe* sp. porcentaje de inhibición de crecimiento y, la actividad antagónica en cultivos duales basado en la escala de Bell *et al.*, (1982). Los resultados obtenidos demostraron que la cepa evaluada de *T. harzianum* inhibió en un 100 % los aislamientos de *Elsinoe* sp. El tiempo en qué cubrió *T. harzianum* a *Elsinoe* sp. fue a las 72 horas y el resto a las 144 horas, basado en la escala antes mencionada los enfrentamientos se posicionaron en 1 y 2 de manera correspondientes. Al realizar la evaluación estadística ($p \leq 0,05$), y comparando los resultados de la pruebas duales con respecto a los controles, los tratamientos evaluados mostraron diferencias significativas, donde se pudo detectar variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *T. harzianum* sobre el crecimiento de *Elsinoe* sp.

Palabras clave: Antagonismo, inhibición, *Trichoderma*, *Elsinoe*

Abstract

It was tested the effectiveness *Trichoderma harzianum* against *Elsinoe* sp. by means of dual cultures, 10 isolates of *T. harzianum* and 10 isolates of the pathogen collected from young plants of *Citrus sinensis* were used. A completely randomized design was used, with the following indicators: growth rate of *T. harzianum* and *Elsinoe* sp. percentage of growth inhibition and the antagonistic activity in dual cultures based on the scale of Bell et al., (1982). The results obtained showed that the evaluated *T. harzianum* strain inhibited the isolates of *Elsinoe* sp. The length of time *T. harzianum* covered *Elsinoe* sp. was at 72 hours and the rest at 144 hours, based on the aforementioned scale the confrontations were positioned at 1 and 2 correspondingly. In the statistical evaluation ($p \leq 0.05$), and comparing the results of the dual tests with respect to the controls, the evaluated treatments showed significant differences, where it was possible to detect variations in the inhibitory effect exerted by *T. harzianum* on the Growth of *Elsinoe* sp.

Key Words: Antagonism, inhibition, Trichoderma, Elsinoe

Introducción

Los cítricos, en especial naranjas y limones, son considerados los frutales de mayor importancia a nivel mundial, derivado a su consumo, a la cantidad de divisas que genera por su exportación, así como por el amplio mercado interno debido a su industrialización, producción y comercialización. De acuerdo a lo reportado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2014) la producción nacional de naranja en el año 2012 fue de 3,666,789 toneladas, siendo el Estado de Veracruz el que aporta el 48.8% de la producción total con 1,789,224 t, de lo cual 68,200 t corresponden al municipio de Tuxpan, siendo uno de los municipios de mayor producción ocupando el noveno lugar en el estado. Diversas enfermedades causadas por agentes bióticos y abióticos, afectan el rendimiento e incluso las posibilidades de supervivencia de los cítricos (Timmer et al., 2000). La roña de los cítricos, es una enfermedad de etiología fungosa que ataca al follaje, tallo y frutos, es causado por *Elsinoe* sp. y se encuentra en todas las zonas citrícolas húmedas del mundo. Para el control de esta enfermedad, lo más común ha sido utilizado el control químico con productos fungicidas como Captafol, Benomilo,

Carbendazim y cobre entre otros (Timmer *et al.*, 2000). Sin embargo, en los últimos tiempos ha tomado gran importancia el tema de inocuidad alimentaria en donde la prioridad de esto es la utilización mínima de agroquímicos, si a esto adherimos la contaminación que tienen estos productos químicos a la naturaleza, a los frutos y a la fungoresistencia, su importancia se eleva más, es por ello que una de las alternativas que podría ser viables es la de utilizar agentes de biocontrol, estos agentes han sido utilizado en gran medida para patógenos del suelo, sin embargo, existen trabajos donde relacionan al hongo *Trichoderma harzianum* como antagonista potencial de patógenos que atacan al follaje, como es el hongo *Elsinöe* sp. considerando estos principios, el presente trabajo lleva esa finalidad.

Materiales y métodos

Área de estudio. La investigación se realizó en el Laboratorio de Parasitología Agrícola de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias perteneciente a la Universidad Veracruzana, localizada en la carretera Tuxpan-Tampico Km. 7.5 en la ciudad de Tuxpan, Veracruz.

Colecta de muestras de plantas con sintomatología. El material enfermo se colectó en el Rancho el Nilo, propiedad del Sr. José Clemente Salman Rocha productor cooperante de la Asociación Agrícola Local de Productores de Cítricos del municipio de Tuxpan, que se encuentra ubicado en la congregación de Frijolillo. Se colectaron hojas, tallos y ramas con las características propias de la enfermedad que consiste en, aparición de protuberancias de aspecto corchoso sobre la las hojas y tallo. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Parasitología Agrícola para su procesamiento.

Aislamiento y purificación del hongo *Elsinoe* sp. Para el aislamiento del patógeno, se cortaron pedazos de la hoja de 5 x 10 mm aproximadamente, estos tejidos se desinfectaron externamente por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 6 % por 60 segundos, inmediatamente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, una vez pasado este tiempo, se eliminó el exceso de agua depositando en papel filtro estéril. Una vez que los tejidos se encontraron desinfectados, estos fueron colocados en cajas Petri con medio de cultivo a base de Papa-Dextrosa-Agra (PDA) colocando dos pedazos de tejidos infectados por caja y fueron incubados a temperatura ambiente del laboratorio

para el crecimiento del hongo. Una vez sembrado los tejidos en el medio de cultivo, se realizaron revisiones cada 24 horas con la finalidad de observar el crecimiento del hongo *Elsinoe* sp. Y que no existieran contaminantes alguno de bacterias o de otros hongos no deseados, para ciertos casos de contaminación, estos fueron removidos de las cajas con la ayuda de una aguja de disección.

Obtención de la Cepa de *Trichoderma harzianum*. Para la obtención de la cepa de *T. harzianum* esta fue proporcionada por el banco de cepas del Laboratorio de Control Biológico de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias ubicado en la Carretera Tuxpan-Tampico Km. 7.5. Del proyecto de investigación titulado “Identificación de hongos fitopatógenos causantes de la gomosis en *Citrus sinensis* y su control biológico mediante cepas nativas de *Trichoderma* spp”

Pruebas de antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* vs *Elsinoe* sp.

Se utilizó la técnica de cultivos duales de Cherif y Benhamou (1990). En cajas Petri con PDA, para cada tratamiento que consiste en depositar en un extremo de la caja un disco de cinco mm de diámetro con micelio activo de colonias fungosas de 10 días de edad de *Elsinoe* sp. y de *T. harzianum*. Se tomaron lecturas cada 24 horas para determinar el número de días al primer contacto entre las hifas del antagonista y el fitopatógeno, así como el comportamiento en general, midiendo el crecimiento de ambas colonias y el diámetro de la zona de traslape.

Diseño Experimental. Para esta prueba se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos y diez réplicas por tratamiento, teniendo en cuenta que cada caja de Petri con el hongo una unidad experimental, considerando la colonia de crecimiento como unidad de estudio, donde la causa de variación fue el desarrollo inhibitorio. Los datos se sometieron a una prueba de normalidad de acuerdo con la prueba de Shapiro Wilk, posteriormente se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con la ayuda del paquete estadístico R (R Core Team, 2015).

Descripción de los tratamientos. Se utilizaron cajas de Petri de vidrio de tamaño estándar (9 cm de diámetro), se sembraron 10 con medio + micelio de *Elsinoe* sp, 10 con medio + micelio de *T. harzianum* y 10 más con ambos hongos, colocados de frente con una separación de 3.5 cm dentro de la caja de Petri, los tratamientos se describen a continuación: T1 = Micelio de 2 mm de diámetro de *T. harzianum*, frente a micelio de 2

mm de diámetro de *Elsinoe* sp., T2 = Micelio de 2 mm de diámetro de *T. harzianum*., T3 = Micelio de 2 mm de diámetro de *Elsinoe* sp. Las variables a considerar: Crecimiento micelial en cm de *Elsinoe* sp. Se midió el desarrollo micelial de manera lineal cada 24 horas a partir de las 48 horas, de haberse sembrado, con la ayuda de un vernier, hasta que cubrió completamente la caja.

- Crecimiento micelial en cm de *T. harzianum*. Se utilizó un vernier para medir el crecimiento micelial de forma lineal, cada 24 horas a partir de las 48 horas de haberse sembrado.
- Actividad antagónica con base a la escala de Bell *et al.* (1982). La actividad antagónica con base a la escala: Bell *et al.* (1982).

Tabla 1. Escala para la evaluación *in vitro* de la actividad antagonista de *Trichoderma* spp.

Valor	Descripción
1	El patógeno crece en toda la caja deteniendo a <i>Trichoderma</i> .
2	El patógeno crece más del 75% entremezclándose con <i>Trichoderma</i> e inhibiéndolo.
3	El patógeno y <i>Trichoderma</i> crecen 50% deteniendo ambos su crecimiento.
4	<i>Trichoderma</i> sobrecrece al patógeno inhibiéndolo y ocupando el 75% de la caja.
5	<i>Trichoderma</i> sobrecrece al patógeno ocupando el 100% de la caja.

Fuente: Bell *et al.* (1982).

- Inhibición del crecimiento del fitopatógeno en porcentaje. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) se utilizó la siguiente fórmula (Ezziyyani *et al.*, 2005): PICR = (R1 – R2)/R1 x 100. Dónde: R1= es el radio del patógeno testigo y, R2= es el radio del patógeno.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba Wilcoxon Rank sums y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico R (R Core Team, 2015).

Resultados y discusión

Aislamiento y descripción del desarrollo de *Elsinoe* sp. Se colectaron tejidos de plantas jóvenes de cítricos con síntomas de la enfermedad. Cada uno de los aislados obtenidos fueron presentando coloración blanca al inicio tornándose hacia un color grisáceo, extendiéndose ligeramente sobre el medio de forma circular, compacta, radial y plana. Desarrollándose de manera uniforme y con características muy similares. Relacionado al tiempo de crecimiento, este inició a partir de 48 horas, siendo 144 horas cuando se cubrió

totalmente la caja Petri a temperatura ambiente, como se puede apreciar en la figura 1, estos resultados coinciden con los mencionados por Ezziyyani *et al.*, (2004) aunque ellos mencionan además una coloración vinácea y grisácea en algunos casos, mientras que Fernández y Suárez (2009), lo describe con una coloración con tintes oscuros, pero que esta coloración dependía mucho del medio de cultivo donde se sembrara y que no lo consideró como una característica propia para la identificación.

Pruebas de antagonismo *in vitro* en medio de cultivo PDA una vez obtenido los dos hongos. Se observó y se midió el desarrollo micelial y la tendencia de la capacidad de inhibición de crecimiento cada 24 horas a partir de las 48 horas de haberse sembrado en medio nutritivo papa-dextrosa-agar. El tiempo que tardó el hongo *T. harzianum* y *Elsinoe* sp. Mostraron contacto entre ellos fuer a los cuatro días, presentando un cubrimiento total de *T. harzianum* sobre *E. spp.* a los seis días mostrando una inhibición entre ellos, estos resultados difieren en 24 horas con los reportados por, Daljeet *et al.*, (2000), ellos al utilizar cinco antagonistas contra el hongo *Elsinoe* sp. entre ellos *T. harzianum*, *T. viride*, *T. ressei*, *T. koningii* y *Epicoccum purpurascens* con la técnica dual como la utilizada en nuestro trabajo encontraron que *Trichoderma harzianum* fue el antagonista que mostró un alto micoparasitismo sobre *Elsinoe* sp. donde este hongo cubrió totalmente el micelio, causando lysis después de 7 días de la inoculación. Cabe hacer mención que *T. harzianum* mostró una eficacia importante sobre *Elsinoe* sp. en este trabajo como se observa en la figura 1.

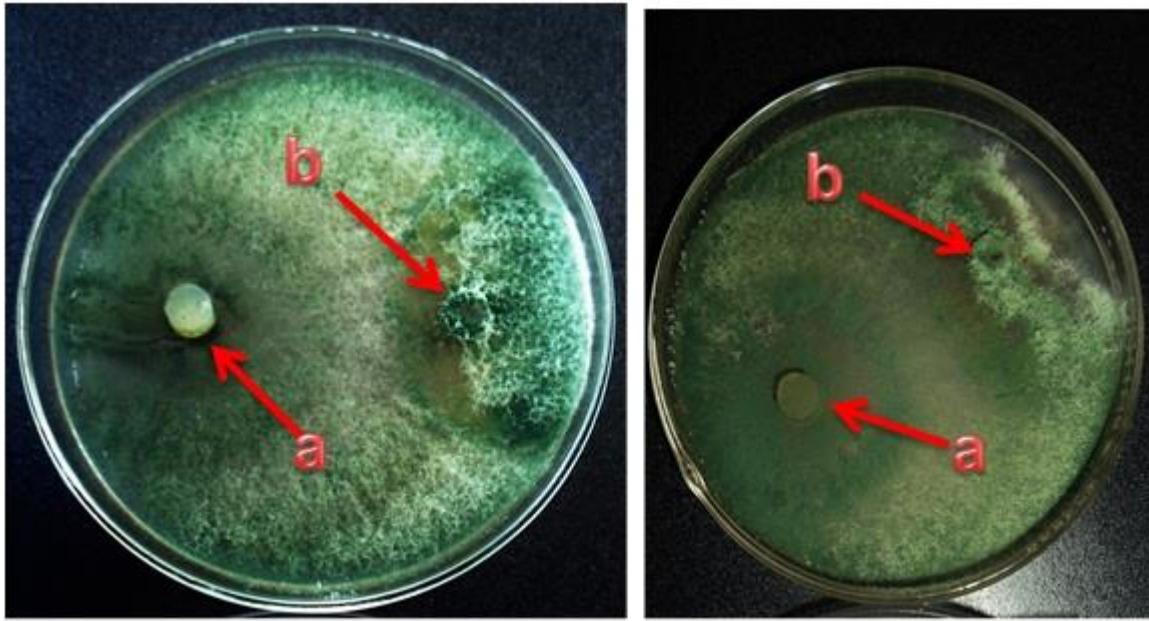


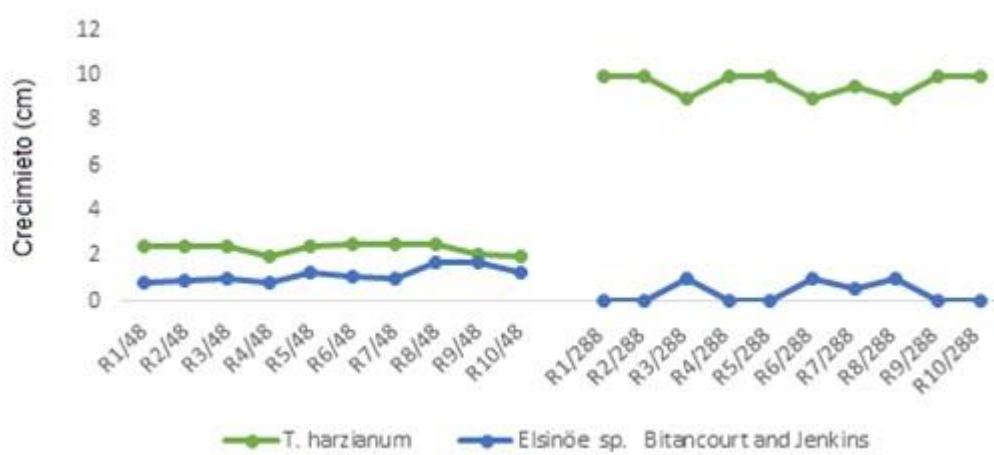
Figura 1. Pruebas duales a) disco de micelio de *T. harzianum* b) disco de micelio de *Elsinoe* sp.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de acuerdo a Ezziyyani *et al.*, (2005) y la escala del grado de inhibición de Bell *et al.*, (1982). (Letras iguales no existen diferencias entre los tratamientos)

<i>Trichoderma harzianum</i> (cm)	<i>Elsinoe</i> sp. (cm)	PICR (%)	Valor
7 a	0	100	1
7 a	0	100	1
6 ab	0.3	90	2
7 a	0	100	1
7 a	0	100	1
4.5 b	1	90	2
6.5 ab	0.2	95	2
6.2 ab	0.1	90	2
7 a	0	100	1
7 a	0	100	1

Los resultados obtenidos en la evaluación estadística ($p \leq 0.05$) mostraron diferencias significativas con respecto a los controles y las pruebas duales donde se observó variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *T. harzianum* sobre el crecimiento micelial de *Elsinoe* sp. Los resultados anteriores muestran que *T. harzianum* frente a *E. australis* inhibe de manera rápida y eficaz cubriendo al 100% a *Elsinoe* sp. En 6 días, clasificándose en la escala 1 y 2 de acuerdo a la escala de Bell *et al.*, (1982) los resultados obtenidos en el trabajo difieren por 24 horas los reportados por Hyun *et al.*, (2001) donde ellos de acuerdo a la misma escala reportan una

inhibición a los 7 días, teniendo más del 90% de inhibición colocando a estos en clase 1 y 2. No existe información o es muy nula refiriéndose al control *in vitro* de *Elsinoe* sp. En un estudio similar realizado por Susanto *et al.*, (2005) donde los resultados que ellos obtuvieron con *T. harzianum* presentaron una capacidad de inhibición del 97.8 % en cultivos duales con este hongo *Drechslera triticirepentis*. Hermosa *et al.* (2012) mencionan que el hongo *T. harzianum* presenta una actividad potencial de biocontrol en cultivos duales existen varios estudios en cultivos duales contra hongos fitopatógenos como los hongos *Phoma betae*, *Rosellinia necatrix*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxyporum* f. sp. *dianthia*.



Conclusiones

Los aislamientos utilizados de *T. harzianum* presentaron una capacidad de inhibición favorable por competencia de nutrientes y espacio, ya que crecen rápidamente, superando el crecimiento de *Elsinoe* spp.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Juan Manuel Pech Canche por su valiosa contribución y, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento a los estudios de Silva-Martínez.

Referencia bibliográfica

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

- Daljeet Singh S, Kapur P, Kuldip Singh. (2000). Management of citrus scab caused by *Elsinoe fawcettii*. Indian Phytopathol.; 53(4): 461-467.
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., & Castillo, M. E. C. (2005). Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum L.*) tratadas con *Trichoderma harzianum*. In Anales de Biología (No. 27, pp. 143-153).
- Fernández B, R. & C. Suárez M. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* 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.
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology, 96(2), 190-194.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158(1), 17-25.
- Hyun, J. W., Timmer, L. W., Lee, S. C., Yun, S. H., Ko, S. W., & Kim, K. S. (2001). Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoe* isolates causing scab diseases of citrus in Jeju Island in Korea. Plant Disease, 85(9), 1013-1017.
- 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/>.
- 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
- Susanto, A., Sudharto, P. S., & Purba, R. Y. (2005). Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations. Mycopathologia, 159(1), 153-157.
- Timmer L.W., Garnsey S.M., & Graham J.H. (2000). Compendium of citrus diseases (No. Ed. 2). American Phytopathological Society (APS Press).
- Timmer, L. W., Priest, M., Broadbent, P., & Tan, M. K. (1996). Morphological and pathological characterization of species of *Elsinoë* causing scab diseases of citrus. Phytopathology, 86(10), 1032-1038.

Tondje, P. R., Roberts, D. P., Bon, M. C., Widmer, T., Samuels, G. J., Ismaiel, A., ... & Bateman, R. (2007). Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. Biological Control, 43(2), 202-212.