

SELECCIÓN IN VITRO DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA PUDRICIÓN RADICAL EN YUCA

Freddy Alonso Bedoya O., Elizabeth Alvarez y John Bernard Loke,
CIAT, A.A. 6713 Cali, Valle, Colombia. E-mail: ealvarez@cgnet.com

95907

RESUMEN

Dentro de las enfermedades que afectan la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), se encuentra la pudrición de raíces causada por *Phytophthora* spp., esta enfermedad se ha encontrado en Colombia causando pérdidas hasta del 80% de la producción en ciertas regiones. El objetivo de este trabajo fué seleccionar aislamientos eficientes de *Trichoderma* spp. mediante ensayos *in vitro* para luego usarlos en el control de varias especies de *Phytophthora*. Cincuenta cepas de *Trichoderma* spp. fueron seleccionadas de una colección de 350 aislamientos procedentes de la rizosfera de yuca cultivada en diferentes zonas edafoclimáticas en América Latina. Las cepas fueron evaluadas por su capacidad antagonista con dos métodos de selección *in vitro*. En el primer método se sembraron directamente el antagonista y *Phytophthora nicotianae* (sin. *P. parasitica*) en platos de cultivo. Trece cepas de *Trichoderma* spp. produjeron inhibición en el desarrollo y/o crecimiento de *P. nicotianae* de una zona mayor a 10 mm, y colonizaron más del 75% del cultivo. Las mismas 50 cepas fueron evaluadas en el invernadero para el control de *P. nicotianae* inoculando estacas enraizadas mediante aplicación al suelo. Cuatro cepas mostraron diferencias significativas en la incidencia, aunque se presentó alta variabilidad entre los resultados de las replicaciones en el tiempo. Por esta razón se desarrolló el segundo método *in vitro* usando filtrados libres de estructuras de *Trichoderma* spp. y se evaluó el efecto de las mismas cepas sobre *P. dreschleri*, *P. nicotianae* y *Phytophthora* spp., se filtraron aislamientos de *Trichoderma* crecidos en medio líquido de Richard para preparar una suspensión que luego se mezcló con PDA y así se obtuvo un medio con los tóxicos del biocontrolador en el cual se sembraron los patógenos. De los 40 aislamientos de *Trichoderma* spp. probados, se destacaron las cepas 12 PDA-4, 14 PDA-4 y 41 PDA-3, por inhibir el crecimiento de *P. dreschleri* y *Phytophthora* spp., hasta en un 80%. La cepa 14 PDA-4 fué efectiva en pruebas de invernadero. Los resultados de la técnica de medio filtrado se correlacionaron con los obtenidos *in vitro*.

Palabras clave: *Phytophthora*, *Trichoderma*, biocontroladores, yuca, *Manihot esculenta*, pudrición radical.

SUMMARY

One of the diseases affecting cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is the root rot caused by *Phytophthora* spp., whose attacks in Colombia have up to 80% of crop production in certain regions. The purpose of this research work was to screen, through *in vitro* assays, for efficient *Trichoderma* spp. isolates through that could be used against various *Phytophthora* species. Fifty *Trichoderma* spp. strains were selected from a collection of 350 isolates taken from the cassava rhizosphere of cultivars grown in different edafoclimatic zones in Latin America. The strains were assessed for their antagonistic capacity using two *in vitro* methods for screening. Following the first method, the antagonistic agent and *P. nicotiana* were placed directly in culture Petri plates. Thirteen strains of *Trichoderma* spp. inhibited growth and/or development of *P. nicotiana* in an area larger than 10 mm in diameter and made colonies in more than 75% of the pathogen culture. The same 50 strains were evaluated in the greenhouse for the control of *P. nicotiana* by applying them to the soil so as to inoculate cassava rooted stakes. Significant differences were found among four strains related to their incidence; however, high variability was also found with time among replications. Due to these results, a second *in vitro* method was developed using filtrates free of *Trichoderma* spp. structures. The effect of the same strains on *P. dreschleri*, *P. nicotiana* and *Phytophthora* spp. was then evaluated. *Trichoderma* isolates were also grown in the Richard liquid medium and then filtrated to prepare a suspension; the latter was mixed with PDA to obtain a medium containing the biocontroler toxins, and the pathogens were then sown in this medium. Among the 40 *Trichoderma* spp. isolates tested, the strains 12 PDA-4, 14 PDA-4 y 41 PDA-3 did extremely good at inhibiting the growth of *P. dreschleri* and *Phytophthora* spp.; inhibition reached up to 80% in some cases. Strain 14 PDA-4 was effective in greenhouse trials. Results of the filtrate medium method correlated well with those obtained *in vitro*.

Key words: *Phytophthora*, *Trichoderma*, biocontrol, cassava, *Manihot esculenta*, root rot.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las enfermedades que afectan el cultivo de la yuca *Manihot esculenta* Crantz, se encuentra la pudrición de raíces y tallos causada por *Phytophthora* spp., la cual se ha encontrado en Africa (Fassi, 1957) y en América tropical causando pérdidas hasta del 80% de la producción total (Alvarez y Loke, 1996). La enfermedad afecta plantas jóvenes y adultas en suelos con problemas de drenaje (Souza Filho *et al*, 1979), causando marchitez repentina de la planta y severa pudrición en las raíces.

En ensayos preliminares (Alvarez, Loke y Mayer, 1996), se evaluó la capacidad antagonista *in vitro* de cincuenta cepas de *Trichoderma* spp. sin haber encontrado una correlación positiva entre estos resultados y los

obtenidos bajo condiciones de invernadero para el control de *Phytophthora nicotianae*, inoculando estacas enraizadas mediante la aplicación del inóculo al suelo.

Por esta razón, en el presente trabajo se desarrolló otro método *in vitro*, usando filtrados libres de estructuras de *Trichoderma* spp. evaluándose el efecto de las cepas sobre dos especies de *Phytophthora*. El objetivo de este trabajo fue el de seleccionar aislamientos eficientes de *Trichoderma* spp. mediante ensayos *in vitro*, para luego usarlos en el control de varias especies de *Phytophthora*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un grupo de 40 aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron seleccionados de una colección de 350 cepas monospóricas procedentes de la

rizosfera de yuca en Colombia, Brasil, Ecuador y Venezuela (Tabla 1), conservadas en papel filtro a baja temperatura (-20 °C), para ser evaluadas como biocontroladores de *P. dreschleri* y *P. nicotianae* aislados de raíces de yuca afectadas por pudrición; las cepas fueron recuperadas y sembradas en platos con medio de cultivo (PDA) e incubadas durante 5 días a 27 °C. De cada aislamiento se tomó un disco de PDA con desarrollo micelial y se inoculó en erlenmeyers con medio líquido Richard (Richard's Medium: 50g Sucrosa, 0,02g FeCl₃, 10g KNO₃, 5g KH₂PO₄, 2,5g MgSO₄.7H₂O; en 1 lt de agua), colocados en un agitador durante 7 días. Después de este tiempo, los aislamientos de *Trichoderma* spp., colonizaron completamente el medio líquido, el cual se pasó a través de un filtro metálico

Tabla 1. Aislamientos de *Trichoderma*, sitio de origen y crecimiento

Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.	Sitio de Origen	Crecimiento de micelio (mm)	
		P4	P12
30 TSM-1	Ciat(Palmira)	3,1	4,2
47 TSM-1A	Meta	3,7	1,2
8 PDA-2A	Quindio	3,0	1,9
26 TSM-2	CIAT(Palmira)	2,8	1,1
11 TSM-4	Estado Ceara(Brasil)	3,1	1,2
51 PDA-3	Bolivar	3,4	0,9
41 PDA-3	Meta	2,6	0,4
14 PDA-4	Estado Para(Brasil)	2,7	0,6
12 PDA-4	Estado Ceara(Brasil)	2,9	0,7
18 TSM-3	Estado Amazo- nas(Brasil)	3,6	1,9
14 PDA-2	nas(Brasil)	2,3	1,3
Testigo	Estado Para(Brasil)	4,4	4,9

de 0,45 μm y luego por un filtro desechable de 0,22 μm , para obtener un volumen final de 48 ml libres de estructuras por cada cepa del biocontrolador. El filtrado se mezcló con PDA (72ml H₂O + 4.39 g PDA) previamente esterilizado para obtener un volumen final de 120 ml de medio con tóxicos. Este medio se sirvió en 6 platos petri, en los que posteriormente se sembraron discos con los patógenos. Las evaluaciones se hicieron midiendo el crecimiento radial de los patógenos en el medio filtrado. El arreglo empleado fue de bloques completos al azar, con 2 tratamientos (cepas de *Phytophthora* spp.) por 8 puntos de siembra en cada caja; 6 cajas o repeticiones unidad de evaluación (medio PDA + filtrado de las cepas de *Trichoderma* spp).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 40 aislamientos probados de *Trichoderma* spp., se destacaron las cepas 12PDA-4 (Ceara, Brasil) 14PDA-4 (Pará, Brasil) y 41PDA-3 (Meta, Colombia), por inhibir el crecimiento hasta en un 80% de *P. drechsleri* y *P. nicotianae* (Figura 1), especies altamente agresivas, previamente caracterizadas en pruebas de patogenicidad en raíces, tallos y hojas (Datos sin publicar CIAT, 1996). Además, estos aislamientos reducen el crecimiento de los patógenos, en casi un 50% en el cuarto día de evaluación (Figura 2).

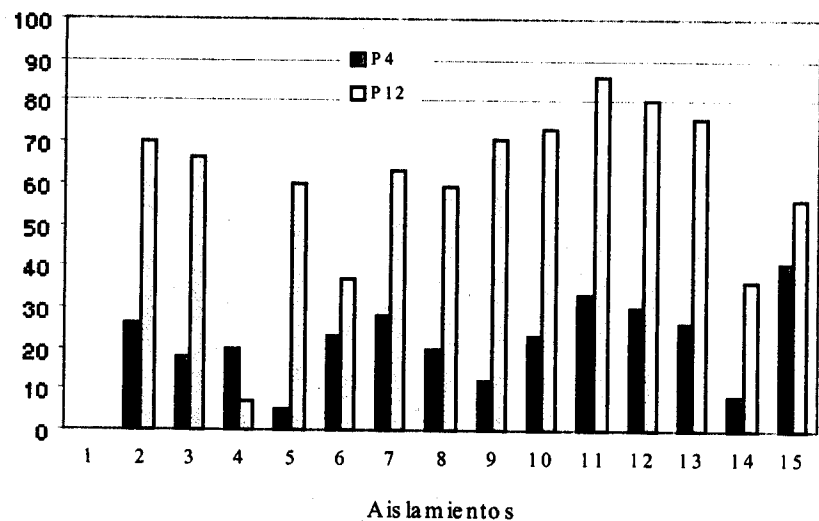
Trichoderma spp. ha sido reportada como un efectivo agente de control biológico de varios fitopatógenos. Dentro de los mecanismos de biocontrol que se han reconocido en *Trichoderma* spp. se encuentra el micoparasitismo, la competencia por nutrientes, la antibiosis, la inducción de crecimiento de las plantas (Baker, 1991; citado por Cotes, 1997), la producción de enzimas hidrolíticas como exoquitinasas, celulasas y exo β - 1,3 glucanasas (Cherif & Benhamou, 1990; Cotes, Thonart & Lepoivre, 1994; citados por Cotes, 1997) y la inducción de proteínas de defensa en la planta como endoquitinasas y endoglucanasas (Cotes, 1993; citado por Cotes, 1997).

A nivel *in vitro* se han realizado varios ensayos que demuestran la capacidad antagó-

nica de *Trichoderma* spp. (Bell *et al*, 1982; citados por Cotes, 1997). Hadar, Chet & Henis (1979) citados por Cotes, (1997), encontraron que *Trichoderma harzianum*

parasitó el micelio de *Rhizoctonia solani* (Askew & Laing, 1994, citados por Cotes, 1997) cuando los dos hongos crecieron juntos en un medio de cultivo que contenía glucosa más minerales. No detectaron una actividad antibiótica de la *T. harzianum* contra ese patógeno, pero si la presencia de las enzimas β -1,3-glucanasa y quitinasa, dichas enzimas fueron reportadas por Cherif y Benhamou, (1990), citados por Cotes (1997) en otro experimento *in vitro*, como inhibidoras del crecimiento del hongo patógeno *Fusarium oxisporum* f. sp *radicis - lycopersici*. La inhibición observada se debió a la afección que sufrió la pared del *F. oxisporum* por un rápido colapso y a la disminución en el turgor de las células en las áreas donde no hubo contacto directo con *Trichoderma* sp. indicando que los metabolitos extracelulares

%Inhibición



1. Testigo, 2. 131 PDA, 3. R3MI8(B), 4. 30TSM-1, 5. 47TSM-1A, 6. 8PDA-2A, 7. 26TSM-2, 8. 11TSM-4, 9. 51PDA-3, 10. 121PDA, 11. 41PDA-3, 12. 14PDA-4, 13. 12PDA-4, 14. 18TSM-3, 15. PDA-2

Figura 1. Inhibición del crecimiento de *Phytophthora nicotianae* (P4) y *P. drechsleri* (P12) por *Trichoderma* spp.

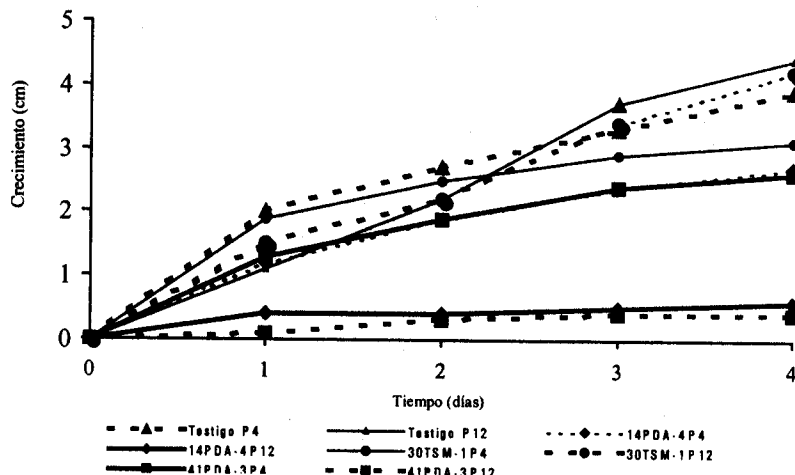


Figura 2. Crecimiento de *Phytophthora* spp. en medio de filtrado de *Trichoderma* sp

pudieron ser los responsables de esa degradación.

CONCLUSIONES

Al observar el comportamiento del crecimiento de los aislamientos de *Phytophthora* spp. sometidos a prueba sobre medio PDA en presencia de tóxicos de diferentes cepas de *Trichoderma*, la cepa 14 PDA-4 fue efectiva en pruebas anteriores en el invernadero, se determinó que hay correlación directa entre los resultados *in vivo*.

El nuevo método de selección *in vitro* desarrollado, así como las cepas caracterizadas como eficientes, muestran un panorama alentador en cuanto al potencial de control biológico de la pudrición radical en yuca, causada por *Phytophthora* spp., conocido por su difícil control.

Se observaron diferencias en cuanto a la respuesta de los aislamientos de *Phytophthora* ante la presencia de algunas cepas de *Trichoderma* spp., las que actúan más eficazmente en el control de *P. drechsleri* que de *P. nicotianae*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, E. y Loke, J. B. 1996. Cassava program annual report 1996. Integrated cassava crop management in major agroecosystems of Latin America and Asia. CIAT. p. 29-37
- Alvarez, E., Loke, J. B. y Mayer, R. 1996. Progress towards biological control of cassava stem and root rots. Poster presentado durante el taller: "Podridões radiculares no cultivo da mandioca".

Cotes P., A. M. 1997. Aspectos bioquímicos y moleculares del control biológico de fitopatógenos. Información suministrada en el curso teórico práctico: "Métodos de análisis molecular como herramienta en la investigación agrícola. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología, Instituto de Genética.

- Fassi, B. 1997. Premieres observations sur une pourriture des racines du manioc causée par un *Phytophthora*. Bulletin d'Information de l'INEAC 6(5): 313-317. Fr. II.
- Souza Filho, B.F. de y Tupinamba, E.A. 1997. Ocorrência da podridão mole das raízes da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em sergipe. Aracaju-se, Brasil, Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Comunicado Técnico No 04. 4p. pt. II.

Reprinted with permission from ASCOLFI. Originally published in Fitopatología Colombiana 23(2):65-67, Copyright 1999.