

## Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEED TL0601 frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Ángela Sarro Baro, José Manuel Lara y Carolina Fernández (FUTURECO BIOSCIENCE SL, Departamento de I+D, Barcelona)

Se evaluó *in vitro* la capacidad de inhibición de una cepa de *Trichoderma lignorum* sobre el crecimiento y esporulación de *Fusarium oxysporium* fsp. *lycopersici* (*Fol*) en cultivos duales en placa petri, inoculando los hongos simultáneamente o después de 24 horas de pre-incubación de cada uno. En la inoculación simultánea, se observó una inhibición del crecimiento del *Fol* de un 69.5% a los 7 días de incubación. En las placas con incubación previa de 24 horas de *T. lignorum* ( $10^5$  esporas/mL), se observó una inhibición completa del crecimiento del patógeno, en todas las concentraciones de *Fol* evaluadas ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , y  $10^5$  esporas/mL), mientras que en la incubación previa de *Fusarium*, *T. lignorum* sólo inhibió el crecimiento significativamente cuando la concentración de *Fol* era de  $10^2$  ó  $10^3$  esporas/mL, es decir del orden de al menos 2 unidades logarítmicas menor que el antagonista. Aunque es necesario validar los resultados en futuros ensayos *in vivo*, éstos sugieren que un biofungicida formulado con *Trichoderma lignorum* FEED TL0601 controlaría más eficazmente *Fol* si se aplicara como tratamiento preventivo que como curativo.

**PALABRAS CLAVES:** *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma lignorum*, biocontrol, antagonista

### INTRODUCCIÓN

La marchitez vascular del tomate está causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hans, que está distribuido prácticamente en todo el mundo. Este deuteromycete, coloniza a menudo las raíces en sus primeras fases de desarrollo, siendo capaz de penetrar en el tejido vegetal a través de heridas o bien por contacto directo. *Fusarium* ssp. produce diversas toxinas, reguladores del crecimiento y enzimas hidrolíticas de la pared vegetal, los cuales pueden obstruir el xilema causando la marchitez de la planta infectada (Beckman, 1987).

Entre los métodos para combatir este patógeno se encuentran la rotación de cultivos, la eliminación de plantas enfermas, el uso de semillas certificadas y variedades resistentes, la solarización y la aplicación de productos fitosanitarios sintéticos o de origen biológicos. Actualmente en España están autorizadas 55 materias activas para combatir esta enfermedad (MARM, 2010), de las cuales sólo dos (*Streptomyces griseoviridis* y *Trichoderma viride* + *Trichoderma harzianum*) son microorganismos agentes de control biológico (ACB). La búsqueda de nuevas materias activas respetuosas con el medio ambiente es una necesidad apremiante en el marco de la implementación de la nueva directiva de uso sostenible de fitosanitarios (2009/128/CE).

Las especies de *Trichoderma* sp. son los microorganismos que con más frecuencia se aislan en los suelos agrícolas, siendo probablemente uno de los ACBs fúngicos más estudiados (Harman, 2006; Vinale *et al.*, 2007). 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. Su modo de acción se expresa 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). Existen en la literatura numerosas publicaciones donde se describe la acción antagonista de *Trichoderma lignorum*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. harzianum* o *T. koningii* sobre *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. udum*, *F. subglutinans* y/o *F. culmorum*, en ensayos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* (Aquino-Martínez *et al.*, 2008; Calistru *et al.*, 1997; Cotxarreta *et al.*, 2002, Michel-Aceves *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2002).

La inhibición del crecimiento *in vitro* de hongos patógenos por ACBs antagonistas se ha descrito ampliamente. La metodología más habitual es la del enfrentamiento equitativo o dual de ambos microorganismos (Aquino-Martínez, 2007), inoculándose al tiempo o no, generalmente en forma de "plug" o gota, y determinándose posteriormente su eficacia mediante una escala de Grados de Antagonismo (Bell *et al.*, 1982) o bien mediante la fórmula de Abbott adaptada (Aquino-Martínez, 2007).

En el presente trabajo se evaluó *in vitro* el potencial, tanto preventivo como curativo, de la cepa FEED TL 0501 de *Trichoderma lignorum* de inhibir al hongo fitopatogéno *Fol* mediante inoculación simultánea y con pre-inoculación de 24 horas del patógeno o del antagonista, aplicando ambos microorganismos mediante Torre de Potter. El objetivo fue determinar el grado de inhibición del patógeno bajo diferentes condiciones de presión de inóculo.

## Materiales y Métodos

### Ensayo 1. Enfrentamiento equitativo.

Placas de PDA (*Potato Dextrose Agar*, pH 5.4, 25°C, con cloranfenicol) fueron inoculadas al mismo tiempo con 10µL de una suspensión con 10<sup>5</sup> esporas/mL del patógeno *Fol* cepa FEAD 0512 (CECT 2866) y 10µL del ACB *Trichoderma lignorum* FEED TL0601 (10<sup>5</sup> esporas/mL). Se incluyeron placas control con sólo el patógeno y placas inoculadas sólo con el ACB. El ensayo consistía de 3 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. Se anotó la evolución del tamaño de la colonia para ambos hongos a los 3, 4, 5, 6 y 7 días. En cada tiempo se calculó el área de crecimiento de cada microorganismo, con base en el radio mayor y menor de cada colonia. Para determinar el grado de inhibición (GI) del crecimiento del patógeno se aplicó la fórmula de Abbott modificada:

$$GI = \frac{(A_P - A_{P+a}) \times 100}{A_P}$$

donde  $A_P$  es el crecimiento radial del patógeno y  $A_{P+a}$  es el crecimiento del patógeno más el antagonista

### Ensayo 2. Enfrentamiento con pre-inoculación del patógeno

Placas de PDA con diferentes concentraciones (10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup>) de *Fol* fueron inoculadas e incubadas a 27°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, a cada placa se aplicó una suspensión de 10<sup>5</sup> esporas/mL de *T. lignorum* por medio de Torre de Potter (presión 3 bares). Placas inoculadas con *T. lignorum* (10<sup>5</sup> esporas/mL) y placas con diferentes concentraciones de *Fol* fueron incluidas como control. Todas las placas se incubaron a 27°C durante 7 días. El crecimiento de los hongos fue evaluado a los 3, 4, 5, 6 y 7 días desde la aplicación del ACB. Al final del ensayo, se realizó el raspado de las placas y se determinó la concentración de esporas de cada hongo a través de diluciones seriadas por recuento directo mediante hemocitómetro.

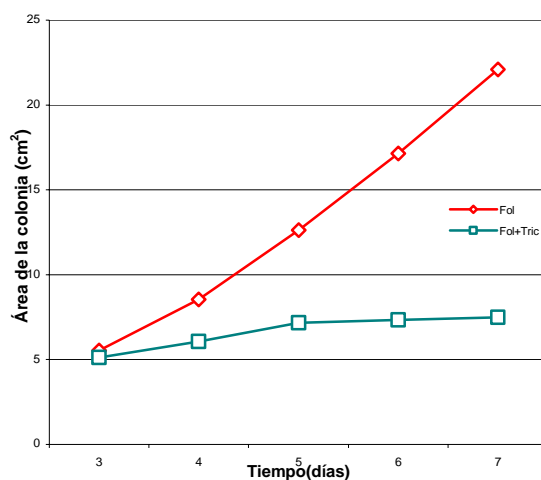
### Ensayo 3. Enfrentamiento con pre-inoculación del hongo antagonista

Placas de PDA con una concentración de 10<sup>5</sup> esporas/mL de *T. lignorum* fueron inoculadas e incubadas a 27°C. A las 24 horas, se aspergearon diferentes suspensiones de *Fol* a distintas concentraciones (10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup>) por medio de Torre de Potter (presión 3 bares). Se incluyeron los mismos controles que en el ensayo 2, incubándose en las mismas condiciones y evaluándose del mismo modo.

## Resultados y Discusión.

### Ensayo 1. Enfrentamiento equitativo.

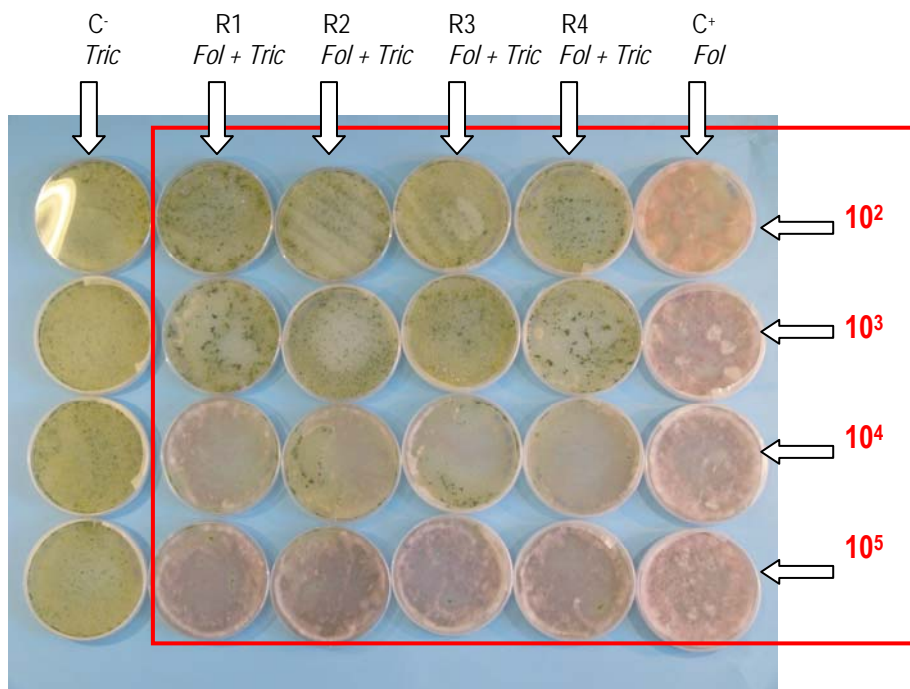
Se observó en todas las repeticiones, un efecto claramente inhibitor del desarrollo de *Fol* por parte de *T. lignorum*, con una reducción en el área de la colonia del patógeno cercana al 35% respecto al control (Gráfico 1).



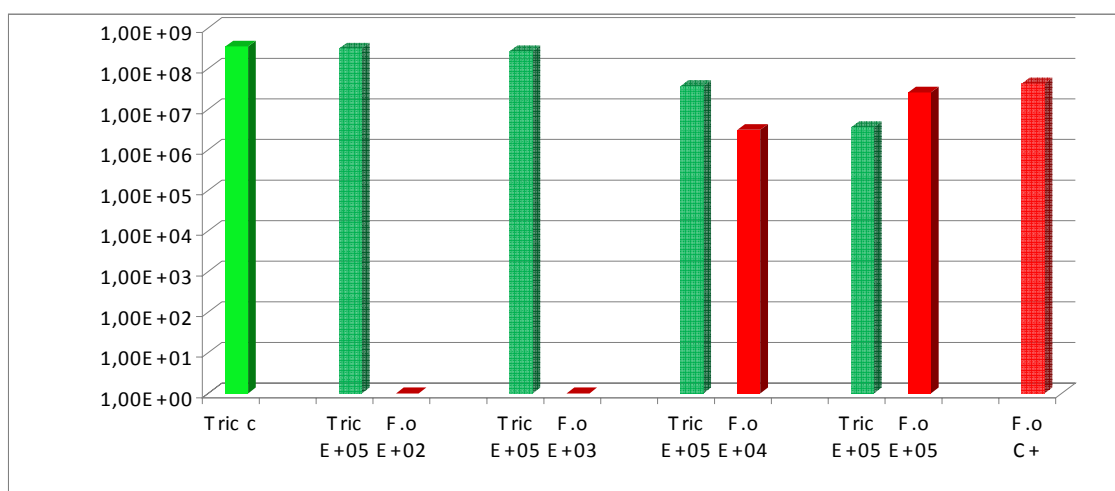
**Gráfica 1.** Perfil de inhibición del crecimiento del patógeno *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* (*Fol*) por el ACB *Trichoderma lignorum* (*Tric*).

## Ensayo 2. Enfrentamiento con pre-inoculación del patógeno

Se observó la evolución del crecimiento de ambos hongos en las placas con inoculación conjunta y se compararon con las placas control. A los 7 días del ensayo (Figura 3), existía una correlación clara entre el crecimiento del patógeno y el ACB, de manera que a mayor concentración de *Fol* menor era la concentración de *T. lignorum*. Para constatarlo se determinó la concentración de ambos hongos en cada una de las placas (Gráfico 2), resultando que a bajas concentraciones de *Fol* (inóculo inicial  $10^2$  y  $10^3$ ), *T. lignorum* era capaz de colonizar completamente el medio de cultivo y detener el crecimiento de *Fol* a pesar que éste tenía una ventaja de 24 horas de crecimiento. Sin embargo, cuando las concentraciones iniciales de *Fol* y *T. lignorum* se igualaban (inóculo inicial  $10^4$  y  $10^5$ ), la diferencia en la concentración final de esporas no era significativa. Esto sugiere que en estas condiciones ha de existir una diferencia de al menos 2 unidades logarítmicas entre la concentración del patógeno y la concentración del hongo antagonista para que se produzca inhibición del crecimiento.



**Figura 3.** Crecimiento de *Trichoderma lignorum* a diferentes dosis de *Fol* a los 7 días de aplicación con pre-incubación del hongo fitopatógeno (24 h). **Tric C-:** Placas inoculadas con *T. lignorum* ( $10^5$ ); **Fol C+:** Placas inoculadas con *Fol* a diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , y  $10^5$ ); **Fol + Tric:** Placas inoculadas conjuntamente con *T. lignorum* ( $10^5$ ) y distintas concentraciones de *Fol*.

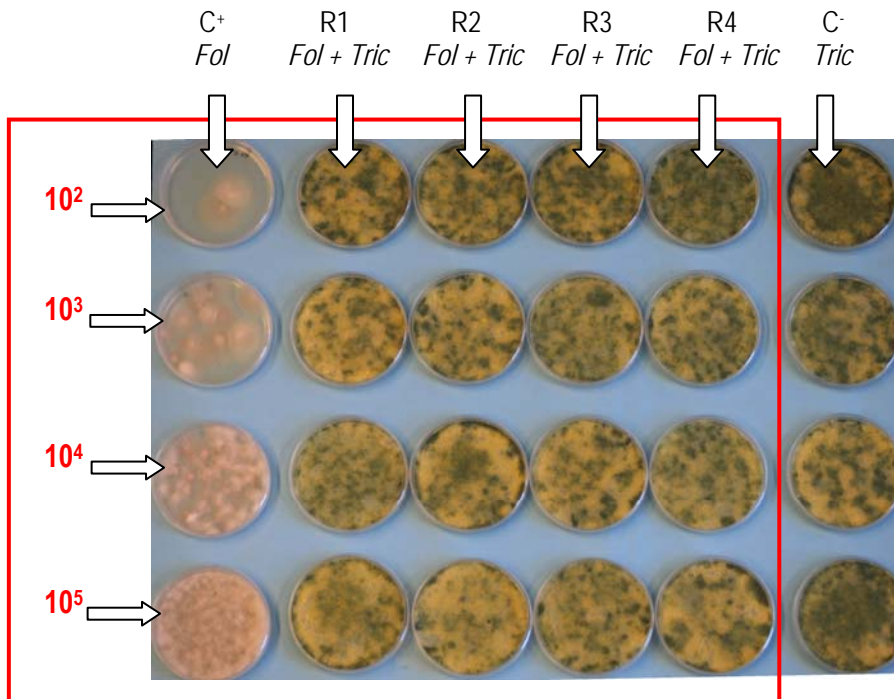


**Gráfico 2:** Concentración de esporas (al final del ensayo) de ambos hongos en condiciones de enfrentamiento con pre-incubación (24h) del hongo patógeno.

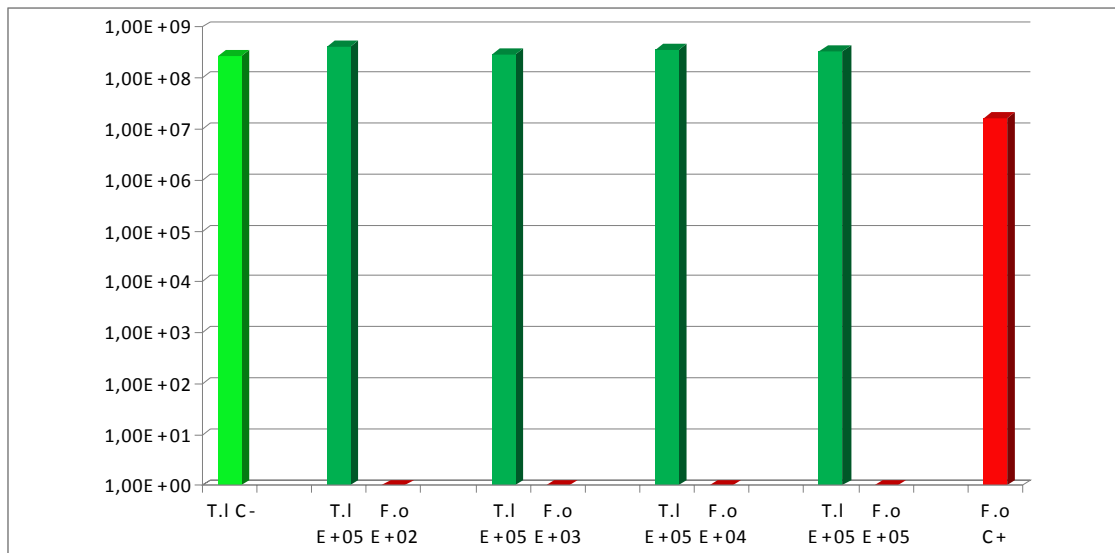
## Ensayo 3. Enfrentamiento con pre-inoculación del hongo antagonista.

En el tercer ensayo se inoculó primero el hongo antagonista dándole ventaja para el aprovechamiento de nutrientes y colonización del espacio. A las 24 h se inoculó el hongo fitopatógeno, con el fin de determinar si *T. lignorum* era capaz de inhibir su crecimiento. En este caso no se observó crecimiento del *Fol* en las placas con inoculación conjunta (Figura 4). Estos

resultados fueron verificados numéricamente determinándose la concentración de ambos hongos en cada una de las placas al final del ensayo (Gráfico 3). El ACB *T. lignorum* fue capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* del patógeno a todas las concentraciones ensayadas.



**Figura 4.** Crecimiento de *T. lignorum* a diferentes dosis de *Fol* a los 7 días de aplicación con prioridad al ACB (24 h). **Tric C-**: Placas inoculadas con *T. lignorum* (10<sup>5</sup>); **Fol C+**: Placas inoculadas con *Fol* a diferentes concentraciones (10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, y 10<sup>5</sup>); **Fol+Tric**: Placas inoculadas conjuntamente con *T. lignorum* (10<sup>5</sup>) y distintas concentraciones de *Fol*.



**Gráfico 3:** Concentración de esporas (al final del ensayo) de ambos hongos en condiciones de enfrentamiento con pre-incubación del agente de control biológico.

## Discusión y conclusiones.

En este trabajo se evaluó la capacidad antagonista de la cepa TL0601 de *Trichoderma lignorum* de Futureco Bioscience frente al hongo patógeno *Fol* en condiciones *in vitro* inoculando tanto el ACB como el patógeno mediante Torre de Potter.

En el enfrentamiento equitativo del ACB y el patógeno, se alcanzó una eficacia de control del 69.5%, ligeramente superior al observado *in vivo* con otras cepas de *T. lignorum* sobre *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*, donde la eficacia varió entre 59.8 y 64.8%, según la cepa evaluada (Aquino-Martínez *et al.*, 2007). En este mismo estudio, las cepas de *T. harzianum* evaluadas mostraron eficacias inferiores (43.6-46.6%) a las observadas en los tratamientos con *T. lignorum*.

Se observó que con crecimiento previo del patógeno, la aplicación de *T. lignorum* 24 horas después, a una concentración similar a la de un producto comercial basado en esporas de *T. lignorum* o bien *T. harzianum* ( $10^5$  e/mL), inhibe el desarrollo de *F. oxysporum* únicamente cuando el patógeno se había inoculado a concentraciones de al menos 2 unidades logarítmicas por debajo de la concentración del ACB. Por el contrario, si se inoculaba previamente el ACB y 24 después se aplicaba el patógeno, *T. lignorum* exhibía una inhibición completa de *Fol* a cualquiera de las dosis ensayadas. Los mecanismos de acción implicados en el efecto antagonista observado podrían ser tanto la competencia por el espacio y el sustrato, como la producción de metabolitos y/o enzimas líticos.

Aunque no siempre las observaciones realizadas en laboratorio en condiciones *in vitro* se corresponden a lo que sucede en ensayos realizados en condiciones de campo, donde interaccionan muchos más factores (planta, suelo, actividad de otros microorganismos, supervivencia, capacidad de colonización etc), este estudio pone de manifiesto que una formulación biofungicida a base de *T. lignorum* FEED TL0601, sería más eficaz para el control de *Fol* si se aplica como tratamiento preventivo que como curativo. Es decir, que para que esta cepa resulte más eficaz, se debería considerar el momento de inoculación con el ACB así como el nivel de inóculo del patógeno, entre otros aspectos. Esto sugiere una posible aplicación del microorganismo antagonista en los primeros estadios de desarrollo de la planta (vivero), favoreciendo la colonización del sistema radicular y rizosfera de la planta a proteger.

## BIBLIOGRAFÍA

AQUINO-MARTÍNEZ, J.G.; VÁZQUEZ-GARCÍA, L.M.; REYES-REYES, B.G. (2008). Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht.f. sp. *Dianthi* (Prill. Y Delacr.) Snyder y Hans con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de villa Guerrero. *Rev. Mexicana de Fitopatología* 26: 127-137.

BECKMAN, C.H. (1987). *The Nature of the Wilt Diseases of Plants*. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. USA. 80 p.

BELL, D.K.; WELLS, H.D., MARKHAM, C.R. (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens.

CALISTRU, C.; MCLEAN, M.; BERJAK, P. (1997). *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. Macroscopical and microscopical observations of fungal interactions. *Mycopathologia* 139 115-121

COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M.I.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. (2002). Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isoaltes to suppress fusarium wilt of tomato. *Soil Biol. Biochem.* 34: 467-476.

HARMAN, G.E. (2006). Overview of Mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*: 190-194

MICHEL-ACEVES, A. C.; OTERO-SANCHEZ, M.A.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; LEZAMA-GUITIÉRREZ, R. (2009). Producción y Actividad Antibiótica del 6 pentil- $\alpha$ -pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:14-21

PRASAD, R.D.; RANGESHWARAN, R.; HEDGE, S.V.; ANUROOP, C.P. (2002). Effect of soil and seed application of *Trichoderma lignorum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. *Crop Prot.* 21: 293-297

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10