

# EFICACIA BIOLÓGICA DE BIOINSUMOS SOBRE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* Y *CAMPYLOCARPON PSEUDOFASCICULARE*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Kenneth Retana Sánchez<sup>1</sup>

## RESUMEN

**Eficacia biológica de bioinsumos sobre *Phytophthora cinnamomi* y *Campylocarpon pseudofasciculare*, en condiciones de laboratorio.** Durante el año 2021, se evaluó la eficacia biológica de diferentes bioinsumos sobre dos agentes causales asociados a la pudrición radical de plantas de aguacate. El estudio se realizó en dos etapas, en la primera se llevó a cabo el aislamiento, identificación morfológica y molecular de los organismos y verificación de los postulados de Koch. En la fase posterior, se realizaron pruebas de confrontación dual entre cada uno de los patógenos y los siguientes organismos: *Bacillus* spp. (INTA-B37), *Bacillus* spp. (BP-16), *Trichoderma harzianum* (aislado de suelo de Orotina (T.H.O)), *Trichoderma harzianum* (aislado de suelo de Nandayure (T.H.N)) y un producto comercial compuesto de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Azotobacter* spp. Se evaluó el porcentaje de inhibición en el crecimiento de los patógenos y, en el caso de las trichodermas, se valoró la competencia por el sustrato. Se identificó que los patógenos corresponden a *Campylocarpon pseudofasciculare* y a *Phytophthora cinnamomi*. En relación con la confrontación dual, se obtuvo que las trichodermas presentaron los mayores valores de inhibición sobre *C. pseudofasciculare*, con un 56,3 % (T.H.N) y 50 % (T.H.O) respectivamente. Asimismo, BP-16 y *T. harzianum* (T.H.O) alcanzaron un 55,2 % y 44,7 % de inhibición sobre *P. cinnamomi*, respectivamente. Con respecto a la competencia por sustrato, las dos trichodermas alcanzaron el grado uno en la escala de Bell frente a ambos patógenos.

**Palabras clave:** Patógeno, Aguacate, Organismos benéficos.

## ABSTRACT

A survey about the biological efficacy of different bioinputs on two causal agents associated with root rot in avocado plants was evaluated during 2021. The study was carried out in two stages, in the first one the isolation, morphological and molecular identification of the organisms and verification of Koch's postulates were carried out. In the subsequent phase, dual confrontation tests were implemented between each of the founded pathogens and the following organisms: *Bacillus* spp. (INTA-B37), *Bacillus* spp. (BP-16), *Trichoderma harzianum* (isolate from Orotina (T.H.O) soil), *Trichoderma harzianum* (isolate from Nandayure (T.H.N) soil), and a commercial product composed of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Azotobacter* spp. The percentage of inhibition in the pathogen's growth was evaluated and, in the case of trichoderma species, the competition for the substrate was measured. Morphological and molecular techniques were used to identified the pathogens

1 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. Teléfono: (506) 8944-4024. Correo: kretana@inta.go.cr ORCID: 0000-0003-1937-7249

as *Campylocarpon pseudofasciculare* and *Phytophthora cinnamomi*. Dual confrontation was performed and the results showed the highest inhibition on *C. pseudofasciculare* with the trichoderma species, with values of 56,3 % (T.H.N) and 50 % (T.H.O), respectively. Likewise, BP-16 and *T. harzianum* (T.H.O) reached 55,2 % and 44,7 % inhibition values on *P. cinnamomi*, respectively. Regarding the competition for substrate, the two trichoderma reached grade one in Bell's scale against both pathogens.

**Keywords:** Pathogen, Avocado, Beneficial organism.

## INTRODUCCIÓN

En el cultivo de aguacate, uno de los patógenos más problemáticos es *P. cinnamomi*, así como otras especies del mismo género. Esta causa una de las enfermedades más devastadoras que afecta en cualquier etapa del cultivo. Cuando la infección se desarrolla en almácigo, las plantas presentan un reducido crecimiento, poco desarrollo foliar y amarillamiento generalizado de hojas (Tamayo 2007).

En plantaciones establecidas, los árboles afectados detienen su crecimiento y las hojas se tornan más pequeñas con apariencia pálida. Se observa un amarillamiento generalizado, con rebrotes pequeños y de poco vigor, así como floraciones excesivas y desfasadas. Posteriormente, las hojas se secan y las ramas laterales muestran una marchitez descendente; en estados avanzados ocurre la muerte árbol. El hongo también puede afectar la base del tronco por lo que se puede formar un chancro oscuro con exudaciones con apariencia blanquecina (Morales *et al.* 2005, Tamayo 2007).

Síntomas similares son provocados por varios hongos de la familia Nectriaceae. Debido a que estos patógenos atacan el sistema radical y pueden llegar a afectar los haces vasculares, según el estado de desarrollo de la enfermedad, el diagnóstico en campo se dificulta, ya que el daño observado puede ser provocado por uno o varios de estos organismos. La identificación morfológica puede ser compleja debido a la similitud morfológica de los conidios, aunque se reconocen algunos aspectos como el tamaño de estos, el número de septos y la presencia o no de microconidios para diferenciarlos (Ramírez y Morales 2013, Parkinson 2017, Palacios 2021).

En relación con el manejo de enfermedades radicales en el cultivo de aguacate, se han desarrollado diferentes estrategias de manejo integrado, sin embargo, prevalece el uso de plaguicidas, lo que conlleva a impactos negativos en el ambiente y la salud. Estos reducen la biota del suelo y simplifican el sistema al minimizar las interrelaciones entre las poblaciones de organismos, lo que puede degenerar en un mayor problema fitosanitario. Asimismo, el uso continuo de moléculas sintéticas ejerce una presión de selección sobre los patógenos, lo que ha provocado tolerancia o resistencia a las mismas (Dobrowolski 2008, Ramírez *et al.* 2013).

Como alternativa a los agroquímicos, se han evaluado distintos organismos para el control de *P. cinnamomi*. Se ha obtenido una reducción de la severidad de la enfermedad que provoca con el uso de *Trichoderma* spp., bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, varias especies del género *Bacillus*, y actinomicetes (Ramírez *et al.* 2013).

Cabe destacar que el potencial de control se incrementa en presencia de materia orgánica debido al efecto supresivo de la diversidad biótica sobre la etapa saprofitica de este y otros patógenos, esto debido a que ocurre una mayor frecuencia de interacciones (competencia, parasitismo, antibiosis) entre las poblaciones presentes. La complejidad microbiana en el suelo promueve la estabilidad y, desde la arista ecológica, la autoorganización de los sistemas diversos contribuye al desarrollo de supresividad (Batista *et al.* 2008, Sarandón y Flores 2014).

El uso preventivo de consorcios (diversidad) de organismos benéficos reduce el desarrollo de las enfermedades de suelo, inclusive, puede disminuir la capacidad de infección del inóculo secundario. Por la tanto, la capacidad de los patógenos de permanecer en el sitio del cultivo depende de la densidad poblacional y de las interacciones que se desarrollen dentro de la comunidad biótica (Pérez 2008).

Con base en lo descrito, se planteó como objetivo de esta investigación determinar la eficacia biológica de diferentes bioinsumos sobre dos agentes causales de la pudrición de raíz en plantas de aguacate (*Persea americana* Mill, material Criollo), en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diagnóstico de los agentes causales

#### Aislamiento e identificación de los agentes causales

Se realizaron muestreos de plantas de aguacate con síntomas de marchitamiento, amarillamiento, pérdida de tejido foliar, pudrición del sistema radical y necrosis en los haces vasculares. Esto se realizó en varias fincas ubicadas en Orotina, Nandayure y Pérez Zeledón.

Cada una de las muestras se envolvió en papel periódico humedecido y se llevaron al Laboratorio de Fitoprotección del INTA. El aislamiento de los organismos se realizó mediante el protocolo para hongos y bacterias indicado por French y Hebert (1980). La identificación morfológica de los organismos asociados a los síntomas descritos se llevó a cabo mediante la observación al microscopio de luz, de las estructuras asexuales de los organismos obtenidos con mayor frecuencia en las cajas Petri. Estas se compararon con las guías para la identificación de organismos de Erwin y Ribeiro (1996), Gallegly y Hong (2008) y lo indicado por Agustí y Armengol (2013).

#### Verificación de los postulados de Koch

Una vez identificados los organismos aislados, se inocularon individualmente y en combinación (Cuadro 1), en plantas de aguacate (patrón criollo, copa Simmonds) de 40 cm de altura. A todas

las plantas se les mantuvo con saturación de humedad por 72 horas para favorecer la infección de los organismos. Se contó con tres repeticiones por tratamiento.

Cuadro 1. Organismos individuales o en mezcla inoculados para verificar los postulados de Koch. Laboratorio de Fitoprotección del INTA, San José, 2021.

Identificador	Organismo o mezcla
T0	Testigo absoluto
T1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
T2	<i>Campylocarpon pseudofasciculare</i>
T3	<i>P. cinnamomi</i> + <i>C. pseudofasciculare</i>

En caso de *Phytophthora*, la inoculación se realizó con 15 g/planta de semillas de sorgo colonizadas por el oomicete con una concentración de  $1 \times 10^5$  esporangios/g. Los cuales se colocaron en tres orificios a cinco centímetros de la base de la planta, a una profundidad de 10 cm. Con respecto a *Campylocarpon*, se inoculó un mililitro de una solución de conidios ( $1 \times 10^6$ ) en la cantidad de puntos y profundidad antes indicada, en cada repetición.

Se verificó la ocurrencia de síntomas y avance de los mismos durante un período de 70 días. A partir de las plantas sintomáticas, se realizó el reaislamiento e identificación del o los organismos causales de la enfermedad generada.

## Identificación molecular

Se realizó la identificación molecular de los patógenos reaislados, y de dos cepas de *Trichoderma* spp., una obtenida de un suelo de la finca El Porvenir cultivada con aguacate, en Nandayure (T.H.N) (Latitud: 9,93717° Norte y Longitud: -85,29633 Oeste) y otra de la finca Cavar la cual está ubicada en Orotina (T.H.O) (Latitud: 9,54505° Norte y Longitud: 84,30214° Oeste). Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Técnicas Moleculares de CIPROC/UCR, bajo los protocolos de extracción de ADN establecidos por la entidad. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Corea del Sur.

Se utilizó la herramienta Blast (instrumento bioinformático para inferir relaciones funcionales, estructurales o evolutivas entre dos secuencias de nucleótidos o proteínas) con la cual se

compararon las secuencias generadas con las que se encuentran en la base de datos del banco de genes (GenBank). El análisis filogenético se realizó con el software MEGA 6, mediante las pruebas del Vecino más cercano y Máxima Verosimilitud.

## Pruebas de confrontación dual

Se evaluó la capacidad antagonica de organismos de control biológico contra los dos patógenos identificados morfológicamente como los causantes de las pudriciones de la raíz de aguacate. Los biocontroladores evaluados fueron: las dos trichodermas antes mencionadas, dos cepas de *Bacillus subtilis* identificadas como BP-16 y INTA-B37. Asimismo, se valoró el efecto del producto comercial Fertibiol® (1×10<sup>9</sup> UFC/mL) constituido de tres cepas de bacterias benéficas (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Azotobacter* spp.) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Microorganismos utilizados en la prueba de confrontación dual en caja Petri. Laboratorio de Fitoprotección del INTA, San José, 2021.

Tratamiento	Descripción
T1	<i>C. pseudofasciculare</i> vs <i>T. harzianum</i> Nandayure
T2	<i>C. pseudofasciculare</i> vs <i>T. harzianum</i> Orotina
T3	<i>C. pseudofasciculare</i> vs Fertibiol
T4	<i>C. pseudofasciculare</i> vs <i>Bacillus</i> BP-16
T5	<i>C. pseudofasciculare</i> vs <i>Bacillus</i> INTA-B37
T6	<i>Phytophthora cinnamomi</i> vs <i>T. harzianum</i> Nandayure
T7	<i>Phytophthora cinnamomi</i> vs <i>T. harzianum</i> Orotina
T8	<i>Phytophthora cinnamomi</i> vs Fertibiol
T9	<i>Phytophthora cinnamomi</i> vs <i>Bacillus</i> BP-16
T10	<i>Phytophthora cinnamomi</i> vs <i>Bacillus</i> INTA-B37
T11	Testigo <i>C. pseudofasciculare</i>
T12	Testigo <i>Phytophthora cinnamomi</i>

## Diseño experimental

En el caso de los postulados de Koch, bajo condiciones de invernadero, se estableció un diseño irrestricto al azar. Se contó con tres repeticiones para cada tratamiento y el testigo.

Respecto a las pruebas de confrontación dual, se estableció un diseño irrestricto al azar con cuatro repeticiones por organismo de control evaluado, con cada hongo identificado como patógeno. Para cada hongo, se contó con un testigo que consistió únicamente en el crecimiento de cada organismo fitopatógeno en cajas Petri con medio de cultivo PDA acidificado, con la misma cantidad de repeticiones antes mencionada.

## Control de calidad

Se realizó el control de calidad del producto comercial Fertibiol. Esto se realizó mediante la determinación de microorganismos presentes en UFC/mL, mediante diluciones decimales del producto y crecimiento en medios de cultivo para hongos y para bacterias. También se analizó la pureza microbiológica (porcentaje de colonias de otros organismos no declarados en el producto) y se llevó a cabo la identificación morfológica y bioquímica de las bacterias.

## Pruebas de confrontación dual

El siguiente procedimiento se realizó, por separado, con cada organismo identificado como patógeno en las pruebas de verificación de los postulados de Koch:

### Bacterias BP-16 y INTA-B37

En cajas Petri con medio de cultivo PDA sin acidificar, se colocó una línea de bacteria (~4cm) en cada extremo a una distancia aproximada de 2,5 cm del centro. Dos días después, se agregó un disco de 0,5 cm de diámetro de PDA colonizado por el patógeno en el centro del plato. Esto se realizó con cada una de las bacterias en estudio (Figura 1).

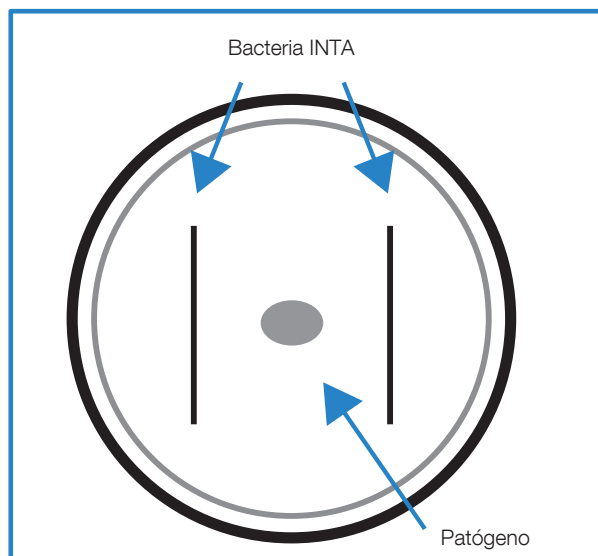


Figura 1. Ordenamiento de las bacterias INTA en las pruebas de confrontación dual.

Las cajas Petri con los organismos se incubaron por un periodo de siete días a temperatura ambiente. La inhibición del crecimiento del hongo (efecto antibiótico de cada bacteria) se evaluó diariamente mediante la determinación de la reducción en el porcentaje de expansión de micelio (mm), comparado con el testigo, mediante la siguiente fórmula:

$$(R1-R2)/R1 \times 100 \text{ (Royse y Ries 1977; Whipps 1987) (Figura 2).}$$

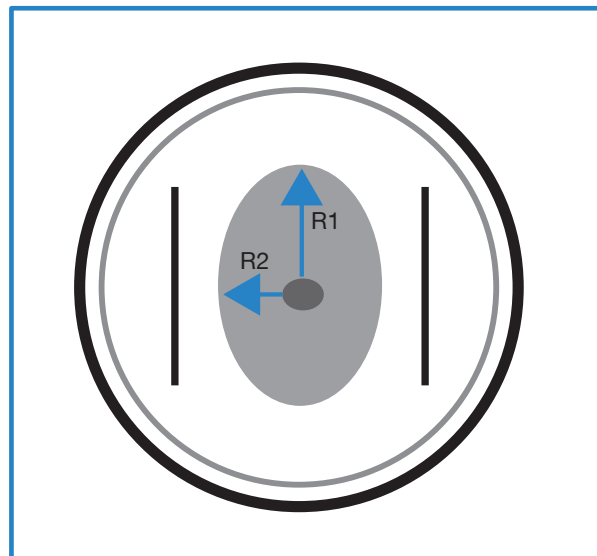


Figura 2. Radios para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento.

### Fertibiol

Se tomaron dos alícuotas de 50  $\mu$ L del producto previamente agitado y se depositaron cada una en línea recta a 2,5 cm del centro (mismo diseño de la figura 1). Dos días después, se colocó un disco de 0,5 cm de diámetro de PDA colonizado con el hongo en el centro de una caja Petri con medio de cultivo PDA sin acidificar. La incubación y la evaluación del porcentaje de inhibición se realizó mediante el procedimiento descrito en el subapartado anterior (Figura 2).

### *Trichoderma harzianum*

Se evaluó la capacidad de inhibición del crecimiento de las dos cepas de *T. harzianum* contra el patógeno (confrontación dual). Para esto, se colocó un disco de 0,5 cm de diámetro de PDA colonizado con el respectivo hongo (cinco días de crecimiento) en un extremo de una caja Petri con medio PDA acidificado y en el lado opuesto se agregó un disco de 0,5 cm de PDA colonizado con el organismo benéfico (cinco días de crecimiento). Esto se llevó a cabo con cada cepa de *T. harzianum* por separado (Figura 3).

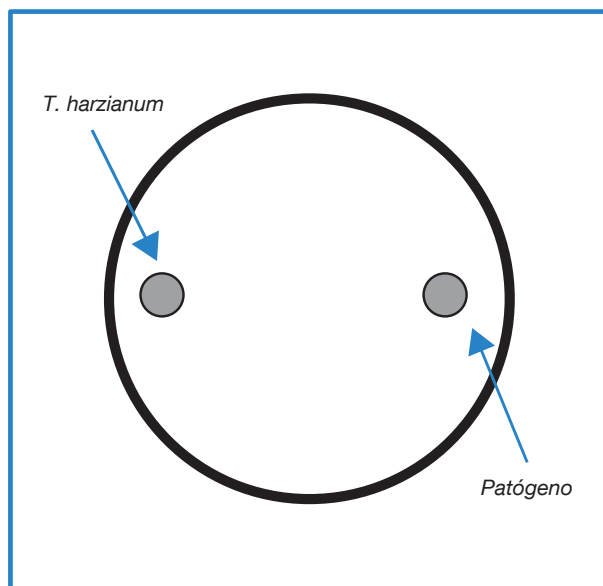


Figura 3. Ordenamiento de los organismos en la prueba de confrontación dual.

Se determinó el porcentaje de inhibición (efecto antibiótico) mediante la fórmula  $(R1-R2)/R1 \times 100$ . En donde R1 es el crecimiento radial del patógeno testigo (mm) y R2 es el crecimiento radial del patógeno (mm) en competencia con *T. harzianum*. Asimismo, se evaluó la competencia por sustrato del hongo benéfico con la escala de Bell (Bell *et al.* 1982) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Escala de evaluación de competencia por sustrato de organismos en confrontación dual.

Grado	Descripción
I	Antagonista cubre el medio + al patógeno
II	Antagonista está en $\frac{2}{3}$ partes del medio
III	Antagonista + patógeno cada uno en la mitad del medio
IV	Patógeno sobrepasa al antagonista
V	Patógeno sobrepasa todo el plato

### Análisis estadístico

Con los datos obtenidos y con el uso del programa Infostat (versión estudiante 2020), se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) mediante modelos lineales generales y mixtos, así como la comparación de medias (DGC  $p < 0,05$ ). Se compararon tratamientos de interés dentro y entre grupos con análisis por contrastes ortogonales. Además, se realizó una comparación de medias (Tukey  $p < 0,01$ ) del crecimiento radial de las trichodermas en estudio frente a cada patógeno, por separado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diagnóstico de los agentes causales

Se identificó morfológicamente (Figura 4) y molecularmente dos patógenos asociados a las pudriciones de las plantas de aguacate, como *Phytophthora cinnamomi* y *Campylocarpon pseudofasciculare*. El primer organismo es reconocido por el hábito de crecimiento del micelio, el cual es de color blanquecino poco algodonoso con bajo volumen que crece unido al medio de cultivo; este presenta hifas aseptadas (cenocíticas) y formación de esporangios multinucleados con forma elipsoide u ovoide, en donde se producen de 20-30 zoósporas heterocontas (morfología desigual) biflageladas. Además, tiene pelos tripartitos en el flagelo anterior llamados mastigonemas (Hardham 2005).



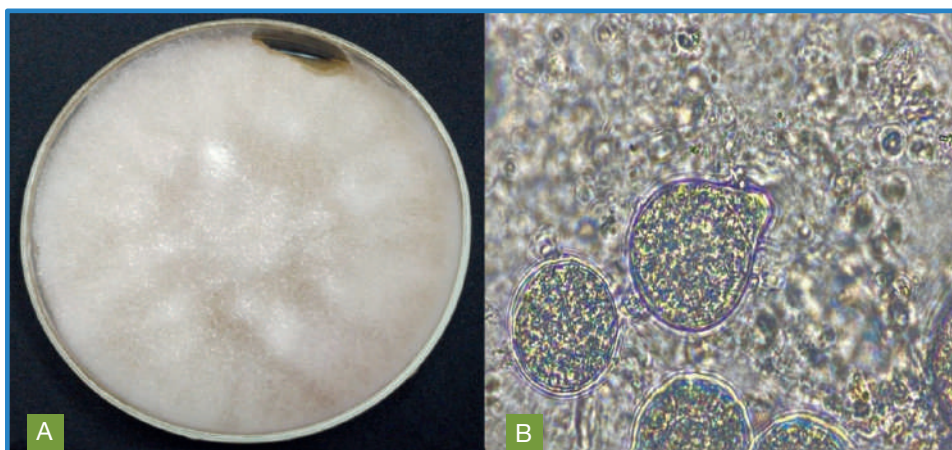


Figura 4. A. Micelio de *P. cinnamomi*. B. Esporangios de *P. cinnamomi*.

Este oomicete se encuentra comúnmente asociado a necrosis radical de árboles de aguacate tanto en vivero como en plantaciones establecidas, donde las condiciones de humedad en el suelo son altas por periodos prolongados y las temperaturas son cálidas. Esto favorece la incidencia del patógeno ya que este requiere de agua libre en el medio para que las zoosporas puedan movilizarse por quimiotaxia hacia la raíz del hospedero, además, facilita que en un plazo de dos a tres días después de la infección, se produzcan nuevos esporangios, lo que incrementa rápidamente el inóculo para nuevas infecciones (Gadek 1999, Hardham 2005).

Cabe destacar que, si la condición de humedad es constante, aún en suelos con buen drenaje,

el patógeno se puede desarrollar. Esto porque, además de favorecer la producción de esporangios, un ambiente húmedo puede provocar modificaciones químicas en el suelo y reducir la tolerancia del hospedero a este u otros patógenos (Pérez 2008). Este aspecto hídrico fue un factor continuo que se observó en los sitios donde se realizaron los muestreos, sobre todo en áreas arcillosas.

En el caso de *C. pseudofasciculare*, la colonia en PDA creció con el centro de color naranja-rojizo y con el borde liso de color blanquecino crema. Los conidios observados fueron hialinos, levemente curvados, cortos y septados (de cuatro a seis septos) (Figura 5). Esta descripción coincide con lo descrito por Agustí y Armengol (2014) y Lawrence *et al.* (2019).



Figura 5. A. Micelio de *C. pseudofasciculare* en medio de cultivo V8. B. Macroconidios de *C. pseudofasciculare*.

Cabe destacar que este hongo sólo produce macroconidios, los cuales son generalmente más alargados que los de *Cylindrocarpon* e *Ilyonectria*, y por lo general, no forman clamidosporas. Este organismo se considera como patógeno de cultivos de aguacate y de otros frutales como el olivo y la vid, el cual provoca síntomas de pudrición radical (Agustí y Armengol 2014).

En relación con la identificación de las dos cepas de *Trichoderma* spp. encontradas en los sitios de estudio, ambas se identificaron molecularmente como *T. harzianum*. Esta especie es ampliamente reconocida en el control de diferentes organismos patógenos del suelo (Martínez *et al.* 2013).

## Verificación de los postulados de Koch

De acuerdo con los resultados de los postulados de Koch los organismos encontrados, de forma individual, provocaron necrosis radical, lo que se traduce en el marchitamiento y necrosis del follaje (Figura 6). Esto último es producto de la pudrición tanto de las raíces finas absorbentes como de las fibrosas, y al bloqueo de haces vasculares (por lo que se reduce la absorción y translocación de agua y nutrientes), lo que lleva a la muerte regresiva de la planta (Gadek 1999, Hardham 2005).

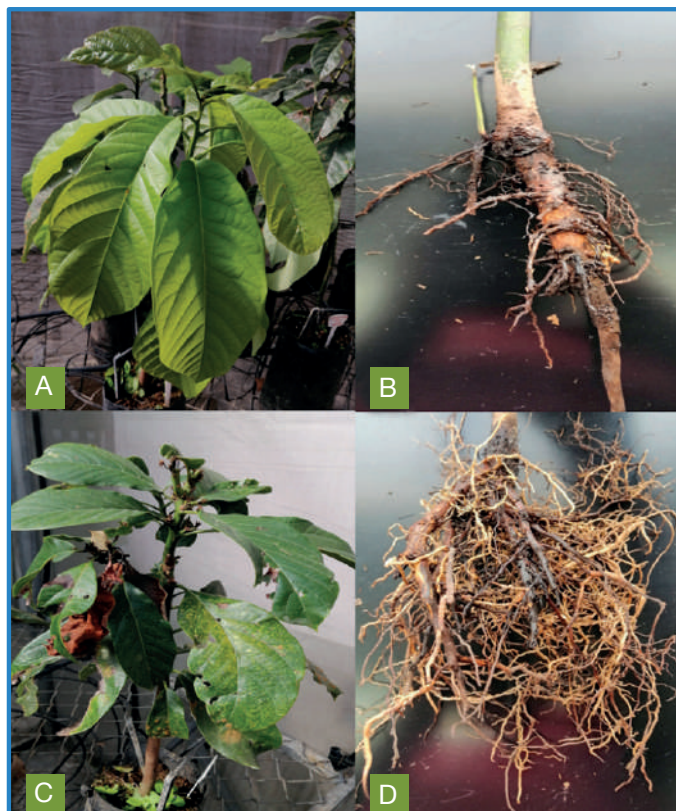


Figura 6. Verificación de los postulados de Koch. A y B. Síntomas provocados por *C. pseudofasciculare*. C y D. Síntomas provocados por *P. cinnamomi*.

Se obtuvo un 67 % de infección en las plantas inoculadas, para cada patógeno. La mezcla de ambos organismos en una misma planta provocó un 33 % de infección, asimismo, en una inoculación previa no se obtuvo infección. Esto se puede deber a que *Phytophthora* presenta una limitada capacidad competitiva, una reducida actividad

saprofítica y poco crecimiento en presencia de otros microorganismos en el suelo (Gadek 1999), por lo que es posible que la población del segundo patógeno, redujo la incidencia del oomicete.

En el caso de *C. pseudofasciculare*, con base en lo obtenido en este ensayo y una prueba



posterior en invernadero con resultados similares, es posible que este patógeno no sea un buen competidor. Asimismo, la condición de alta humedad del sustrato pudo haber afectado la capacidad de infección en la planta al momento de la inoculación y se mantuvo como saprófito, sin embargo, es necesario más investigación para determinar las interacciones de este hongo con otros organismos y su efecto en su capacidad de infección en el huésped, ya que hasta el momento no se reporta información al respecto. Además, Santos *et al.* (2014) mencionan que este organismo inoculado individualmente en el cultivo de uva presentó un periodo de incubación de cuatro

meses, lapso en el cual es probable que se afecte su desarrollo en nuevos tejidos en presencia de otros organismos, tanto benéficos como patogénicos.

Por último, se debe considerar la interacción planta-patógeno en donde es posible que los genotipos inoculados, por provenir de semilla, podrían presentar un nivel de tolerancia a uno o a ambos patógenos. Álvarez *et al.* (2018) reportan una variabilidad genética de hasta un 84 % en materiales criollos, lo cual influye en el comportamiento de las poblaciones de aguacate ante organismos patogénicos.

## Pruebas de confrontación dual

### *Campylocarpon pseudofasciculare*

#### *Trichoderma harzianum*

Ambas trichodermas mostraron una inhibición superior al 50 % sobre *C. pseudofasciculare*. A los tres días después del inicio del estudio, cada hongo benéfico hizo contacto con el patógeno (Figura 7), y a los seis días se dio la colonización de estos sobre el organismo perjudicial, por lo que alcanzaron el grado uno de la escala de Bell (Cuadro 4). Esta velocidad de colonización y la capacidad de parasitación permite considerar a ambas cepas como altamente antagonistas (Bell *et al.* 1982, Sánchez 2016).

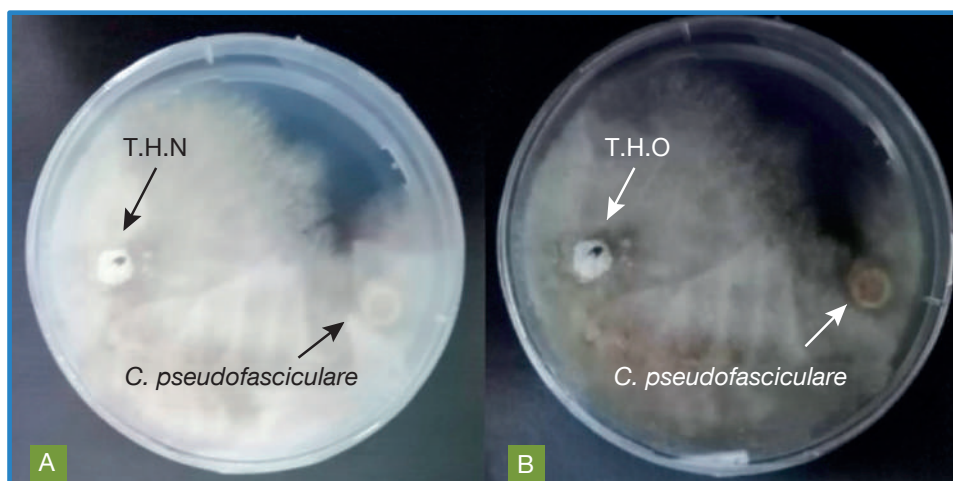


Figura 7. De izquierda a derecha, crecimiento de *Trichoderma harzianum* frente a *C. pseudofasciculare*, a los tres días en confrontación dual. A. Cepa obtenida de Finca el Porvenir, Nandayure. B. Cepa aislada de la Finca Cavar, Orotina.

El patógeno mostró una velocidad de crecimiento baja, por lo que los hongos de biocontrol colonizaron el medio con rapidez. A partir de este resultado, se puede asumir que estos últimos presentan una potencial ventaja competitiva para

colonizar la rizosfera frente al ascomicete. Cabe destacar que *T. harzianum* presenta un sistema quitinolítico compuesto de dos  $\beta$ -1,4- *N*-acetilglucosaminidasas, cuatro endoquitinasas y 1,3-glucanasas (moduladas según el organismo que parasitan), las

cuales provocan degradación celular de los hongos de raíz. Ambos mecanismos limitan la incidencia del patógeno en el huésped (Haran *et al.* 1996, Ait-Lahsen *et al.* 2001). Bajo la condición del ensayo, es posible que los mecanismos descritos influyeron en el reducido crecimiento del patógeno.

Otros mecanismos de control que se reconocen de esta y otras especies de *Trichoderma* son la detoxificación de toxinas excretadas por los patógenos y la desactivación de enzimas de estos producen en el proceso de infección. Además,

inducen mecanismos de defensa bioquímicos y fisiológicos en la planta (Harman 2000, Infante *et al.* 2009).

Respecto a la comparación del crecimiento radial de las trichodermas frente a este patógeno, no se obtuvo diferencias entre sí (Cuadro 4). Sin embargo, bajo condiciones limitantes de baja humedad y alta temperatura la cepa de Nandayure tiene un mayor potencial de establecimiento y control, lo cual es un aspecto relevante ante la variabilidad climática actual.

Cuadro 4. Competencia por sustrato de las cepas de *Trichoderma harzianum* contra patógenos radicales de árboles de aguacate, en pruebas *in vitro*. Laboratorio de Fitoprotección, INTA, San José.

Confrontación	Grado (Escala Bell)	Crecimiento radial de T.H. (cm)*	Tiempo contacto (días)
<i>T. harzianum</i> Nandayure vs <i>C. pseudofasciculare</i>	I	4	3
<i>T. harzianum</i> Orotina vs <i>C. pseudofasciculare</i>	I	5,1	3
<i>T. harzianum</i> Nandayure vs <i>Phytophthora cinnamomi</i>	I	4,0	3
<i>T. harzianum</i> Orotina vs <i>Phytophthora cinnamomi</i>	I	4,4	3

\* n.s. Diferencias no significativas, según Tukey ( $p < 0,01$ ).

## Fertibiol

En el caso de este producto comercial, no se obtuvo efecto inhibitorio sobre el desarrollo del patógeno (Figura 8). Esto se debe a que, según el control de calidad del producto, no se encontraron los organismos que en la etiqueta se declaran. No obstante, se reconoce que los microorganismos que se indica que contiene el producto, tienen potencial para el control biológico. Lo anterior tanto por las interacciones amensalismo y antagonismo que cada bacteria puede ejercer contra patógenos de suelo, así como por las relaciones de competencia que estas bacterias desarrollan en la raíz contra estos organismos nocivos (Rodríguez *et al.* 2016, Pedraza *et al.* 2020).

Al respecto, Arriola (2018) reporta que no obtuvo inhibición de este producto frente a *Ralstonia solanacearum*, bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, al realizar evaluaciones en invernadero, los organismos redujeron la incidencia del patógeno a un 24 %. La autora explica que estas diferencias en los resultados obedecen a que posiblemente las bacterias tuvieron una movilidad reducida en el medio de cultivo o a que la producción o difusión de los compuestos antimicrobianos producidos por estas pudo ser lenta. Asimismo, se debe valorar si la solución comercial contiene alguna sustancia que inhibe el crecimiento de los organismos en caja Petri con el fin de proteger las cepas.

### Bacterias BP-16 y INTA-B37

En la confrontación con la bacteria BP-16 (cepa de *Bacillus subtilis*), se obtuvo un 5,2 % de inhibición del crecimiento del hongo, lo cual puede ser considerado como un efecto leve de control (Figura 8). A pesar de este resultado, se reporta que esta cepa, bajo condiciones *in vitro*, redujo el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 57 % y de *Rhizoctonia solani* un 45 % (Vargas 2020).

Las diferencias entre lo anterior y los resultados obtenidos requieren de más investigación, para determinar si existen mecanismos bioquímicos del hongo que bloquean las sustancias inhibitorias que produce la bacteria. A pesar del bajo porcentaje de reducción del crecimiento alcanzado, esta bacteria puede ser útil en la disminución de la incidencia de este y otros patógenos en la raíz debido a la competencia por espacio y nutrientes, además, induce la respuesta sistémica en plantas mediante la producción de lipopéptidos y refuerza las respuestas basales de las plantas (Chandler *et al.* 2015, Allard *et al.* 2016).



Figura 8. Crecimiento de *C. pseudofasciculare* a los siete días en confrontación con la bacteria BP-16

En el caso de la bacteria INTA-B37, la inhibición sobre el patógeno fue de 39,4 %. Este valor fue menor que el alcanzado por Vargas (2020) quien obtuvo un 69 % de reducción del crecimiento de este organismo sobre *F. oxysporum* y un 61 % sobre *R. solani*. Lo anterior indica el

potencial que tiene esta para el control de hongos perjudiciales para las plantas (Figura 9).

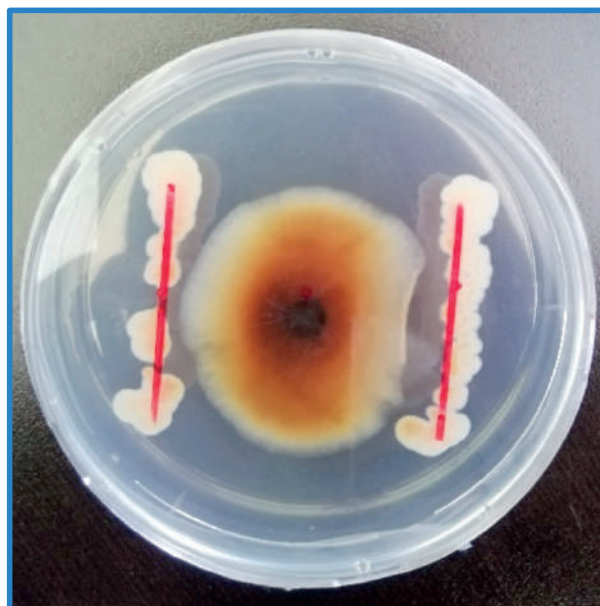
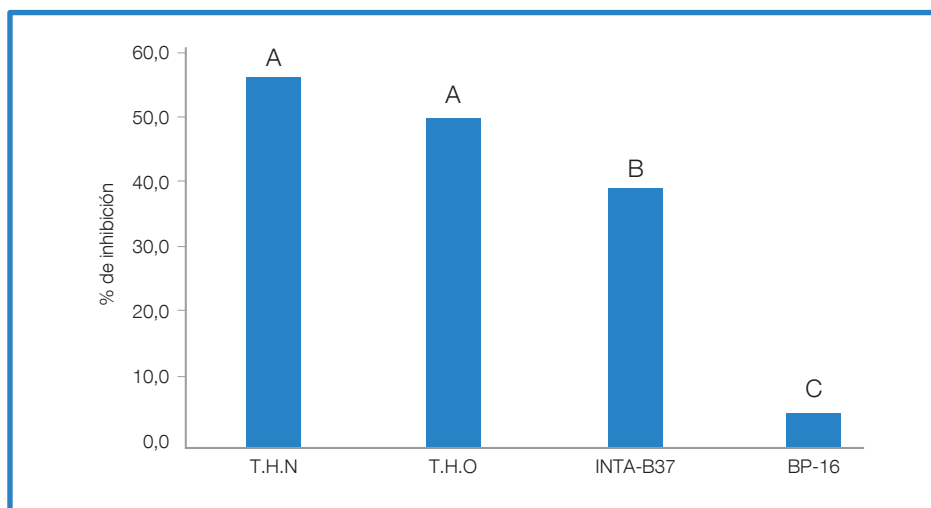


Figura 9. Crecimiento de *C. pseudofasciculare* a los ocho días en confrontación con la bacteria INTA-B37.

En este ensayo no se determinó los metabolitos implícitos en esta habilidad inhibitoria, pero se reconoce que las bacterias del género *Bacillus* producen compuestos antimicrobianos, tales como péptidos de síntesis no ribosomal (NRPs) y policétidos (PKs). Además, generan enzimas líticas como quitinasas, glucanasas, proteasas y acil homoserin lactonasas AHSL), compuestos orgánicos volátiles y hormonas, cuya expresión varía en forma y cantidad según la interacción organismo benéfico-planta-patógeno (Pedraza *et al.* 2020).

### Análisis estadístico

El porcentaje de la variación en la variable evaluada sobre este hongo que es explicado por el modelo lineal fue  $R^2 = 0,75$  ( $p < 0,05$ ). La cepa de *T. harzianum* proveniente de Nandayure obtuvo el mayor valor de inhibición sobre el patógeno con un 56,3 %, seguido por la cepa de *T. harzianum* obtenida de Orotina con un 50,1 %, sin diferencias significativas entre ellas. La bacteria INTA-B37 presentó un 39,4 % de inhibición y BP-16 un 5,2 %, con lo cual ambas bacterias presentaron diferencias estadísticas en el porcentaje de reducción de crecimiento del hongo (Figura 10).



Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de los tratamientos (DGC  $p < 0,05$ ).

Figura 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Campylocarpon pseudofasciculare* en presencia de *T. harzianum* Nandayure (T.H.N), *T. harzianum* Orotina (T.H.O), *Bacillus* BP-16 y *Bacillus* INTA-B37.

De acuerdo con los contrastes realizados (Cuadro 5), se comprobó que las dos cepas de trichoderma no presentan diferencias significativas entre sí en esta variable ( $p = 0,6425$ ). Asimismo, se determinó que la bacteria INTA-B37 redujo un 34,2 % más que BP-16 el crecimiento de *C. pseudofasciculare* ( $p < 0,0001$ ).

Al comparar el efecto inhibitorio de las dos trichodermas contra la reducción del desarrollo alcanzado por las dos bacterias sobre el patógeno se obtuvo que ambas cepas del hongo benéfico disminuyeron el avance de *C. pseudofasciculare* un 30,9 % más que las dos cepas de *Bacillus subtilis* ( $p = 0,0006$ ) (Cuadro 5). Estos resultados demuestran la capacidad de control de los organismos evaluados sobre este patógeno y permite asumir el potencial uso de estos en consorcios para el combate del hongo.

Cuadro 5. Estimadores de las diferencias de las medias de los porcentajes de inhibición alcanzados por los organismos de control evaluados sobre *C. pseudofasciculare*

Tratamiento	Porcentaje	p-valor
T.H.N vs T.H.O	6,23	0,6425
INTA-B37 vs BP-16	34,20	<0,0001
T.H.N*T.H.O vs BP-16*INTA-B37	30,91	0,0006

## ***Phytophthora cinnamomi***

### ***Trichoderma harzianum***

Ambas cepas de este organismo benéfico tuvieron un efecto inhibitorio medio frente *P. cinnamomi*. La que se obtuvo de Nandayure alcanzó un 34,5 % y la que se aisló de Orotina un 44,7 % de reducción de crecimiento del patógeno. Estos valores se consideran bajos, sin embargo,

fueron influenciados por una mayor velocidad de desarrollo mayor del oomicete en presencia de las trichodermas, en comparación con el testigo. Debido a esto, en ambos casos, a los tres días del inicio del ensayo se dio el contacto entre cada hongo benéfico y el patógeno, y a los cuatro días las dos trichodermas llenaron por completo la respectiva caja Petri (Figura 11).



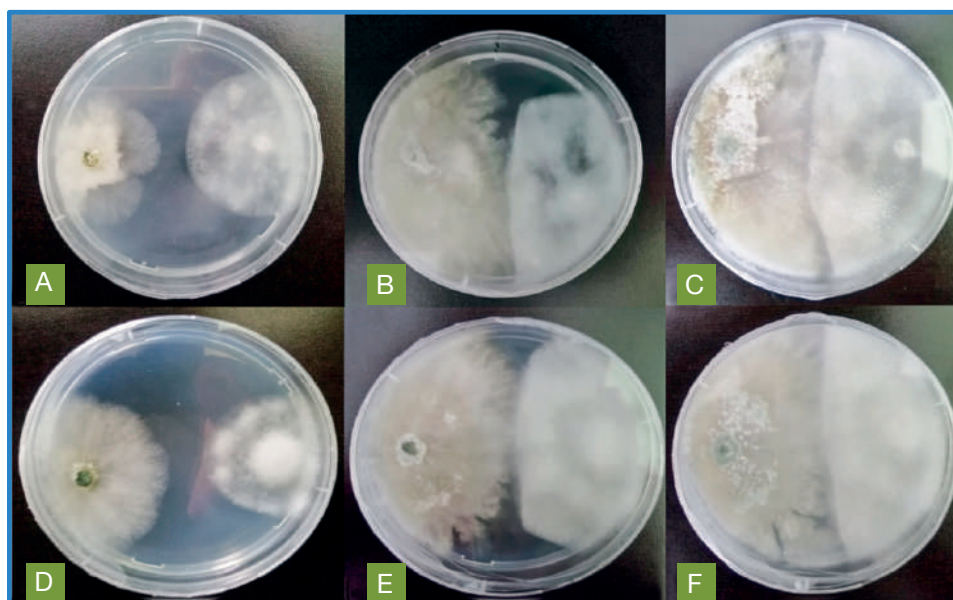


Figura 11. De izquierda a derecha, confrontación dual (CD) de dos cepas de *Trichoderma harzianum* frente a *Phytophthora cinnamomi*. A. T.H.N a los dos días. B. T.H.N a los tres días. C. T.H.N a los cuatro días. D. T.H.O a los dos días. E. T.H.O a los tres días. F. T.H.O a los cuatro días.

Esta reacción de crecimiento se puede deber a un mecanismo de defensa del patógeno frente a *T. harzianum*. En el caso de la cepa que se obtuvo de Nandayure, se dio un crecimiento mayor al testigo en 0,35 cm y 0,68 cm, en el primer y segundo día, respectivamente. En relación con la aislada de Orotina, se obtuvo una diferencia de 0,17 cm, únicamente para el segundo día. En el resto del periodo, en ambos casos, se dio un decrecimiento por la interacción con el otro organismo en la caja Petri (Figura 12).

No existen reportes previos de este comportamiento de desarrollo, sin embargo, se menciona que, en el caso de *P. capsici*, esta produce más esporangios en presencia de *Trichoderma* spp., en respuesta a la inhibición que ejerce este organismo (Ahmed *et al.* 1999). Esto indica un posible efecto del hongo benéfico sobre la fisiología de estos oomicetes.

Cabe destacar que el comportamiento descrito también ocurrió con las dos bacterias en estudio. En el caso de BP-16, para el primer día *P. cinnamomi* frente creció 1,1 cm más que el testigo y para el segundo día el radio fue igual al testigo, en el resto de periodo de evaluación se dio un decrecimiento por el efecto inhibitorio. Con respecto a INTA-B37, este patógeno se expandió 1,1 cm y 0,7 cm más que el testigo, en los mismos días indicados. En los días restantes hubo una tendencia de crecimiento similar al testigo (Figura 13).

En ensayos *in vitro* similares con distintas cepas de *T. harzianum* sobre *P. cinnamomi*, se reporta una inhibición en un rango de 21,8 - 53,8 %. Estas diferencias obedecen a la procedencia de los aislamientos y a variaciones en la habilidad antagonica y parasitica del hongo benéfico (Sánchez 2016).

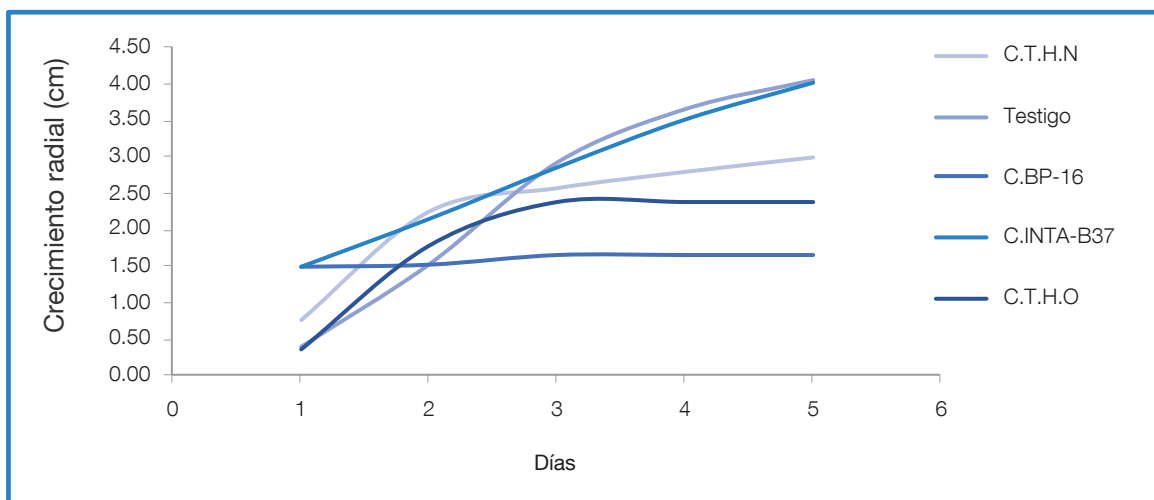


Figura 13. Crecimiento radial de *Phytophthora cinnamomi* en PDA acidificado en confrontación dual con los organismos en estudio.

## Fertibiol

No se obtuvo inhibición del crecimiento del patógeno por la razón expuesta en el apartado anterior. Asimismo, este resultado pudo ser influenciado por la reacción de crecimiento del patógeno que se indicó en el subapartado anterior.

## Bacterias BP-16 y INTA-B37

De acuerdo con las evaluaciones, la bacteria INTA-B37 no tuvo efecto de inhibición sobre el crecimiento del oomicete. Esto se puede deber a que el patógeno no es susceptible a los metabolitos que libera la bacteria o bien a que la tasa de crecimiento de *P. cinnamomi*, en respuesta a la presencia del organismo benéfico, superó la concentración de dichos compuestos, por lo cual no fue suficiente para reducir el desarrollo de patógeno de forma evidente (Figura 14).

En el caso de la bacteria BP-16, esta redujo un 55 % el crecimiento de esta phytophthora. Se reporta una cepa de este organismo aislada de raíces de aguacate que alcanzó un 26 % de

inhibición contra este patógeno (Hakizimana *et al.* 2011). Por lo tanto, el resultado obtenido es más del doble del valor anterior por lo que se puede considerar como un organismo con alto potencial para ser utilizado como controlador de *P. cinnamomi* en plantaciones de aguacate (Figura 15).

Los mecanismos de inhibición de *B. subtilis* ya fueron mencionados en el apartado anterior y han sido ampliamente descritos en diversos ensayos. Las diferencias en la reducción de crecimiento obtenidas con los dos patógenos de este estudio indican la posibilidad de una variación en la liberación de metabolitos entre cepas de *Bacillus subtilis*, tanto en tipo como en concentración.

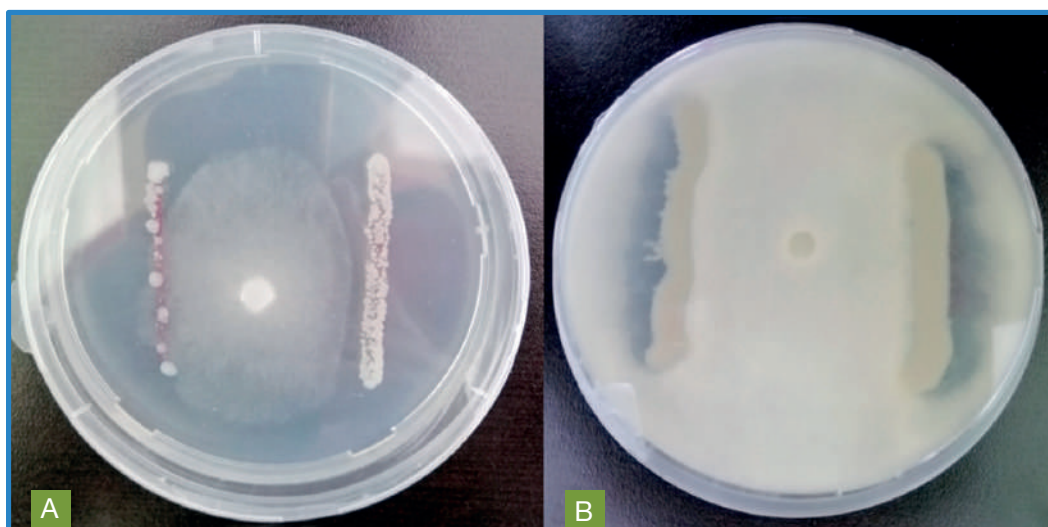


Figura 14. Crecimiento de *P. cinnamomi* en confrontación con la bacteria INTA-B37. A. Crecimiento un día después del inicio del ensayo. B. Tres días después del inicio del ensayo.

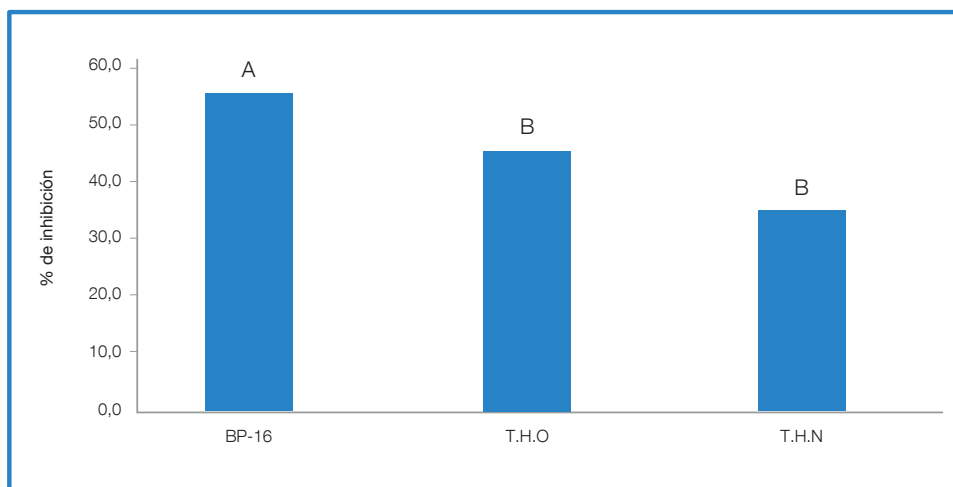


Figura 15. Crecimiento de *P. cinnamomi* en confrontación con la bacteria BP-16. A. Crecimiento un día después del inicio del ensayo. B. Cuatro días después del inicio del ensayo.

### Análisis estadístico

El porcentaje de la variación en la variable evaluada sobre este oomicete que es explicado por el modelo lineal fue  $R^2 = 0,74$  ( $p < 0,05$ ). De acuerdo con los resultados de este ensayo, la bacteria BP-16 presentó el mayor porcentaje de inhibición del patógeno con un 55 %, valor que

difiere estadísticamente en comparación con la reducción alcanzada por las dos *T. harzianum*, las cuales presentaron un 44,7 % (O) y 34,5 % (N). Entre estas cepas de hongos benéficos no se presentaron diferencias significativas (Figura 17).



Letras distintas indican diferencias significativas (DGC  $p < 0,05$ ).

Figura 17. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* en presencia de *Bacillus* BP-16, *T. harzianum* Nandayure, *T. harzianum* Orotina.

En relación con los contrastes entre las medias de los valores obtenidos, se obtuvo que la *T. harzianum* proveniente de Orotina redujo un 10,2 % el desarrollo del patógeno en relación con la cepa originaria de Nandayure ( $p=0,0482$ ). Además, el efecto de inhibición de la bacteria BP-16 versus ambas cepas del hongo benéfico, fue mayor un 15,52 % ( $p < 0,0052$ ) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Estimadores de las diferencias de las medias de los porcentajes de inhibición alcanzados por los organismos de control evaluados sobre *P. cinnamomi*.

Tratamiento	Porcentaje	p-valor
T.H.O vs T.H.N	10,23	0,0482
BP-16 vs T.H.N y T.H.O	15,52	<0,0052

Al comparar las medias del porcentaje de inhibición de los organismos evaluados sobre *C. pseudofasciculare* (C) y *P. cinnamomi* (P), se obtuvo que no hubo diferencias entre estos grupos ( $p=0,1604$ ), sin embargo, al contrastar las medias de los valores de reducción del crecimiento obtenido con las trichodermas para cada patógeno, las confrontadas con *C. pseudofasciculare* tuvieron un 13,6 % más de efectividad que en el caso del oomicete ( $p=0,0461$ ) (Cuadro 7), lo cual pudo ser influenciado por la agresiva respuesta de desarrollo de *P. cinnamomi* frente a los organismos de control.

En general, con los resultados obtenidos, se pudo determinar el potencial de control de los organismos benéficos sobre ambos patógenos. Se debe valorar el uso de estos en consorcio para el combate biológico en campo.

Cuadro 7. Estimadores de las diferencias de las medias de los porcentajes de inhibición alcanzados por grupo sobre *C. pseudofasciculare* y *P. cinnamomi*.

Tratamiento	Porcentaje	p-valor
T.H.N, T.H.O y BP-16 (P) vs T.H.N, T.H.O y BP-16 (C)	7,63	0,1604
T.H.N, T.H.O (C) vs T.H.N, T.H.O (P)	13,55	0,0461



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al M.Sc. Luis Vargas Cartagena del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) y a la Ph.D. Mónica Blanco Meneses y al Ph.D. Mauricio Serrano Porras de la Universidad de Costa Rica, por su valiosa colaboración para el desarrollo de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Agustí, C.; Armengol J. 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea* 52(2):245–261.
- Agustí, C.; Armengol, J. 2014. El pie negro de la vid: agentes causales, epidemiología y estrategias de control. *Phytoma* (260):32-35.
- Ahmed, A.; Pérez, C.; Egea, C.; Candela, M. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* 48:58–65.
- Ait-Lahsen, H.; Soler, A.; Rey, M.; De la Cruz, J.; Monte, E.; Llobell, A. 2001. An antifungal Exo- $\alpha$ -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5833-5839.
- Allard, R.; Tessier, L.; Lécuyer, F.; Lakshmanan, V.; Lucier, J.; Garneau, D.; Caudwell, L.; Vlamakis H.; Bais, D.; Beauregard, P. 2016. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio* 7(6):1-10.
- Álvarez, M.; Pecina, V.; Acosta, E.; Almeyda, I. 2018. Evaluación molecular del aguacate criollo (*Persea americana* Mill) en Nuevo León, México. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20(2):38-46.
- Arriola, I. 2018. Evaluación de la eficacia *in vitro* e *in vivo* de productos químicos, microorganismos antagónicos y extractos botánicos, sobre el nivel de inóculo de *Ralstonia solanacearum*, agente causal de la marchitez bacteriana en tomate. Tesis M.Sc. Universidad de Costa Rica. San Pedro, Costa Rica. 110 p.
- Batista, J.; García, R.; Pérez, J.; Zabaleta E.; Montes, R.; Cerrato, R. 2008. Inducción de supervivencia a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico. *INTERCIENCIA* (33):96-102.
- Bell, D; Well, H; Markham, C. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-38
- Chandler, S.; Van Hese, N.; Coutte, F.; Jacques, P.; Höfte, M.; De Vleeschauwer, D. 2015. Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 91:20-30.
- Dobrowolski, M.; Shearer, B.; Colquhoun, I.; O'Brien, P.; Hardy, G. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology* 57:928-936.
- Erwin, D.; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora: Diseases Worldwide*. Minnesota, USA, APS Press. 562 p.
- French, E.; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA). 288 p.
- Gadek, P. 1999. Patch Deaths in Tropical Queensland Rainforests: association and impact of *Phytophthora cinnamomi* and other soil borne organisms. Cairns, Australia, Cooperative Research Centre for Tropical Rainforest Ecology and Management. 101 p.
- Gallegly, M.; Hong, C. 2008. *Phytophthora: Identifying species by morphology and DNA fingerprints*. Minnesota, USA, APS Press. 158 p.

- Hakizimana, J.; Gryzehout, M.; Coutinho, T.; Van Den Berg, N. 2011. Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*. Cairns, Australia, Proceedings VII World Avocado Congress. p. 1-10.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I., 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980-985.
- Hardham, A. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology* 6:589-604.
- Harman, G. 2000. Myths and dogmas of control. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4):377-393.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal* 24(1):14-21.
- Lawrence D.; Nouri, M.; Trouillas F. 2019. Taxonomy and multi-locus phylogeny of *Cylindrocarpon*-like species associated with diseased roots of grapevine and other fruit and nut crops in California. *Fungal Systematics and Evolution* 4:59-75.
- Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal* 28(1): 1-11.
- Morales, J.; Morales, V.; López, J. 2005. El aguacate: Manejo integrado del cultivo. Boletín técnico. Bucaramanga, Colombia, Corpoica. 45 p.
- Palacios, L. 2021. Caracterización de microorganismos asociados a la pudrición de raíces de Aguacate *Persea americana* Mill en viveros del Valle del Cauca, Colombia. Tesis Lic. Palmira, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 45 p.
- Parkinson, L. 2017. Investigating soilborne necrotrophic fungi impacting avocado tree establishment in Australia. Tesis Ph.D. Queensland, Australia, The University of Queensland. 252 p.
- Pedraza, L.; López, C.; Uribe, D. 2020. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con las plantas. *Acta biológica Colombiana* 25(1):112-125.
- Pérez, R. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2:1-24.
- Ramírez, G.; Morales J. 2013. Primer informe de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill) en Colombia. *Protección Vegetal* 28(1):27-35.
- Ramírez, J.; Castañeda, D.; Morales, J. 2013. Dinámica microbiana del suelo asociada a diferentes estrategias de manejo de *Phytophthora cinnamomi* Rands en aguacate. *Ceres* 60(6):11-819.
- Rodríguez, J.; Ríos, Y.; Baró, Y. 2016. Efectividad de cepas de *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. para el control de especies fúngicas asociadas a hortalizas. *Cultivos Tropicales* 37(1):13-19.
- Royse, D.; Ries S. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology* 68: 603-607.
- Sánchez, I. 2016. Caracterización del agente causal de la pudrición radicular del aguacate y *Trichoderma* sp., como potencial agente de control biológico en Nicaragua. Tesis M.Sc. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 62 p.
- Santos, R.; Blume, E.; Brião, M.; Harakawa, R.; Garrido, L.; Rego, C. 2014. Characterization of *Campylocarpon pseudofasciculare* associated with black foot of grapevine in southern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea* 53(3):406-415.
- Sarandón, J; Flores, C. 2014. Agroecología: Bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. EDULP. 466p.
- Tamayo, P. 2007. Enfermedades de Aguacate. *Politécnica* (4):51-70 p.
- Vargas, C. 2020. Selección de microorganismos antagonistas de fitopatógenos que afectan el cultivo de tomate y papa. Informe Final. San José, Costa Rica. INTA. 29 p.
- Whipps, J M. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glass-house pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, 107(1): 127-142.