



POSIBILIDADES DE BIOCONTROL DE LA PODREDUMBRE DE RAÍCES Y CORONA EN PLANTAS DE FRESA

Arenas, C., Casanova, C., López, C.J. y Melero, J.M.

Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba.

RESUMEN

A fin de controlar sosteniblemente la Podredumbre de Raíz y Corona de la Fresa (PRCF), causada por *Fusarium solani*, hemos realizado un estudio de biocontrol con aislados de *Trichoderma* spp. recuperados de suelo y plantas de fresa, así como de aguacate, para confirmar los posibles mecanismos involucrados y el potencial control de PRCF.

En un total de 32 aislados, se caracterizaron las especies *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum* como posibles agentes de biocontrol *in vitro* en cultivos duales (CD) o sobre discos de celofán estéril (DCE) que permiten flujo de metabolitos antagonistas al medio de cultivo PDA, donde se transfirieron a continuación cuatro aislados de *F. solani* patogénicos en plantas de fresa. *T. harzianum* formó un halo de inhibición frente al crecimiento dual con aislados de *F. solani*, pero no redujo el crecimiento del mismo en el ensayo con DCE. *T. virens* y *T. asperellum* redujeron el crecimiento de los *F. solani* en DCE y limitaron los síntomas de la enfermedad.

Las plantas de fresa vegetando durante 2 semanas a 25°C en sustrato inoculado con granos de trigo esterilizados y luego colonizados por los aislados de *Trichoderma*, se inocularon con los citados aislados de *F. solani*. En estos experimentos de patogenicidad evaluamos los síntomas en plantas (cv. Fortuna) incubadas a 25±3°C, óptimas para ambos, los agentes de biocontrol y los patógenos. Tras 3 meses de incubación, los pesos frescos medios de las plantas de fresa inoculadas con *F. solani*, así como de la parte aérea de las mismas, se incrementaron respecto a sus testigos, cuando se aportaron las *Trichoderma*. Así demostramos la eficacia de las antagonistas frente a la enfermedad.

En plantas no inoculadas, los aportes de *T. harzianum* y *T. virens* supusieron mejoras de los pesos de las plantas respecto a los observados tras el mero aporte de *T. asperellum*. Los efectos netos de las inoculaciones con los aislados de *F. solani* fueron escasos, aunque más acusados con uno de ellos.

Palabras clave: *Cultivos duales, Fragaria x ananassa, Fusarium solani, metabolitos fúngicos inhibidores del crecimiento micelial, Trichoderma asperellum, T. atroviride, T. harzianum, T. virens.*

INTRODUCCIÓN

La Podredumbre de Raíz y Corona de las plantas de Fresa (PRCF) es una enfermedad emergente de los cultivos de fresa en España, causada por *Fusarium solani*. Afecta a los esquejes enraizados propagados vegetativamente en viveros de altura (provincias de Ávila, Segovia y Valladolid), así como a los cultivos de producción de frutos en túneles de plástico en el sur de la provincia de Huelva, donde se han detectado pérdidas importantes en cultivares como ‘Fortuna’(Pastrana *et al.*, 2014).

Entre las 200 especies de *Trichoderma* reconocidas molecularmente (Atanovska *et al.*, 2013), hay muchas que producen metabolitos antibióticos y/o enzimas extracelulares que degradan celulosa y quitina, pudiendo así reducir la invasión de las plantas por los agentes fitopatógenos. Además, tienen capacidad de incrementar el desarrollo de las raíces y el crecimiento de las plantas. Así se lograría el control biológico de cultivos hortícolas y extensivos, y algunos efectos beneficiosos sobre ellos, habiéndose conseguido formulaciones de uso comercial común (Harman, 2000; Harman and Björman, 1998; Harman *et al.*, 2004; Howell, 2003).

Son muy útiles los aislados de *Trichoderma* que crecen en asociación con las raíces de plantas (competencia en la rizosfera). Otros mecanismos de biocontrol incluyen la inducción de resistencia sistémica en plantas (que implica al ácido salicílico y a la formación de proteínas PR) y el micoparasitismo mediante estructuras análogas a los apresorios (Harman, 2006; Zaidi and Singh, 2013).

Los aislados de *Trichoderma* suelen ser eficaces en el control de hongos (*Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*...), oomicetos (*Phytophthora*) y bacterias (*Pseudomonas* y *Xanthomonas*) fitopatógenos (Howell, 2003; Hjeljord and Tronsmo, 1998; Harman *et al.*, 2004; Harman, 2006; Zaidi and Singh, 2013). Los tratamientos de plántulas de fresa con un producto comercial basado en el aislado de T18 de *Trichoderma asperellum* logró un buen efecto frente a la enfermedad PRCF, análogo al que se obtuvo con un formulado comercial compuesto de dos especies de *Bacillus*, que resultaron también potenciales agentes de biocontrol respecto a la podredumbre carbonosa (cuyo agente causal es *Macrohomina phaseolina*), importante patógeno de fresa en las áreas de cultivo de fresa en España (Pastrana *et al.*, 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos duales (CD)

Se transfieren discos de margen de colonias de cada uno de los cuatro aislados de *F. solani* con crecimiento activo en placas con medio de cultivo PDA que se incuban a 25°C. Tras 2 días, se transfieren cada uno de los diferentes aislados de *Trichoderma* enfrentándose a 3 cm de los discos anteriores de *Fusarium* y, cuando ambos se encuentran, se miden los radios de crecimiento y se anota el tipo de interacción entre las *Trichoderma* spp. y *F. solani*.

Cultivos sobre Discos de Celofán Estériles (DCE)

Se cortan discos de celofán para cubrir toda la superficie de cada placa de PDA. Se sumergen estos en agua y se esterilizan en autoclave, depositándolos sobre el medio estéril. A continuación, se sitúan discos de colonias de los aislados de *Trichoderma* en el centro de las placas y se incuban durante 3 días a 25°C para que los metabolitos generados por el micelio fluyan al medio, retirando el celofán antes de que se inicie la esporulación. En el centro de dichas placas (sin celofán) se transfieren discos de colonias de los aislados de *F. solani*.

Se vuelven a incubar y, determinando la velocidad de su crecimiento lineal, se evalúa la inhibición atribuible a los metabolitos previamente generados por las *Trichoderma*.

Para los tres experimentos, con un total de 34 aislados de *Trichoderma*, se compararon estadísticamente las áreas bajo las curvas de crecimiento lineal de los cuatro aislados de *F. solani* evaluados.

Inoculaciones de plantas de fresa

Para los experimentos de patogenicidad se incubaron los aislados de *F. solani* en hidrolizado de caseína + solución AZ estéril, en agitador orbital (137 rpm) durante una semana a 25°C. A partir de las 2 semanas de la inoculación se aportaron en torno a la corona de cada planta de fresa (cv. Fortuna) inoculada, 20 granos de trigo colonizados con los aislados de *Trichoderma* spp. (Foto. 3), que fueron cubiertos por el sustrato.

Este proceso de aporte de posibles agentes de control biológico se repitió al cabo de un mes, observando secuencialmente los síntomas hasta que las plantas se extrajeron a los 3 meses.

Los sistemas radicales se lavaron cuidadosamente para anotar síntomas y se determinaron los pesos frescos de las plantas completas, así como los de sus partes aéreas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivos duales (CD)

Se observaron tres tipos de interacciones entre los aislados de *Trichoderma* spp. y *Fusarium solani*. Solapamiento de colonias: los micelios crecen sobre el espacio disponible en las placas, sin interacción entre ellos. Halo de inhibición: se muestra un espacio que separa ambas colonias, que frenan sus crecimientos y Línea de inhibición: los micelios llegan a contactar y crean una línea de mayor coloración con posible inhibición leve (Foto. 1).

Cultivos sobre Discos de Celofán Estériles (DCE)

En el primer experimento de DCE, tres de los 12 aislados evaluados, procedentes de cultivos de fresa, T7 (*T. harzianum*), T19 y T23, no se diferenciaron significativamente del

testigo, para los aislados FsABG, Fs614 y Fs725 de *F. solani* transferidos a PDA con los metabolitos (Fig. 1). Por contra, T1 resultó muy efectivo en reducir el crecimiento micelial de Fs614 y Fs725, y T13 frente a los otros dos aislados de *F. solani*. Además, T10 y T11 solo resultaron efectivos frente a FsABG (Fig. 1).

En el segundo experimento se ensayaron 12 nuevos aislados de cultivos de fresa, y el aislado T30 (*T. asperellum*) redujo significativamente el crecimiento micelial de los aislados Fs614 y Fs725. El aislado T33 fue muy efectivo frente a Fs614, mientras que T36 y T41 fueron significativamente efectivos restringiendo el crecimiento de FsAGB y Fs393, respectivamente. Por contra, T24 se asemejaba más al testigo con cualquiera de los *F. solani* (Fig. 2).

En el tercer experimento se evaluaron 10 aislados de *Trichoderma* procedentes de cultivos de aguacate ubicados en las zonas costeras de Málaga y Granada. Los crecimientos lineares de colonias de Fs393 y FsAGB se redujeron cuando se realizaron en PDA con CH273 (*T. atroviride*) y CH303 (*T. virens*), en tanto que CH312 redujo el crecimiento de FsABG y Fs614, posiblemente por la difusión de metabolitos de estos aislados al medio de cultivo (Fig. 3).

En la Foto 4 se contrastan los síntomas en un testigo no inoculado y la severidad en plantas de fresa a los 3 meses de haberlas inoculado con *F. solani*.

Tras ese periodo de incubación, los respectivos promedios de los pesos total (PT) y de sus partes aéreas de las plantas de fresa inoculadas con los aislados de *F. solani* se incrementaron respecto a sus testigos sin *Trichoderma* (Tabla 1), mostrándose la eficacia antagonista frente a la enfermedad. En concordancia con el halo de inhibición entre colonias de *F. solani* y *Trichoderma* observado en CD (Foto 1), un efecto análogo ocurrió para el PT de plantas inoculadas con Fs174 y con *T. harzianum* (T7), pero no se mostró con *T. virens* (CH303).

Los testigos inoculados con *F. solani* que no tuvieron aportes de *Trichoderma* también disminuyeron PT y el peso de la parte aérea de las plantas (Ppa), aunque no significativamente, respecto al testigo no inoculado (Tabla 1).

En ausencia de *F. solani*, aumentó levemente el Ppa con los aportes de *T. harzianum* y *T. virens*, mientras que solo con *T. asperellum* observamos el efecto contrario para PT (Tabla 1).

Para un control sostenible de la enfermedad, hemos evaluado el biocontrol con aislados monoconídicos de *Trichoderma* spp., indagando los posibles mecanismos de acción, y el potencial control de PRCF. Se caracterizaron tres especies como posibles agentes de biocontrol *in vitro* en CD, o sobre DCE (que permite el flujo de metabolitos antagonistas al medio PDA), donde se transfirieron posteriormente cuatro aislados de *F. solani* patogénicos en plantas de fresa.

El aislado de *T. harzianum* formó un halo de inhibición (Foto 2) frente al crecimiento dual con *F. solani*, pero no redujo el crecimiento del mismo en el ensayo DCE. Por contra, los aislados de *T. asperellum* y *T. virens* redujeron el crecimiento de los *F. solani* en DCE.

La efectividad de biocontrol de estos aislados ha sido también demostrada previamente en el patosistema *Rosellinia necatrix*-aguacate (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009; Ruano-Rosa *et al.*, 2010; Arjona-Girona *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Con aislados de tres especies de *Trichoderma*, se ha mostrado control biológico de la PRCF ocasionada por *F. solani* en cultivos de fresa, tanto por los metabolitos liberados *in vitro* que restringen su crecimiento, como en pruebas de patogenicidad en plantas inoculadas con en sustratos a los que aportaban micelios de *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum*.

Parece oportuno continuar una línea de investigación para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de actuación de las especies antagonistas (Howell, 2003).

Asimismo, habría que confirmar los resultados obtenidos y determinar la frecuencia de aislados con esa propiedad frente al patógeno y a la PRCF, así como en relación a otros importantes hongos patógenos de dicho cultivo, como la Podredumbre carbonosa, levemente

Cabría, posteriormente, optimizar las metodologías para su aplicación en cultivos de fresa en campo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARJONA-GIRONA, I., VINALE, F., RUANO-ROSA, D, LORITO, M. AND LÓPEZ-HERRERA, C.J. 2014. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. European Journal of Plant Pathology 140. 385-397.
- ATANOSOVA, L.; DRUZHININA, I.S.; JAKLISTSCH, W.M. 2013. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. Pp. 10-42 In: *Trichoderma: Biology and Applications*, CAB International. (eds P.K. Mukherjee *et al.*), 327 pp.
- HARMAN, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis 84, 377-393.
- HARMAN, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194.
- HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. 2004. *Trichoderma* species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2, 43-56.

HJELJORD, L. AND TRONSMO, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. Pp. 131-151 In: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2 Taylor & Francis (eds G.E. Harman and C.P. Kubicek), 393 pp.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87: 4-10.

PASTRANA A.M., M.J. BASALLOTE-UREBA1, A. AGUADO1, K. AKDI AND N. CAPOTE. 2017. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathol Mediterr* 55: 109-120.

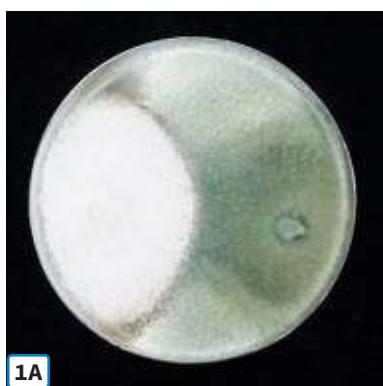
PASTRANA A.M., N. CAPOTE, B. DE LOS SANTOS, F. ROMERO AND M.J. BASALLOTE-UREBA, 2014. First report of *Fusarium solani* causing crown and root rot on strawberry crops in southwestern Spain. *Plant Disease* 98: 161.

RUANO ROSA, D. AND LÓPEZ-HERRERA, C.J. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as bio-control agents against avocado white root rot. *Biological Control* 51: 66-71. RUANO ROSA, D., DEL MORAL-NAVARRETE, L. AND LÓPEZ-HERRERA, C.J. 2010. Selection of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Rosellinia necatrix* Spanish journal of Agricultural Research 8: 1084-1097.

ZAIKI, N.W. AND SINGH, U.S. 2013. *Trichoderma* in plant health management. Pp. 230-246 In: *Trichoderma: Biology and Applications*, CAB International. (eds P.K. Mukherjee et al.), 327 pp.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada dentro del Programa Estatal de I+D+I orientada a los Retos de la Sociedad. Proyecto RTA 2013-00062-C05-03.



FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1: 1A) Solapamiento de colonias (SC): Los micelios crecen sobre el espacio disponible en las placas, sin interacción entre ellos; 1B) Halo de inhibición (HI): Se muestra un espacio que separa ambas colonias, que frenan sus crecimientos; 1C) Línea de inhibición (LI): los micelios llegan a contactar y crean una línea de mayor coloración con posible inhibición leve.



Fotografía 2. 2A) Inoculación de esquejes enraizados de plantas de fresa con suspensiones de conidias de *F. solani*; 2B) tras lo que se prepararon suspensiones acuosas concentradas (a 10^6 conidias/ml) en las que se sumergían los sistemas radiculares de los esquejes, durante 30 min a temperatura ambiente; 2C) trasplantándolas luego en macetas con sustrato estéril que se regaba con dichas suspensiones inoculantes y se mantuvieron en invernadero climatizado ($25\pm3^\circ\text{C}$).

Fotografía 3. Colonización de granos de trigo estériles con *Trichoderma* spp.

Fotografía 4. Síntomas en plantas testigo (izda) e inoculadas con *F. solani* (dcha).

TABLAS

TABLA 1. Peso (g) total (PT) de las plantas y de sus partes aéreas (Ppa), inoculadas con dos aislados de *Fusarium solani* y aportes de *Trichoderma virens* (Tv), *T. harzianum* (Th) o *T. asperellum* (Ta).

A. Fúngicos (Fs+Tr)	Ppa	PT
• 0 + Th	16.61 A	23.39 ABCD
• ABG + Th	16.20 A	24.89 ABC
• 174 + Th	14.70 AB	29.96 A
• 0 + Tv	17.08 A	25.87 AB
• ABG + Tv	15.59 AB	23.56 ABCD
• 174 + Tv	11.21 BC	23.21 CD
• 0 + Ta	9.91 CD	17.13 DE
• ABG + Ta	16.28 A	26.20 AB
• 174 + Ta	17.07 A	27.81 AB
• 0 + 0	0.33 CD	23.84 ABCD
• ABG + 0	7.90 CD	18.93 CDE
• 174 + 0	5.35 D	16.19 E

FIGURAS

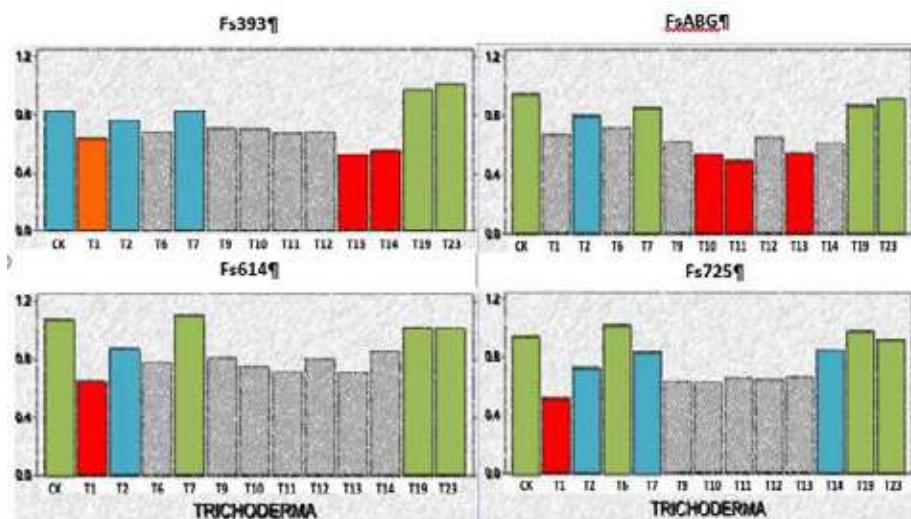


Figura 1. Áreas bajo la curva de crecimiento lineal de cuatro aislados de *F. solani*.

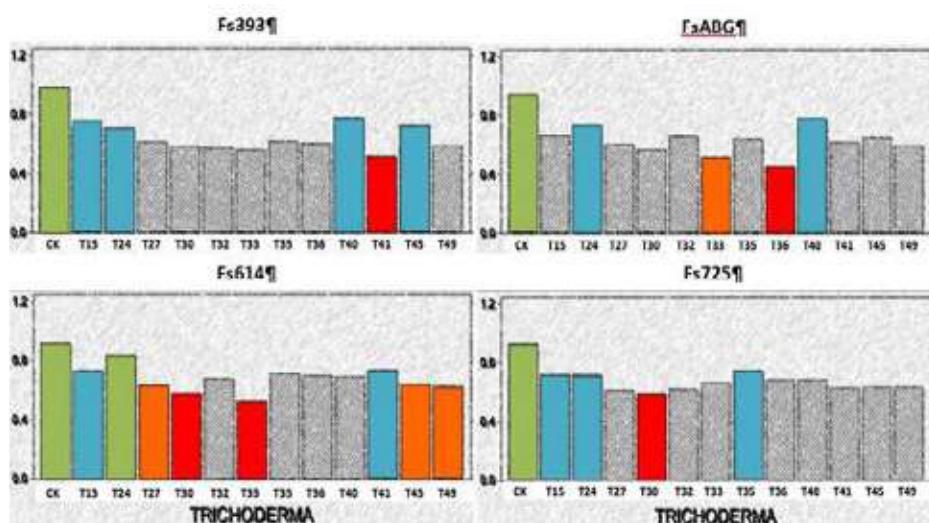


Figura 2. Áreas bajo la curva de crecimiento lineal de cuatro aislados de *F. solani*.

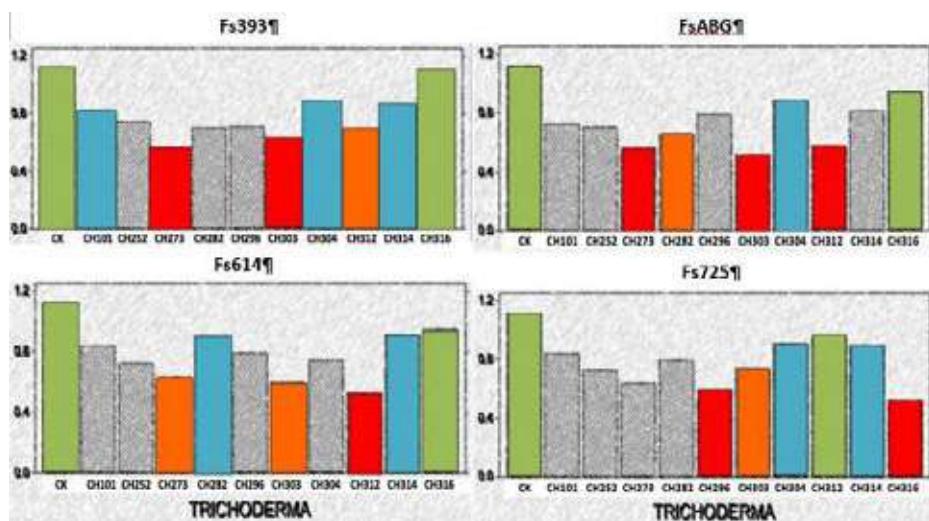


Figura 3. Áreas bajo la curva de crecimiento lineal de cuatro aislados de *F. solani*.