

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de microorganismos biocontroladores frente a *Pythium derbayanum* Heese

In vitro evaluation of antifungal activity of biocontrol microorganisms to *Pythium derbayanum* Heese

Michel Leiva-Mora¹, Alexander Bernal Cabrera², Yelenys Alvarado Capó¹, Nayanci Portal González¹, Mayra Acosta Suárez¹, Mileidy Cruz Martín¹, Cynthia Sánchez¹, Berkis Roque Morales¹.

1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. CP 54 830. Cuba.

1. Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba. Carretera a Camajuaní km 5 ½. CP 54 830. Cuba.

E-mail: michel@ibp.co.cu

RESUMEN. El género *Pythium*, comprende un amplio grupo de especies que ocasionan pérdidas económicas importantes en la agricultura. En vitroplantas de plátanos y bananos se ha diagnosticado la presencia de *P. derbayanum* Hesse como el agente causal de la marchitez en fase de aclimatización, para el cual el tratamiento con fungicidas químicos no ha sido efectivo. En el trabajo se evaluó el antagonismo *in vitro* mediante la técnica del cultivo dual, de tres microorganismos biocontroladores (*Trichoderma viridae*, *Gliocladium virens* y *Bacillus subtilis*) frente a *P. derbayanum*, para evaluar candidatos que inhiban eficientemente el crecimiento micelial de este patógeno. Se constató que todos los microorganismos biocontroladores utilizados inhibieron el crecimiento micelial de *P. derbayanum*; siendo *T. viridae* la que mayor capacidad antagónica y porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. derbayanum* ocasionó. Asimismo, *T. viridae* invadió totalmente la colonia del hongo fitopatógeno y esporuló sobre ella, mientras que *G. virens* solo cubrió el 50 % de la colonia de *P. derbayanum* sin esporular sobre la misma. Este resultado brinda la posibilidad de utilizar microorganismos biocontroladores como una alternativa promisoriosa para el control biológico de *P. derbayanum* en la fase de aclimatización de plátanos y bananos.

Palabras clave: Aclimatización, control biológico, marchitez de las posturas, *Pythium derbayanum*.

ABSTRACT. *Pythium* genera comprise a wide range of species which cause great economical losses in agriculture. Banana and plantain vitroplants, have been commonly affected by *P. derbayanum* Hesse, reported as the causal agent of *Musa* spp. wilt in acclimatization, which is weakly controlled by chemical fungicides. In this paper, it was evaluated the *in vitro* antifungal activity of biocontrol microorganisms to *P. derbayanum*. The *in vitro* antagonism was evaluated using dual culture techniques, using three biocontrol microorganisms (*Trichoderma viridae*, *Gliocladium virens* y *Bacillus subtilis*) and *P. derbayanum*, to evaluate candidates able to inhibit the mycelial growth from this pathogen. It was demonstrated that all the biocontrol microorganisms, inhibited the mycelial growth of *P. derbayanum* and *T. viridae* showed the major antagonistic capacity and the greater inhibition of pathogen mycelial growth. *T. viridae* sporulate profusely over the mycelia colony of *P. derbayanum*, while *G. virens* colonize 50% of the colony of the pathogen but sporulation was not seen. The results presented in this investigation, give an alternative biological control of *P. derbayanum*, using antagonistic microorganisms in the acclimatization of banana and plantain plants.

Key words: Acclimatization, biological control, damping-off, *Pythium derbayanum*.

INTRODUCCIÓN

El género *Pythium*, comprende un grupo de especies que ocasionan pérdidas económicas importantes en la agricultura (Augspurger y Wilkinson, 2007). Las mismas, causan la podredumbre de las raíces y frutos en campo e invernadero. Sin embargo, dentro de este género también se encuentran algunas especies

biocontroladoras de patógenos del suelo (Vallance *et al.*, 2008).

Las especies de *Pythium* tienden a ser inespecíficas y generalistas en su rango de huéspedes y por ello suelen ser devastadoras (Owen-Going, 2002). Sin embargo, los daños ocasionados por *Pythium* se

limitan a un área localizada, debido a la poca movilidad de las zoosporas. Además, dichos propágulos necesitan una superficie de agua para trasladarse (Sutton *et al.*, 2006). En vitroplantas de plátanos y bananos se ha diagnosticado la presencia de *Pythium derbayanum* Hesse, como el agente causal de la marchitez en fase de aclimatización. (Herrera y Ditta, 1999)

Para el control de las enfermedades causadas por especies de *Pythium*, se utilizan medidas culturales y agrotécnicas que favorezcan la aireación de los suelos, el manejo adecuado de la fertilización y el uso de fungicidas. Sin embargo, algunos productos químicos utilizados para su control, impactan negativamente el medio ambiente y la salud humana; además, no ofrecen una adecuada efectividad en el control de las especies fitopatógenas de *Pythium*. (Jayaraj y Radhakrishnan, 2008)

Al uso de hongos biocontroladores (*Trichoderma* spp.), se le ha brindado una mayor atención para encontrar alternativas de control más eficientes y que a la vez causen un menor daño al agroecosistema (Stefanova, 2007). Por otra parte, se han informado bacterias biocontroladoras de *Pythium* spp., entre las más importantes: *Bacillus subtilis*, *Bacillus natus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas viridiflava*. (Gravel *et al.*, 2005)

En la actualidad no existen alternativas biológicas para el control de *Pythium derbayanum* Heese, causante de la marchitez de plantas de bananos y plátanos en fase de aclimatización y el control con fungicidas químicos hasta el presente ha sido inefectivo. En relación con lo anterior, el presente trabajo pretende demostrar que mediante el uso de agentes biocontroladores *in vitro* se puede inhibir el crecimiento micelial de *Pythium derbayanum* Heese. Para dar cumplimiento a dicha hipótesis, nuestra investigación se trazó como objetivo: evaluar el antagonismo *in vitro* de tres microorganismos biocontroladores frente a *Pythium derbayanum* Heese.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología aplicada del instituto de Biotecnología de las Plantas.

Microorganismos biocontroladores. Se utilizaron cepas de *Tichoderma viridae* (TsIII-85), *Gliocladium virens* (Gv-01), ambas pertenecientes a la colección de hongos filamentosos del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), ubicado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Además se utilizó una cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y un aislado de *Pythium derbayanum* (CCIBP-Pd1), depositado en la colección de cultivos microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Para la evaluación del antagonismo *in vitro*, se utilizó la técnica del cultivo dual del agente biocontrolador y *P. derbayanum*. Se usaron placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían 15 mL del medio de cultivo Agar papa dextrosa [Potatoe dextrose agar, PDA (BioCen)]. Para el caso de los hongos biocontroladores y de *P. derbayanum* se colocaron discos de micelio de 5 mm de diámetro en los extremos de las placas de Petri. La suspensión bacteriana (*Bacillus subtilis*), se aplicó en el centro de la placa en forma de banda horizontal mediante un hisopo estéril y se colocaron en los bordes de la placa discos de micelio de *P. derbayanum*. Se utilizaron por cada tratamiento 10 placas de Petri y dos para cada control del crecimiento. Asimismo, se eligió un diseño completamente aleatorizado y todas las placas fueron colocadas dentro de incubadoras (Memmert) a 28 °C y oscuridad constante.

Para evaluar la capacidad antagónica de los hongos biocontroladores, se usó la escala descriptiva que se muestra en la tabla 1 y la evaluación se realizó a los 7 días.

Además, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) a los 7 días, mediante la fórmula propuesta por Samaniego *et al.* (1981). $PICM = 100 \times R1 - R2 / R1$, donde: R1 es el radio de la colonia de *P. derbayanum* utilizada como control del crecimiento y R2 es el radio de la colonia de *P. derbayanum* en el cultivo dual con el microorganismo antagonista.

Tabla 1. Escala descriptiva para comparar la capacidad antagónica de diferentes hongos biocontroladores sobre *P. derbayanum*

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno
1	Invasión de un cuarto de la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno
2	Invasión de la mitad de la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno y esporulación sobre la misma

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 16.0 para Windows. Para comparar la capacidad antagónica de los hongos biocontroladores se utilizó un ANOVA de clasificación simple y para la comparación de las medias se usó la prueba de la menor diferencia significativa (LSD), mientras que para el PICM se usó la prueba de Kruskal Wallis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se constató que mediante el uso de agentes biocontroladores *in vitro* se pudo inhibir el crecimiento micelial de *P. derbayanum*, siendo *T. viridae* la de mayor capacidad antagónica (tabla 2). Asimismo, *T. viridae* invadió totalmente la colonia del hongo fitopatógeno y esporuló sobre la misma; mientras que *G. virens* solo cubrió la mitad de la colonia de *P. derbayanum* sin la formación de conidios.

Tabla 2. Capacidad antagónica de diferentes hongos biocontroladores sobre *P. Derbayanum*

Hongos antagonistas	Capacidad antagónica
<i>Trichoderma viridae</i>	3,78 a
<i>Gliocladium virens</i>	3,26 b

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según la prueba de la menor diferencia significativa (LSD) para $p < 0,05$.

Similarmente, *T. viridae* mostró la mayor inhibición del crecimiento micelial de *P. derbayanum*, seguido de *B. subtilis*, mientras que *G. virens* fue el de menor efecto inhibidor (tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. derbayanum* causado por diferentes microorganismos biocontroladores

Microorganismos biocontroladores	Inhibición del crecimiento micelial de <i>P. derbayanum</i> (%)	Medias de rango
<i>Trichoderma viridae</i>	80,01	24,33 a
<i>Gliocladium virens</i>	63,04	7,14 c
<i>Bacillus subtilis</i>	65,00	14,50 b

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis para $p < 0,05$.

En relación con los resultados anteriores, varias especies de *Trichoderma* controlan eficientemente patógenos de semillas, raíces y follaje; utilizando como modo de acción el parasitismo, la competencia por el sustrato y el espacio, la resistencia inducida, la antibiosis, así como la inactivación de enzimas importantes en

el metabolismo del patógeno (Hajek, 2004). Asimismo, Harman y Kubicek (1998), han reflejado la capacidad antagónica que poseen numerosas especies de *Trichoderma* así como la posibilidad de interactuar con varios hongos fitopatógenos del suelo y lograr el biocontrol de los mismos.

Por otra parte, *B. subtilis* mostró un efecto inhibidor del crecimiento micelial de *P. derbayanum* y esto concuerda con los resultados informados por diversos autores sobre diferentes especies de hongos fitopatógenos que son controlados eficientemente por la actividad biocontroladora de *B. subtilis* (Romero *et al.*, 2007). Similarmente, Xiao *et al.* (2007) al utilizar el método del cultivo dual de *B. subtilis* y una cepa de *Glomus etunicatum* (hongo micorrízico), lograron demostrar el efecto inhibidor *in vitro* de la bacteria sobre el crecimiento micelial y la germinación de las esporas del hongo, lo cual se debió a la emisión de compuestos volátiles y la liberación de lipopéptidos solubles con efectos antifúngicos.

Aunque en el presente trabajo *G. virens* fue quien mostró menor capacidad antagónica y PICM, autores como Lumsden y Knauss (2007), han informado resultados satisfactorios en el control de *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*, los cuales causan severas pérdidas en la marchitez de posturas pre y post-emergente de numerosos cultivos de interés económico.

Este resultado, por vez primera, explora la posibilidad de utilizar microorganismos biocontroladores como una alternativa promisoriosa para el control biológico de *P. derbayanum* en la fase de aclimatización de plátanos y bananos. Aunque los tres microorganismos biocontroladores mostraron antagonismo *in vitro*, fue *T. viridae* el que mejores resultados ofreció.

BIBLIOGRAFÍA

1. Augspurger, C.K. and H.T. Wilkinson: "Host Specificity of Pathogenic *Pythium* Species: Implications for Tree Species Diversity. *Biotropica*. 39 (6): 702-708, 2007.
2. Gravel, V.; C. Martinez; H. Antoun and J.R. Tweddell: "Antagonist Microorganisms with the ability to Control *Pythium* Damping-off of Tomato Seeds in Rockwool." *Biocontrol*. 50(5): 771-786, 2005.
3. Hajek, E.A.: Microbial antagonists combating plant pathogens and plant parasitic nematodes. En: (eds Hajek EA) An introduction to biological control, pp 284-285, 2004.

4. Harman, G.E. and C.P. Kubicek: *Trichoderma and Gliocladium*. (Eds). Harman GE, Kubicek CP. London & Bristol, PA: Taylor & Francis. 2: 343-363, 1998.

5. Herrera, I. L. y R.M.A Ditta: "La marchitez de las vitroplantas de banano en la fase de adaptación causada por *Pythium derbayanum*, Heese." *Centro Agrícola* 3: 93-96, 1996.

6. Jayaraj, J.N. and V. Radhakrishnan: "Enhanced activity of introduced biocontrol agents in solarized soils and its implications on the integrated control of tomato damping-off caused by *Pythium* spp.," *Plant and soil*. 304(1-2): 189-197, 2000.

7. Lumsden, D.R. and F. J. Knauss: Commercial development of *Trichoderma virens* for Damping-off Disease. En: Biological control a global perspective. Eds (C. Vincent, MS. Goettel, ZG Lazarovits), pp. 203-204, 2007.

8. Owen-Going, T.N: Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in commercial-scale and small-scale hydroponic systems. M.Sc. thesis, University of Guelph, Guelph, Ontario, 200 pp., 2002.

9. Stefanova, N.M.: "Introducción y eficacia del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba." *Fitosanidad*. 11(3):75-79, 2007.

10. Sutton, C.J.; R.C. Sopher; N.T. Owen-Going; W. Liu *et al.*: "Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives." *Summa Phytopathol*. 32 (4): 307-321, 2006.

11. Vallance, J.; F. G. Lee.; F. Deniel and P. Rey: "*Pythium oligandrum* biocontrol: Influence on fungal populations' dynamics and plant resistance" *Phytopathology*. 98 (6):161.

12. Xiao X; H. Chen ; J Wang ; Ch. Ren; L. Wu: Impact of *Bacillus subtilis* JA, a biocontrol strain of fungal plant pathogens, on arbuscular mycorrhiza formation in *Zea mays*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(7): 1133-1137, 2007.

Recibido: 4/octubre/2008

Aceptado: 2/febrero/2009