

Control biológico de *Rosellinia* sp. causante de la muerte súbita en macadamia (*Macadamia integrifolia*) con aislados de *Trichoderma* spp.

Biological control of *Rosellinia* sp. causing of the sudden death of the macadamia (*Macadamia integrifolia*) with isolates of *Trichoderma* spp.

Andrés Dejesús Sanabria Velázquez¹ y Cristhian J. Grabowski Ocampos²

¹ Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria. Centro de Investigación Hernando Bertoni. Departamento Fitopatología. Caacupé, Paraguay. ² Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Agrarias. Área de Protección Vegetal. San Lorenzo, Paraguay.

* Autor para correspondencia (sanabria300@hotmail.com)

Recibido: 21/04/2015; Aceptado: 18/05/2016.
10.18004/investig.agrar.2016.diciembre.77-86

RESUMEN

Para evaluar la eficiencia del control biológico ejercido por aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre *Rosellinia* sp. causante de la muerte de plantas de macadamia, se realizaron dos experimentos en el Laboratorio de Fitopatología de la FCA-UNA, San Lorenzo, Central y en el vivero San Joaquín, Caraguatay, Cordillera. Para las pruebas *in vitro* se obtuvieron 19 aislados de *Trichoderma* spp. de parcelas productoras de macadamia del Paraguay y se enfrentaron en cultivo pareado con *Rosellinia* sp. para medir su capacidad antagonista, utilizando el Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco repeticiones. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar a los aislados GS18 (Itapúa), GS13 (Central), GS10 (Cordillera) para su evaluación *in vivo*. Para el segundo experimento en condiciones *in vivo* se utilizó el DCA, los tratamientos consistieron en T1: Testigo (sólo el patógeno), T2: Mezcla de aislados de *Trichoderma* spp. y T3: Carbendazim al 0,1%, con cinco repeticiones. Las plantas de macadamia de 12 meses fueron tratadas con los aislados de *Trichoderma* spp.. Transcurridas 2 semanas se infestó el sustrato de todas las plantas con propágulos de *Rosellinia* spp.. Se aguardaron otras 2 semanas que permitieron el establecimiento del patógeno y se aplicó Carbendazim al 0,1%. En las plantas testigo se constató 53% de incidencia de la enfermedad, en las tratadas con *Trichoderma* spp. 26%, y en las plantas tratadas con Carbendazim se verificó 7%. Se concluye que los aislados nativos *Trichoderma* spp. presentan potencial como agentes biocontroladores de *Rosellinia* sp. al reducir la incidencia de la enfermedad en condiciones *in vivo*.

Palabras clave: antagonismo, hongos, aislados nativos, agente biocontrolador, patógeno radicular.

ABSTRACT

To evaluate the biological control exercised by native isolates of *Trichoderma* spp. on *Rosellinia* sp., responsible for the death of macadamia nut plants, two experiments were carried out at the Phytopathology Lab of the FCA-UNA, San Lorenzo, main campus and at the San Joaquín nursery, Caraguatay, Cordillera. For *in vitro* tests, 19 isolates of *Trichoderma* spp. were obtained from several macadamia growing plots in Paraguay. They were faced in matched crops with *Rosellinia* sp. to measure their antagonistic capacity, using a completely randomized design with five repetitions. The results allowed selecting the isolates GS18 (Itapúa), GS13 (Central), GS10 (Cordillera) for their *in vivo* evaluation. For the second experiment, a completely randomized design was used. The treatments consisted on T1: Control (the pathogen only), T2: *Trichoderma* spp isolates mix and T3: 1% Carbendazim having each one five repetitions. 12 months old Macadamia plants were treated with the *Trichoderma* spp isolates mix. After 2 weeks, the substratum of all plants was infested with *Rosellinia* sp. propagules, two more weeks were allowed to assure the establishment of the pathogen and then Carbendazim with 0,1% dose, was applied. In the control plants, it was observed a 53% incidence of disease, a 26% in the plants treated with the *Trichoderma* spp. mix and 7% in plants treated with Carbendazim. It is concluded that native isolates of *Trichoderma* spp. have a potential as *Rosellinia* sp. bio-control agents since they reduce the incidence of the disease in *in vivo* conditions.

Key words: antagonism, fungi, native isolates, bio-control agent, roots pathogen.

INTRODUCCIÓN

La macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) es un cultivo comercial de importancia creciente debido a sus refinadas nueces, las cuales son muy apreciadas en toda Europa, Japón y Estados Unidos. Las nueces son utilizadas en el sector de “snacks,” confitería, heladería, industria del chocolate, repostería, su aceite es utilizado en productos dermatológicos y cosméticos (Armadans 2007). Al igual que otros cultivos, la macadamia es susceptible al ataque de diversos hongos causantes de daños y pérdidas en la producción. Los patógenos fúngicos *Botryodiplodia* sp. y *Rosellinia pepo*, agente causal de la llaga estrellada o muerte súbita, son los de mayor importancia al causar pérdidas en el rendimiento del cultivo (Villegas 2005).

El hongo *Rosellinia* sp. es un parásito facultativo, su distribución es cosmopolita, reportándose alrededor de todo el mundo, además posee un amplio rango de hospederos causando pérdidas económicas en varios cultivos y árboles frutales. En Argentina se han reportado varias especies del género *Rosellinia* spp., entre ellas *R. necatrix*, *R. pepo*, *R. bunodes* y *R. paraguayensis* (Sir et al. 2012). En Paraguay fue reportado recientemente como agente causal de la muerte de plantas de macadamia en su etapa productiva (Grabowski et al. 2014), pudiendo llegar a presentar una incidencia entre el 5 y el 70%, comprometiendo anualmente áreas nuevas de siembra (Villegas et al. 2006).

El hongo se establece inicialmente en las raíces secundarias, penetrando la raíz por medio de estructuras especializadas llamadas apresorios, razón por lo cual la invasión del sistema radical es lenta, pero progresiva. Una vez que se establece en los tejidos de la base del árbol se presenta un debilitamiento, con posterior amarillamiento del follaje y una ausencia de emisión de brotes nuevos; después de algunas semanas el árbol muere. Las hojas se tornan de un color rojizo y quedan adheridas por varias semanas (Mendoza 2000, Grabowski et al. 2014). Los factores que favorecen el desarrollo del patógeno son la presencia de árboles viejos de sombrero con sus raíces en proceso de descomposición, los altos contenidos de materia orgánica en la superficie del suelo y la frecuencia de las lluvias, observándose una incidencia casi insignificante en donde la frecuencia de las lluvias es baja y existe escasa acumulación de humus y materia orgánica (Mendoza et al. 2002).

Teniendo en cuenta la falta de productos fungicidas indicados para el manejo de la enfermedad debido a la baja eficiencia que estos presentan en el suelo (Sharma y Gupta 1985); el control biológico es una propuesta prometedora, ya que esta técnica está directamente involucrada a la selección y reintroducción de un antagonista, que pueda establecerse en el mismo nicho ecológico del patógeno y pueda proteger el sistema radicular de la planta de macadamia, reduciendo la intensidad de la enfermedad.

Varios autores como Aránzazu (1996), Mendoza et al. (2002), Cazorla et al. (2006) mencionan que el uso de antagonistas, principalmente de los géneros *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas* sp., es el método más prometedor para el combate de *Rosellinia* spp. debido a los resultados positivos obtenidos en ensayos utilizando estos mismos microorganismos para el control del fitopatógeno. El éxito de *Trichoderma* spp. para controlar patógenos de suelo se debe a que estos antagonistas son aislados de suelos con condiciones ecológicas similares a los que son reintroducidos, asegurando su capacidad de competencia y expresión de más de un mecanismo antagónico, lo cual ya había sido mencionado por Harman et al. (2004) y Harman (2006).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia del control biológico ejercido por los aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre el fitopatógeno radicular de la macadamia *Rosellinia* sp., en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología del Área de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), San Lorenzo, Central y en el vivero de la finca productora de macadamia San Joaquín ubicada en la ciudad de Caragatay, Cordillera. El periodo de experimentación estuvo comprendido entre los meses de octubre de 2013 y febrero de 2014.

Los aislados nativos de *Trichoderma* spp. fueron obtenidos a partir de muestras de suelos provenientes de diferentes fincas de producción de macadamia del Paraguay (Tabla 1). El aislamiento de *Trichoderma* spp. se realizó mediante una adaptación del método de dilución del suelo citado por Fernández (1993). Este método consistió en diluir 3 g de suelo en 100 cc de agua destilada estéril y agitar la suspensión. Posteriormente

bajo la cámara de flujo laminar se retiró y colocó 1 cc de la suspensión en una placa de Petri esterilizada. Luego, se adicionó el medio de cultivo PDA (Papa- Dextrosa- Agar) + Oxitetraciclina, y se agitó suavemente. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días en la incubadora.

Los cultivos puros de *Trichoderma* spp. fueron codificados con el termino GS (nomenclatura arbitraria) y un número, de manera a diferenciarlos de otros aislados nativos de *Trichoderma* spp.,

Tabla 1. Muestras de suelo georreferenciadas para la obtención de aislados de *Trichoderma* spp. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay, 2014.

Código de la muestra	Aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	Localidad	Coordenadas
1	GS1, GS2	Paraguarí	21 J 475359 UTM 7174680
2	GS3	Cordillera	21 J 491517 UTM 7174368
4	GS4, GS5	Cordillera	21 J 500410 UTM 7183024
5	GS6, GS7	Central	21 J 0464904 UTM 7189080
6	GS8, GS9	Cordillera	21 J 0467008 UTM 7212897
6R	GS10, GS11	Cordillera	21 J 0467008 UTM 7212897
6Saico	GS12	Cordillera	21 J 0467008 UTM 7212897
7	GS13, GS14	Central	21 J 0440920 UTM 7190631
8M	GS15	Central	21 J 0440920 UTM 7190631
10	GS16, GS17	Itapúa	21 J 0606252 UTM 7005321
10B	GS18, GS19	Itapúa	21 J 0606252 UTM 7005321

El hongo *Rosellinia* sp. fue aislado de plantas con síntomas de muerte súbita o problemas radiculares de las parcelas de producción de macadamia del Paraguay. Las raíces colectadas de plantas de macadamia se lavaron con agua corriente y fueron cortadas en trozos de 1 a 2 cm, después se desinfectaron mediante una solución con alcohol al 70% y otra de hipoclorito de sodio al 2%, seguidamente se realizó un triple enjuague en agua destilada estéril, se dejó secar el tejido vegetal y se transfirió a placas de Petri con medio de cultivo EMA (Extracto de Malta-Agar) bajo cámara de flujo laminar. Posteriormente, se dejaron incubar a 28°C durante 8 días (Villegas et al. 2006). Para el reconocimiento de *Rosellinia* sp. se observaron las colonias mediante el estereoscopio y el microscopio óptico identificando las estructuras típicas del hongo, concordando con Villegas et al. (2006) y Mendoza (2000) quienes describen al patógeno como un hongo de crecimiento lento en medio de cultivo, con micelio de aspecto algodonoso el cual a medida que envejece se torna de color gris ahumado a café. También se observaron los hinchamientos piriformes característicos del género *Rosellinia* mencionados por los mismos autores.

Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. ante *Rosellinia* sp.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con 20 tratamientos siendo 19 los aislados de *Trichoderma* spp., enfrentados cada uno con *Rosellinia* sp., y un testigo consistente en un disco con medio de cultivo y micelio de *Rosellinia* sp.. Cada tratamiento contó con cinco repeticiones, resultando 100 unidades experimentales, las cuales consistieron en una placa de Petri cada una.

Para seleccionar los aislados de *Trichoderma* spp. con capacidad antagonica ante *Rosellinia* sp. se empleó la técnica de cultivo pareado mencionada por Bell et al. (1982), según la cual se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro del crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. y del fitopatógeno *Rosellinia* sp., los cuales se transfirieron a placas de Petri de 90 mm conteniendo medio de cultivo PDA y se llevaron a incubación a 28°C hasta que el tratamiento testigo llenó la placa de Petri.

Se evaluó la actividad antagonica de los aislados de *Trichoderma* spp. midiendo la velocidad de crecimiento micelial promedio (mm/día) y la sobreposición del micelio de *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno *Rosellinia*

sp., para ello se utilizó la escala propuesta por Bell et al. (1982), detallada en la Tabla 2.

También se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno mediante la siguiente fórmula adaptada de Orrego et al. (2013):

$$I = 100 - [(LMP_{CP} / LMP_{CI})] * 100$$

Donde:

I: Inhibición del crecimiento de *Rosellinia* sp. (%)

LMP_{CP}: Longitud del crecimiento de *Rosellinia* sp. en cultivo pareado (mm)

LMP_{CI}: Longitud del crecimiento de *Rosellinia* sp. en cultivo individual (mm)

Tabla 2. Escala propuesta por Bell et al. (1982) para la evaluación y clasificación del antagonismo. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2014.

Índice	Descripción
1	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio
2	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio
3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro
4	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i> spp.
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> spp.

Eficiencia de *Trichoderma* spp. en el control de *Rosellinia* sp. en condiciones *in vivo*

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos y cinco repeticiones como se observa en la Tabla 3. Se consideró como unidad experimental tres macetas con una planta de macadamia cada una, totalizando 45 plantas.

El tratamiento T1 (testigo) consistió en plantas con sustrato infestado sólo con el fitopatógeno *Rosellinia* sp. Por otro lado, en el tratamiento T2 el sustrato de las plantas fue tratado con una mezcla de tres aislados de *Trichoderma* spp. más eficientes en las pruebas *in vitro*. En el tratamiento T3 fue aplicado el fungicida Carbendazim al 0,1% de acción sistémica, compuesto por

2-metoxicarbamoil-bencimidazol (50 g), agentes dispersantes y solventes c.p.s (100 cm³), formulado como suspensión concentrada (SC).

Durante los experimentos fueron utilizadas plantas injertadas de macadamia de la variedad HAES 344 de 12 meses de edad. Las dimensiones de las macetas de las plantas fueron 15 cm de diámetro y 45 cm de alto, conteniendo como sustrato arena gorda y materia orgánica en proporción 2:1. Las plantas fueron ubicadas bajo malla media sombra (50%) registrándose temperaturas de 30±5°C. El riego se realizó periódicamente de manera a mantener la humedad del sustrato a capacidad de campo.

Para la incorporación de los propágulos de *Trichoderma* spp. al sustrato de las macetas con plantas de macadamia, se procedió a mezclar y homogeneizar en un solo recipiente el arroz colonizado por los tres aislados nativos seleccionados mediante las pruebas de antagonismo *in vitro* y se dispersó 50 g en cada maceta a un nivel uniforme de profundidad (López-Herrera et al. 1999).

Al cabo de dos semanas posteriores al establecimiento del agente de control biológico, se infestaron las macetas con propágulos de *Rosellinia* sp. incorporando 250 g de arroz colonizados por el patógeno a un nivel uniforme de profundidad regando posteriormente con agua, según la metodología mencionada por López-Herrera et al. (2003) y Grabowski et al. (2014).

La aplicación del fungicida Carbendazim se realizó 15 días posteriores a la infestación del sustrato con el patógeno *Rosellinia* sp.. El equipo empleado para realizar la aplicación fue el pulverizador tipo mochila de 20 L con pico del tipo cono hueco.

La evaluación se realizó determinando la incidencia de la enfermedad, es decir el número de plantas muertas en cada tratamiento, mediante observaciones semanales a partir de las cuatro semanas posteriores a la inoculación del patógeno, tiempo en el cual se observaron los primeros signos del patógeno.

Los datos obtenidos, en ambos experimentos, fueron sometidos al análisis de Varianza (ANAVA), y al encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó el Test de Tukey al 5% de probabilidad de error. Los datos de incidencia en plantas de macadamia fueron transformados mediante $[(\sqrt{Y}) + 1]$ y luego se realizó el ANAVA. Para los

análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico InfoStat® (Di Rienzo et al. 2008).

Tabla 3. Tratamientos aplicados en plantas de macadamia en vivero. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2014.

Tratamiento	Descripción
T1	Testigo
T2	Mezcla de aislados seleccionados de <i>Trichoderma</i> spp.
T3	Carbendazim (0,1%)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. ante *Rosellinia* sp.

Sobreposición micelial de *Trichoderma* spp. sobre *Rosellinia* sp.; en la Tabla 4 se observa el crecimiento micelial lineal medido en mm/día para los 19 aislados de *Trichoderma* spp. a las 72 h de incubación.

Se hallaron diferencias significativas entre los aislados nativos de *Trichoderma* spp. en cuanto a su velocidad de crecimiento lineal, registrándose valores de 17,85 mm/día hasta 30,37 mm/día.

Los valores de crecimiento micelial lineal de los aislados estudiados en este experimento fueron mayores a los verificados en trabajos anteriores de control de fitopatógenos del suelo con aislados de *Trichoderma* spp. como los de Franco y Orrego (2013) quienes registraron valores máximos de 20,25 mm/día, también Garcete y Orrego (2011) obtuvieron valores de 17,00 mm/día ambos para cultivo pareado con *Macrophomina phaseolina*, mientras que Manzur (2011) observó valores máximos de 18,10 mm/día de crecimiento micelial promedio contra el hongo del suelo *Sclerotium rolfsii*. Por su parte Valencia y Castro (2004) registraron velocidades de crecimiento micelial de 22,5 mm/día en condiciones de luz al seleccionar aislados de *Trichoderma* spp. para el control de *Rosellinia bunodes*.

En cuanto a los grados de la escala de Bell et al. (1982) también se verificaron diferentes valores para los aislados de *Trichoderma* spp.. Para los aislados GS18, GS13, GS1, GS2, GS10, GS3, GS4 y GS15 se registraron valores igual a 1, lo que significa que sobrecrecieron completamente a *Rosellinia* sp. y cubrieron totalmente la superficie del medio. Por otra parte, para los aislados

GS8, GS11, GS5, GS19, GS12, GS6, GS7, GS14 y GS9 se verificaron valores igual a 2, lo que equivale a que los aislados de *Trichoderma* spp. sobrecrecieron las dos terceras partes de la superficie del medio. Los aislados GS16, GS17 y el patógeno *Rosellinia* sp. colonizaron cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo pareció dominar al otro obteniendo el valor 3 de la escala.

Tabla 4. Velocidad y escala de crecimiento lineal de aislados de *Trichoderma* spp. en las pruebas de antagonismo *in vitro* con *Rosellinia* sp. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2014.

Aislado	Velocidad (mm/día)*	Escala de Bell**
GS18	30,37 a	1
GS13	29,64 a	1
GS1	29,28 a	1
GS2	28,73 a	1
GS10	28,56 a	1
GS3	28,51 a	1
GS4	27,56 a	1
GS15	27,30 a	1
GS8	26,75 a	2
GS11	26,64 a b	2
GS5	25,82 a b c	2
GS19	25,24 a b c	2
GS12	25,16 a b c	2
GS6	24,86 a b c	2
GS7	24,77 a b c	2
GS14	24,34 a b c	2
GS9	24,20 a b c	2
GS16	18,29 b c	3
GS17	17,85 c	3

(*)Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey al 5%

(**)Escala adaptada de Bell et al. (1982)

Según los mismos autores la técnica de selección *in vitro* basada en esta escala, puede llegar a ser solo un acercamiento simplista a un sector pequeño de los sistemas biológicos implicados en el control de enfermedades. Sin embargo, provee información útil acerca de la variabilidad de los distintos aislamientos de *Trichoderma* en cuanto a su capacidad de antagonizar a los patógenos.

Los trabajos mencionados anteriormente coinciden en que existe una variabilidad entre los aislados nativos de *Trichoderma* spp. de diferentes zonas agroecológicas en cuanto a su capacidad de sobrecrecer al patógeno y cubrir la superficie del medio, lo cual ya había sido destacado por Papavizas (1985).

La variabilidad de estos hongos agentes de control biológico y la expresión de sus diferentes mecanismos de antagonismo, se deben principalmente a la adaptación de los diferentes aislados a sus respectivos ecosistemas y a la interacción entre los componentes patógeno-planta-antagonista, debido a lo cual no todos los aislados seleccionados tienen la misma capacidad de expresar sus diferentes mecanismos de antagonismo, en este caso la competencia por espacio (Bautista et al. 2008, Infante et al. 2009, Cordero y Maniscalco 2010). Por esta razón a pesar de que todos los aislados fueron obtenidos de parcelas de producción de macadamia, estos presentaron diferentes grados de sobreposición.

Inhibición de crecimiento *in vitro* de *Rosellinia* sp.; en la Tabla 5 son detallados los porcentajes de inhibición de crecimiento de *Rosellinia* sp. ejercido por los aislados de *Trichoderma* spp. en cultivo pareado.

Se verificaron diferencias significativas entre los aislados de *Trichoderma* spp. en cuanto a los porcentajes de inhibición de crecimiento de *Rosellinia* sp. en los experimentos de antagonismo *in vitro*, registrándose porcentajes de inhibición de crecimiento de 42,80% hasta 80,20%. Estos valores son superiores a los registrados por Ruano-Rosa et al. (2010) quienes observaron porcentajes de inhibición de crecimiento de *Rosellinia* sp. de 39,80 hasta 14,90%.

Lo registrado en este experimento coincide con Esquivel et al. (1992) quienes observaron *in vitro* que todos los aislados del antagonista fueron excelentes competidores al patógeno, debido a su rápida tasa de desarrollo. El crecimiento de las colonias de *Rosellinia* en placas de Petri fue inhibido por el crecimiento de la colonia de *Trichoderma* spp. que creció y esporuló sobre ella. Por su parte, Ruano-Rosa et al. (2003) también observaron que todos los aislados de *Trichoderma* spp., excepto el aislado CH-252, limitaron el crecimiento del patógeno *Rosellinia necatrix*, observándose poca variación en su efecto para cada aislado del antagonista sobre el patógeno.

Estos resultados demuestran que los aislados de *Trichoderma* spp. presentan potencial como controladores

biológicos de *Rosellinia* sp. al inhibir el crecimiento micelial del patógeno coincidiendo con otros autores como Mendoza et al. (2002); López-Herrera et al. (2003); Ruano-Rosa et al. (2003); Valencia y Castro (2004); Ruano-Rosa et al. (2010), quienes también seleccionaron aislados nativos de *Trichoderma* para el control de patógenos de suelo.

Tabla 5. Inhibición de crecimiento *in vitro* de *Rosellinia* sp. por efecto del enfrentamiento con diferentes aislados de *Trichoderma* spp. en cultivo pareado. FCA-UNA. San Lorenzo. Paraguay. 2014.

Aislado	Inhibición de crecimiento de <i>Rosellinia</i> sp. (%)*	
GS13	80,20	a
GS18	78,40	a
GS10	75,40	a
GS8	72,40	a
GS4	71,80	a
GS1	70,80	a
GS11	69,60	a
GS6	68,20	a
GS19	68,00	a
GS2	67,00	a
GS15	66,80	a
GS9	66,40	a
GS14	66,00	a
GS12	65,20	a
GS7	64,20	a
GS4	63,80	a
GS3	63,60	a
GS17	42,80	b
GS16	42,80	b
Testigo	0,00	c

(*)Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey al 5%

Fueron seleccionados los aislados de *Trichoderma* spp. GS13, GS18 y GS10, debido a la eficiencia que exhibieron en el control de *Rosellinia* sp. en las pruebas de antagonismo *in vitro*. También López-Herrera et al. (1999) seleccionaron diferentes aislados de *Trichoderma* spp. (T6: *Trichoderma aureoviridae*, T9 y T10: *Trichoderma longibrachiatum*, TB1.2: *Trichoderma harzianum*) teniendo en cuenta su capacidad para antagonizar al patógeno *Rosellinia necatrix* en condiciones *in vitro*, verificándose su eficiencia al reducir

un 37% el porcentaje de aislamiento del patógeno de raíces de plantas de aguacate durante los experimentos *in vivo*.

Eficiencia de *Trichoderma* spp. en el control de *Rosellinia* sp. en condiciones *in vivo*

En la Figura 1 se detalla la incidencia del ataque de *Rosellinia* sp. sobre plantas de macadamia en cada tratamiento durante las pruebas *in vivo*.

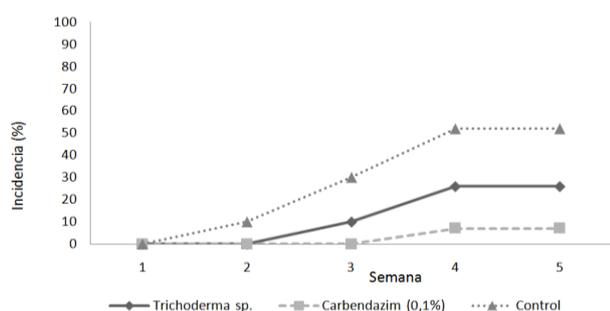


Figura 1. Porcentaje de incidencia del ataque de *Rosellinia* sp. sobre plantas de macadamia. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2014.

En el tratamiento testigo se observó los primeros signos y síntomas en las plantas a los 30 días de la inoculación con el patógeno, progresando hasta alcanzar una incidencia de 53%, diferenciándose estadísticamente del tratamiento Carbendazim en el cual la incidencia fue del 7%. Para la mezcla de aislados de *Trichoderma* spp. fue observada una incidencia de 26%, no presentando diferencias significativas con ninguno de los tratamientos.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Valencia y Castro (2004) quienes observaron una incidencia de *Rosellinia bunodes* en raíces de plantines de café del 20 al 28% tratadas con aislados de *Trichoderma* spp., mientras que el tratamiento testigo presentó un 64% de plantines enfermos al cabo de 30 días de la inoculación con el patógeno. También Oliveira et al. (2008) observaron síntomas y signos del patógeno 32 días posteriores a la inoculación.

Ruano-Rosa et al. (2003) registró que los aislados de *Trichoderma* spp. que ejercieron un mejor control sobre la enfermedad causada por *Rosellinia necatrix* fueron CH 255 y CH 316, observándose para ambos tratamientos todas las plantas sanas, el CH 303 presentó un 30% de plantas muertas y los aislados CH218, CH256, CH300, CH304, CH314 más de 30% de plantas muertas, no diferenciándose significativamente del testigo inoculado

con el patógeno, concluyendo también que sería conveniente la utilización de combinaciones de aislados para potenciar su efecto antagonista sobre el patógeno.

Los microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp. son capaces de ejercer un control preventivo al colonizar las raíces de las plantas las cuales son su hábitat natural, proliferando en simbiosis con la planta, regulando las poblaciones de patógenos e induciendo resistencia en las mismas (Infante et al. 2009). Esto se verificó al examinar las raíces de las plantas de macadamia tratadas con la mezcla de aislados de *Trichoderma* spp. (Figura 2).

Cabe destacar que el control biológico permite regular las poblaciones de microorganismos patógenos, pero no eliminarlos por completo (Aguilar 1980), este hecho es avalado por los resultados obtenidos en esta investigación donde en las plantas tratadas con aislados de *Trichoderma* spp. se registró un 26% de incidencia comparado a las tratadas con Carbendazim, en las cuales se observó un 7% de plantas enfermas. López-Herrera et al. (2003) mencionan que el fungicida Carbendazim presentó cierta eficiencia en el control de *Rosellinia* sp. durante ensayos con plantas de aguacate, sin embargo, la baja persistencia del fungicida en el suelo se tradujo en la aparición de síntomas de la enfermedad pasados 30 días de una segunda inoculación con el patógeno.

Para los aislados de *Trichoderma* spp. GS13, GS18 y GS10 fue observado un efecto antagónico frente a *Rosellinia* sp. tanto durante las pruebas *in vitro* como posteriormente en las pruebas *in vivo*. Estos aislados obtenidos de parcelas productoras de macadamia fueron eficientes al controlar a *Rosellinia* sp. durante las pruebas *in vivo* debido a su gran velocidad de crecimiento y su alta capacidad para colonizar el sustrato, permitiendo comprobar el potencial como agentes de control biológico que presentaron durante las pruebas *in vitro*.

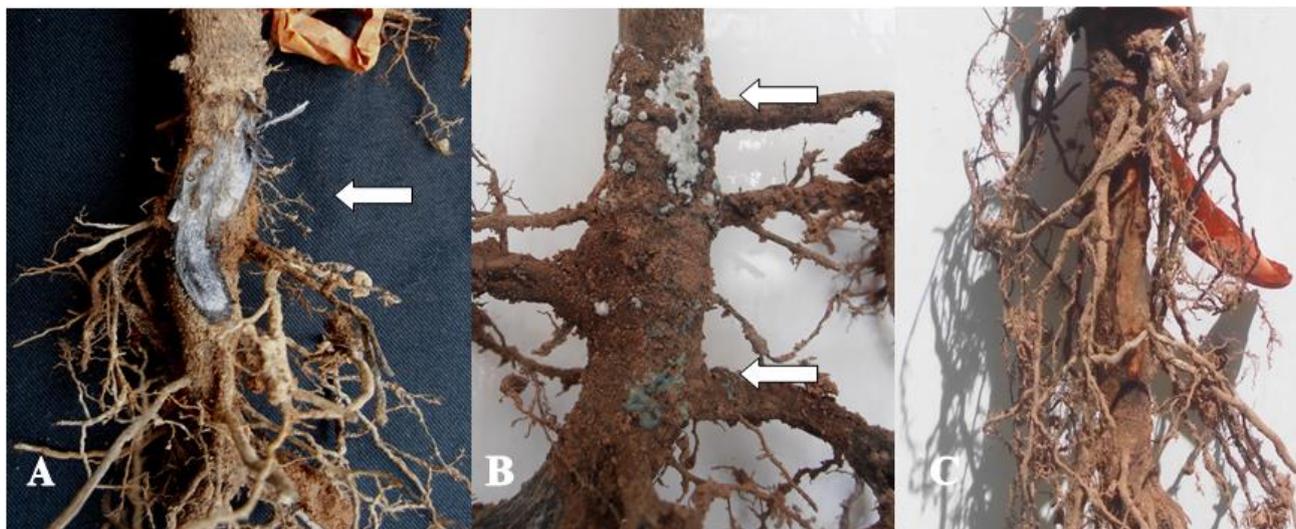


Figura 2. Sistema radicular de plantas de macadamia. A) Micelio del patógeno *Rosellinia* sp. (flecha) creciendo bajo la corteza del sistema radicular en el tratamiento testigo. B) Colonias de color blanco y verde correspondientes a *Trichoderma* spp. (flechas) en plantas tratadas con la mezcla de aislados. C) Ausencia de crecimiento fúngico en raíces tratadas con Carbendazim. FCA-UNA. San Lorenzo, Paraguay. 2014.

CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* los aislados nativos de *Trichoderma* spp. obtenidos de diferentes parcelas productoras de macadamia presentan diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento, el grado de sobreposición micelial y su capacidad de inhibición de crecimiento *in vitro* de *Rosellinia* sp., siendo seleccionados los aislados de *Trichoderma* spp. GS13, GS18, GS10, GS8, GS4, GS1, GS11, GS6, GS19, GS2, GS15, GS9, GS14, GS12, GS7, GS4 y GS3 por presentar potencial antagonístico ante *Rosellinia* sp..

En condiciones *in vivo* la mezcla de aislados nativos de *Trichoderma* spp. seleccionados mediante pruebas *in vitro* (GS13, GS18, GS10) reduce la incidencia de la enfermedad causada por *Rosellinia* sp. en plantas de macadamia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilar, P. 1980. Apuntes sobre el control biológico y el control integrado de las plagas agrícolas en el Perú (en línea). Consultado 28 jul 2012. Disponible en <http://www.revperuentomol.com.pe/publicaciones/vol23/CONTROL-BIOLOGICO-Y-CONTROL-INTEGRADO-EN-EL-PERU83.p df>
- Aránzazu, HF. 1996. Comportamiento de la llaga estrellada *Rosellinia pepo* Pat. sobre raíces de cacao (en línea). Fitopatología Colombiana 20(1):7-10. Consultado 28 jul 2013. Disponible en <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=C O1999 002871>
- Armada, A. 2007. Cultivo de macadamia en el Paraguay. San Lorenzo, Paraguay, FCA-UNA. 63 p.
- Bautista, CJ; García, R; Pérez, J; Zavaleta, E; Montes, R; Ferrera, R. 2008. Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo; un enfoque holístico al control biológico (en línea). Interciencia. 33(2):96-102. Consultado 15 ene 2014. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/pdf/inci/v33n2/art05.pdf>
- Bell, DK; Wells, HD; Markham, CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens (en línea). Phytopathology 72(4):379-382. Consultado 28 dic 2012. Disponible en <http://www.cabdirect.org/abstracts/19821384099.html;jsessionid=12E7A977CD30D71D33BCF5D82A243B62>
- Cazorla, F; Duckett, S; Bergström, E; Noreen, S; Odijk, R; Lugtenberg, B; Thomas-Oates, J; Bloembergen, G. 2006. Biocontrol of avocado *Dematophora* root rot by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the production of 2-hexyl 5-propyl resorcinol (en línea). Plant Disease 19(4):418-428.

- Consultado 3 feb 2013. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/MPMI-19-0418>
- Cordero, MR; Maniscalco, DP. 2010. Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* L. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (en línea). *Interciencia* 35(10):777-783. Consultado 3 feb. 2013. Disponible en http://www.interciencia.org/v35_10/777.pdf
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2008. InfoStat, versión 2008. Argentina, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 336p.
- Esquivel, VH; Leguizamón, JE; Arbeláez, G. 1992. Búsqueda y evaluación de antagonistas a *Rosellinia bunodes*, agente causante de la llaga negra del café (en línea). *Cenicafé* 43(2):33-42. Consultado 15 dic 2013. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CAFE.xis&method=post&format>
- Fernández, M. 1993. Manual para laboratorio de Fitopatología. San José, Costa Rica, IICA. 289 p.
- Franco, B; Orrego, A. 2013. Compatibilidad *in vitro* de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas (en línea). *Investigación agraria* 15(1): 15-22. Consultado 15 ene 2014. Disponible en <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/2/2>
- Garcete, JM; Orrego, A. 2011. Efecto de aislados nativos de *Trichoderma* spp. en la incidencia de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en sésamo (*Sesamum indicum* L.) (en línea). *Investigación agraria* 13(2):87-93. Consultado 15 ene 2014. Disponible en <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/220/213>
- Grabowski, C; Sanabria, A; Armadans, A. 2014. Caracterización e identificación del organismo causal de la muerte súbita de la macadamia (*Macadamia integrifolia*) en Paraguay. In III Congreso Nacional de Ciencias Agrarias. (3, 2014, San Lorenzo, Paraguay). Paraguay, FCA. 496 p.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, L; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts (en línea). *Nature Reviews* 2(1):43-56. Consultado 03 ene 2014. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035008>
- Harman, GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. symposium the nature and application of biocontrol microbes II: *Trichoderma* spp. (en línea). The American Phytopathological Society. Cornell University, 96(2): 190-194. Consultado 23 ene 2014. Disponible en <http://www.hort.cornell.edu/department/faculty/harman/pubs/06APSsymp.pdf>
- Infante, D; Martínez, B; González, N; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos (en línea). *Revista de Protección Vegetal* 24(1): 14-21. Consultado 23 ene 2013. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext
- López-Herrera, CJ; Pérez- Jiménez, RM; Llobel, A; Vazquez, EM; Zea-Bonilla, T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamoni* y *Rosellinia necatrix* en Aguacate (en línea). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 261-265. Consultado 19 mar 2014. Disponible en http://209.143.153.251/WAC4/WAC4_p261.pdf
- López-Herrera, CJ; Pérez- Jiménez, RM; Zea-Bonilla, T. 2003. Evaluación de diferentes fungicidas para el control de la Podredumbre Blanca del Aguacate (en línea). In V Congreso Mundial del Aguacate (5, Málaga, España) Acta. Málaga, España, Junta de Andalucía. Consultado 19 mar 2014. Disponible en http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p543.pdf
- Manzur, M. 2011. Control de *Sclerotium rolfsii* con aislados nativos y comerciales de *Trichoderma* sp. *in vitro*. Tesis Ing. Agr. San Lorenzo, Paraguay, FCA-UNA. 40 p.
- Mendoza, R. 2000. Aislamiento selectivo y pretamizado en bioensayos de micoparásitos contra *Rosellinia* spp. (en línea). Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 107 p. Consultado 16 ene 2014. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0372E/A0372E.PDF>

- Mendoza, R; Ten Hoopen, M; J Kass, D; Sánchez, V; Krauss. 2002. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa (en línea). *Science direct* 27(2): 210–227. Consultado 16 ene 2014. Disponible en <http://www.science-direct.com/science/article/pii/S1049964403000148>
- Oliveira, ML; Melo, GL; Niella, AR; Silva, VR. 2008. Black root rot caused by *Rosellinia pepo*, a new disease of the clove tree in Brazil (en línea). *Tropical plant pathology* 33(2): 90-95. Consultado 16 ene 2014. Disponible em http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S198256762008000200002&script=sci_arttext&tlng=pt
- Orrego, A; Rodriguez, H; Grabowski, C; Franco, B. 2013. Comportamiento de aislados de *Trichoderma* spp. en cultivo pareado con *Macrophomina phaseolina*. In Orrego, A. *Trichoderma* spp. hongo biocontrolador de fitopatógenos. San Lorenzo, Paraguay, FCA-UNA/INBIO. 129 p.
- Papavizas, GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol (en línea). *Annual review of Phytopathology* 23(1): 23-54. Consultado 21 mar 2014. Disponible en <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.23.090185.000323?journalCode=phyt>
- Ruano-Rosa, D; López-Herrera, C. J. 2003. Control de la Podredumbre Blanca del Aguacate mediante métodos químicos y biológicos combinados (en línea). Córdoba, ES, Instituto de Agricultura Sostenible. Consultado 14 mar 2013. Disponible en <http://worldavocadocongress2011.com/userfiles/file/Fernando%20Pliego-Alfaro.pdf>
- Ruano-Rosa, D; Del Moral-Navarrete, L; López-Herrera. 2010. Selection of *Trichoderma* spp. isolates antagonistic to *Rosellinia necatrix* (en línea). *Journal of Agricultural Research* 8(4): 1084-1097. Consultado 14 mar 2013. Disponible en <http://digital.csic.es/handle/10261/84178>
- Sharma, SK; Gupta, VK. 1985. Movement and persistence of fungicides in apple soils (en línea). *Indian Phytopathology* 38(1): 648-652. Consultado 17 mar 2013. Disponible en <http://scholar.google.com.py/scholar?>
- Sir, EB; Perera, TC; Romero, AI; Hladki, AI. 2012. Novedades para el género *Rosellinia* (Ascomycota-Xylariaceae) en el Noroeste de la República Argentina (en línea). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 47(3): 311-321. Consultado 12 mar 2014. Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-23722012000200003&script=sci_arttext
- Valencia, JC; Castro, BL. 2004. Estudio de algunos aspectos biológicos de aislamientos de *Trichoderma* sp. antagonísticos a *Rosellinia bunodes* (en línea). *Cenicafé* 55(1): 16-28. Consultado 20 dic 2013. Disponible en <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/222>
- Villegas, C. 2005. Reconocimiento fitosanitario en cinco variedades cultivadas de macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden et Betcher) en la zona cafetera colombiana (en línea). *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 74(1): 69-76. Consultado 17 ago 2012. Disponible en orton.catie.ac.cr/repdoc
- Villegas, C; Realpe, CE; Riaño, NM. 2006. Aislamiento y Caracterización Morfológica de *Rosellinia pepo* Pat. en plantas de Macadamia (en línea). *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 59(2):3509-3526. Consultado 17 ago 2012. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472006000200008&script=sci_arttext&tlng=es