



# ALTERNATIVAS MICROBIOLÓGICAS PARA EL MANEJO DE *Phytophthora cinnamomi* Rands., EN *Persea americana* Mill. BAJO CONDICIONES DE CASA-MALLA

## Microbiological alternatives for *Phytophthora cinnamomi* Rands., management in *Persea americana* Mill. under greenhouse conditions

Joaquín G. Ramírez Gil<sup>✉</sup>, Darío A. Castañeda Sánchez y Juan G. Morales Osorio

**ABSTRACT.** Avocado crop production in Colombia requires establishing environmentally friendly and inexpensive measures for wilt disease management, whose main causal agent is. Soil microorganisms use is an option for improving nutrition and health in *Persea americana*, looking to be more competitive in order to face the free trade agreements and to exploit the full export potential for this fruit. Understanding the complexity of the soil microbiota system, due to its great diversity and different ecological relationships that govern it, this study was designed to evaluate under greenhouse conditions the effect of *Trichoderma* sp., *Glomus fasciculatum* and *Pseudomonas* sp. isolates, on *P. americana* seedling development inoculated and non-inoculated with *P. cinnamomi*. Results found in this work suggest that *G. fasciculatum* and *Pseudomonas* sp., alone or in combination increase avocado seedling development, meanwhile *Trichoderma* sp. showed the best results in reducing the wilt disease progress on *P. cinnamomi*-inoculated plants. Soil microorganisms have a large potential for *P. Americana* development and pathogen protection, but it is necessary to understand all possible relationships in order to strengthen their use as biofertilizers and biocontrol agents.

**Key words:** avocado wilt, plant growth promoting microorganisms

**RESUMEN.** Para la producción de aguacate en Colombia es necesario establecer alternativas de manejo amigables con el medio ambiente y de bajo costo para el control de la enfermedad conocida como marchitez, cuyo principal agente causal es *Phytophthora cinnamomi*. El uso de microorganismos del suelo, es una opción viable para mejorar la nutrición y sanidad en *Persea americana*, buscando ser más competitivos en aras de afrontar los tratados de libre comercio y poder aprovechar el potencial exportador que presenta este frutal. Entendiendo la complejidad del sistema de la microbiota del suelo, consecuencia de su gran diversidad y de las distintas relaciones ecológicas que lo gobiernan, este trabajo estuvo encaminado a evaluar en condiciones de invernadero el efecto de cepas de *Trichoderma* sp., *Glomus fasciculatum* y una cepa de *Pseudomonas* sp., en el desarrollo de plántulas de *P. americana*, sin inocular e inoculadas con *P. cinnamomi*. Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que *G. fasciculatum* y *Pseudomonas* sp., solos o en combinación, favorecen el desarrollo de plántulas de aguacate, mientras que *Trichoderma* sp. presentó los mejores resultados en la reducción del progreso de la enfermedad de marchitez en plantas inoculadas con *P. cinnamomi*. Los microorganismos del suelo presentan un enorme potencial para el desarrollo y protección contra patógenos en *P. americana*, pero se hace necesario entender todas las relaciones para poder potenciar su uso como biofertilizantes y agentes de biocontrol.

**Palabras clave:** marchitez de aguacate, microorganismos promotores de crecimiento

## INTRODUCCIÓN

Las condiciones agroclimáticas que se encuentran en varias regiones de Colombia presentan características favorables para el desarrollo del cultivo de aguacate (1), razón por la cual, según la FAO (2), Colombia reporta los más altos rendimientos de la fruta en toneladas por hectárea. A pesar de esto,

Ms.C. Joaquín G. Ramírez, Laboratorio Fitotecnia Tropical; Dr.C. Darío A. Castañeda Sánchez, Máster en Geomorfología y Suelo; Dr.C. Juan G. Morales Osorio Máster en Bioquímica, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Departamento de Ciencias Agronómicas, Campus El Volador, Bloque 11. A. A. 1779. Bloque 19A- lab. 306. Medellín, Colombia.

✉ jgramireg@unal.edu.co; dacasta4@unal.edu.co  
jgmorealeso@unal.edu.co

este frutal estuvo mucho tiempo relegado a pocas regiones del país, donde la siembra no se realizaba comercialmente. Las necesidades de satisfacer una demanda interna y las perspectivas de exportación han incrementado las plantaciones notablemente durante la última década, ocupando actualmente el tercer lugar en área sembrada de frutales (3). El incremento rápido en el área sembrada, implica generar paquetes tecnológicos de manejo para mantener la competitividad y la sostenibilidad del cultivo.

La marchitez es la principal enfermedad registrada en el cultivo de aguacate en Colombia (4, 5). Este problema puede ser ocasionado por factores bióticos y abióticos, destacándose el Oomycete *P. cinnamomi*, el cual comúnmente se conoce como tristeza (4, 6). Para el manejo de esta enfermedad se aplican principalmente productos de origen químico (5). El uso permanente de moléculas sintéticas para el manejo de *P. cinnamomi*, ejercen una fuerte presión de selección de las poblaciones, generando en algunos casos resistencia o disminución de la sensibilidad a las moléculas químicas utilizadas (7).

Como una alternativa al control químico de enfermedades, se han realizado intensas investigaciones sobre microorganismos que pueden contribuir al manejo de los problemas fitosanitarios. Los mecanismos por medio de los cuales ejercen control de las enfermedades son variados e incluyen desde el antagonismo, la inducción de resistencia, el suministro de nutrimentos y de fitohormonas al hospedante, el micoparasitismo, la antibiosis, la competencia, entre otros (8, 9). Los estudios realizados en aguacate, demuestran que la dinámica microbiana del suelo, muestra una influencia en el desarrollo de *P. cinnamomi* (10, 11). Se han identificado algunos grupos de microorganismos con efecto de supresión en *P. cinnamomi* y que mejoran el crecimiento de *P. americana*, como bacterias clasificadas dentro del género *Pseudomonas* (10, 11); hongos del género *Trichoderma* (11, 12) y hongos micorrízicos (13).

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de los microorganismos *Trichoderma* sp., *G. fasciculatum* y una cepa de *Pseudomonas* sp., en el desarrollo de plantas de *P. americana*, inoculadas con *P. cinnamomi*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fitotecnia Tropical, de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (6°15'N, 75°35'W, 1495 m s. n. m.). El suelo utilizado fue un Andisol proveniente del Peñol (Antioquia, Colombia), previamente esterilizado en autoclave a 1,02 atm y 121 °C, por dos ciclos consecutivos de una hora cada uno. Se realizó análisis del suelo, curva de

incubación de cal, isoterma de absorción de fosfato y máxima capacidad de retención de humedad; con el fin de suministrar las condiciones adecuadas para el desarrollo de las plantas y microorganismos (pH: 5,6; 0,02 ppm de P en solución y humedad al 50 % de la máxima capacidad de retención del suelo).

## MICROORGANISMOS

Se utilizó un aislamiento de *P. cinnamomi* (CIB-35) proveniente de la colección de cepas de la Corporación para Investigaciones Biológicas-Medellín, Colombia (CIB), virulento sobre *Persea americana* var. Hass. Se seleccionó la cepa de *G. fasciculatum* de la colección de microorganismos del suelo de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, que mostró los mejores resultados a nivel de desarrollo de *P. americana*<sup>A</sup>. La cepa de *Pseudomonas* sp., se aisló de la rizosfera de un árbol de aguacate, sembrado en un lote altamente afectado por *P. cinnamomi*. La muestra de suelo se disolvió en agua destilada estéril y se prepararon diluciones 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>, de las cuales se sembraron 100 µL en medio King B KB (14), suplementado con ampicilina (50 mg L<sup>-1</sup>) y cloranfenicol (12,5 mg L<sup>-1</sup>) (15). Las colonias que produjeron pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta (260 nm)<sup>B</sup> se re-aislaron en el mismo medio (15). A partir de las colonias puras obtenidas, se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para producción de índoles totales, usando la solución indicadora Salkoswki, modificada para su uso en sobrenadantes de cultivos bacterianos y se seleccionó la colonia que presentó la mayor producción de esta fitohormona, para las pruebas (16). Para la selección de la cepa de *Trichoderma* sp., se realizaron pruebas de reducción del diámetro radial *in vitro* (17), usando cepas comerciales de *Trichoderma* sp. y *T. asperellum* (Biotropical™) y tres cepas de *Trichoderma* sp., aisladas en PDA, suplementado con 0,5 % de Igepal (Sigma, St Louis, USA) (18), a partir de muestras colectadas del suelo ubicado alrededor del tronco, en un metro de diámetro a partir de la base del tallo, de árboles de aguacate afectados con este patógeno. Se seleccionó la cepa que presentó mayor reducción del crecimiento radial de *P. cinnamomi*, sobre PDA, la cual se identificó como *Trichoderma* sp. (código TAF22).

## PLANTAS

Se utilizaron semillas de *P. americana*, con un peso de 40-50 g, provenientes de árboles sanos, con

<sup>A</sup> Montoya, B. y Osorio, W. Mycorrhizal dependency of avocado at different levels of soil solution phosphorus. En: Memorias del III Congreso Latinoamericano del Aguacate. Medellín, Colombia, 2009. pp. 19-31.

<sup>B</sup> Ramírez, C. A.; Patino, L. F.; Rodríguez, P. A.; Bustamante, E. y Pérez, J. C. Aislamiento y evaluación de rizobacterias potenciales promotoras de crecimiento en banano y plátano. XVII Reunión Internacional de la ACORBAT. 2006. pp. 12-22.

el fin de disminuir la variabilidad en las plantas. La desinfección superficial se realizó mediante lavado en solución acuosa de hipoclorito de sodio (3 % v:v) por un minuto, lavado en agua, tratamiento hidrotérmico a 48-50 °C por 30 min, seguido de tratamiento por inmersión en mezcla acuosa de fungicida carboxín + captan (vitabax®)+ insecticida clorpirifos (Lorsban®) durante 15 min (1). Después de la desinfección se aplicó un pre-tratamiento para acelerar la germinación, el cual consistió en la remoción de la testa, corte basal de 2 a 4 mm y corte apical de 10 a 20 mm (1). Las semillas se sembraron en cuarzo tamizado en malla de 2 mm, a los 60 días, se trasplantaron a potes plásticos de 2 kg de capacidad. Con el fin de observar resultados en forma temprana, se removieron los cotiledones de las plántulas al momento del trasplante. Las plantas se mantuvieron en condiciones de casa-malla, fertilizadas con la solución nutritiva Hoagland, manteniendo las condiciones de 50 % de la máxima capacidad de retención de humedad del suelo.

### TRATAMIENTOS EVALUADOS

En la tabla se presentan resumidos todos los tratamientos, evaluados en el presente estudio. Las inoculaciones de los microorganismos del suelo se hicieron en forma individual y en mezclas, tanto a plantas de aguacate, inoculadas y no inoculadas con *P. cinnamomi*.

### INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS

Para evaluar el efecto de *G. fasciculatum*, se inoculó el suelo con 35 g de inóculo crudo kg<sup>-1</sup> de suelo (45 propágulos infectivos de *G. fasciculatum* g<sup>-1</sup> de suelo) (19). La inoculación con *Trichoderma* sp, se realizó preparando una solución ajustada a una concentración de 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de suelo (9). La bacteria *Pseudomonas* sp., se inoculó a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de suelo (9). Un mes después de aplicados los tratamientos se realizó la inoculación con *P. cinnamomi*, en aquellos que lo incluyeron, para lo cual se multiplicó el inóculo en PDA, y se ajustó a una concentración de 10<sup>5</sup> propágulos mL<sup>-1</sup>. El inóculo de *P. cinnamomi*, se introdujo en el suelo de la rizósfera repartido homogéneamente en la maceta. Para el tratamiento de manejo tradicional, con productos químicos a base de los compuestos metalaxyl+mancozeb y fosfito de potasio, se utilizaron las dosis recomendadas en otros estudios (4), realizando su aplicación mediante aspersión al suelo.

### VARIABLES EVALUADAS

Para la evaluación de la severidad de la enfermedad, se utilizó la escala reportada para plantas jóvenes (30). Los síntomas y desarrollo de la enfermedad se registraron cada ocho días, durante un período de 90 días, después de la inoculación con

**Tabla. Resumen de tratamientos aplicados en plántulas de aguacate**

Tratamiento	Microorganismo Inoculado				Fungicidas <sup>(1)</sup>
	<i>P. cinnamomi</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>G. fasciculatum</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	
T1 <sup>(2)</sup>	- <sup>(2)</sup>	-	-	-	-
T2	+ <sup>(3)</sup>	-	-	-	-
T3	+	+	-	-	-
T4	-	+	-	-	-
T5	+	-	+	-	-
T6	-	-	+	-	-
T7	+	-	-	+	-
T8	-	-	-	+	-
T9	+	-	+	+	-
T10	-	-	+	+	-
T11	+	+	+	-	-
T12	-	+	+	-	-
T13	+	+	-	+	-
T14	-	+	-	+	-
T15	+	+	+	+	-
T16	-	+	+	+	-
T17	+	-	-	-	+

<sup>(1)</sup> Mezcla de los fungicidas metalaxyl, mancozeb y fosfito de aluminio

<sup>(2)</sup> -Plantas no inoculadas con el respectivo microorganismo o no aplicación de fungicidas

<sup>(3)</sup> +Plantas inoculadas con el respectivo microorganismo o aplicación de la mezcla de fungicidas

*P. cinnamomi*. Con los datos obtenidos se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC, por sus siglas en inglés) (20). La altura y el diámetro de la base del tallo de las plantas, se midieron cada 15 días después de iniciados los tratamientos. Al final del experimento (120 días) se midieron las siguientes variables: biomasa seca de raíz y aérea, área foliar, viabilidad de raíces muestreando en tres lugares distintos de la maceta mediante la utilización de un cilindro biselado (100 cm<sup>3</sup>). Además se realizó el re-aislamiento de *P. cinnamomi*, a partir de raíces de todas las plantas inoculadas.

El porcentaje de colonización micorrízica se realizó mediante la técnica de líneas de intercepción (21). Se tomaron raíces, se lavaron con agua corriente y se procedió a su decoloración con KOH (10 %) por 24 h (22). Luego se decoloraron en inmersión alcalina (0,5 % NH<sub>4</sub>OH y 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v, en solución acuosa), por 30 minutos (23). Las micorrizas se visualizaron con azul de tripano (0,025 % en agua) (24). En las raíces teñidas se procedió simultáneamente a identificar la presencia de *Trichoderma* sp. y *P. cinnamomi*. A partir de muestras tomadas de la rizosfera se realizó el re-aislamiento de *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas* sp.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar, con tres replicas por tratamiento. Se analizó la homocedasticidad y normalidad de los datos ( $\alpha < 0,01$ ), utilizando los criterios de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Los datos se sometieron a análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,01$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

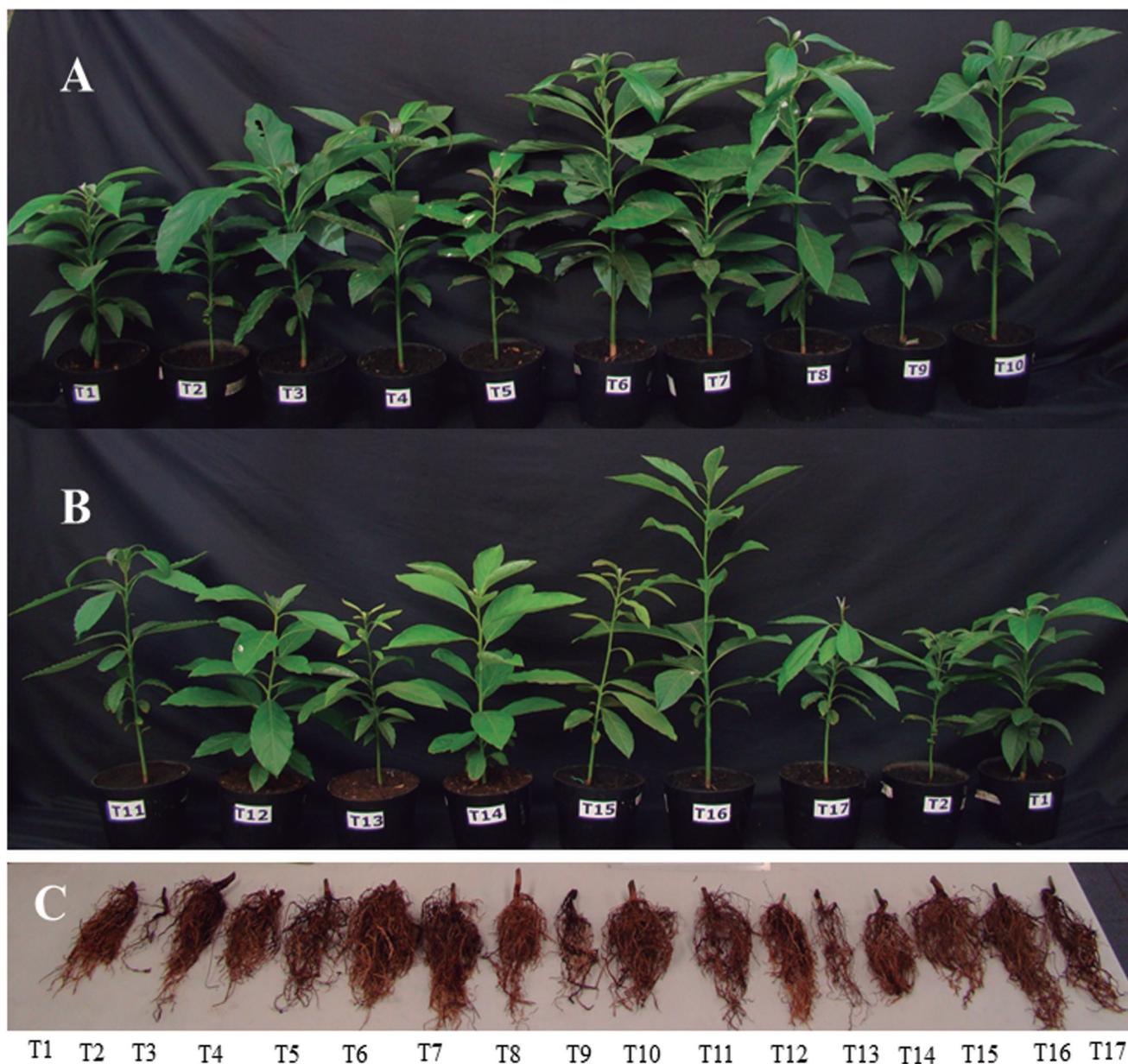
Diez días después de la aplicación, las plántulas inoculadas con *P. cinnamomi* presentaron síntomas típicos de la enfermedad, caracterizados por marchitez, amarillamiento foliar, retraso en el crecimiento y pudrición de raíces (Figura 1A, 1B y 1C). Durante el tiempo de evaluación no se observó muerte total de las plantas. Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,01$ ) encontradas para los valores de AUDPC permitieron diferenciar los tratamientos en cuatro grupos (Figura 2A). En el primer grupo se ubicó el control inoculado con el patógeno únicamente (T<sub>2</sub>), el cual presentó el nivel más alto de enfermedad. En el segundo grupo, con un nivel intermedio de enfermedad, se encontraron los tratamientos inoculados con el microorganismo patógeno, junto con otros microorganismos del suelo aplicados solos y en mezcla, y el tratamiento inoculado con el patógeno más la mezcla de fungicidas

(T<sub>5</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>11</sub>, T<sub>13</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>17</sub>). En el tercer grupo se ubicó el tratamiento inoculado con el patógeno y con una cepa del hongo *Trichoderma* sp. (T<sub>3</sub>). Este tratamiento mostró el nivel más bajo de enfermedad, entre los tratamientos en donde se inoculó el patógeno. En el cuarto grupo de tratamientos no se detectó la enfermedad (AUDPC = 0) y estuvo conformado por los tratamientos en donde no se inoculó *P. cinnamomi* (T<sub>1</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>12</sub>, T<sub>14</sub>, T<sub>14</sub>).

En todos los tratamientos donde se realizó la inoculación con *P. cinnamomi*, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas* sp., se logró re-aislar colonias de estos tres microorganismos, además, para los dos primeros se observaron estructuras típicas en muestras de raíces teñidas. En contraste, en los tratamientos no inoculados con estos microorganismos, no se observaron las estructuras características de estos.

En general las cepas de microorganismos aplicados en el presente trabajo, con el objetivo de controlar el patógeno, lograron reducir el nivel de enfermedad de manera similar o mejor, que la mezcla de fungicidas. Sin embargo, al aplicarlos combinadamente no se obtuvo el efecto sinérgico reportado en la literatura para las especies de los mismos géneros (8, 9, 12). El aislamiento de *Trichoderma* sp. (T<sub>3</sub>), mostró la mayor reducción de la enfermedad, con nivel superior al tratamiento con fungicidas; las especies pertenecientes a este género han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de inhibir otros microorganismos (9, 17). El género *Trichoderma* presenta mecanismos de competencia, hidrólisis enzimática e inducción de respuestas de defensa en la planta, entre otros, lo que ha permitido su uso como biocontrolador de patógenos como *P. cinnamomi* (12). Se ha reportado la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR) y adquirida (SAR) por parte de bacterias del grupo de las *Pseudomonas* sp. y HMA (26, 27, 28).

Esta activación podría depender de diversos factores como el genotipo de la cepa utilizada, el suelo, los nutrientes disponibles, el clima y el manejo del cultivo, entre otros; ya que en contraste con lo obtenido en el presente estudio, en trabajos realizados por otros autores (29), no se encontró efecto de la inoculación micorrizal sobre los niveles de enfermedad inducida por *P. cinnamomi*. Considerando que en Colombia, el manejo de la tristeza del aguacate, se basa en un 68 % en productos de origen químico como única estrategia y los agroquímicos representan el 48,1 % de los costos totales de producción (3, 5), el uso de los microorganismos para control de la enfermedad, reportados en este trabajo podrían ser una alternativa viable, la cual se debe evaluar en condiciones de cultivo.

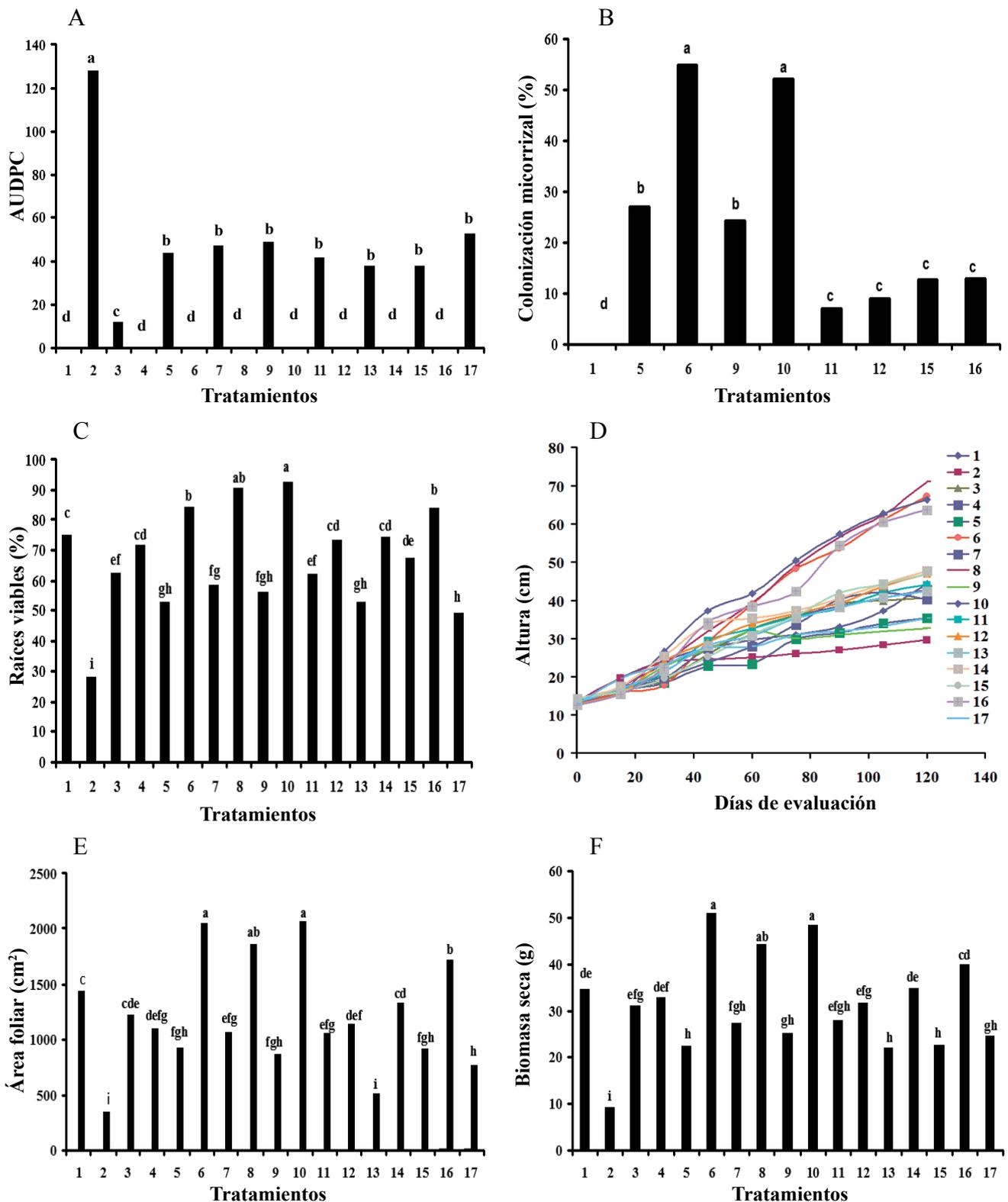


A: T<sub>1</sub>: plantas control, T<sub>2</sub>: plantas inoculadas con *P. cinnamomi*, T<sub>3</sub>: *T. harzianum* + *P. cinnamomi*, T<sub>4</sub>: *T. harzianum*, T<sub>5</sub>: *P. cinnamomi* + *G. fasciculatum*, T<sub>6</sub>: *G. fasciculatum*, T<sub>7</sub>: *P. cinnamomi* + *Pseudomonas* sp., T<sub>8</sub>: *Pseudomonas* sp., T<sub>9</sub>: *Pseudomonas* sp. + *G. fasciculatum* + *P. cinnamomi*; T<sub>10</sub>: *Pseudomonas* sp. + *G. fasciculatum*.

B: T<sub>11</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *G. fasciculatum*, T<sub>12</sub>: *T. harzianum* + *G. fasciculatum*, T<sub>13</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>14</sub>: *T. harzianum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>15</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>16</sub>: *T. harzianum* + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>17</sub>: metalaxyl + mancozeb + fosfito de potasio + *P. cinnamomi*, T<sub>2</sub>: plantas inoculadas con *P. cinnamomi*, T<sub>1</sub>: plantas control.

C: T<sub>1</sub>: plantas control, T<sub>2</sub>: plantas inoculadas con *P. cinnamomi*, T<sub>3</sub>: *T. harzianum* + *P. cinnamomi*, T<sub>4</sub>: *T. harzianum*, T<sub>5</sub>: *P. cinnamomi* + *G. fasciculatum*, T<sub>6</sub>: *G. fasciculatum*, T<sub>7</sub>: *P. cinnamomi* + *Pseudomonas* sp., T<sub>8</sub>: *Pseudomonas* sp., T<sub>9</sub>: *Pseudomonas* sp. + *G. fasciculatum* + *P. cinnamomi*; T<sub>10</sub>: *Pseudomonas* sp. + *G. fasciculatum*. B: de izquierda a derecha T<sub>11</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *G. fasciculatum*, T<sub>12</sub>: *T. harzianum* + *G. fasciculatum*, T<sub>13</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>14</sub>: *T. harzianum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>15</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>16</sub>: *T. harzianum* + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>17</sub>: metalaxyl + mancozeb + fosfito de potasio + *P. cinnamomi*.

**Figura 1. Detalle de plantas representativas de cada tratamiento al final del trabajo (120 días)**



(A) porcentaje de colonización micorrizal; (B) área foliar; (C) biomasa seca; (D) altura de las plantas; (E) viabilidad de raíces; (F) valores con letras diferentes muestran diferencias significativas con base en la prueba Tukey (99 %)

T<sub>1</sub>: plantas control, T<sub>2</sub>: plantas inoculadas con *P. cinnamomi*, T<sub>3</sub>: *T. harzianum* + *P. cinnamomi*, T<sub>4</sub>: *T. harzianum*, T<sub>5</sub>: *P. cinnamomi* + *G. fasciculatum*, T<sub>6</sub>: *G. fasciculatum*, T<sub>7</sub>: *P. cinnamomi* + *Pseudomonas* sp., T<sub>8</sub>: *Pseudomonas* sp., T<sub>9</sub>: *Pseudomonas* sp. + *G. fasciculatum* + *P. cinnamomi*; T<sub>10</sub>: *Pseudomonas* sp. + *G. fasciculatum*. B: de izquierda a derecha T<sub>11</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *G. fasciculatum*, T<sub>12</sub>: *T. harzianum* + *G. fasciculatum*, T<sub>13</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>14</sub>: *T. harzianum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>15</sub>: *P. cinnamomi* + *T. harzianum* + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>16</sub>: *T. harzianum* + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp., T<sub>17</sub>: metalaxyl + mancozeb + fosfito de potasio + *P. cinnamomi*

**Figura 2. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC)**

## COLONIZACIÓN MICORRÍZICA

En la observación microscópica, las estructuras predominantes encontradas fueron de tipo micelio interno, externo, vesículas y arbusculos, coincidiendo con lo reportado en la literatura para HMA (13). El porcentaje de colonización osciló entre el 7 y 54,6 %, resultados similares a lo reportado por algunos autores<sup>A</sup> quienes encontraron valores de colonización para plantas sanas entre 57 y 77 %, con *G. fasciculatum*. Otros trabajos han encontrado valores de colonización micorrízica superiores al 77 %, utilizando cepas de los géneros *Glomus* sp. y *Acaulospora* sp. (13). El porcentaje de colonización micorrízica depende de numerosos factores como el fósforo presente en el suelo, el porcentaje de materia orgánica, el genotipo de la HMA y de la planta y la disponibilidad de otros nutrientes, entre otros.

Los valores obtenidos para porcentaje de colonización micorrízica, permitieron agrupar los tratamientos en cuatro grupos significativamente diferentes ( $\alpha < 0,01$ ) (Figura 2B). En el primer grupo con el valor más alto, se ubicaron los tratamientos inoculados con micorriza y sin microorganismo patógeno, T<sub>6</sub> (*G. fasciculatum*) y T<sub>10</sub> (*G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp.). En el segundo grupo se encontraron los tratamientos a plantas inoculadas con *P. cinnamomi* y con *G. fasciculatum* (T<sub>5</sub>) y con *P. cinnamomi* y *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp. (T<sub>9</sub>). En el tercer grupo se identificaron los tratamientos T<sub>11</sub>, T<sub>12</sub>, T<sub>15</sub> y T<sub>16</sub>, los cuales fueron aplicaciones de mezclas de *G. fasciculatum* con *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas* sp., a plantas en unos casos infectadas con el agente causal de la marchitez y en otros sin infectar. En el cuarto grupo se ubicaron aquellos tratamientos sin aplicación del HMA *G. fasciculatum* (T<sub>1</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>13</sub>, T<sub>14</sub> y T<sub>17</sub>). Como era de esperarse, estos tratamientos presentaron un valor de cero para porcentaje de colonización micorrízica y por esta razón no se muestran en la Figura 2B. Los resultados sugieren que la cepa de *Trichoderma* sp. aplicada, incidió negativamente en la colonización de la cepa de HMA. Como se discutió antes, el antagonismo en las especies del género *Trichoderma* hacia otros microorganismos, se ha identificado extensamente, lo que podría explicar lo observado. Este posible antagonismo se debe considerar cuidadosamente al momento de diseñar una estrategia de control biológico de las enfermedades. Por otra parte, algunos estudios plantean que *P. cinnamomi* afecta negativamente la colonización micorrízica en aguacate (29), lo que explicaría la disminución en el porcentaje de colonización, presentado en el segundo grupo de significancia. Para los tratamientos T<sub>5</sub> y T<sub>9</sub>, ubicados en el segundo grupo de porcentaje de colonización micorrízica, se observaron los menores valores de AUDPC en las plantas con aplicación de HMA. Para

la aplicación de microorganismos benéficos solos o en mezclas, en los cultivos de aguacate en campo, se deben realizar trabajos adicionales considerando las diferentes variables que inciden en el resultado final de control de la enfermedad.

## VIABILIDAD DE RAÍCES

Los valores más altos en los porcentajes de raíces viables, se encontraron en los tratamientos T<sub>8</sub> (*Pseudomonas* sp.) y T<sub>10</sub> (*G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp.), seguido por T<sub>6</sub> (*G. fasciculatum*), y T<sub>16</sub> (*Trichoderma* sp. + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp.) (Figura 2C). Los resultados indican un mayor efecto de promoción de crecimiento de raíces por la cepa usada de *Pseudomonas* sp., solo o en combinación con el HMA. Para la cepa usada de *Pseudomonas* sp., se encontró producción de la fitohormona ácido-indolacético (AIA), la cual incrementaría la proliferación de raíces viables (Figura 2C), como se observó para los tratamientos T<sub>8</sub> y T<sub>10</sub>, con valores de 90-92,3 % respectivamente.

Todos los tratamientos, que involucraron infección con *P. cinnamomi*, mostraron valores más bajos de raíces viables, que los no inoculados con el patógeno, confirmando su efecto detrimental sobre las raíces. En los tratamientos T<sub>3</sub>, T<sub>7</sub> y T<sub>11</sub>, se encontraron valores mayores de raíces viables, que en el tratamiento que usó la mezcla de fungicidas únicamente (T<sub>17</sub>). Para estos tratamientos se obtuvieron valores similares de AUDPC, con un mejor nivel de control de la enfermedad que el observado en el control inoculado únicamente con el patógeno (T<sub>2</sub>) (Figuras 2A y 2C). Es posible que un incremento en las raíces viables, pueda mejorar la capacidad de soportar la infección por *P. cinnamomi* y disminuir los síntomas visibles de la enfermedad. Los materiales de *P. americana* que se han categorizado como tolerantes a este patógeno, presentan mayor cantidad de raíces viables, lo que apoya esta hipótesis (6, 25).

## VARIABLES BIOMÉTRICAS DE LAS PLANTAS

Durante los primeros 30 días después de la aplicación de los tratamientos, no se observaron diferencias notables en las variables altura, área foliar y biomasa seca, entre los diferentes tratamientos aplicados a las plantas de aguacate (Figura 2D, 2E y 2F). A partir del día 30 en adelante se percibieron las diferencias entre tratamientos, notablemente se observó una marcada reducción del crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas con *P. cinnamomi* (T<sub>2</sub>), hasta finalizar el estudio. Esta tendencia en la variedad de aguacate Hass, es similar a la reportada para la variedad Mexicola, en la cual se redujo un 25 % la altura, 18 % el diámetro del tallo, 90 % el número de hojas y 49 % el área foliar (30). A partir del día 30

y hasta el final de la evaluación, en los tratamientos sin inoculación de *P. cinnamomi*, pero con aplicación de los otros microorganismos: T<sub>6</sub> (*G. fasciculatum*), T<sub>8</sub> (*Pseudomonas* sp.), T<sub>10</sub> (*Pseudomonas* sp. + *G. fasciculatum*) y T<sub>16</sub> (*Trichoderma* sp. + *G. fasciculatum* + *Pseudomonas* sp.), se observó un mayor valor para los parámetros área foliar, biomasa y altura de las plantas, respecto a los otros tratamientos. Para los tratamientos inoculados adicionalmente con *P. cinnamomi* (T<sub>5</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>15</sub>), se encontró una velocidad menor de crecimiento, respecto a aquellos no inoculados con el patógeno (Figura 2D). Los menores valores para área foliar, biomasa seca y altura se presentaron para el tratamiento inoculado únicamente con *P. cinnamomi* (T<sub>2</sub>) (Figuras 2 D, 2E y 2F).

Los valores medidos para todas las variables analizadas en este estudio muestran que el aislamiento usado de *P. cinnamomi* fue virulento y causó un efecto perjudicial sobre las plantas (4, 30). Durante la etapa de establecimiento en vivero y el trasplante al campo, las plantas de aguacate son muy vulnerables al ataque por patógenos principalmente *P. cinnamomi* (4, 6). Los microorganismos *G. fasciculatum* (T<sub>6</sub>) y la bacteria *Pseudomonas* sp. (T<sub>8</sub>), solos o combinados (T<sub>10</sub>), mostraron utilidad potencial para ser usados en las fases de germinación y establecimiento de plantas de aguacate var. Hass. El efecto positivo de los microorganismos no patogénicos, usados en este trabajo, sobre plantas de aguacate podría atribuirse a varios mecanismos reportados previamente para cepas de estas mismas especies (13, 29). La especie *P. americana* no posee pelos radiculares, por lo que los HMA podrían actuar aumentando el volumen de exploración del suelo (1, 31) y el grupo estudiado de *Pseudomonas* sp., incrementó el porcentaje de raíces viables, posiblemente por la producción observada de auxinas, lo que aumentaría la capacidad de absorción de agua y nutrientes (9, 26). Las plantas con mejor condición fisiológica y raíces saludables, podrían soportar mejor las condiciones de estrés abiótico y biótico como el ocasionado por el patógeno *P. cinnamomi* (25), como se encontró en el presente trabajo.

Es importante evaluar los microorganismos benéficos en árboles establecidos en condiciones de campo y durante períodos de tiempo prolongados, para determinar su utilidad durante todas las fases del cultivo y la duración de los efectos positivos encontrados.

## CONCLUSIONES

El tratamiento con *Trichoderma* sp., mostró el mejor control de la enfermedad denominada marchitez en plantas de aguacate. Las cepas usadas de *G. fasciculatum* y *Pseudomonas* sp. promovieron el crecimiento, el área foliar y la formación de raíces

viables en plantas de *P. americana* y alcanzaron un nivel de control de marchitez similar al de los productos químicos fungicidas aplicados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al profesor Nelson Walter Osorio, director del grupo de investigación en Microbiología del Suelo de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración y apoyo y a Laura Osorno, por la ayuda en el procesamiento de las raíces para la evaluación de colonización micorrizal y la medición del fósforo foliar.

## REFERENCIAS

- Bernal, A. y Cipriano, A. Generalidades del cultivo de Aguacate. En: Tecnología para el cultivo de aguacate. Manual Técnico 5 CORPOICA Centro de Investigación La Selva. Rionegro Antioquia, 2008. pp. 11-80. ISBN 978-958-8311-74-6.
- FAO. Anuario estadístico FOASTAT. 2010. [Consultado 17 septiembre 2012]. Disponible en: <http://www.fao.org>.
- Aproare, Sat. Línea base o diagnóstico de campo. *Informativo el aguacate*, 2009, vol. 2, no. 1, pp. 5-7.
- Ramírez, J. G.; Castañeda, D. A. y Morales, J. G. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres*, 2014, vol. 61, no. 1, pp. 050-061. ISSN 0034-737X.
- Vásquez, L.; Ríos, G.; Londoño, M. y Torres, M. Caracterización biofísica y socioeconómica del sistema de producción de aguacate cv Hass en los departamentos de Antioquia, Caldas, Risaralda y Quindío. Corporación Colombiana de investigación CORPOICA. Centro de investigación la selva. Rionegro Antioquia, 2011. 54 pp. ISBN 978-958-740-074-8.
- Perez, M. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2008, vol. 2, no. 1, pp. 1-24. ISSN 1749-0472.
- Dobrowolski, M.; Shearer, B.; Colquhoun, I.; O'Brien, P. y Hardy, G. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology*, 2008, vol. 57, pp. 928-936. ISSN 1983-2052.
- Etebu, E. y Osborn, A. A Review of Indicators of Healthy Agricultural Soils with Pea Footrot Disease Suppression Potentials. *Sustainable Agriculture Research*, 2012, vol. 1, no. 2. pp. 10-35. ISSN 1044-0046.
- Jena, N. *Pseudomonas* and *Trichoderma*: The most effective bio-control agents against damping off pathogens of vegetable crops. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 2012, vol. 14, no. 2, pp. 295-298. ISSN 0972-3005.
- Yang, C.; Crowley, D. y Menge, J. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *Microbiology Ecology*, 2001, vol. 35. pp. 129-136. ISSN 0095-3628.

11. Costa, J.; Menge, J. y Casale, W. Biological control of *Phytophthora* root rot of avocado with microorganisms grown in organic mulches. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2000, vol. 31, pp. 239-246. ISSN 1517-8382.
12. Chambers, S. y Scott, E. *In vitro* antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* sp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology*, 1995, vol. 143, pp. 471-477. ISSN 0931-1785.
13. Orozco, I.; Vargas, C.; Cabezas, M. y Cuervo, J. Colonización micorrizica en plantas de aguacate (*Persea americana* L.). *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 2010, vol. 13, no. 2, pp. 51-60. ISSN 0123-4226.
14. King, E.; Ward, M. y Raney, D. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal Laboratory Clinical Medical*, 1954, vol. 44, pp. 301-307. ISSN 0022-2143.
15. Simon, A. y Ridge, E. H. The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent *Pseudomonas*. *Journal Applied Bacterial*, 1974, vol. 37, pp. 459-460. ISSN 1365-2672. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1974.tb00464.x.
16. Patten C. L. y Glick B. R. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of host plant root system. *Applied environment microbiology*, 2002, vol. 48, pp. 3795-3801. ISSN 0099-2240.
17. Khalili, E.; Sadravi, M.; Naeimi, S.; y Khosravi, V. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, vol. 43, no 1. pp. 297-305. ISSN 1517-8382.
18. Porras, M.; Barrau, C. y Romero, F. Effects of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. *Crop Protection*, 2007, vol. 26, pp. 782-787. ISSN 0261-2194.
19. Porter, W. The "Most Probable Number" method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular micorrizal fungi in soil. *Australian Journal of Soil Research*, 1979, vol. 17, pp. 515-519. ISSN 0004-9573.
20. Madden, L. V.; Hughes, G. y van den Bosch, F. The Study of Plant Disease Epidemics. *American Phytopathological Society*. 2007. 650 pp. ISSN 0031-949X.
21. Giovannetti, M. y Mosse, M. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 1980, vol. 84, pp. 489-500. ISSN 1469-8137.
22. Phillips, J. M. y Hayman, D. S. Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Transaction British Mycological Society*, 1970, vol. 55, pp. 158-161. ISSN 0007-1536.
23. Brundrett, M. C. y Abbott, L. K. Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest. II. Spatial variability in inoculum levels. *New Phytologist*, 1995, vol. 131, pp. 461-469. ISSN 1469-8137.
24. Kormanik, P. P.; McGraw, A. C. y Shultz, R. C. Procedures and equipment for staining large number of plant roots for endomycorrhizal assay. *Canadian Journal of Microbiology*, 1980, vol. 26, pp. 536-538. ISSN 0008-4166.
25. Phillips, D.; Grant, B. y Weste, G. Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 1987, vol. 77, pp. 691-698. ISSN 0031-949X.
26. Lugtenberg B. y Kamilova, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2009, vol. 63, pp. 541-556.
27. García, L.; Romero, D.; Zerriouh, H.; Cazorla, F.; Torres, D.; Vicente, A. y Pérez, A. Isolation and selection of plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. *Plant Soil*, 2012, vol. 358, pp. 201-212. ISSN 1573-5036.
28. Jung, C.; Martínez, A.; López, A. y Pozo, A. Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *Journal Chemical Ecology*, 2012, vol. 38, pp. 651-664. ISSN 0098-0331.
29. Davis, R. M.; Menge, I. A. y Zentmyer, G. A. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root rot of three crop plant. *Phytopathology*, 1978, vol. 68, pp. 1614-161. ISSN 0031-949X.
30. Besoain, X.; Arenas, C.; Salgado, E. y Latorre, B.A. Efecto del Periodo de Inundación en el Desarrollo de la Tristeza del Palto (*Persea americana*), Causada por *Phytophthora cinnamomi*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 2005, vol. 32, no. 2, pp. 97-103. ISSN 0718-1620.
31. Parniske, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, vol. 6, pp. 763-775. ISSN 1740-1526.

Recibido: 14 de abril de 2013

Aceptado: 27 de septiembre de 2013

#### ¿Cómo citar?

Ramírez Gil, Joaquín G.; Castañeda Sánchez, Darío A. y Morales Osorio, Juan G. Alternativas microbiológicas para el manejo de *Phytophthora cinnamomi* Rands., en *Persea americana* Mill. bajo condiciones de casa-malla. [en línea]. *Cultivos Tropicales*, vol. 35, no. 4, pp. 19-27. ISSN 1819-4087. [Consultado: \_\_\_\_]. Disponible en: <-----/>