

## **A1-191 Evaluación de *Trichoderma* spp., en asociación con *Agave cupreata* y *Juniperus deppeana* en suelos del municipio San Juan Tzicatlacoyan, Puebla-México.**

Omar Romero-Arenas<sup>1</sup>, Miguel Angel Damian Huato<sup>1</sup>, José A., Rivera Tapia<sup>2</sup>, Fernando Aldana<sup>3</sup>, y Conrado Parraguirre Lezama<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); <sup>2</sup> Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias-BUAP; <sup>3</sup> Departamento de Química del Agua, Instituto de Ciencias-BUAP  
<sup>4</sup> Ingeniería Agroforestal, Campus Tetela-BUAP.

### **Resumen**

Se realizó un estudio para evaluar la importancia de la adición de cepas nativas de *Trichoderma* sp a la rizosfera de *Juniperus deppeana* y *Agave cupreata*, como alternativa para el establecimiento de una plantación forestal en San Juan Tzicatlacoyan. Estas especies están consideradas recuperadoras de suelos y presentan una amplia distribución en zonas áridas, así como rápido crecimiento y adaptación. El inoculante con base de grano de trigo resultó un excelente sustrato para la cepa (TS1P1) de *Trichoderma* sp donde se comparó con un inoculante comercial marca Tricovel®, con el fin de determinar la mejor adherencia entre especies forestales. Los resultados mostraron que la cepa nativa (TS1P1) en la rizosfera de *A. cupreata* presentó mayor adherencia con mejor desarrollo en el índice de calidad de Dickson que fue de 1.34 a los 90 días de crecimiento siendo superior a Tricovel® que solo obtuvo 1.09 en el mismo tiempo. La conformación de estructuras reproductivas, confirman la presencia de *Trichoderma* en la raíz de las plantas de *J. deppeana* y *A. cupreata*, mostrando que es posible su empleo para la asociación de estas especies de importancia forestal.

**Palabras clave:** cepas nativas de *Trichoderma*; rizosfera; importancia forestal; Índice de Dickson.

### **Abstract**

A study was conducted to assess the significance of the addition of native strains of *Trichoderma* sp at rhizosphere of *Juniperus deppeana* and *Agave cupreata*, as an alternative to the establishment of a forest plantation in San Juan Tzicatlacoyan. These species are considered to recuperative soil and are widely distributed in arid areas, addition its rapid growth and adaptation. The inoculant based in wheat grain, it turned an excellent substrate for strain (TS1P1) of the *Trichoderma* sp where it was compared with a commercial inoculant "Tricovel®" brand, in order to determine the best addition between forest species. The results showed that the best addition is in the rhizosphere of *A. cupreata* with the native strain (TS1P1), also gives a better development in the Dickson quality index of 1.34 at 90 days of growth exceeding that Tricovel® 1.09 in the same time. The formation of reproductives structures confirm the presence of *Trichoderma* at the root of the plants, showing that it is possible to use native strains to field for the association of these forest species.

**Keywords:** native strains; rhizosphere; forest importance; Index Dickson.

### **Introducción**

En el suelo existen diversos microorganismos con capacidad antagónica hacia microorganismos fitopatógenos, uno de los más estudiados es *Trichoderma* spp., debido a su fácil y rápido crecimiento en medio de cultivo. Éste hongo es un habitante natural del

suelo y se caracteriza por su comportamiento saprófito, propiedad que le proporciona ventajas antagónicas, tales como antibiosis, competencia por nutrientes, micoparasitismo a otros hongos; permitiendo su selección y uso para el biocontrol en determinados cultivos agrícolas (Howell y Stipanovic, 1995). En México la pobreza constituye un factor esencial en la degradación de los suelos, sobre todo en el medio rural; a causa de la descapitalización sufrida por el sector durante décadas. La situación es tal, que ocho de cada diez familias rurales son pobres y de éstas cuatro se encuentran en pobreza extrema (Carabias, 1993). El deterioro de la tierra o la desertificación es un problema ecológico contemporáneo de mayor importancia en los países en desarrollo (Duarte, 1990). Este proceso ha sido definido como “la disminución o destrucción del potencial biológico de los recursos naturales, ocasionado por el mal uso y manejo de los mismos; lo que trae como consecuencia procesos degenerativos del medio físico, económico y social de las comunidades involucradas en su entorno” (Ortiz *et al.*, 1994). Las plantaciones forestales se establecen con fines comerciales o de rehabilitación y pueden desempeñar varias funciones en el ecosistema. En los lugares donde se han establecido con fines de rehabilitación del medio ambiente, ayudan a la conservación del suelo y agua (Grubb, 1995).

*Juniperus deppeana* vegeta sobre una amplia variedad de suelos incluyendo los alcalinos, los de contenido moderado en sales solubles y con drenaje deficiente. Pero también es frecuente observarlos en suelos poco profundos y pedregosos. Vázquez Yanes *et al.*, (1999) menciona que el *Juniperus deppeana* se asocia con *Pinus cembroides*, *Pinus leiophylla*, *Quercus rugosa*, *Quercus crassifolia*, *Agave sp.*, *Cupressus sp.*, *Platanus sp.*, *Fraxinus sp.* Los agaves son un grupo de plantas de gran importancia económica y ecológica para México (Gentry, 1982; Eguiarte *et al.*, 2000). El género *Agave* cuenta con más de 160 especies, 75 % de las cuales se encuentran presentes en el país (Eguiarte *et al.*, 2000). De acuerdo a lo anterior, esta investigación tiene como objeto evaluar la adaptación de *Trichoderma spp.*, asociado a plantas de *Juniperus deppeana* y *Agave cupreata* en suelos del municipio de San Juan Tzicatlacoyan Puebla, México, ya que no se han reportados datos de esta asociación inducida para la recuperación de suelos a largo plazo.

## Metodología

### *Material biológico*

Los trabajos se llevaron a cabo en el laboratorio de micología del *Campus Tetela* BUAP y los trabajos de campo se establecieron en el municipio San Juan Tzicatlacoyan, Puebla. Se trabajó con la cepa nativa (TS1P1) de *Trichoderma spp.*, la cual forma parte del cepario del laboratorio de micología del Centro de Agroecología-BUAP y la cepa comercial de la marca Tricovel ®. Las plántulas de *Agave cupreata* y *Juniperus deppeana* fueron proporcionadas por la Comisión Nacional Forestal, procedentes del vivero Xoyatlan Municipio Palmar del Bravo, Puebla, México, con 8 meses de edad y una altura promedio de 11.7 y 24.5 respectivamente.

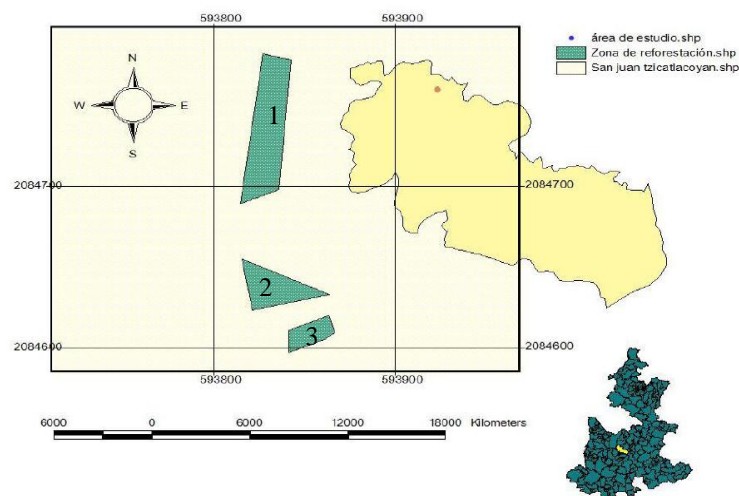
### *Descripción del área de estudio*

El Municipio de Tzicatlacoyan se localiza en la parte central del estado de Puebla, México, limita al norte con los municipios de Cuautinchán y Tecali de Herrera, al sur con San Juan Atzompa, Huatlatlauca y La Magdalena. Presenta un clima templado subhúmedo, con lluvias en verano y suelos con gran diversidad edafológica, identificándose el grupo de los Leptosoles como los más abundantes (INEGI, 2013).

### *Establecimiento de la plantación*

La plantación se estableció bajo el sistema de cepa común en el predio ejidal bajo la tutela del C. Cupertino Rodríguez; consistió en establecer líneas paralelas, con la previa medición

de curvas de nivel, donde se realizaron cepas de 40\*40 cm con una profundidad de 40 cm, procurando que se depositen a un lado de la cepa los primeros 20 cm de tierra que es la más fértil y del otro lado los otros 20 cm más profundos, se retiró el envase de plástico sin dañar a la raíz y se colocó en la cepa, después de cocar la planta se relleno con la tierra más profunda procurando apisonar ligeramente para que tenga una mejor aireación y drenaje el suelo. Las plantas se distribuyeron en tres parcelas de diferentes medidas (Figura 1), pero con el mismo criterio de acomodo: *Agave cupreata* intercalado con un *Juniperus deppeana* siguiendo esta secuencia cada dos metros hasta completar las líneas de cada parcela. Las líneas se intercalaron a razón de los siguientes tratamientos: ST (Sin Tratamiento), CTC (Con Tricovel®) y CTN (Cepa TS1P1) esperando un total de 12 hileras por 16 plantas en el bloque 1, 20 hileras por 49 plantas en el bloque 2 y 8 hileras con 4 plantas para el bloque 3.



**FIGURA 1.** Macro localización del municipio y micro localización de la zona a reforestar.

#### *Inoculación de las Plantas con Trichoderma spp*

En el caso de la cepa TS1P1 (Nativo), se colonizó incorporando 8 g de semillas de trigo con  $10^9$  conidios  $g^{-1}$  a la planta ya establecida, con ayuda de una pala de jardinería al costado derecho procurando una profundidad de 30 cm, con la finalidad de que los granos queden en contacto en todos los niveles de la raíz. Para la aplicación de Tricovel® se seguirán las recomendaciones de la marca mezclando los granos de arroz con *Trichoderma spp*. En un bote de 25 L de agua para después dosificar 10 mL de solución a una concentración de  $10^9$  conidios  $g^{-1}$  a cada planta.

#### *Análisis destructivo del material y determinación de Trichoderma spp*

Se realizaron 3 muestreos destructivos de 15 plantas por tratamiento, al término de 90 días, cuidadosamente retirados del suelo con ayuda de pala derecha procurando no dañar el sistema radical. Las planas de *Agave cupreata* y *Juniperus deppeana* se observaron al microscopio óptico, en presencia de suelo; para observar la presencia de estructuras de *Trichoderma spp.*, para determinar la relación inducida entre la planta y el microorganismo. Esta observación se realizó a nivel raíz, para ello se tomaron tres niveles a) alto "el más cercano al cuello de la raíz b) intermedio c) bajo "el segmento más cercano a la cofia de la raíz". Además se retiró 10 g de suelo cercano a la raíz para observar la coloración del suelo y las muestras fueron observadas al microscopio a 10x, 40x.

### Determinación del porcentaje de viabilidad de *Trichoderma spp.*, en suelo

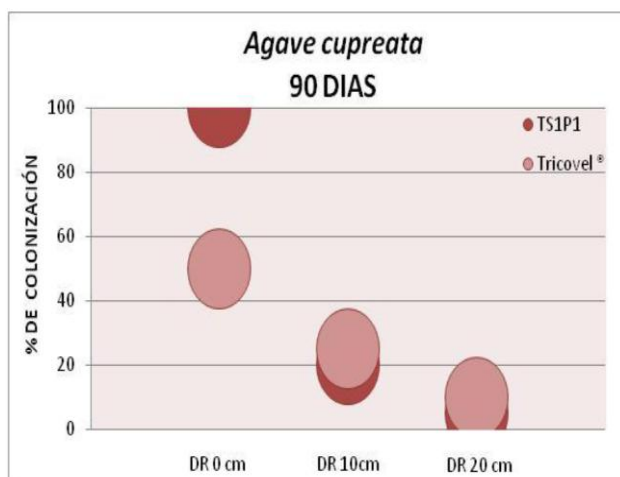
Para la determinación del porcentaje de viabilidad de esporas, se recolectó 10 g de suelo de cada uno de los tratamientos evaluados a una distancia de 10 \* 40 cm de profundidad. Se realizaron diluciones seriadas decimales con 1 g hasta llegar a la concentración  $1 \times 10^9$ . Las muestras de la concentración de esporas de cada suspensión obtenida se realizaron con la ayuda de una cámara hematómetra de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Island, NY). El conteo en la cámara se realizó cuatro veces para cada tratamiento y repetición. Posteriormente se determinó la viabilidad de las esporas, en cajas Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), donde se inocularon 100 esporas contenidas en 20  $\mu$ L por caja. A las 48 horas posteriores a la siembra, se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) germinadas (Romero, 2007).

### Análisis estadístico

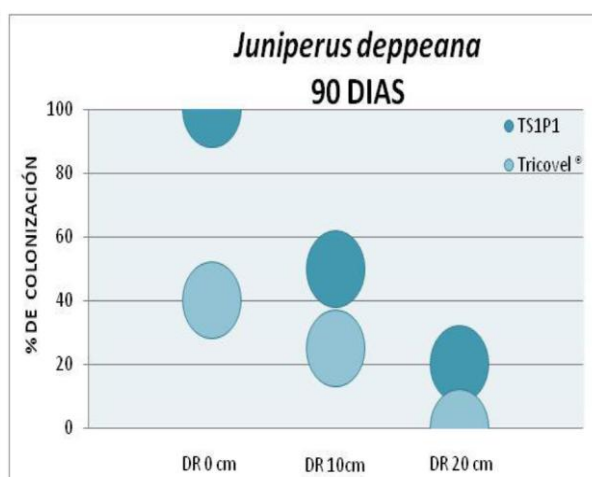
Con los datos que se obtuvieron de las variables se realizó la separación de medias, prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), para evaluar por especie, por periodo y por tratamiento, para ello se utilizó el programa SPSS®, además de evaluar el Índice de Calidad de Dickson a los 90 días de ambas especies forestales.

## Resultados y discusiones

La determinación del porcentaje de supervivencia de las cepas TS1P1 en comparación con Tricovel® a los 90 días inoculación mostró que el comportamiento de *Agave cupreata* asociado a ambos tratamientos, donde el establecimiento de la cepa TS1P1 presentó en DR 0 cm el 100% de presencia mientras que Tricovel® alcanzó el 50% de colonización superando en DR10 cm y DR20 cm a TS1P1 alcanzando el 25 y 10% respectivamente (Fig. 1). Para *Juniperus deppeana* la cepa TS1P1 DR0 cm no disminuyó sus niveles de colonización, manteniendo el 100% en la rizosfera. El tratamiento con Tricovel® no presentó desarrollo en DR20 cm (Fig. 2 y 3).



**FIGURA 2.** Comportamiento de TS1P1 Y Tricovel® a los 90 días de crecimiento en *Agave cupreata*.



**FIGURA 3.** Comportamiento de TS1P1 Y Tricovel® a los 90 días de crecimiento en *Juniperus deppeana*.

La determinación del porcentaje de viabilidad de cada uno de los tratamientos a las 48 hrs., presento 13 UFC para la Cepa TS1P1 con *Juniperus deppeana*, 16 UFC para la Cepa

TS1P1 asociado a *Agave cupreata*, 8 UFC para la cepa Tricovel® con *Juniperus deppeana* y 1 UFC para la asociación Cepa Tricovel® con *Agave cupreata*.

El Índice de Calidad de Dickson se calculó a los 90 días de inoculación en plantas de *Agave cupreata* y *Juniperus deppeana*, donde la prueba de Tukey presenta diferencias significativas, en el caso de *Agave cupreata* presenta la conformación de 2 grupos: el grupo “a” TS1P1 con los niveles altos en diferencia al grupo “b” que fueron Tricovel® y el testigo (Tabla 1). En el caso de *Juniperus deppeana*, los tratamientos como el testigo mostraron diferencias significativas; siendo TS1P1 la cepa con los valores más altos. Se presenta la conformación de 3 grupos: el grupo “a” TS1P1 con los niveles altos en diferencia al grupo “b” Tricovel® y el grupo “c” testigo (Tabla 1).

Estos resultados confirman que el biocontrol de hongos fitopatógenos y la biofertilización empleando *Trichoderma* spp., es un método utilizado en diversos cultivos en diferentes partes del mundo, sin embargo el uso de cepas comerciales presenta dificultades con su persistencia en el suelo, debido a factores como la genética de los aislamientos, las condiciones del medio ambiente (González *et al.*, 1999), sin embargo, el empleo de cepas más adaptadas a las condiciones agroecológicas de la región y que cuenten con la capacidad conjunta de biocontrol y biofertilización presentan mayor adaptación al medio (Kleifeld y Chet, 1992; Michel *et al.*, 2001) por estas razones es importante la selección de aislamientos nativos mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona específica donde serán utilizados.

**TABLA 1.** Índice de Calidad de Dickson a los 90 días de inoculación.

Tratamientos	N	<i>Agave cupreata</i>		<i>Juniperus deppeana</i>		
		b	a	c	b	a
Testigo	15	1.094		0.194		
Tricovel®	15	1.099			0.269	
TS1P1	15		1.345			0.343
Sig.		0.651	1.000	1.000	1.000	1.000

Las especies de *Trichoderma* incrementaron el crecimiento radical y el desarrollo de las plantas. Kleifeld y Chet (1992) atribuyen el efecto sobre el crecimiento no únicamente a la protección contra patógenos, sino también a la presencia de un factor regulador de crecimiento. Alatomare *et al.*, (1999) señalan que *T. harzianum* posee la habilidad para solubilizar varios nutrientes de las plantas de sus fases minerales insolubles o escasamente solubles mediante mecanismos quelatantes y reductores; debido a estos mecanismos es que los fosfatos (principalmente de calcio) Fe, Cu y Zn suelen ser más asimilables por las plantas, de ahí que el empleo de las cepas nativas pueden representar importantes ventajas para la nutrición del cultivo.

## Conclusiones

El desarrollo de las unidades formadoras de colonias de TS1P1 fueron más altas en comparación con Tricovel® en ambas plantas con 13 UFC para la Cepa TS1P1 con *Juniperus deppeana*, 16 UFC para la Cepa TS1P1 asociado a *Agave cupreata*, 8 UFC para la cepa Tricovel® con *Juniperus deppeana* y 1 UFC para la asociación Cepa Tricovel® con *Agave cupreata*.



De acuerdo a la prueba de Tukey, el Índice de Calidad de Dickson en la cepa TS1P1, tuvo diferencias significativas respecto a Tricovel® y el Testigo durante los 90 días de tratamiento asociado en *Agave cupreata* y *Juniperus deppeana*.

La confirmación de la presencia de estructuras de *Trichoderma* en la rizósfera de las plantas de *Juniperus deppeana* y *Agave cupreata*, son indicios de que es posible su empleo en campo para la asociación de estas especies de importancia forestal.

### Referencias bibliográficas

- Alatomare C., Norvell, W.A., Bjorkman, T., and Harman, G.E (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2926-2933.
- Carabias L., J (1993) Hacia un modelo de desarrollo sustentable. In: Alternativas para el campo mexicano. D. Fontamara. S.A México D.F.
- Duarte R (1990) Contribución del representante y jefe de la misión diplomática de la FAO en México al Primer Simposium Nacional sobre Degradación de Suelos. pp. 97-103. In: Memorias del Simposium. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Eguiarte L.E., A. Silvia y V. Souza (2000) Biología evolutiva de la familia Agavaceae: biología reproductiva, genética de poblaciones y filogenia. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 166: 131-150.
- Gentry H. S (1982) *Agaves of Continental North America*. Univ. Arizona. Press Tucson, Arizona. U.S.A. 670 p.
- González S.C.H., Rodríguez, L.L., Arjona, C., Puertas, A., y Fonseca, M (1999) Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizósfera de Solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. *Investigación Agraria Producción y Protección Vegetales*. 14:297-306.
- Grubb J (1995) Mineral nutrition and soil fertility in tropical rain forests. En: A. Lugo y C.Lowe (eds.) *Tropical forests: management and ecology*. Springer New York. 308-330 p.
- Howell C.R., R.D. Stipanovic (1995) Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling diseases by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathology*. 85:469-472 p.
- INEGI (2013) Síntesis geográfica del Estado de Puebla, México. Libro electrónico, Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Kleifeld O., and Chet I (1992) *Trichoderma harzianum*. Interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil* 144:267-272.
- Michel A.A.C., Rebolledo, O.D., Lezama, R.G., Ochoa, M.E.M., Mesina, J.C.E., y Samuels, G.J (2001) Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:154-167.
- Ortiz A.; Martínez, V.; Cerdá, A (1994) Effects of osmotic shock and calcium on growth and solute composition of *Phaseolus vulgaris* plants. *Physiologia Plantarum, Copenhagen*. 91: 468-476.
- Romero Arenas O (2007) Desarrollo Tecnológico Para Controlar el Moho Verde (*Trichoderma* spp.) Durante el Cultivo Comercial de los Hongos Comestibles (*Pleurotus* y *Lentinula*) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Campus Puebla. 136 pp.
- Vázquez-Yanes C., A. I. Batis Muñoz, M. I. Alcocer Silvia, M. Gual Díaz y C. S. Dirzo (1999) Árboles y Arbustos potencialmente valiosos para la Restauración Ecológica y la Reforestación. Reporte Técnico. CONABIO Instituto de Ecología, UNAM.