



ARTÍCULO ORIGINAL

***Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis* y Peróxido de hidrógeno para control de *Phytophthora* spp en limón “persa” (*Citrus latifolia*)**

Luis Felipe Juárez-Santillán^{1*}, Juan Pablo Reyes-Gómez¹, Juan Rechy-Rangel¹, José de Jesús López-Ceballos, Jocabel Extocapan-Molina y Sandra Noemí Cortés-Cortés¹.

¹Ingeniería en Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, Campus Gutiérrez Zamora, Veracruz, México.

Fecha de recepción: 24 de junio de 2022; fecha de aceptación del artículo: 08 de julio de 2022.

PALABRAS CLAVE

Gomosis, control biológico, hongos antagonistas.

Resumen

Phytophthora spp, es un vector que provoca una enfermedad conocida como “gomosis” en diversos frutos. En varias regiones del estado de Veracruz se produce limón, con el avance del tiempo se ha ido infectando por la enfermedad mencionada, causada por *Phytophthora* spp. Es por ello que el objetivo principal de este trabajo es determinar si *Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis* o H₂O₂, funcionan como agente de control. Se desarrollaron cuatro tratamientos (*Trichoderma* al 5 %, 10 % y 15 %; *Bacillus subtilis* al 5 %, 10 % y 15 %; mezcla de *Trichoderma* spp y *Bacillus subtilis* al 2.5 %:2.5 %, 5 %:5 %, 7.5 %:7.5 % respectivamente; y H₂O₂ al 5 %, 10 % y 15 %) más un control. Los principales resultados indican que la mezcla de *Trichoderma* spp y *Bacillus subtilis*, no presentan buenos resultados ante el control de *Phytophthora* spp; mientras que las dosis de 10 % y 15 % tanto de H₂O₂ como de *Trichoderma* spp, fueron las que presentaron mayor eficiencia ante gomosis, ya que hubo un buen desarrollo de raíz y hoja, además de la aparición de nuevos brotes en la planta; en el tratamiento control, la raíz de las plantas presentaron pudrición y poco follaje. Estos resultados sugieren que *Trichoderma* spp y H₂O₂, son adecuados para el control de *Phytophthora* spp, a nivel foliar y radicular respectivamente. La mezcla de un agente químico inocuo al medio ambiente y un agente biológico resultan prometedores para el control de enfermedades en limón “persa”.

<https://doi.org/10.56382/tdis.rem.cid.2022.1.1.7.14>

Correspondencia: Luis Felipe Juárez-Santillán. Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, Área académica de Agrobiotecnología, Campus Gutiérrez Zamora, Carretera Gutiérrez Zamora-Boca de Lima Km 2.5 Gutiérrez Zamora, Veracruz, México, Tel.: 7668451952, correo electrónico: luis.santillan@utgz.edu.mx

ISSN: 2954-498X · e-ISSN: 2954-4998. - Revista Multidisciplinaria de Ciencia Innovación y Desarrollo © 2022. Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora. Todos los derechos reservados

KEYWORDS

Gummosis, biological control, antagonistic fungi

Abstract

Phytophthora spp. is a vector that causes a disease known as “gummosis” in various fruits. In several regions of the state of Veracruz Lemon is produced, with the advance of the time it has been infected by the mentioned disease, caused by *Phytophthora* spp. That is why the main objective of this work is to determine if *Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis* or H₂O₂, work as control agent. Four treatments were developed (*Trichoderma* at 5 %, 10 % and 15 %; *Bacillus subtilis* at 5 %, 10 % and 15 %; mixture of *Trichoderma* spp and *Bacillus subtilis* at 2.5 %:2.5 %, 5 %:5 %, 7.5 %:7.5 % respectively; and H₂O₂ at 5 %, 10 % and 15 %) plus a control. The main results indicate that the mixture of *Trichoderma* spp and *Bacillus subtilis*, do not present good results before the control of *Phytophthora* spp; while the doses of 10 % and 15 % of both H₂O₂ and *Trichoderma* spp, were those that presented greater efficiency before gummosis, since there was a good development of root and leaf, besides the appearance of new buds in the plant; in the control treatment, the root of the plants presented rot and little foliage. These results suggest that *Trichoderma* spp and H₂O₂, are suitable for the control of *Phytophthora* spp, at foliar and root level respectively. The mixture of a chemical agent innocuous to the environment and a biological agent are promising for the control of diseases in “Persian” lemon.

Introducción

El control biológico representa un reto importante para la agricultura. El uso de microorganismos, así como de agentes químicos que no dañen al ambiente, resultan de gran interés para el campo agrícola. Los cítricos en general presentan un problema debido a una enfermedad conocida comúnmente como “gomosis”; para su control, se han investigado cepas del género *Trichoderma* sobre *Phytophthora* spp, agente causal de la “gomosis”.

Algunas especies de bacterias tales como: *Bacillus cereus* y hongos como *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, han sido empleadas en el control biológico de enfermedades (Huang *et al.*, 2010). *Trichoderma* spp juega un papel importante en control biológico en infección de cultivos, así como para la remediación del suelo, ya que *Trichoderma* entra en simbiosis con las raíces de plantas (Martínez-Medina *et al.*, 2016). Las especies de *Trichoderma* han presentado buenos resultados en el control de patógenos, así como en el crecimiento de plantas bajo estrés biótico y abiótico; se ha empleado también como biofertilizante, bioplaguicida (Chen *et al.*, 2020). *Bacillus subtilis* tiene capacidad para producir una variedad de moléculas, que presentan propiedades antifúngicas, las cuales presentan una baja toxicidad y alta biodegradabilidad. Además, produce antibióticos muy efectivos contra los hongos y cuando se instala en las raíces y hojas, induce la producción de fitoalexinas,

que confieren resistencia al ataque de hongos y nematodos patógenos. Esta es una característica importante, ya que, tiene muchas ventajas en comparación con los fungicidas químicos, al no ser tóxico para humanos, animales y plantas, además, no constituye un contaminante ambiental (Nagua-Ortega, 2016).

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se ha empleado como agente desinfectante, ya que no produce subproductos nocivos (Eicher-Sodo, 2020). H₂O₂ a elevadas concentraciones induce daño oxidativo, sin embargo, a concentraciones en el rango de nano-molar actúa como una molécula de señalización y en muchos aspectos se parece a las fitohormonas (Martin *et al.*, 2018).

El H₂O₂ representa una molécula de señalización clave, que conecta las vías de señalización múltiple de fitohormonas y actúa como un segundo mensajero en respuesta a diversas condiciones que modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Se considera como un regulador del crecimiento (Fitohormona putativa). El H₂O₂, se produce y degrada por las plantas en respuesta a estímulos y es percibido por proteínas especializadas y provoca una respuesta a concentraciones bajas. Sin embargo, el factor limitante es su transporte, aunque se puede transportar fácilmente dentro de una sola célula y exportarse al espacio extracelular, no se cree que pueda servir como una señal de larga distancia debido a su baja estabilidad y la presencia de captadores de H₂O₂. El H₂O₂ es un mediador versátil de la comunicación molecular en las plantas y si se clasifica como una fitohormona, esto no cambia su

actividad en las plantas. Por su alto poder oxidante también puede ser empleado como agente para el control de hongo y algunas plagas (Martin *et al.*, 2018).

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, se tuvo como objetivo evaluar a *Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis* y H_2O_2 , para el control de *Phytophthora* spp en limón persa. Los resultados de esta investigación servirán para proponer un tratamiento eficiente para el control de “gomosis”.

Material y métodos

Para el desarrollo del experimento se utilizó una cepa de *Bacillus subtilis* y una de *Trichoderma* spp, aisladas del suelo de un cultivo de limón persa en la localidad de Pital perteneciente al municipio de San Rafael, Veracruz. El experimento consistió en cuatro tratamientos más un control: 1) *Bacillus subtilis*, 2) *Trichoderma*, 3) *Bacillus subtilis* con *Trichoderma* spp y 4) H_2O_2 . El cultivo empleado fue limón persa (*Citrus latifolia*) (diagrama 1).

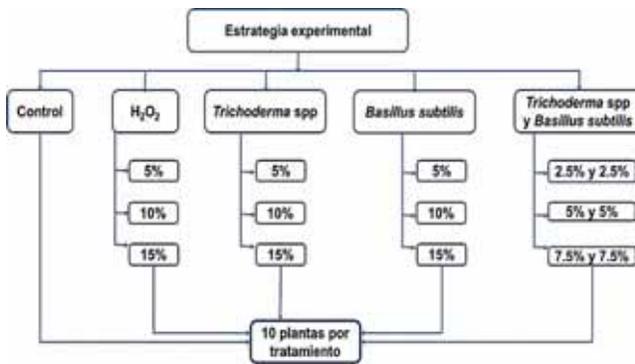


Diagrama 1. Estrategia experimental

El H_2O_2 empleado fue grado farmacéutico al 3 %, de *Trichoderma* spp se partió de una solución de 10^6 conidios/ml y de *Bacillus subtilis* se empleó una solución de 10^8 cel/ml. Las concentraciones del diagrama 1, fueron preparadas volumen/volumen, empleando agua purificada.

Cada tratamiento se realizó con 10 plantas. Las aplicaciones se realizaron cada 15 días, a nivel foliar y radicular, durante tres meses. La cantidad de cada solución empleada a nivel radicular y foliar fue de 20 ml de cada solución.

Las evaluaciones que se hicieron fueron visuales, se enfocaron en observar el estado de raíz y coloración de hojas.

Resultados

En la imagen 1, se pueden ver las plantas control, las cuales no desarrollaron follaje y se ve un daño muy marcado por la presencia de hongos en raíz.



Imagen 1. Tratamiento control hoja y raíz

En la imagen 2, se presentan los tres tratamientos con *Bacillus subtilis*, se puede observar que el mejor tratamiento es del 15 %, ya que en este no aparece tanto amarillamiento de hoja ni necrosis y manchas de la misma, en comparación con los otros dos.



Imagen 2. Tratamientos a nivel foliar con *Bacillus subtilis*: A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 3, se observan las raíces de las plantas de limón al final del experimento, el mejor desarrollo de raíz se observa en el tratamiento de 10 % de *Bacillus subtilis*, en los tres se ven espacios en donde la raíz no se desarrolló bien.

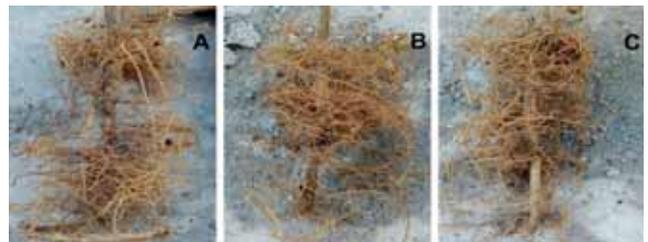


Imagen 3. Tratamientos a nivel radicular con *Bacillus subtilis*: A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 4, se observa que los tres tratamientos del *Trichoderma* spp mostraron una mejoría, pero se nota el cambio del tratamiento de 10 % y 15 % sobre el de 5 %. Por el verde oscuro que muestra el 10 % se puede decir que es el que dio mejores resultados.



Imagen 4. Tratamientos a nivel foliar con *Trichoderma* spp: A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 5, se muestran la raíz de cada uno de los tratamientos de *Trichoderma* spp. Los señalados con rojo son los que muestran los mejores resultados; el 10 % presenta levemente mejor raíz que la de 15 %, pero si se presta atención en el tercer tratamiento, esas raíces blanquecinas son nuevas, lo que significa que dentro de pocos días está produciendo mejor zona radicular.

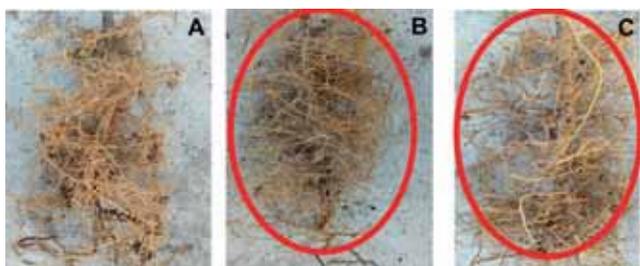


Imagen 5. Tratamientos a nivel radicular con *Trichoderma* spp: A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 6, se presenta el tratamiento combinado de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp en la zona del follaje. No se distingue cambio alguno entre cada tratamiento en cuanto a coloración de follaje.



Imagen 6. Tratamientos a nivel foliar con *Trichoderma* spp y *Bacillus subtilis*: A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 7, se presenta el tratamiento combinado de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp en la zona radicular. Si bien, en los tres tratamientos no se ve un aparente daño, el desarrollo radicular es menor en comparación con los tratamientos de *Trichoderma* spp y H_2O_2 . Entre estos tres tratamientos, se puede observar que el que presentó el mejor desarrollo radicular es el de 10 %.

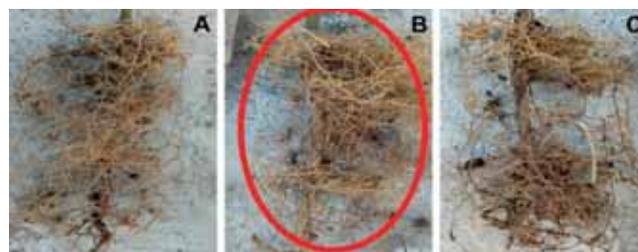


Imagen 7. Tratamientos a nivel radicular con *Trichoderma* spp y *Bacillus subtilis*: A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 8, se presenta el resultado de los tratamientos a nivel foliar del H_2O_2 . Este tratamiento fue uno de los mejores, las tres diferentes dosis mostraron buenos resultados y la coloración en el follaje mejoró en los tres. El tratamiento del 15 % fue el mejor, presentando buena apariencia e incluso mayor cantidad brotes nuevos.



Imagen 8. Tratamientos a nivel foliar con H_2O_2 : A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 9, se muestran las raíces de cada uno de los tratamientos a base de H_2O_2 . El tratamiento del 10 % mostró una mayor cantidad de raíz. La raíz del 5 % muestra mejoría, pero sigue siendo menor a los otros tratamientos.

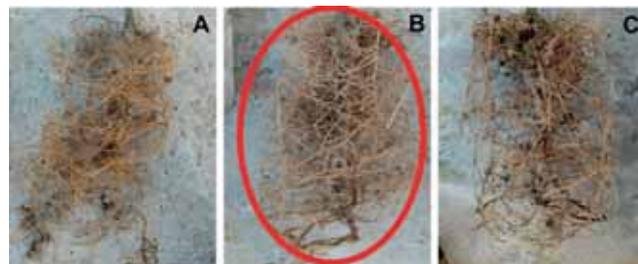


Imagen 9. Tratamientos a nivel radicular con H_2O_2 : A) 5 %, B) 10 %, C) 15 %

En la imagen 10, se compara la raíz de cada uno de los tratamientos. Se nota escasez y necrosis en la raíz del control. Además, se observa que los tratamientos diferentes al control funcionaron, pero es muy notoria la mejoría con *Trichoderma* spp y del H₂O₂.



Imagen10. Comparativo de raíces con los diferentes tratamientos al 10 %

Discusión

Se ha notado que en el cultivo de limón persa se realizan podas intensas como parte del manejo del cultivo, y esto favorece la incidencia de gomosis, por lo que es necesario proteger a los árboles inmediatamente después de realizar la poda.

Leyva-Mir *et al.*, (2021), trabajaron en el control de *Lasiodiplodia* con *Trichoderma*, encontrando que no tuvo un buen control, lo cual pudo deberse a que se aplicó de forma foliar y en condiciones poco favorables (Harman *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2013). Estos resultados son un tanto contrarios a los obtenidos en este trabajo, ya que en este caso con los tratamientos empleados el control de gomosis a nivel foliar fue favorable. Esto indica que *Trichoderma* spp es adecuado para gomosis y no así para *Lasiodiplodia*. Algunos estudios en limón persa y tangerina indicaron que *Trichoderma* spp., puede tener un efecto similar que el metil tiofanato para controlar la pudrición de la raíz ocasionada por *Fusarium* (El-Mohamedy *et al.*, 2013). En estudios realizados *in vitro*, Bhadra *et al.* (2015), reportaron alta efectividad de *T. viridae* en el control de *Lasiodiplodia theobromae*. Considerando los resultados obtenidos en estos experimentos, sí se recomendaría el uso de *Trichoderma* para el control de gomosis y algunas otras enfermedades que pudieran presentar los cítricos. Por lo que estos resultados son consistentes con los obtenidos en este trabajo en cuanto a *Trichoderma* spp.

El H₂O₂ es un agente oxidante, con la característica de que los subproductos generados son sólo agua y

oxígeno (inocuos al medio ambiente). También, tiene un gran efecto sobre el desarrollo de plantas, ayuda en la germinación de semillas, además disminuye la virulencia de patógenos y la expresión de síntomas de enfermedades en plantas (Siti *et al.*, 2015). Se ha detectado que una cantidad adecuada de H₂O₂ para cada planta favorece el contenido de K⁺, antocianina y caroteno, flavonoide, contenido de fenol y proteínas solubles, fosfato de sacarosa Sintasa (SPS), fenilalanina amoniacal liasa (PAL) y las actividades antioxidantes en las frutas tratadas aumentan (Siti *et al.*, 2015). Bajo esta información, se confirman los resultados positivos aquí obtenidos, ya que el H₂O₂ favoreció el desarrollo radicular e inhibió a *Phytophthora* spp, se vio una mayor vigorosidad en la parte foliar y la presencia de brotes se vio favorecida.

El principal cuidado que se debe tener con el H₂O₂ al ser empleado en plantas es la concentración, ya que ciertas concentraciones, este puede causar un daño oxidativo, es por ello que la cantidad que se emplee en plantas debe estar en el rango de nano-molar, debido a su elevado poder oxidante (Cheeseman, 2007). Las concentraciones empleadas en este trabajo no causaron algún estrés en las plantas, sino todo lo contrario, las tres favorecieron el desarrollo radicular y vigorosidad foliar.

Al momento de emplear la combinación de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp (Bacteria-hongo), lo que está ocurriendo es una competitividad entre ellos o posiblemente la secreción de sustancias que hacen, son nocivas entre ellos y por lo tanto su actividad que podría ser favorable para la planta, se ve inhibida. En este sentido los estudios para utilizar microorganismos en conjunto deben seguir siendo analizados.

El control biológico muestra una eficacia de 45 % con aplicaciones de *Trichoderma* al tallo de cítricos en intervalos de 21 días durante un año (Adedeji *et al.*, 2010). El uso de patrones para injerto resistentes como *Citrang troyer*, *Citrang carrizo*, *Swingle citrumelo* CPB 4475, *Poncirus trifoliata* y *Citrus aurantium* representan una buena opción para el combate de patógenos (Lucas y Beltrán, 2004).

La aplicación de microorganismos benéficos (*Trichoderma*, *Bacillus subtilis*) han demostrado efectividad hasta 80 %. Actualmente el uso del control biológico para *Colletotrichum* spp en distintos hospederos ha ido en aumento, se ha utilizado aplicaciones de algunos microorganismos antagonicos como *Rodhotorula minuta*, *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. (Ryu *et al.*, 2014; Vos *et al.*, 2014) estas aplicaciones se han alternado con un manejo Bio-racional lo cual ha tenido buen resultado, también, se han implementado algunos extractos de flores de brócoli (*Brassica*

oleracea var. *Itálica*), raíces de tomillo (*Gliricida sepium*) y extracto de semillas de papaya (*Carica papaya*). El uso del control biológico puede ayudar en la prevención de lesiones en los hospederos (Dowling *et al.*, 2020; Hyden *et al.*, 2009; Landero-Valenzuela *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2002). Sin embargo, es necesario hacer más estudios sobre los mecanismos de biocontrol que ejercen estos organismos ante *Phytophthora* spp, ya que año con año ha ido en aumento la enfermedad de gomosis en cítricos generada por este vector.

Conclusiones

De forma general tanto *Trichoderma*, *Bacillus* y H_2O_2 , presentan efectos favorables para el control de *Phytophthora* spp; pero los que mejor resultado presentan son el H_2O_2 a nivel radicular y *Trichoderma* a nivel foliar. Por lo que es muy recomendable el uso de H_2O_2 para mejorar raíz y controlar *Phytophthora* en este órgano, mientras que a nivel foliar los mejores resultados se tuvieron con *Trichoderma* spp. Tanto *Trichoderma* como H_2O_2 , presentaron los mejores resultados con la dosis de 10 %.

Contribución de los autores

LFJS, diseño del trabajo y redacción.

JRR, diseño y recolección de datos.

JPRG, diseño y recolección de datos.

JJLC, Análisis y redacción.

JEM, análisis y redacción.

SNCC, Análisis y redacción.

Financiamiento

Ninguno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Presentaciones previas

Ninguna.

Referencias

1. Adedeji, A. R., Odebode, A. C., Sanusi, R. A. y Olaiya, A. O. (2010). Comparative efficacy and economic viability of *Trichoderma* strains as bio-control agents for the control of *Phytophthora* pod rot of cocoa in Nigeria. *African Research Review*. 4(3), 349-366.
2. Bhadra, M. M., Khair, A., Hossain, M. A. y Sikder, M. M. (2015). Efficacy of *Trichoderma* spp. and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae*. Bangladesh. *Bangladesh J. Sci. Industrial Res.* 49(2), 125-130.
3. Cheeseman, J. M., (2007). Hydrogen Peroxide and Plant Stress: A Challenging Relationship. *Plant Stress* 1(1), 4-15.
4. Dowling, M. E., Peres, N. A., Villani, S. y Schnabel, G. 2020. Managing *Colletotrichum* on Fruit Crops: A “Complex” Challenge. *Plant Disease*, 104(9), 2301-2316.
5. Eicher-Sodo, M. (2020). “Hydrogen peroxide: A grower’s best friend?”. Theses and Dissertations (Comprehensive). 2215. <https://scholars.wlu.ca/etd/2215>
6. El-Mohamedy, R. S. R., Morsey, A. A. y Bakeer, A. R. T., (2013). Utilization of bio composted agricultural wastes in management of Fusarium dry root rot disease on lime (*Citrus aurantifolia* L.). Thailand. *J. Agric. Technol.* 9(5), 1215-1225.
7. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M., (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. London. *Nature Reviews Microbiology*. 2(1), 43-56.
8. Huang, C. J., Yang, K. H., Liu, Y. H., Lin, Y. J. y Chen, C. Y., (2010). Suppression of southern corn leaf blight by a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* C1L. *Ann Appl Biol* 157, 45-53.
9. Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z. y Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39, 1-17.
10. Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. 24(1), 14-21.
11. Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. y Aguado-Rodríguez G., (2017). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1189-98.

12. Leyva-Mir, S. G., Bautista-Cruz, M. A., Almaguer-Vargas, G., Colinas-León, M. T., Tovar-Pedraza, J. M. y Camacho-Tapia, M. (2021). Efectividad de fungicidas y *Trichoderma* spp. para el control de *Lasiodyplodia* spp. en huertos de limón ‘Persa’ en Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12 (2), 345-353.
13. Lucas, E. A. y Beltrán, P. C., (2004). *Phytophthora* en cítricos, un problema de difícil solución. *Vida Rural*. 56-62 pp.
14. Martin, C., Hana, H., Miroslav, B., Markéta, L. y Bretislav, B. (2018). Review Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1-30.
15. Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y., (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Cuba. *Revista Protección Vegetal*. 28(1), 1-11.
16. Martínez-Medina, A., Pozo, M. J., Cammue, B. P. y Vos, C. M., (2016). Belowground defence strategies in plants: the plant-Trichoderma dialogue below ground defence strategies in plants. Springer, New York, NY, pp 301-327.
17. Naua-Ortega, E. S., (2016). Uso de la Bacteria *Bacillus subtilis* como agente de control biológico de hongos fitopatógenos en cultivos tropicales. Tesis, Universidad Técnica de Machala. p-1.
18. Ryu, H., Park, H., Suh, D. S., Jung, G. H., Park, K. y Lee, B. D., (2014). Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK-CSM-1. *Journal of Ginseng Research*, 38(3), 215-219.
19. Siti, Z. I., Mohammad, M. K., Nashriyah, M. y Amru, N. B., (2015). Effects of Hydrogen Peroxide on Growth, Development and Quality of Fruits: A Review. *J. Agron.*, 14 (4), 331-336.
20. Vos, C. M., Yang, Y., De Coninck, B. y Cammue, B. P. A., (2014). Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control*, 74, 65-81.
21. Yoshida, S., Shirata, A. y Hiradate, S., (2002). Ecological Characteristics and Biological Control of μ Lberry Anthracnose. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 36(2), 89-95.