

Biocontrol de la pudrición de raíz de nochebuena de interior con *Trichoderma* spp.*

Root rot biocontrol for indoor poinsettia with *Trichoderma* spp.

Felipe de Jesús Osuna-Canizalez^{1§}, María Félix Moreno-López¹, Faustino García-Pérez¹, Sergio Ramírez-Rojas¹ y Jaime Canul-Ku¹

¹Campo Experimental Zacatepec-INIFAP. Carretera Zacatepec-Galeana, km. 0.5. C. P. 62780. Zacatepec, Morelos, México. Tel. 7341103906. (garcia.faustino@inifap.gob.mx), (ramirez.sergio@inifap.gob.mx), (canul.jaime@inifap.gob.mx). [§]Autor para correspondencia: osuna.felipe@inifap.gob.mx.

Resumen

En Morelos, la pudrición de la raíz causada por *Fusarium* spp., es una de las principales enfermedades de la nochebuena de interior. Por su efecto devastador, en su prevención o control se realizan aplicaciones frecuentes de productos químicos, con los riesgos inherentes a la salud humana y al ambiente. En la búsqueda de alternativas bioracionales al manejo de esta enfermedad, se realizó un ensayo en el que se evaluaron tres cepas comerciales de *Trichoderma* spp., en tres diferentes sustratos: S1= “tierra de hoja” (70% v/v)+tezontle grueso (15% v/v)+tezontle fino (10% v/v)+agrolita (5% v/v); S2= turba (80% v/v)+ fibra de coco (20% v/v); S3= “tierra de hoja” (70%) + “tepojal” (30%), en las variedades comerciales más comunes, Freedom Red y Prestige Red. Se utilizó un diseño factorial de tratamientos 4 x 3 x 2 y los tratamientos resultantes se evaluaron en un diseño completamente al azar con seis repeticiones. Respecto a la incidencia de pudrición de la raíz, las cepas comerciales de *Trichoderma* spp., no mostraron diferencias entre sí ni con el testigo químico. La pudrición de la raíz estuvo asociada con S2, debido a una baja capacidad de aireación, y sólo se presentó en Prestige Red. La población (UFC g⁻¹) de *Trichoderma* spp., en el sustrato al término del ciclo, fue igual ($p \leq 0.05$) entre cepas comerciales y entre estas y el testigo químico

Abstract

In Morelos, root rot caused by *Fusarium* spp., is one of the main diseases of indoor poinsettia. In order to prevent or control its devastating effect, frequent applications of chemical products are performed, with inherent risks to human health and environment. In quest for alternative biorational options, an essay in which three commercial strains of *Trichoderma* spp., was done, in three different substrates: S1= “organic soil” (70% v/v)+thick tezontle (15% v/v)+thin tezontle (10% v/v)+agrolita (5% v/v); S2= peat moss (80% v/v)+ coconut fiber (20% v/v); S3= “organic soil” (70%)+“tepojal” (30%), in most common commercial varieties, Freedom Red and Prestige Red. A factorial design of 4 x 3 x 2 treatment was used and resulting treatments were evaluated in a completely random design with six repetitions. Regards root rot incidence, commercial strains of *Trichoderma* spp., did not show differences between them, either with chemical control. Root rot was associated with S2, due low aeration capacity, and only it was seen in Prestige Red. Population of *Trichoderma* spp.,(UFC g⁻¹) in the substrate at end of cycle was the same ($p \leq 0.05$) between commercial strains and between them and the control (without inoculation), due presence of native strains of *Trichoderma* in organic components of substrates (“organic soil”, peat moss and coconut fiber).

* Recibido: septiembre de 2011
Aceptado: marzo de 2012

(sin inoculación), debido a la presencia de cepas nativas de *Trichoderma* en los componentes orgánicos de los sustratos (“tierra de hoja”, turba y fibra de coco).

Palabras clave: *Euphorbia pulcherrima*, *Fusarium* spp., cepas nativas, sustratos, variedades.

Introducción

En México se producen anualmente alrededor de 14 millones de plantas de nochebuena de interior; Morelos es el estado productor más importante, con 5.85 millones de plantas (Anónimo, 2009). En Morelos, uno de los problemas fitosanitarios más importante en este cultivo es la marchitez de la planta causada por pudrición de la raíz (García *et al.*, 2009), la cual se presenta durante cualquier etapa del ciclo de desarrollo, aunque su incidencia es mayor en etapas avanzadas, al inicio del proceso de pigmentación; los síntomas de la enfermedad son los siguientes: las hojas pierden gradualmente turgencia, se debilitan, adquieren tonalidades que van del verde claro al amarillo verdoso, finalmente empardecen, se desprenden y la planta muere. Estudios previos permitieron identificar al hongo *Fusarium* sp., como el principal agente causal de esta enfermedad de la raíz en nochebuena (García *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, los métodos para controlar la pudrición de raíz en nochebuena se basan en aplicaciones frecuentes de productos agroquímicos (García, 2008), los cuales incrementan tanto el costo de producción como los riesgos a la salud humana, por exposición directa a los productos o por contaminación de aire y agua con los mismos. En Morelos, dicho riesgo se incrementa por el hecho de que la mayoría de viveros comerciales de producción de nochebuena se localizan en zonas urbanas o periurbanas, con alta densidad poblacional.

El uso de agentes de control biológico para prevenir o controlar enfermedades en plantas cultivadas, es una alternativa sustentable que ha mostrado efectividad en amplio número de casos (Harman, 2000). El hongo *Trichoderma* spp., es uno de los agentes de biocontrol más eficaces debido a que posee una serie de mecanismos contra agentes patógenos, como micoparasitismo, producción de antibióticos, estimulación de mecanismos de defensa de las plantas y competencia efectiva por espacio en la rizosfera (Lorito *et al.*, 2010; Shores *et al.*, 2010); esto último se debe a sus altas tasas de crecimiento y a su habilidad para adaptarse a condiciones de estrés, como el de temperatura alta (Montero-Barrientos *et al.*, 2010).

Key words: *Euphorbia pulcherrima*, *Fusarium* spp., native strains, substrates, varieties.

Introduction

In Mexico there are produced around 14 millions of plants of indoors poinsettia; being Morelos the most important producer state, with 5.85 millions of plants (Anonymous, 2009). In Morelos, in this crop one of the most important phytosanitary problems is plant wilting caused by root rot (García *et al.*, 2009), which is seen during any stage of development cycle, although its incidence is higher in advanced stages, at the beginning of pigmentation process; disease symptoms are the following: leaves gradually loss turgence, they weaken and acquire tones ranging from clear green to greenish yellow, they finally got darkened, detached and the plant dies. Previous studies allowed identification of fungi *Fusarium* sp., as main causing agent for this root disease in poinsettia (García *et al.*, 2009).

Normally, methods to control root rot in poinsettia are based on frequent application of agrochemical products (García, 2008), which increase as well production costs as human health risks, by direct contact with them or air and water pollution. In Morelos, such risk is increased by the fact that most greenhouses for poinsettia commercial production are located in high population density urban or semi-urban areas.

Use of biological control agents to prevent or control diseases in cultivated plants, is a sustainable alternative that has proven effectiveness in wide number of cases (Harman, 2000). Fungi *Trichoderma* spp., is one of the most effective biocontrol agents due it has a number of mechanisms against pathogen agents, like microparasitism, antibiotic production, stimulation of plants defense mechanisms and effective competence by space in rhizosphere (Lorito *et al.*, 2010; Shores *et al.*, 2010); the latter is because its high growing rates and its capacity to adapt under stressing conditions like high temperature (Montero-Barrientos *et al.*, 2010).

Poinsettia for indoors is cultivated in containers or flowerpots of diverse capacities. The most common used substrates include like organic component to “organic soil” and “ocochal”, which consist in vegetable remains built up in surface of forest soils located in Villa del Carbón, State of

La nochebuena de interior se cultiva en contenedores o macetas de diversas capacidades. Los sustratos más comúnmente empleados incluyen como componente orgánico a la “tierra de hoja” y al “ocochal”, que consisten en residuos vegetales acumulados en la superficie de suelos forestales ubicados en Villa del Carbón, Estado de México, compuestos principalmente por hojas de encino y acículas de pino; los componentes inorgánicos de las mezclas incluyen materiales como el “tezontle” y el “tepojal”, ambos de origen volcánico, obtenidos localmente, en el caso del primero, y en la localidad de Calimaya, estado de México, el segundo; el tercer componente inorgánico comúnmente empleado es la agrolita, producida mediante un proceso industrial que involucra la expansión de la perlita a altas temperaturas.

En el cultivo de plantas en contenedor, la selección de un sustrato con propiedades físicas y químicas adecuadas es fundamental, debido al volumen reducido en el que desarrollan las raíces (Caron y Riviére, 2003), en comparación a cuando desarrollan en suelo. Desde el punto de vista microbiológico, diversos reportes señalan interacciones significativas entre la naturaleza del sustrato y el desarrollo de microorganismos benéficos, en términos positivos en algunos casos (Callejas-Ruiz *et al.*, 2009) o negativos en otros (Vestverg y Kukkonen, 2007). En diversos estudios se reportan efectos supresivos de sustratos sobre el desarrollo de patógenos de la raíz, especialmente con la adición de composta (Yogev *et al.*, 2006; Raviv, 2007; Pane *et al.*, 2011).

En Morelos, actualmente las dos variedades de nochebuena de interior más demandadas son Freedom Red y Prestige Red, ambas reportadas como susceptibles a la secadera por pudrición de raíz. Por ello, los objetivos del presente estudio fueron: a) determinar la factibilidad del biocontrol de pudrición de la raíz de nochebuena de interior en las dos variedades, mediante la inoculación de cepas comerciales de *Trichoderma* spp.; y b) definir el efecto del sustrato sobre variables del crecimiento y calidad de planta terminada de nochebuena de interior y su interacción con las cepas comerciales de *Trichoderma* spp.

Materiales y métodos

Sitio experimental

El ensayo se llevó a cabo en un vivero ubicado en la localidad de Tetela del Monte, Cuernavaca, Morelos, a 2 200 msnm, 18° 58' 0" latitud norte y 99° 15' 0" longitud oeste. La

México, comprised mainly by oak leaves and pine acicular; inorganic components of mixtures include material such as “tezontle” and “tepojal”, both from organic origin, locally obtained in the case of first, and in locality of Calimaya, Estate of Mexico, the latter; the third inorganic component commonly used is agrolita, produced by industrial process which involves perlite expansion at high temperatures.

During plants cultivation in container, is fundamental selection of substrate with suitable physical and chemical properties, due reduced volume in which roots develop (Caron and Riviére, 2003), in comparison when they develop in soil. From microbiological point of view, several reports give significant interactions between substrate nature and development of beneficial microorganisms, in some cases in positive way (Callejas-Ruiz *et al.*, 2009) or negative in others (Vestverg and Kukkonen, 2007). In diverse studies suppressive effects of substrates on development of root pathogens are reported, specially with compost addition (Yogev *et al.*, 2006; Raviv, 2007; Pane *et al.*, 2011).

Currently, in Morelos, the most demanded two varieties of poinsettia for indoors are Freedom Red and Prestige Red, both reported as susceptible to wilting by root rot. In this way, aims of this study were: a) define biocontrol feasibility on indoors poinsettia root rot in both varieties, by inoculation of commercial *Trichoderma* spp., strains; and b) to define effect of substrate on growth and plant quality variables for indoors poinsettia and its interaction with commercial *Trichoderma* spp., strains.

Materials and methods

Experiment site

Essay was performed in greenhouse located in Tetela del Monte, Cuernavaca, Morelos, at 2 200 masl, 18° 58' 0" northern latitude and 99° 15' 0" west longitude. Structure is metallic, with white polyethylene on roof, 30% transferability and shade net with 50% transferability in walls.

Design of treatments and experimental design

It was used a complete 4 x 3 x 2 factorial treatments design. The first factor had four levels: three commercial strains of *Trichoderma* spp., locally available, a) c1= Fithan^{MR}, c2=

estructura es metálica, con polietileno blanco-lechoso en el techo, con transmisividad 30% y malla sombra con 50% de transmisividad, en las paredes.

Diseño de tratamientos y diseño experimental

Se utilizó un diseño de tratamientos factorial completo $4 \times 3 \times 2$. El primer factor constó de cuatro niveles: tres cepas comerciales de *Trichoderma* spp., disponibles localmente, a) c1= Fithan^{MR}, c2= Trico-Bio^{MR}, c3= Bactiva^{MR}; el testigo químico fue el cuarto nivel, en el que se realizaron cuatro aplicaciones de fungicidas químicos (1) Carbendazim; 2) Metalaxil; 3) Captan; y 4) Carbendazim. El factor dos fueron los sustratos, con tres niveles: S1= “tierra de hoja” (70%) + tezontle grueso (15%) + tezontle fino (10%) + agrolita (5%); S2= turba + fibra de coco (80% y 20%, respectivamente); y S3= “tierra de hoja” (70%) + “tepojal” (30%) (sustrato tradicional); en todos los casos, la proporción se expresa en términos de v/v. El tercer factor correspondió a las dos variedades más comunes en el estado de Morelos, Freedom Red y Prestige Red, ambas de flor roja. Los 24 tratamientos formados se evaluaron en un diseño completamente al azar con seis repeticiones. La unidad experimental constó de una maceta con 1.8 L de sustrato y una planta.

Sustratos

Una vez mezclados los diferentes componentes, los sustratos se analizaron en laboratorio para determinar algunas propiedades físicas como densidad aparente, densidad real, espacio poroso total, así como proporción de agua, aire y material sólido a capacidad de contenedor; las determinaciones se llevaron a cabo en un medidor de tres fases del suelo, marca Daiki, modelo DIK 1120, con modificaciones al protocolo para adaptarlo a sustratos; dicha modificación consistió en tomar la muestra de cada sustrato a capacidad de contenedor, mediante el cilindro metálico de volumen conocido que normalmente se usa para tomar muestras de suelo en campo, para de ahí determinar en el equipo las proporciones de aire, sólidos y agua presentes en la muestra de sustrato. Las propiedades químicas evaluadas fueron pH y conductividad eléctrica, usando una proporción sustrato: agua de 1:1.5. Los sustratos no se esterilizaron previo a su uso.

También se determinó la presencia de *Trichoderma* spp., en los sustratos previo a su utilización, mediante la técnica de dilución en placa, usando PDA (39 g L⁻¹) y rosa de bengala (50 ppm) más sulfato de estreptomycin (48 ppm) para prevenir crecimiento de bacterias, ajustando el medio a pH= 3.5 con ácido láctico. Las cajas con cada sustrato en medio de cultivo se incubaron

Trico-Bio^{MR}, c3= Bactiva^{MR}; chemical control was fourth level, in which four application of chemical fungicides were performed: 1) Carbendazim; 2) Metalaxil; 3) Captan; and 4) Carbendazim. Second factor was substrates, with three levels: S1= “organic soil” (70%) + thick tezontle (15%) + thin tezontle (10%) + agrolita (5%); S2= peat moss + coconut fiber (80% and 20%, respectively); and S3= “organic soil” (70%) + “tepojal” (30%) (normal substrate); in all cases, proportion is expressed in terms of v/v.

Third factor was two most common varieties in state of Morelos: Freedom Red and Prestige Red, both have red flowers. 24 treatments were assessed in completely random design with six repetitions. Experimental unit consisted in a pot with 1.8 L of substrate and a plant.

Substrates

Once different components are mixed, substrates were analyzed in laboratory to determine some physical properties like apparent density, real density, total porous space, as well as water, air and solid material proportion at container capacity; calculations were made in a three phase soil device, Daiki model DIK 1120, with modifications to protocol to adapt it to substrates; such modification consisted in taking each sample of substrate at container capacity, by means of known volume metallic cylinder normally used in field, for defining in equipment air, solids and water proportions existing in substrate sample. Chemical properties assessed were pH and electric conductivity, using proportion substrate:water 1:1.5. Substrates were not sterilized previous to use.

Also presence of *Trichoderma* spp., in substrates previous to its use, by plate dilution technique, using PDA (39 g L⁻¹) and rose bengal (50 ppm) plus streptomycin sulfate (48 ppm) to prevent bacteria growth, adjusting medium at pH= 3.5 with lactic acid. Boxes with each substrate in culture medium were incubated at 25 °C in darkness; after 48 hours observations started to morphologically identify colonies, and then see structures in microscope, and with help of Barnett and Hunter guides (1972), determine presence of *Trichoderma* spp.; finally substrate UFC g⁻¹ were quantified. Substrates properties are listed in Table 1.

Vegetable material

Rooting cuts of Freedom Red and Prestige Red poinsettia cultivars of 32 days of age were used, which were developed in the same site of experiment.

a 25 °C en la oscuridad; transcurridas 48 horas se iniciaron las observaciones para identificar morfológicamente las colonias, para después observar estructuras en el microscopio, y con el auxilio de las claves de Barnet y Hunter (1972), determinar la presencia de *Trichoderma* spp.; finalmente se cuantificaron las UFC g⁻¹ de sustrato. Las propiedades de los sustratos se muestran en el Cuadro 1.

Material vegetal

Se utilizaron esquejes enraizados de los cultivares de nochebuena Freedom Red y Prestige Red, de 32 días de edad, desarrollados en el mismo sitio experimental.

Inoculación y reinoculación de *Trichoderma* spp.

La inoculación inicial se llevó a cabo tres días después del trasplante (ddt), en dosis de 1 ml L⁻¹ de agua en el caso de Fithan^{MR} y Trico-Bio^{MR} y 1 g L⁻¹ en el caso de Bactiva^{MR}; esta y las siguientes inoculaciones se hicieron durante los riegos. Se realizaron cuatro reinoculaciones de las cepas comerciales, en las dosis indicadas; la decisión de reinocular se tomó con base en muestreos periódicos de sustrato, mediante el siguiente procedimiento: se invertía la maceta y se extraía la planta con cepellón, tomando cuidadosamente alrededor de 15 g de sustrato en total, de tres partes del cepellón. En el último muestreo se tomaron tres repeticiones por tratamiento y se analizaron por separado para realizar análisis estadístico; en todos los muestreos previos se formaron muestras compuestas, considerando el sustrato de cada repetición como una submuestra. Se decidía reinocular cuando en el sustrato de alguno de los tratamientos de biocontrol se presentaba conteos bajos, con tendencia a cero, de UFC de *Trichoderma*.

Variables del crecimiento y color de brácteas

Se midieron las variables altura de planta en seis repeticiones, así como el número de tallos, hojas y brácteas, en tres repeticiones por tratamiento; el color se midió en una bráctea totalmente pigmentada, con un espectrofotómetro X-Rite, Modelo 3960. Debido a su ciclo más corto, en Freedom Red las mediciones se hicieron a los 161 ddt, mientras que en Prestige Red se realizaron a los 189 ddt.

Evaluación de pudrición de la raíz

Se realizaron observaciones semanales para detectar síntomas de pudrición de la raíz (García *et al.*, 2009). Cuando aparecieron plantas enfermas, se llevaron a laboratorio y

Cuadro 1. Propiedades químicas y físicas (a capacidad de contenedor) de los sustratos evaluados.

Table 1. Chemical and physical properties (at pot capacity) of assessed substrates.

	Sustrato 1 ^z	Sustrato 2	Sustrato 3
pH	5.33	6.0	6.23
CE (dS m ⁻¹)	0.28	0.62	2.08
Da (g cm ⁻³) ^y	0.33	0.12	0.52
CA (%) ^x	63.49	25.68	41.76
EPT (%) ^w	85.67	90.38	77.66
MS (%) ^v	14.33	9.62	22.33

^zSustrato 1: “tierra de hoja” (70% v/v); tezontle grueso (15% v/v), agrolita (10% v/v); tezontle fino (5% v/v); sustrato 2: turba (Sunchine Mix 1, 80% v/v); fibra de coco (20% v/v); sustrato 3: “tierra de hoja” (70% v/v); “tepojal” (30% v/v); ^yDa= densidad aparente; ^xcapacidad de aireación; ^wEPT= espacio poroso total; ^vmaterial sólido. Propiedades físicas a capacidad de contenedor.

Inoculation and re-inoculation of *Trichoderma* spp.

Initial inoculation was performed three days after transplant (ddt), at a dose of 1 ml L⁻¹ of water in case of Fithan^{MR} and Trico-Bio^{MR}; and 1 g L⁻¹ in case of Bactiva^{MR}; this and the following inoculations were made during irrigations. Four re-inoculations of commercial strains were made, at indicated doses; decision to inoculate was taken based on periodic samples of substrate, by the following procedure: pot was put upside down and plant was extracted with plug, carefully taking 15 g of substrate, from three portions of plug. In the last sampling three repetitions per treatment were taken and analyzed individually to make statistical analysis; in all previous sampling compound samples were formed, considering each substrate of each repetition as sub-sample. It was decided to re-inoculate when substrate of any of biocontrol treatments showed low count, with trend to null, of UFC of *Trichoderma*.

Variables of growth and bracts color

In six repetitions height plant variables were measured, as well as number of stems, leaves and bracts, in three repetitions per treatment; color was measured in a totally pigmented bract, by X-Rite, model 3960 spectrophotometer. Due its shorter cycle, in cv Freedom Red measurements were made at 161 ddt, while in cv Prestige Red were made at 189 ddt.

Assessment of root rot

Weekly observations were made to detect root rot symptoms (García *et al.*, 2009). When ill plants emerged, they were taken to the laboratory and a standard procedure was

se siguió un procedimiento estándar mediante el cual se colocaron trozos de raíz en un medio con PDA, se incubó por 72 h a 25 °C en la oscuridad, después de lo cual, las colonias desarrolladas se identificaron morfológicamente y microscópicamente con base en las claves de Barnett y Hunter (1972) y Toussoun y Nelson (1976).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza a los resultados de las variables evaluadas, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 2000, versión 8.1. En función de los resultados del análisis de varianza, se realizaron comparaciones de medias de tratamientos, de acuerdo con la prueba de Tukey, con el mismo paquete estadístico.

Resultados

Crecimiento de *Trichoderma* spp.

No se presentaron diferencias significativas en el número de UFC g⁻¹ de sustrato, entre las diferentes cepas evaluadas, ni entre estas y el testigo químico, en el que no se inoculó artificialmente a *Trichoderma* spp. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Población de *Trichoderma* en el sustrato, en función de la cepa comercial inoculada (muestreo al final del ciclo del cultivo).

Table 2. Population of *Trichoderma* in the substrate, in function of inoculated commercial strain (sampling at end of crop cycle).

Cepa comercial	Fithan ^{MR}	Trico-Bio ^{MR}	Bactiva ^{MR}	Testigo químico
UFC g ⁻¹	1 558 a ^z	1 614 a	1 633 a	1 400 a

^zMedias con la misma letra son iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

En las muestras de los diferentes sustratos, tomadas antes del establecimiento del ensayo y analizadas en laboratorio, se detectó la presencia de *Trichoderma* spp., en la “tierra de hoja” (69 UFC g⁻¹), en la turba (1 400 UFC g⁻¹) y en la fibra de coco (100 UFC g⁻¹); en los sustratos inorgánicos (tezontle en sus dos granulometrías, tepojal y agrolita) no se detectó la presencia de *Trichoderma*.

En lo que respecta al efecto del sustrato sobre la población de *Trichoderma* al final del ciclo del cultivo, no hubo diferencias estadísticas significativas (Cuadro 3).

followed, in which portions of root were put in medium with PDA, it was incubated during 72 h at 25 °C in darkness, then the developed colonies were morphologically identified based on Barnett and Hunter (1972) and Toussoun and Nelson (1976) guides.

Statistical analysis

To results of assessed variables an analysis of variance is applied, using GLM procedure of SAS 2000, versión 8.1, statistic software. In function of anova results, comparisons of treatments average were made, according to Tukey test, with the same software.

Results

Growth of *Trichoderma* spp.

There were no significant differences in value of UFC g⁻¹ of substrate, between different assessed strains, either between them and chemical control, in which *Trichoderma* spp. was not artificially inoculated (Table 2).

In samples of different substrates, taken before assessment and analyzed in laboratory, presence of *Trichoderma* spp., was detected in “organic soil” (69 UFC g⁻¹), in peat moss

(1 400 UFC g⁻¹) and in coconut fiber (100 UFC g⁻¹); in the inorganic substrates (tezontle in its two granulometries, tepojal and agrolita) presence of *Trichoderma* was not detected.

About effect of substrate on *Trichoderma* population at the end of crop cycle, there were no significant statistical differences (Table 3).

Finally, *Trichoderma* populations in the substrate were not affected by used variety (Table 4).

Cuadro 3. Población de *Trichoderma* en el último muestreo, en función del sustrato utilizado.

Table 3. *Trichoderma* population in last sampling, in function of used substrate.

Sustrato ^z	S1	S2	S3
UFC g ⁻¹	1543 ab ^y	1225 b	1906 a

^zS1: “tierra de hoja” (70% v/v); tezontle grueso (15% v/v); agrolita (10% v/v); tezontle fino (5% v/v); S2: turba (Sunchine Mix 1, 80% v/v); fibra de coco (20% v/v); S3: “tierra de hoja” (70% v/v); “tepojal” (30% v/v). ^ymedias con la misma letra son iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Finalmente, las poblaciones de *Trichoderma* en el sustrato no fueron afectadas por la variedad utilizada (Cuadro 4).

Pudrición de raíz

En general, se tuvo una incidencia baja de plantas con pudrición de la raíz (Cuadro 5); la enfermedad se presentó solamente en la variedad Prestige Red y se asoció con el sustrato de turba+fibra de coco, debido probablemente a su elevada retención de humedad (Cuadro 1).

Cuadro 5. Efecto de los factores evaluados sobre la presencia de plantas con pudrición de la raíz y patógenos identificados.
Table 5. Effect of assessed factors on plants with presence of root rot and identified pathogens.

Factor		Plantas con pudrición de raíz	Hongos identificados
<i>Cepa comercial</i>			
Fithan ^{MR}		1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Rhizopus oryzae</i>
Trico-Bio ^{MR}		1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.
Bactiva ^{MR}		2	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizopus oryzae</i>
Testigo químico		1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Sustrato^z</i>			
S1		1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.
S2		3	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizopus oryzae</i>
S3		1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Trichoderma</i> spp.
<i>Variedad</i>			
Freedom Red		0	
Prestige Red		5	

^zS1= tierra de hoja (70% v/v); tezontle grueso (15% v/v); agrolita (10% v/v); tezontle fino (5 % v/v); S2= turba (Sunchine Mix 1, 80% v/v), fibra de coco (20% v/v); S3= tierra de hoja (70% v/v); tepojal (30% v/v).

En las raíces de plantas enfermas predominaron *Fusarium* sp., y *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., se detectó en todas las plantas enfermas del ensayo (5 de 5), mientras que *Trichoderma* se encontró en 3 de 5 plantas enfermas.

Cuadro 4. Población de *Trichoderma* en el sustrato, en función de la variedad cultivada.

Table 4. *Trichoderma* population in the substrate, in function of cultivated variety.

Variedad	Freedom Red	Prestige
UFC g ⁻¹	1604 ^z a	1512 a

^zMedias con la misma letra son iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Root rot

In general, low incidence of plants with root rot was obtained (Table 5); disease only emerged in cv Prestige Red and it was related with peat moss+coconut fiber substrate, probably due its high humidity retention (Table 1).

In roots with ill plants *Fusarium* sp., and *Trichoderma* spp., were the predominant ones; *Fusarium* spp., was detected in all ill plants of essay (5 of 5), while *Trichoderma* was found in 3 of 5 ill plants.

Growth variables and bracts color

No significant effect was found on inoculated *Trichoderma* strains, on variables of plant growth nor color; the components of color, chromatic and luminosity, got

Variables del crecimiento y color de brácteas

No se encontró efecto significativo de las cepas de *Trichoderma* inoculadas, sobre variables del crecimiento de la planta ni sobre el color; los componentes de color, croma y luminosidad, tuvieron valores más altos ($p \leq 0.05$) en el testigo químico, comparado con los tratamientos que incluyeron inoculación artificial (Cuadro 6).

higher values ($p \leq 0.05$) in chemical control, compared to treatments that included artificial inoculation (Table 6).

Substrate 1 got higher values ($p \leq 0.05$) of variables plant height and number of leaves, regards the other two substrates; substrate 3 (commercial control), got lower values ($p \leq 0.05$) from all growth variables, while in substrate 2 there were no found

Cuadro 6. Efecto de los factores evaluados sobre variables del crecimiento y componentes del color de las brácteas.

Table 6. Effect of assessed factors on variables growth and bracts color components.

Factor	Altura cm	Núm. tallos	Núm. hojas	Núm. brácteas	Color		
					Luminosidad	Croma	Hue
Cepa comercial							
Fithan ^{MR}	31.11 a ^z	12.41 a	83.75 a	170.46 a	30.36 b	53.66 b	24.85 a
Trico-Bio ^{MR}	32.21 a	13.04 a	87.16 a	173.00 a	30.28 b	53.14 b	25.62 a
Bactiva ^{MR}	32.72 a	13.33 a	88.16 a	179.92 a	30.76 b	54.75 b	25.27 a
Testigo químico	31.42 a	12.91 a	91.04 a	186.38 a	31.93 a	55.38 a	24.98 a
Sustrato ^y							
S1	34.20 a	13.06 a	104.81 a	181.78 a	30.86 a	53.79 a	25.37 a
S2	30.93 b	13.18 a	80.93 b	202.66 a	31.48 a	55.11 a	25.05 a
S3	30.45 b	12.53 b	76.84 b	147.88 b	30.16 a	53.80 a	25.19 a
Variedad							
Freedom Red	36.69 a	12.10 b	78.22 b	210.06 a	32.36 a	54.93 a	24.89 a
Prestige Red	27.15 b	13.75 a	96.83 a	144.81 b	29.24 b	53.40 b	25.51 b

^zDentro de columnas, medias con la misma letra son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). ^yS1= tierra de hoja (70% v/v); tezontle grueso (15% v/v), agrolita (10% v/v); tezontle fino (5% v/v); S2= turba (Sunchine Mix 1, 80% v/v); fibra de coco (20 % v/v); S3= tierra de hoja (70% v/v); tepojal (30% v/v).

El sustrato 1 tuvo valores más altos ($p \leq 0.05$) de las variables altura de planta y número de hojas, respecto a los otros dos sustratos; el sustrato 3 (testigo comercial), tuvo los valores más bajos ($p \leq 0.05$) de todas las variables del crecimiento, mientras que en el sustrato 2 no se encontraron diferencias significativas con el sustrato 1 en las variables número de tallos y número de brácteas (Cuadro 6). Ningún componente del color fue afectado significativamente por el factor sustratos (Cuadro 6).

Entre variedades, Freedom Red presentó valores más altos ($p \leq 0.05$) en las variables altura y número de brácteas, así como en todos los componentes del color; Prestige Red tuvo mayor número de tallos y hojas en comparación con Freedom Red (Cuadro 6).

significant differences with substrate 1 in variables number of stems and number of bracts (Table 6). None color components were significantly affected by factor substrates (Table 6).

Between varieties, Freedom Red showed higher values ($p \leq 0.05$) in variables height and number of bracts, as well in all color components; Prestige Red got higher number of stems and leaves if compared to Freedom Red (Table 6).

Discussion

The obtained results show that is possible improve root rot issue handling on indoors poinsettia by inoculation of *Trichoderma* commercial strains, without using chemical

Discusión

Los resultados obtenidos muestran que es posible manejar el problema de pudrición de la raíz de nochebuena de interior mediante la inoculación de cepas comerciales de *Trichoderma*, sin recurrir al uso de productos químicos. Las tres cepas comerciales evaluadas se pueden obtener sin problemas en las empresas que distribuyen agroquímicos localmente y la facilidad de su aplicación hace viable su utilización a nivel comercial.

El uso indiscriminado de agroquímicos es una práctica común en los viveros de producción de nochebuena de interior (García, 2008); ésta práctica se ve agravada por el hecho de que las plantas se producen en ambientes cerrados o semicerrados y porque la mayoría de las zonas productoras se ubican en áreas urbanas o periurbanas. El uso de agentes de biocontrol en el manejo de diversas enfermedades de plantas, así como otras estrategias bioracionales como el uso de extractos botánicos para el control de plagas, son alternativas que deben explorarse para reducir los riesgos del uso de agroquímicos en la salud humana y en los ecosistemas. En este sentido, la utilización de *Trichoderma* spp., en el manejo de enfermedades que atacan a las raíces de las plantas se ha documentado con amplitud (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004). A pesar de que en los últimos años se ha incrementado el número de agentes biológicos de control disponibles en el mercado, éstos sólo representan 0.02% (Paulitz, 2001) al 1% (Fravel, 2005) de las ventas totales a nivel mundial, en comparación con los agroquímicos.

En todos los componentes orgánicos de los sustratos evaluados se encontraron cepas nativas de *Trichoderma* sp., en las pruebas de laboratorio realizadas antes del inicio de los ensayos. En la “tierra de hoja” ya se tenían antecedentes de este hecho, en evaluaciones previas realizadas por nuestro grupo (no publicadas); al respecto, Callejas-Ruiz *et al.* (2009), reportan la presencia de cepas nativas de micorriza en la “tierra de hoja”, en un ensayo con nochebuena cv. Supjibi. Por otro lado, no se esperaba encontrar *Trichoderma* en turba o en fibra de coco, tal como ocurrió, ya que se asegura por parte de las empresas productoras, que estos sustratos son esterilizados, regularmente con vapor de agua, previo a su venta. Al respecto cabe señalar reportes sobre la tolerancia de *Trichoderma* a altas temperaturas (Montero-Barrientos *et al.*, 2007; 2008) y otros estreses abióticos (Montero *et al.*, 2010), lo cual podría explicar su presencia en el material original previo al ensayo.

products. In companies that locally distribute agrochemicals the three assessed commercial strains can be in easy obtained, and its simple handling makes viable its use at commercial level.

Indiscriminate use of agrochemicals is a common practice in greenhouses producing indoor poinsettia (García, 2008); this practice is worsen by the fact that plants are harvested in closed or semi-closed environments and because most of producing areas are located in urban or periurban zones. Biocontrol agents used for handling diverse plant diseases, as well as other biologic rational strategies like botanic extracts for plague control, are alternatives that would be explored to reduce agrochemical application risk for human health and ecosystems. In this sense, *Trichoderma* spp., use for handling diseases that attack plant's root as been widely documented (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004). Despite in last year number of available biological control agents in the market has increased, compared to agrochemicals, they only represent from 0.02% (Paulitz, 2001) to 1% (Fravel, 2005) of total worldwide sales.

In the laboratory tests performed before beginning essays, in all organic components of assessed substrates native strains of *Trichoderma* sp., were found. Previous assessments not published made by our team about this issue were already recorded for “organic soil”; Callejas-Ruiz *et al.* (2009), report presence of native Straits of mycorrhiza in “organic soil”, in an assessment with poinsettia cv. Supjibi.

On the other hand, it was not expected to find *Trichoderma* in peat moss or coconut fiber, like it did, since producer companies assure that such substrates are regularly sterilized with water steam pervious to sale. In this regard, there are reports about *Trichoderma* tolerance to high temperatures (Montero-Barrientos *et al.*, 2007; 2008) and to other abiotic stress (Montero *et al.*, 2010), which would explain its presence in material previous to assessment.

Under assessment conditions, native strains apparently grew in suitable way, since their populations in the substrate in the treatments without inoculation of commercial strains were the same ($p \leq 0.05$) as the quantified in treatments where artificial inoculation was made (Table 2 and Table 3).

Root rot incidence was clearly related with variety and substrate (Table 5). Variety Prestige Red is expected to take part of market share of cv Freedom Red, the most popular

Bajo las condiciones del ensayo, las cepas nativas al parecer crecieron adecuadamente, ya que sus poblaciones en el sustrato, en los tratamientos sin inoculación de cepas comerciales, fueron iguales ($p \leq 0.05$) a las cuantificadas en los tratamientos en que se realizó la inoculación artificial (Cuadros 2 y 3).

La incidencia de pudrición de la raíz se asoció claramente con la variedad y con el sustrato (Cuadro 5). Prestige Red es una variedad de nochebuena de interior que se espera ocupe parte del mercado de Freedom Red, la variedad más popular en Morelos; los resultados obtenidos en el estudio muestran una mayor susceptibilidad de Prestige Red a la pudrición de la raíz, lo que motiva una alerta a los productores. De hecho, en los tratamientos que incluyeron Freedom Red no se presentó ninguna planta con pudrición de la raíz. Por otro lado, en la mezcla de turba y fibra de coco se presentó el mayor número de plantas con problemas de secadera (Cuadro 5), lo cual probablemente se debió a la baja capacidad de aireación de este sustrato (Cuadro 1). La planta de nochebuena se considera como demandante intermedia de porosidad de aireación (Johnson, 1968) y probablemente la proporción de poros de aire fue insuficiente en este sustrato. En el caso de turba, se reporta que tiene baja supresividad de patógenos asociados a la raíz (Bonanomi *et al.*, 2007), por lo que regularmente se deben utilizar fungicidas para prevenir damping-off o “secadera”, tanto en la producción de plántulas como en sistemas de cultivo sin suelo en invernadero (Pane *et al.*, 2011).

A nivel internacional, la turba es el sustrato orgánico más ampliamente utilizado (Carlile, 2009); la producción anual se estima en 25 millones de m³ (Caron y Rivière, 2003). Por otro lado, la fibra de coco es un sustrato emergente que se pretende sustituya parcialmente a la turba, debido al agotamiento de las reservas mundiales de ésta y a la amplia y sostenida disponibilidad de la fibra de coco (Nichols, 2007); a nivel mundial, se estima que la disponibilidad anual de fibra de coco es alrededor de 8 millones de toneladas con las que pueden cultivarse unas 350 000 ha de invernadero (Nichols y Savidov, 2009).

En Morelos y los otros estados productores de ornamentales en la región central de México, los componentes orgánicos más utilizados en la producción en contenedor, son “tierra de hoja” y “ocochal”, los cuales provienen del Estado de México y se obtienen en bosques manejados por comuneros y ejidatarios, con supervisión de

variety in Morelos. Results obtained in the study show greater susceptibility to root rot for cv Pretige Red, rising alert to producers. Indeed, in treatments that included cv Freedom Red there was no plant with root rot. On the other hand, in mixture of peat moss and coconut fiber, greater number of plants with wilting issues (Table 5) was seen, probably due to low aeration capacity of this substrate (Table 1).

Poinsettia is considered like intermediate aeration porosity requirement plant (Johnson, 1968) and probably the rate of air pores was not enough in this substrate. In the case of peat moss, it is reported that has low suppressive action of root related pathogens (Bonanomi *et al.*, 2007), therefore fungicides should be regularly used in order to prevent damping-off or wilting, as well in seedling productions as in greenhouse harvest systems without soil (Pane *et al.*, 2011).

At international level, peat moss is the most widely used organic substrate (Carlile, 2009); yearly production is ca. 25 millions of m³ (Caron and Rivière, 2003). On the other hand, coconut fiber is an emerging substrate that is expected to replace peat moss, due to its worldwide reserves depletion and to the wide and sustained availability of coconut fiber (Nichols, 2007); at world level, it is estimated that yearly availability of coconut fiber is around 8 million of tons which would yield around harvest of 350 000 ha in greenhouse (Nichols and Savidov, 2009).

In Morelos and other ornamental plants producer states in Central Mexico, the most used organic components for production in container are “organic soil” and “ocochal”, which come from state of Mexico and come from forest managed by common landers and ejidatarios, under supervision of Federal Attorney for Environmental Protection (PROFEPA). Results of this study show that organic soil is a competitive organic component in poinsettia production, since in suitable proportions, contributes with good physic and microbiologic properties to substrate, such as high total porous space, aeration capacity and native strains of beneficial microorganisms.

Conclusions

The obtained results showed feasibility of root rot biocontrol for indoor poinsettia by inoculation of substrate with *Trichoderma* spp., commercial strains.

Procuraduría Federal de Protección al Medio Ambiente (PROFEPA). Los resultados del presente estudio muestran que la tierra de hoja es un componente orgánico competitivo en la producción de nochebuena, ya que en proporciones adecuadas, aporta buenas propiedades físicas y microbiológicas al sustrato, tales como elevada proporción de espacio poroso total, capacidad de aireación y cepas nativas de microorganismos benéficos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron la factibilidad del biocontrol de pudrición de la raíz de nochebuena de interior mediante inoculación del sustrato con las cepas comerciales de *Trichoderma* spp. La mayor incidencia de pudrición de la raíz se presentó en el sustrato con turba (80% v/v) + fibra de coco (20%), lo cual se asoció con una baja capacidad de aireación de la mezcla. Se detectaron cepas nativas de *Trichoderma* spp., en la “tierra de hoja”, la turba y fibra de coco. La variedad Prestige Red mostró mayor susceptibilidad a pudrición de la raíz, en comparación con Freedom Red, que tuvo cero incidencia.

Literatura citada

- Anónimo. 2009. Estadísticas de producción: nochebuena. (SAGARPA-SIAP).
- Barnet, H. L. and Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd. Edition. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minnesota. USA. 214 p.
- Bonanomi, G.; Antignani, V.; Pane, C. and Scala, F. 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. J. Plant Pathol. 89:311-324.
- Callejas-Ruíz, B. A.; Castillo-González, A. M.; Colinas-León, M. T.; González-Chávez, M. Del C.; Pineda-Pineda, J. y Valdez-Aguilar, L. A. 2009. Sustratos y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de nochebuena. Rev. Chapingo Serie Hort. 15(1):57-66.
- Carlile, B. 2009. Organic materials for growing media in Europe: current and future scenarios. Proceedings of the 18th Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizer. Rome, Italy. 8-12 pp.

High incidence of root rot was seen in the substrate with peat moss (80% v/v) + coconut fiber (20%), which was related to low aeration capacity of mixture. Native strains of *Trichoderma* spp., were detected in “organic soil”, peat moss and coconut fiber. Variety Prestige Red showed higher susceptibility to root rot, in comparison to Freedom Red, which had null incidence.

End of the English version



- Caron, J. and Rivière, L. M. 2003. Quality of peat substrates for plants grown in containers. In: organics soils and peat materials for sustainable agriculture. Parent, L.-E. and Ilnicki, P. (eds.). CRC Press LLC (eBook ISBN: 978-1-4200-4009-8, DOI: 10.1201/9781420040098.ch4).
- Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43:337-359.
- García, A. 2008. Producción de nochebuena planta terminada. Memoria del 7°. Simposium Internacional de Viverismo. Casasano, Cuautla, Morelos. 63-77 pp.
- García, P. F.; Ramírez, R. S.; Osuna, C. F. J. y Ocampo, T. 2009. Enfermedades de las principales ornamentales en Morelos. SAGARPA. INIFAP. Campo Experimental Zacatepec. Folleto técnico Núm. 39. 30 p.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84:377-393.
- Harman, G. E.; Lorito, M. and Lynch, J. M. 2004. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. Adv. App. Microbiol. 56:313-30.
- Johnson, P. 1968. Horticultural and agricultural uses of sawdust and soil amendments. Paul Johnson, National City, CA. 46 p.
- Lorito, M.; Sheridan, L. W.; Harman, G. E. and Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from ‘omics to the field. Ann. Rev. Phytopathol. 48:395-417.
- Montero-Barrientos, M.; Cardoza, R. E.; Gutierrez, S.; Monte, E. and Hermosa, R. 2007. The heterologous overexpression of hsp23, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. Current. Genetics 52:45-53.

- Montero-Barrientos, M.; Hermosa, R.; Nicolas, C.; Cardoza, R. E.; Gutiérrez, S. and Monte, E. 2008. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. *Fungal Gen. Biol.* 45:1506-13.
- Montero-Barrientos, M.; Hermosa, R.; Cardoza, R.; Gutiérrez, S.; Nicolás, C. and Monte, E. 2010. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 167:659-65.
- Nichols, M. A. 2007. Coir - a XXIst Century sustainable growing medium. *Acta Hortic.* 747:91-95.
- Nichols, M. A. and Savidov, N. A. 2009. Recent advances in coir as a growing medium. *Acta Hortic.* 843:333-336.
- Pane, C.; Spaccini, R.; Piccolo, A.; Scala, F. and Bonanomi, G. I. 2011. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biological Control* 56:115-124.
- Paulitz, T. C. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39:103-133.
- Raviv, M. 2007. Recent advances in soil-borne disease control using suppressive media. *Acta Hortic.* 819:125-134.
- Statistical Analysis System (SAS). 2000. User's Guide Release 8.1. (Eds.). SAS Institute, Inc. Cary, NC.
- Shoresh, M.; Harman, G. E. and Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Ann. Rev. Phytopathol.* 48:1-23.
- Toussoun, T. A. and Nelson, P. E. 1976. *Fusarium*. A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. 2nd Edition. Pennsylvania State University. USA. 39 p.
- Vestberg, M. and Kukkonen, S. 2007. Microbiologically improved peat-based media for nursery production by addition of arbuscular mycorrhizal fungi. *Acta Hortic.* 819:403-410.
- Yogev, A.; Raviv, M.; Hadar, Y.; Cohen, R. and Katan, J. 2006. Plant waste-based composts suppressive to diseases caused by pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Europ. J. Plant Pathol.* 116:267-278.