

Eficacia de bioplaguicidas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* R4T en banano bajo condiciones semi-controladas

Luisa Fernanda Izquierdo-García^{1*}; Carlos Andrés Moreno-Velandia¹; Rommel Igor Pacheco²; Juan Camilo Gómez²; Andrea del Pilar Villarreal¹; Magda Rocío Gómez- Marroquín¹; Sandra Lorena Carmona¹; Diana Marcela Burbano-David¹; Ruth Jesenia Quiroga-Mateus¹; Alfonso Rafael Orozco²; Martha Liliana Montes²; Gustavo Adolfo Rodríguez-Yzquierdo³; Mónica Betancourt-Vásquez¹

¹Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Agrosavia, Centro de Investigación Tibaitatá. Km 14 Vía Bogotá a Mosquera, Mosquera, Cundinamarca, Colombia. ²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Agrosavia, Centro de Investigación Caribía. Zona bananera, Magdalena, Colombia. ³Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Agrosavia, Dirección de vinculación, Sede Central. Km 14 Vía Mosquera-Bogotá, Cundinamarca, Colombia.

*Autor de

Correspondencia:

Luisa Fernanda Izquierdo-García
lfizquierdo@agrosavia.co

Contribución:

Tecnológica

Sección:

Fitosanidad

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

16 Abril, 2024

Cita:

Izquierdo-García LF, Moreno-Velandia CA, Igor PR, Camilo GJ, del Pilar VA, Gómez-Marroquín MR, Lorena CS, Burbano-David DM, Quiroga-Mateus RJ, Rafael OA, Liliana MM, Rodríguez-Yzquierdo GA y Betancourt-Vásquez M. 2024.

Eficacia de bioplaguicidas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* R4T en banano bajo condiciones semi-controladas. *Acorbat Revista de Tecnología y Ciencia* 1(1): 48 <https://doi.org/10.62498/ARTC> .2448

RESUMEN

En esta investigación se evaluó el efecto de nueve bioproductos comerciales a base de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre el desarrollo del marchitamiento del banano (*F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4) en condiciones de invernadero de bioseguridad. Los tratamientos a base de bacterias T5 (*B. subtilis*) y T7 (*B. amyloliquefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* K84 y *B. pumilus*) y el tratamiento T9 (consorcio de *Trichoderma* spp.) redujeron el avance de la incidencia de la enfermedad, con eficacias de 63%, 98% y 92%, respectivamente. Los tratamientos T7 y T9 redujeron el índice de severidad en 96% y 89%, respectivamente e impidieron el ingreso del patógeno en el tejido vegetal. Nuestros resultados indican que el uso de controladores biológicos representa una alternativa viable para la prevención y manejo de *Foc* R4T desde la fase de vivero.

Palabras clave: biocontrol, bioinsumos, biofungicidas, marchitez, patógeno cuarentenario, Fitosanidad.

ABSTRACT

In this research, the effect of nine commercial bioproducts based on *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. on Fusarium-wilt of banana development (*F. oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4) under biosafety greenhouse conditions. Treatments T5 (*B. subtilis*), T7 (*B. amyloliquefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* K84 and *B. pumilus*) and T9 (*Trichoderma* spp. consortium) reduced the incidence progress of the disease by 63%, 98% and 92%, respectively. Treatments T7 and T9 reduced the severity index by 96% and 89%, respectively, and prevented the colonization of inner tissue by the pathogen. The results suggest that the use of biological control agents represents a promissory alternative for the management of *Foc* TR4.

Keywords: biocontrol, biofungicides, Fusarium wilt, quarantine pathogens, phytosanity.



INTRODUCCIÓN

La marchitez vascular del banano causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) es la enfermedad más limitante de este cultivo (Ploetz et al., 2015). En el año 2019, la ONPF colombiana - El Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, declaró la emergencia fitosanitaria por la detección de la raza 4 tropical (R4T) de *Foc* en plantaciones de banano en el departamento de La Guajira (Garcia-Bastidas et al., 2019). En América Latina y el caribe este hongo es catalogado como plaga cuarentenaria (FAO, 2018) por su fácil dispersión, su largo periodo de permanencia en el suelo, los efectos negativos en el cultivo y porque no se cuenta con variedades resistentes como lo era el cultivar de banano Cavendish para *Foc* Raza 1.

Las estrategias convencionales de manejo suelen ser poco efectivas y ante la ausencia de materiales resistentes, el control biológico con microorganismos antagonistas representa una estrategia promisoría para el manejo de *Foc* R4T. Varias publicaciones científicas han mostrado resultados positivos para el manejo de la enfermedad con cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. (Akila et al., 2011; Li et al., 2022; Wong et al., 2019). Sin embargo, no existen biofungicidas registrados contra *Foc* R4T en países afectados como Colombia y Perú (ICA, 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas de banano Cavendish cv. Williams se trataron con bioplaguicidas disponibles en el mercado local, al finalizar la etapa de enraizamiento. Estas plantas fueron trasplantadas en suelo inoculado con la cepa de *Foc* R4T 190203 facilitada por el ICA.

Para la producción del inóculo de *Foc*, el hongo fue multiplicado en salvado de trigo estéril. Inicialmente se obtuvo la biomasa del microorganismo crecido durante siete días en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y se resuspendió en caldo papa-dextrosa (PDB), se homogenizó con ayuda de vórtex y se filtró a través de una muselina estéril (malla 0,5 mm) para recuperar los microconidios libres de micelio. Esta suspensión se ajustó a 1×10^7 microconidios mL^{-1} en PDB estéril y se empleó para inocular sustrato estéril salvado de trigo en bolsas de alta densidad (121°C, 15 PSI, 20 minutos x dos ciclos). Se inoculó 10 ml de la suspensión de microconidios por bolsa con 72 g de salvado con 52 mL de agua destilada estéril (ADE). Luego de la inoculación las bolsas se incubaron durante 20 días a 25 °C.

Para cosechar el inóculo de *Foc* R4T multiplicado en el sustrato sólido, se hizo un lavado sumergiendo el sustrato en ADE, se agitó vigorosamente para desprender las estructuras del hongo del sustrato y se filtró por muselina estéril (malla 0,5 mm). Se calculó el rendimiento en términos de microconidios g^{-1} de sustrato mediante conteo de microconidios en cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad de los microconidios mediante la siembra y conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) en medio PDA suplementado con tritón (0.1 % v/v) y cloranfenicol (250 mg L^{-1}). Finalmente, se tomó la cantidad necesaria de sustrato colonizado por *Foc* R4T para ajustar las concentraciones de los inóculos en 1×10^6 microconidios mL^{-1} de *Foc* R4T. La inoculación del patógeno en el suelo se hizo en drench 6 días antes de trasplante adicionando 100 mL de inóculo en 1×10^6 microconidios mL^{-1} en bolsas de vivero que contenían 1 kg de sustrato (turba canadiense).

Aplicación de tratamientos

Los tratamientos se aplicaron en cuatro momentos: 1. En semillero, tres días antes de trasplante (5 mL/planta), 2. En el suelo, tres días antes de trasplante (100 mL/planta), 3. En el momento de trasplante (100 mL/planta) y 4. Siete días después de trasplante (100 mL/planta). Los tratamientos correspondientes a bioplaguicidas a base de *Trichoderma* se aplicaron en 1×10^6 conidios mL^{-1} , mientras que los que contenían bacterias como principio activo se aplicaron en 1×10^7 células mL^{-1} . Las plantas se mantuvieron en condiciones semi-controladas en invernadero de bioseguridad para *Foc* R4T en zona afectada (La Guajira, Colombia). Se incluyó un control negativo (plantas crecidas en suelo inoculado con *Foc* R4T y sin método de control) y un control absoluto (plantas crecidas en suelo libre del patógeno y sin tratar).

Diseño experimental y variables evaluadas

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones. La unidad experimental fue de cinco plantas y se contó con dos réplicas del experimento completo en el tiempo. Se realizó el seguimiento para observar la expresión de los síntomas característicos de la enfermedad. Se midió la incidencia y la severidad de la enfermedad empleando la escala de Dita et al. (2011) con modificaciones. También se registró el periodo de incubación de la enfermedad en cada uno de los tratamientos. Se calculó el índice de severidad de la enfermedad de acuerdo con la ecuación descrita por Zhang et al. (1996). Con los datos periódicos de incidencia y de severidad se calculó el área bajo las curvas de progreso de cada variable.

Detección molecular del Foc R4T en tejido vegetal de plantas asintomáticas

Con el ánimo de verificar la presencia o ausencia de *Foc* R4T en el tejido interno del cormo de las plantas que no presentaron síntomas de enfermedad se implementó un protocolo de detección molecular estandarizado previamente. Brevemente, se cortaron fragmentos de 5 mm de la parte central del cormo y se almacenaron en tubos Eppendorf a -20 °C. Posteriormente se liofilizó el tejido durante 48 horas y se pulverizó con nitrógeno líquido para realizar la extracción de ADN empleando el protocolo propuesto por Daire et al. (1997).

Se porcionaron 300 mg de tejido pulverizado en tubos de microcentrífuga de 2 mL, adicionados con 1 mL de buffer de lisis. Se agitó en vórtex durante 1 minuto y se incubó a 65 °C en baño maría durante una hora. Posteriormente se añadieron 800 µL de cloroformo para separar las proteínas y residuos, agitando en vórtex por 30 s y centrifugando a máxima velocidad por 10 min. El sobrenadante resultante, se precipitó usando 800 µL de Isopropanol e incubando a 4 °C por 15 minutos hasta observar la aparición de la madeja de ADN. La madeja se rescató manualmente usando una punta de micropipeta de 10 µL de volumen, y se trasladó a un tubo nuevo con 800 µL de etanol al 70%. La calidad del ADN obtenido se verificó por electroforesis en gel de agarosa y la concentración se determinó mediante la cuantificación por espectrofotometría empleando un NanoDrop. Para determinar si el ADN presentaba suficiente calidad para PCR se realizó la amplificación de un gen que amplifica elementos repetitivos específicos de musáceas (BrepF: 5' GATTTTGTAGATTTTGGACACCG 3' BrepR: 5' GAATAACAAATATGCTCCAATACCC 3') (Mansoor et al., 2005) y se usó como control positivo ADN de tejido vegetal de banano y como control negativo ADN de pasto kikuyo.

Con el propósito de confirmar el ingreso detectable de *Foc* R4T al tejido de cormo de plantas de banano asintomáticas, se realizó amplificación por PCR convencional de un marcador molecular específico para *Foc* R4T (W2987_F: 5'-TGCCGAGAACCACTGACAA-3'; W2987_R: 5'-GCCGATGTCTTCGTCAGGTA-3) (Li et al., 2013) a partir del ADN vegetal extraído. Como control se usó un ADN de planta infectada con *Foc* R4T y como control negativo se usó ADN de *Foc* R1.

Análisis de los datos

Inicialmente se eliminaron los datos atípicos en las diferentes réplicas. Luego de comprobar la normalidad (Shapiro-Wilk, $\alpha = 0.05$) y de homogeneidad de varianzas

(Bartlett, $\alpha= 0.05$), los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Dunnett ($\alpha= 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera réplica del experimento los síntomas de la enfermedad se presentaron a partir del día 61 después de trasplante (ddt). El experimento tuvo una duración de 80 días desde el trasplante, periodo en el que alcanzó 90% de incidencia de la enfermedad en el control patógeno (Figura 1). Los tratamientos T5 (*B. subtilis*), T7 (*B. amyloliquefaciens*, *A. radiobacter* K84 y *B. pumilus*) y el tratamiento T9 (mezcla de *Trichoderma* spp.) redujeron el progreso de la incidencia de la enfermedad con respecto al tratamiento control negativo (Figura 1), con eficacias de 63%, 98% y 92%, respectivamente. Solo los tratamientos T7 y T9 redujeron el progreso del índice de severidad de la enfermedad (Figura 2) en 96% y 89%, respectivamente, comparados con el control negativo.

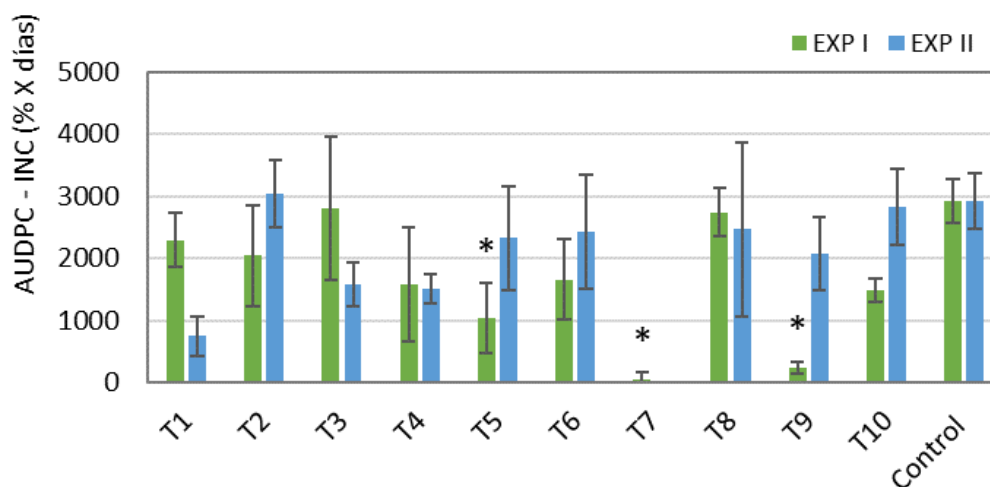


Figura 1. Área bajo la curva de progreso de la incidencia (AUDPC – INC) del marchitamiento del banano en respuesta al tratamiento de las plantas con bioproductos a base de agentes de control biológico en dos repeticiones del experimento (EXP I y EXP II). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control negativo en cada experimento de acuerdo con la prueba Dunnett ($\alpha= 0.05$).

En la segunda réplica del experimento, el periodo de incubación fue más corto, los primeros síntomas se observaron a los 27 ddt. A los 55 ddt el control negativo presentó el 90% de incidencia lo que determinó la finalización del experimento (Figura

1). En esta réplica el tratamiento T7 redujo en 100 % la incidencia y severidad de la enfermedad con ausencia de plantas enfermas durante el transcurso de la evaluación (Figura 1 y 2). El patógeno no fue detectado en ninguna de las plantas aparentemente sanas mediante detección molecular.

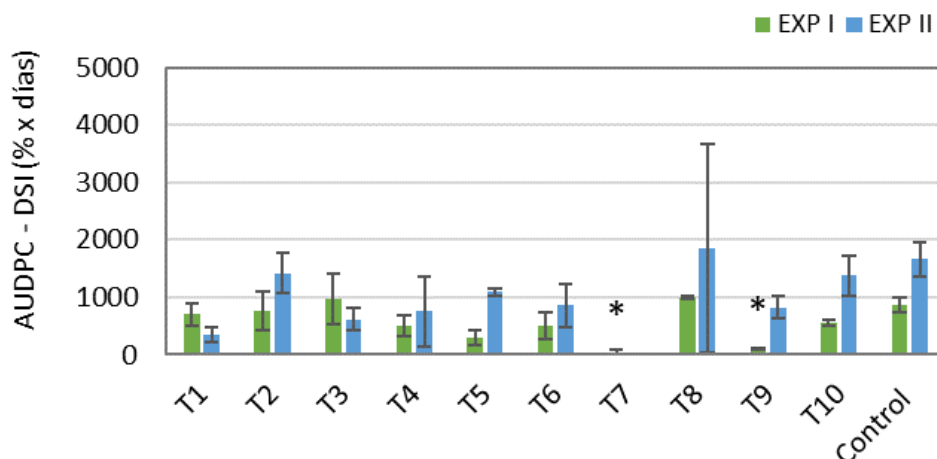


Figura 2. Área bajo la curva de progreso del índice de severidad (AUDPC – DSI) del marchitamiento del banano en respuesta al tratamiento de las plantas con bioproductos a base de agentes de control biológico en dos repeticiones del experimento (EXP I y EXP II). Las barras sobre las columnas representan la desviación estándar de los datos (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control negativo en cada experimento de acuerdo con la prueba Dunnett ($\alpha=0.05$).

CONCLUSIONES

El tratamiento T7 mostró consistencia en la reducción de la enfermedad entre las dos réplicas del experimento con eficacias de hasta el 100 %, siendo un tratamiento promisorio para el control de la enfermedad. En la actualidad se están desarrollando ensayos similares en condiciones de campo, para evaluar el efecto de los biocontroladores en condiciones de infección natural. Se avanza adicionalmente en la caracterización de los sus modos de acción y eco-fisiológica de los tratamientos con el fin de contar con un tratamiento de referencia que permita facilitar la búsqueda de las características de tratamientos eficaces en el control de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*, 57, 175–183.
2. Daire, X., Clair, D., Reinert, W., & Boudon-Padieu, E. (1997). Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103(6), 507–514. Doi:10.1023/a:1008641411025
3. Dita MA; Waalwijk C; Paiva LV; Souza Jr M.T., & Kema GHJ. 2011. A greenhouse bioassay for the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* x ‘Grand Naine’ (Musa, AAA, Cavendish subgroup) interaction. *Acta Hort.* 897:377–380.
4. FAO. (2018). *NIMF 5. Glosario de términos fitosanitarios. Normas Internacionales de Medidas Fitosanitarias*. Retrieved from https://www.ippc.int/largefiles/adopted_ISPMs_previousversions/es/ISPM_05_2005_Es_2006-05-02.pdf
5. Garcia-Bastidas, F., Quintero-Vargas, C., Ayala-Vasquez, M., Seidl, M. F., Schermer, T., Santos-Paiva, M., & Kema, G. H. (2019). First report of Fusarium wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease*, (2018), 1–5.
6. ICA, 2022. Bioinsumos registrados a 30 de septiembre de 2022. <https://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dcc8132/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>
7. Li, Y., Jiang, S., Jiang, J., Gao, C, Qi, X., Zhang, L., Sun, S., Dai, Y., & Fan, X. (2022). Synchronized efficacy and mechanism of alkaline fertilizer and biocontrol fungi for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. *J. fungi*. 2022, 8, 261. <https://doi.org/10.3390/jof8030261>
8. Mansoor, S., Qazi, J., Amin, I., Khatri, A., Khan, I. A., Raza, S., ... Briddon, R. W. (2005). A PCR-Based Method, With Internal Control, for the Detection of Banana Bunchy Top Virus in Banana. *Molecular Biotechnology*, 30(2), 167–170.
9. Ploetz, Randy C. (2015). Fusarium wilt of banana. *Phytopathology*, 105(12), 1512–1521.
10. cv. Grand Naine. *Biocontrol Science & Technology*. 25 (10), 1147–1164
11. Wong, N.B. Saidi, G. Vadamalai, C.Y., & D. Zulperi (2019). Effect of bioformulations on the biocontrol efficacy, microbial viability and storage stability of a consortium of biocontrol agents against Fusarium wilt of banana. *Journal of Applied Microbiology*. 127, 544–555.
12. Zhang, Jiuxu, Howell, C. R. & Starr, J. L. 1996. Suppression of Fusarium colonization of cotton roots and Fusarium wilt by seed treatments with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. *Biocontrol Science and Technology* 6: 175-188. <https://doi.org/10.1080/09583159650039377>