

Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 1 y Raza 2 en México

Alba P. Suaste-Dzul^{1*}; Yulissa Guadalupe Paredes-Jurado¹; Gisela Jareth Lino-López¹; Facundo Rafael Muñiz Paredes¹; Jorge Antonio Sánchez González¹; Francisco Ramírez y Ramírez²; Guillermo Santiago Martínez²

¹Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, DGSV-SENASICA, Tecomán, Colima, México. ² Dirección General de Sanidad Vegetal-SENASICA, Tecamac, Edo de México, México.

***Autor de**

Correspondencia:

Alba P. Suaste-Dzul
albasuaste@gmail.com

Contribución:

Tecnológica

Sección:

Fitosanidad

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

16 Abril, 2024

Cita:

Suaste-Dzul AP, Paredes-Jurado YG, Lino-López GJ, Muñiz PFR, Sánchez GJA, Ramírez yRF y Santiago MG. 2024. Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 1 y Raza 2 en México.

Acorbat Revista de
Tecnología y Ciencia 1(1):

50

<https://doi.org/10.62498/AR>

TC.2450

RESUMEN

En la década de los 60's la enfermedad conocida como Marchitez por *Fusarium* Raza 1 (Foc R1) y Raza 2 (Foc R2) amenazó plantaciones de *Musa* spp. Actualmente el riesgo de introducción de Foc R4T, afectaría su producción y exportación. Ante la eventual introducción de Foc R4T, se propone un manejo integrado para mejorar la salud del suelo. En este estudio se obtuvieron 240 aislados nativos identificados como *Trichoderma* spp. de cinco áreas de producción de musáceas en México. Las evaluaciones *in vitro* presentaron un antagonismo de 69-70% del porcentaje de inhibición del crecimiento contra Foc R1, mientras que para la Raza 2 del 61-63%, contra aislados nativos.

Palabras clave: Manejo integrado, bioprospección, Marchitez por *Fusarium*, control biológico, Fitosanidad.

ABSTRACT

In the 1960s, *Musa* spp. plantations were threatened by *Fusarium* wilt Race 1 (Foc R1) and Race 2 (Foc R2). Currently, the introduction of Foc R4T poses a risk to both production and exports. Therefore, integrated management is proposed to improve soil health in preparation for eventual arrival of Foc R4T. This study obtained 240 native isolates of *Trichoderma* spp. from five Musaceae production areas in Mexico. The *in vitro* analysis revealed 69-70% antagonism in the growth inhibition percentage against Foc R1, and 61-63% antagonism against Race 2, when tested against native isolates.

Keywords: Integrated Management, bioprospection, *Fusarium* wilt, biological control, phytosanitary.



INTRODUCCIÓN

La Marchitez por *Fusarium*, provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* es una de las enfermedades más devastadoras que supone una grave amenaza para la industria bananera mundial. Existen tres razas de este patógeno que afectan plátanos y bananos, la Raza 1 (Foc R1), Raza 2 (Foc R2) y la Raza 4 tropical (Foc 4T). Con esto, la presencia de este patógeno en dos países de América (Colombia y Perú), incrementa el riesgo de su introducción a México (Florencio-Anastasio *et al.*, 2022). Sin medidas de control eficaces disponibles hasta la fecha, se ha explorado el control biológico para restringir la propagación e implementar acciones preventivas contra el fitopatógeno (Damodaran *et al.*, 2020). El género *Trichoderma* es un hongo con gran potencial antagonista debido a su rápido crecimiento, su capacidad para colonizar diversos sustratos y su resistencia a productos químicos nocivos. Este hongo antagonista es parte de los componentes predominantes del microbioma del suelo en diversos ecosistemas, como campos agrícolas, praderas, bosques, pantanos y desiertos (Kamala *et al.*, 2015). Varias especies de *Trichoderma* son importantes agentes de control biológico de fitopatógenos fúngicos y actúan como estimuladores de la salud de las plantas. A partir de este punto, y a manera de responder ante cualquier situación de emergencia fitosanitaria, es necesario realizar actividades de exploración y selección de aislados de hongos nativos de *Trichoderma* spp. con potencial para inhibir el crecimiento del modelo fitopatogénico Foc R1/Foc R2 en áreas productoras de plátanos y bananos del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Para la obtención de aislados nativos de *Trichoderma* spp. se colectaron muestras de suelo asociadas a la rizósfera de plátanos y bananos en el estado de Colima (Cuadro 1). Adicionalmente, como parte de las actividades de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (VEF) para la detección oportuna de Foc R4T, que implementa el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria a través de los Comités Estatales de Sanidad Vegetal, se solicitó el apoyo de los técnicos del Programa de VEF y de la campaña contra Moko del Plátano de los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco y Michoacán para la colecta de muestras compuestas de suelo, con el propósito de incrementar los sitios de muestreo representativos de áreas bananeras en México (Cuadro 1) y obtener aislamientos que estén adaptados tanto al cultivo como a las condiciones climáticas y/edáficas donde se cultiva plátano y banano en nuestro país. Las exploraciones y los muestreos se realizaron en predios de plátanos y bananos, en

donde no se tenía evidencia de aplicación de productos comerciales a base de microorganismos, sin explotación excesiva del suelo y evitando sectores de camino de personal o animales. Una muestra compuesta se conformó de por lo menos 20 puntos al azar dentro de la unidad productora.

Cuadro 1. Sitios de muestreo para la obtención de aislados nativos de *Trichoderma* spp.

Procedencia	Municipio	Cantidad de muestra	Variedad muestreada
Colima	Tecomán	3	Enano gigante, Dominico y Plátano Macho
	Armería	2	Enano gigante, plátano pera
Michoacán	Coahuayana	2	Enano gigante
	Apatzingán	2	Enano gigante
	Parácuaro	2	Enano gigante
Chiapas	Tapachula	1	Enano gigante
	Las Margaritas	1	Plátano criollo
	Copainalá	1	Plátano Macho
	Suchiate	1	Enano gigante
	Mazatán	1	Enano gigante
	La Independencia	1	Plátano criollo
	Ostuacán	1	Plátano criollo
	Pichucalco	1	Enano gigante
Veracruz	Álamo Temapache	1	Plátano Macho
	Atzalán	1	Dominico
	Papantla	1	Plátano Macho
	Tlapacoyan	1	Dominico
	Nautla	1	Plátano macho
	San Rafael	1	Enano gigante
Tabasco	Cunduacán	1	Enano gigante
	Centro	1	Enano gigante
	Huimanguillo	1	Enano gigante
	Jalapa	1	Francés
	Tacotalpa	1	Enano gigante
	Cárdenas	1	Enano gigante
	Teapa	1	Enano gigante

Proceso de aislamiento de hongos antagonistas

El aislamiento de los hongos antagonistas, especialmente del género *Trichoderma* spp., se realizó por el método de dilución en placa utilizando el medio de cultivo Rosa de Bengala (Souza-Motta *et al.*, 2003). Para cada muestra compuesta de suelo, se pesaron 25 g y se resuspendieron en 225 mL de agua destilada estéril (dilución de 1:10). Posteriormente, se adicionó 1 mL de la suspensión en 99 mL de agua destilada estéril, manteniendo todas las muestras en agitación (~550 rpm). En la base de las placas de Petri se inoculó 1 mL de la suspensión de suelo 1:100 y enseguida se vació 15 mL del medio Rosa de Bengala (DIFCO™) a una temperatura de 45 ± 2 °C. Las placas de Petri fueron homogenizadas manualmente con movimientos rotación suaves y se incubaron 27 ± 2 °C por 5-7 días, hasta la aparición de colonias de *Trichoderma*. Se realizó 10 réplicas en medio Rosa de Bengala por cada muestra de suelo destinada al aislamiento de hongos antagonistas. Las claves taxonómicas utilizadas para la identificación de *Trichoderma* spp. fueron las descritas por Gams y Bissett (2002).

Modelo Fitopatogénico: Foc R1 y Foc R2

Los hongos fitopatógenos fueron donados por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Ambos aislados correspondientes a Foc R1 y Foc R2 fueron reactivados en Agar de Dextrosa de Patata (PDA) y cultivados durante 7 días a 27°C, para lograr la esporulación del micelio. Ambas cepas, fueron analizadas para su identificación molecular utilizando la región ITS.

Antagonismo *In vitro*

El efecto antagónico de los aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre Foc R1 y Foc R2 se determinó utilizando el método de cultivos duales. En un extremo de la placa de Petri se sembró un disco de 9 mm del medio de cultivo PDA que contenía el micelio del aislado nativo de *Trichoderma* y, en el extremo opuesto, un disco de Foc R1 o Foc R2, manteniendo una distancia de 4-4.5 cm entre cada disco confrontado en una placa de Petri de 9 cm de diámetro. Se utilizaron como controles los discos de Foc R1 y Foc R2, sin confrontar. Los aislados confrontados y sus controles, fueron incubados a 27 °C durante 7 días, o hasta que el micelio del tratamiento control llenara por completo la placa de Petri. En todos los ensayos se utilizaron cuatro réplicas por tratamiento y los experimentos fueron repetidos independientemente dos veces, bajo un diseño completamente al azar. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio (PICM) de Foc R1 y Foc R2, utilizando la siguiente fórmula desarrollada por Matarese *et al.* (2012):

$$\text{PICM (\%)} = \left[\frac{[R_1 - R_2]}{R_1} \right] \times 100$$

Donde R_1 = Crecimiento radial del fitopatógeno sin confrontar (control); R_2 = Crecimiento radial del fitopatógeno en confrontación con el antagonista.

Los datos obtenidos del ensayo de confrontación *in vitro* se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de separación de medias con Tukey con $p \leq 0.05$ con el paquete estadístico SPSS Statistics (IBM Corp, 2013). Así mismo, se utilizó la escala de antagonismo propuesta por Bell *et al.*, (1982), con el fin de determinar el grado de actividad antagonica *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra la Raza 1 y Raza 2 de Foc (Cuadro 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De manera sistemática, se obtuvieron un total de 240 aislados nativos de *Trichoderma* spp., distribuidos entre los cinco principales estados productores de plátanos y bananos (Figura 1). El mayor número de aislados de *Trichoderma* fueron obtenido del estado de Tabasco, seguido de Chiapas y Veracruz. Con frecuencia la biodiversidad en las comunidades microbianas está relacionada con la productividad y la estabilidad de los ecosistemas (Wang *et al.*, 2023). Por lo tanto, debido a la importancia ecológica de *Trichoderma* spp. y a su aplicación como agente de control biológico en el campo, en este estudio se pretende conocer su biodiversidad en las principales áreas productoras de plátano, a fin de ser utilizadas como tecnología preventiva contra las razas fitopatógenicas de Foc que están presentes y ausentes en México.

Todos los aislados nativos del antagonista *Trichoderma* fueron identificados a nivel de género por sus características morfológicas (Figura 2), y se encuentran en proceso de identificación molecular. Por otro lado, las cepas de Foc R1 y Foc R2, a pesar de no distinguirse morfológicamente, se observó la presencia de microconidios unicelulares, ovoides, con una y dos células en cadenas simples o cortas, y macroconidios hialinos y multiseptados. Estos resultados fueron confirmados por análisis de la región ITS con 100% de identidad con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* del GenBank.

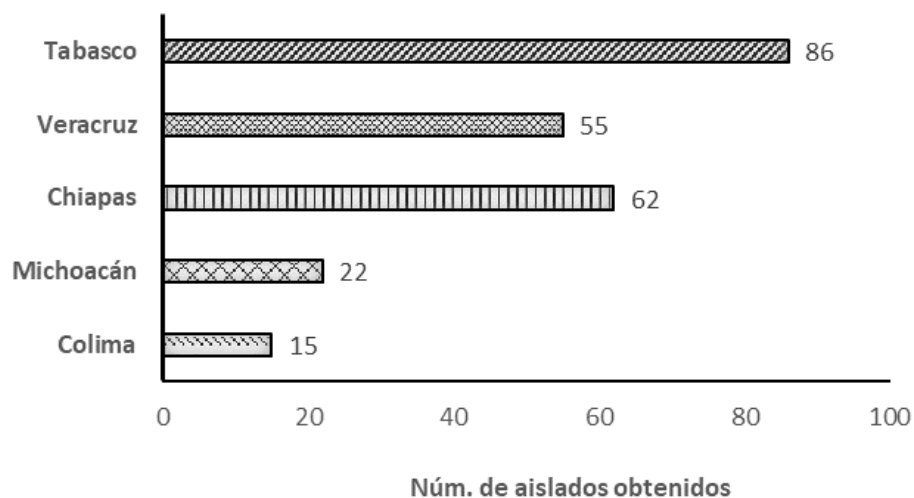


Figura 1. Número total de aislados nativos de *Trichoderma* obtenidos de cinco Estados productores de plátanos y bananos.

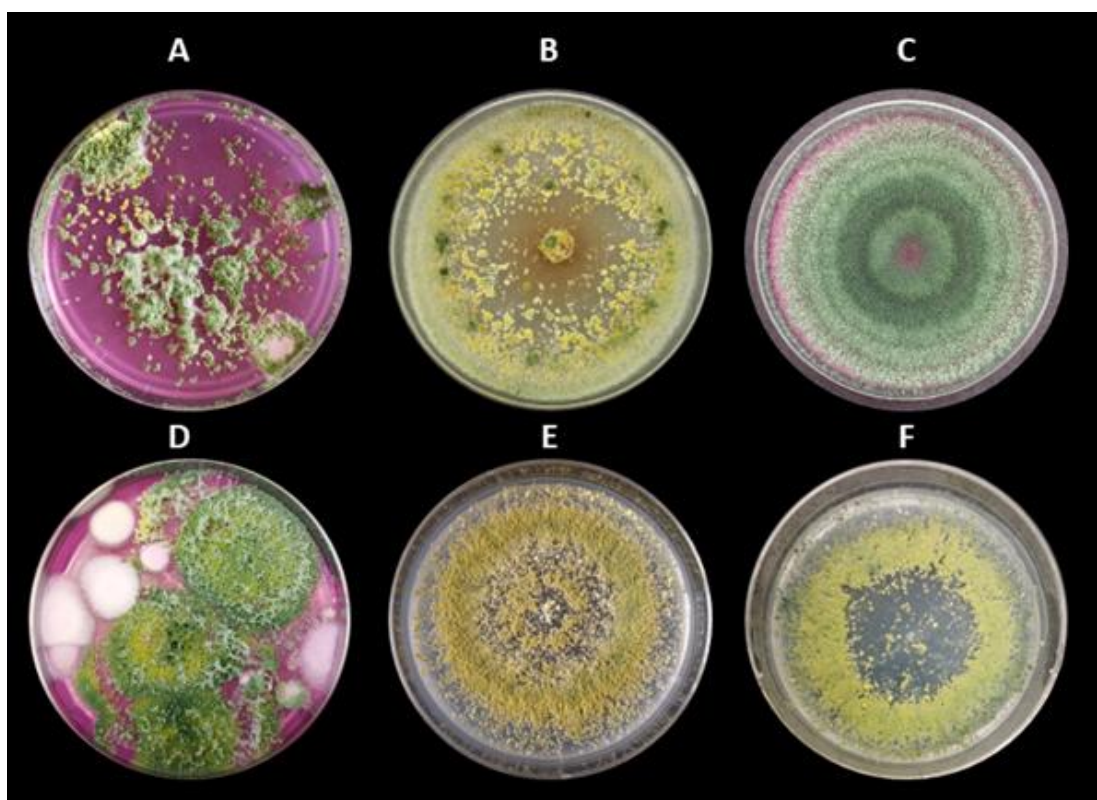


Figura 2. *Trichoderma* nativas de la rizósfera de plátanos y bananos. **A.** Aislamiento proveniente de Colima; **B.** Aislado CHE-CNRCB 1119 de Colima; **C.** Aislamiento CHE-CNRCB 1117 de Colima; **D.** Aislamiento proveniente de Michoacán; **E.** Aislamiento 24B. 1 de Michoacán; **F.** Aislamiento 24B. 2 de Michoacán.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. obtenidas en el estado de Colima, CHE-CNRCB 1116, 1117, 1119 y 1120 mostraron inhibición significativa frente al crecimiento de Foc R1 entre un 69-70 % ($p < 0.05$) cuando fue comparado con su control, sin confrontar. Por otro lado, la acción antagónica ejercida por las cepas nativas CHE-CNRCB 1115 y 1120 contra Foc R2 fue de 61.3 y 62.5 % ($p < 0.05$), respectivamente (Figura 3). Los ensayos de antagonismo *in vitro* para los aislado que provienen de Tabasco, Michoacán, Veracruz y Chiapas, se encuentran bajo análisis estadístico.

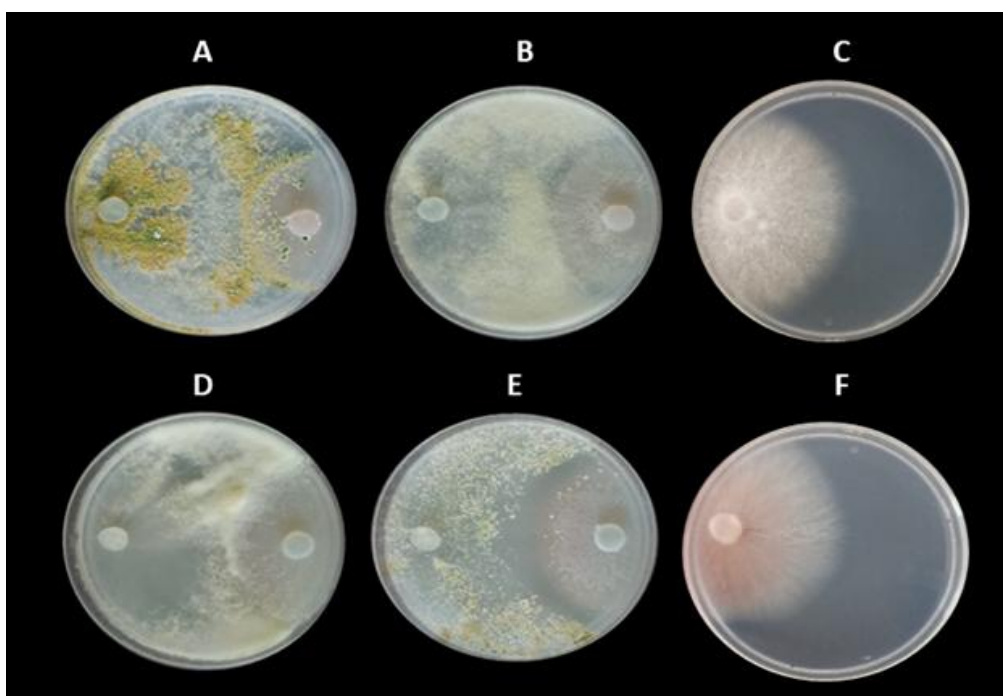


Figura 3. Efecto antagónico de aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre la inhibición del micelio de Foc R1 y Foc R2. De lado izquierdo de la placa de Petri se observa al fitopatógeno (Foc R1 o Foc R2) y de lado derecho, se observa al hongo antagonista evaluado. **A.** Confrontación de CHE-CNRCB 1116 x Foc R1; **B:** CHE-CNRCB 1117 x Foc R1; **C:** CHE-CNRCB 1119 x Foc R1; **D:** CHE-CNRCB 1115 x Foc R2; **E:** CHE-CNRCB 1119 x Foc R2; **F:** CHE-CNRCB 1120 x Foc R2.

Perspectivas

Aislar, identificar y caracterizar mayor cantidad de microorganismos antagonistas nativos, especialmente el antagonista *Trichoderma* spp., de las principales variedades comerciales de musáceas. Seleccionar *in vitro* e *in vivo* los aislados nativos con potencial antagonismo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Desarrollar un protocolo de producción masiva de *Trichoderma* en diferentes sustratos, que permitan generar tecnología aplicada al campo agrícola mexicano.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio mostraron que los aislados nativos del género *Trichoderma* spp. inhibieron en diferente grado, el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 1 y Raza 2. Por tanto, esta capacidad antagónica podría contribuir a desarrollar un esquema de manejo integrado del cultivo, basado principalmente en mejorar la salud de suelo a través del uso de aislados endémicos, tanto de las razas fitopatógenicas de Foc presentes en México, como de Foc R4T, ausente en nuestro país.

REFERENCIAS

1. Bell K, Wells D, Markham R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.
2. Damodaran T, Rajan S, Muthukumar M, Gopal R, Yadav K, Kumar S, Jha SK. 2020. Biological management of banana Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 using antagonistic fungal isolate CSR-T-3 (*Trichoderma reesei*). *Frontiers in Microbiology* 11:595845.
3. Florencio-Anastasio JG, García-Ávila CJ, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Quezada-Salinas A, Almaraz-Suárez JJ, Moreno-Velázquez M, Hernández-Ramos, L. 2022. Effectiveness of antagonistic bacteria, commercial fungicides, and fourth generation quaternary ammonium salts, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race “1 or 2”. *European Journal of Plant Pathology* 163:719-731.
4. Gams W and Bissett J. 2002. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor & Francis Ltd, Abingdon, OX, UK, pp. 3-34.
5. Kamala T, Devi SI, Sharma KC, Kennedy K. 2015. Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma Biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. *Biomed Research International* 28526:1-21.
6. Matarese F, Sarrocco S, Gruber S, Seidl-Seiboth V, Vannacci, G. 2012. Biocontrol of Fusarium Head Blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology* 158: 98-106.
7. Souza-Motta CM, de Queiroz MA, dos Santos MJ, Massa DM, Nascimento JP, Laranjeira D. 2003. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:273-280.
8. Wang Y, Liu Z, Hao X, Wang Z, Wang Z, Liu S, Tao C, Wang D, Wang B, Shen Z., Shen Q, Li, Q. 2023. Biodiversity of the beneficial soil-borne fungi steered by *Trichoderma*-amended biofertilizers stimulates plant production. *NPJ Biofilms and Microbiomes* 9:1-9.