

## Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* causante de marchitez en plátano (AAB)

Claudia Jiménez Pérez<sup>1\*</sup>; Elba Vallejo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) – Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (CENIAP). Maracay, Venezuela.

**\*Autor de**

**Correspondencia:**

Claudia Jiménez Pérez  
clauji14@hotmail.com

**Contribución:**

Tecnológica

**Sección:**

Fitosanidad

**Recibido:**

15 Diciembre, 2023

**Aceptado:**

15 Enero, 2024

**Publicado:**

16 Abril, 2024

**Cita:**

Jiménez PC y Vallejo E.  
2024. Antagonismo *in vitro*  
de *Trichoderma* spp. contra  
*Fusarium oxysporum*  
causante de marchitez en  
plátano (AAB).  
Acorbat Revista de  
Tecnología y Ciencia 1(1):  
52  
<https://doi.org/10.62498/AR.TC.2452>

### RESUMEN

Se evaluó la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. provenientes de diferentes zonas de Venezuela contra FOCR4T aislada de plátano proveniente del estado Aragua. Se realizaron pruebas de enfrentamiento *in vitro*, el ensayo de estableció bajo un diseño completamente aleatorizado con 8 tratamientos y 3 repeticiones. Se incubó a 27-28 °C, por 7 días a oscuridad continua. Se evaluó porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) y porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Como resultado se obtuvo que el rango de PIC entre tratamiento 56,1 – 63,60 % y PIE 70 – 92,8%, sin diferencias significativa entre tratamientos. *Trichoderma* spp. deben ser evaluados en invernadero y campo para definir efectividad y aplicabilidad.

**Palabras clave:** musáceas, control biológico, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza Tropical 4, Fitosanidad.

### INTRODUCCIÓN

El plátano es el frutal de mayor importancia en Venezuela. Además, considerado un cultivo tradicional debido a su adaptabilidad a los distintos agroecosistemas a lo largo del territorio nacional. La producción de cultivo está presente en de la zona de Sur del Lago de Maracaibo; estados Zulia, Trujillo, Mérida y Táchira, representando aproximadamente el 70 % de la producción total nacional. La zona norte-oriental del estado Yaracuy, también presenta condiciones ideales para el cultivo, asimismo en los estados Barinas, Portuguesa, Apure, Guárico, Monagas, Bolívar, Delta Amacuro, La Guaira (Martínez, et al 2020) y actualmente en el estado Aragua en los municipios Mariño, Zamora, José Ángel Lamas (observaciones realizadas por los autores).

El plátano es la fruta que más se produce en el país seguida por el cambur, su producción para el 2019 fue de 750170 tn y para el 2021 664095 tn (FAO 2023), con un consumo per capita para el año 2014 de 52,28gr/día (INE 2023). El plátano en



Venezuela está sembrado como monocultivo perenne a bajas densidades o en asociaciones con cultivos como café y cacao. El clon más utilizado es ‘Hartón gigante’ (Musa AAB, Subgrupo plátano), y representa un aspecto importante en la economía de pequeños productores (Martínez et al. 2020).

Por otra parte, el estado Aragua contribuye con la mayor producción de banano Cavendish, conformando el eje bananero de mayor importancia en la región central de Venezuela). La producción de este cultivo presenta limitaciones fitosanitarias, entre ellas: el Moko (*Ralstonia solanacearum*), Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) (Foc R4T) (Martínez et al. 2020), considerada entre las enfermedades más letales en la historia de la agricultura (Dita et al., 2010). De esta última enfermedad, recientemente fueron reportadas evidencias científicas de la presencia de Foc R4T en banano en estado Aragua, Carabobo y Cojedes (Mejías et al. 2023) y en plátano en el municipio José Ángel Lamas de estado Aragua (Jiménez et al. 2023 por publicar).

Debido los problemas fitosanitarios que se presenta en el estado Aragua en banano y plátano, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *Trichoderma* spp para inhibir el crecimiento y esporulación In vitro de FOCR4T, aislados de plantación de plátano Hartón Gigante ubicada en el municipio José Ángel Lamas del estado Aragua Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se visitó la unidad de producción ubicada en el Sector el Mahomo II, Santa Cruz, Municipio José Ángel Lamas, estado Aragua Venezuela con una plantación de con las siguientes características de 2000 plantas de plátano ‘Hartón’ con síntomas característicos a los causados por FOCR4T. De esta plantación se tomaron muestras vegetales. Así mismo, se tomaron muestra suelo en diferentes municipios del estado Aragua: de un lote de terreno que estuvo sembrado con cambur Cavendish, el cual fue eliminado por la presencia de síntomas de marchitez y lleva 4 años en barbecho ubicado municipio José Lamas. Otras muestras en los municipios Zamora, Girardot y por último en el estado Mérida.

### Procesamiento de muestra vegetal

Se tomaron muestras vegetales de pseudotallo con síntomas de necrosis a lo largo de los haces vasculares de color vinotinto-rojizo, fueron llevadas al laboratorio de INIA-CENIAP. Se tomaron trozos de tejido y fueron desinfectados con hipoclorito de

sodio al 1% por 1 minuto, luego se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril (ADE), se eliminó exceso de ADE con papel absorbente estéril. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar se procedió a la siembra de tejido vegetal de 5-10 mm en medio de cultivo Papa dextrosa agar acidificado más antibiótico (PDAA + Sulfato de Streptomycin). Luego estas cajas se incubaron a 27-28 °C por 4-5 días+/-, seguidamente se purificaron las colonias y se realizaron cultivos monosporicos para la identificación del patógeno por características culturales de la colonia y características macros y microscópicas y se compararon con el manual específico para *Fusarium*.

### **Procesamiento de muestra de suelo**

Para el aislamiento de posibles antagonistas, se preparó una solución madre con 10 gramo de suelo y 90 mL de agua destilada estéril (ADE), posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$ ; se tomó 1 mL de la solución madre y se colocó en un tubo con 9 mL ADE para obtener dilución  $10^{-1}$ , este procedimiento se repitió hasta llegar a  $10^{-6}$ . Se incubaron por 3-4 días, pasado ese tiempo se seleccionaron colonias de color verde y se procedió a su identificación a través del montaje en lámina y el uso de las claves taxonómicas para el género *Trichoderma*.

### **Pruebas de enfrentamiento in vitro entre *Fusarium* y *Trichoderma***

Para medir la capacidad antagonica de *Trichoderma* spp, se evaluó la competencia por nutrientes y espacio del aislamiento; para ello se realizaron pruebas de enfrentamientos y se realizó mediciones de crecimiento de diámetro de la colonia de los hongos a las 48, 72, 96 o hasta se unieran las dos colonias. Al finalizar la evaluación del crecimiento de ambos hongos, se midió la esporulación del patógeno utilizando un Hematocimetro.

Para realizar enfrenamiento entre FOC y *Trichoderma* se utilizó la técnica de cultivo dual, la cual consiste en una caja petri de 9cm con PDAA + antibiótico (Sulfato de streptomycin), se colocaron en un extremo un disco de 5cm con micelio de FOC y en el otro extremo un disco con micelio del antagonista (*Trichoderma* sp.). Como testigos se colocaron en cajas de Petri FOC en un extremo sin *Trichoderma* sp. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 27 °C 7 días o hasta el contacto físico de antagonista y patógeno.

Con los datos de crecimiento del patógeno y antagonista se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC) utilizando la siguiente fórmula  $PIC = (D1 - D2)/D1 \times 100$ , donde D1 es el diámetro de la colonia patógeno testigo y R2 es el diámetro menor del patógeno enfrentados. Para calcular el Porcentaje de Inhibición de

Esporulación (PIE) se utilizó fórmula  $PIC = (E1 - E2)/E1 \times 100$ , donde E1 es el esporulación de la colonia patógeno testigo y esporulación menor del patógeno enfrentados; formulas propuesta por Suárez, et al., (2008);

$$P_{Inhibición(\%)} = \frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \times 100$$

Dónde:

D.C.C = Diámetro de la colonia testigo patógeno.

D.C.P = Diámetro de la colonia patógeno con antagonista

En este ensayo se estableció bajo un diseño de experimento Completamente Aleatorizado con 8 tratamientos: 7 aislamientos de *Trichoderma* spp., contra uno de FOC más un testigo (Foc sin *Trichoderma* spp.), con tres repeticiones. Los datos tanto PIC como PIE, fueron analizados a través de un ANAVA y una comparación de medias de Tukey, a través del programa estadístico Infostad.

### Identificación del patógeno

Para la identificación del patógeno por técnicas convencional se utilizaron cultivos monosporicos para la identificación del patógeno por características culturales de la colonia y características macros y microscópicas y se compararon con el manual para *Fusarium*. Para el diagnóstico molecular FOC, se realizó la extracción de ADN de tejido vegetal con síntomas siguiendo protocolo de extracción del Kit de QGEN, junto con la técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) en punto final, utilizando los cebadores específicos descrito por de Li *et al.* 2013 y Dita *et al.* 2010. En estas pruebas se incluyeron controles para dar confiabilidad al diagnóstico tales como: Control positivo + :ADN FOC R4t Colombia, Control Negativo – absoluto: Mix PCR+ agua, Control de negativo: Mix +ADN de musáceas (planta sana ), Control de la reacción: Mix + ADN distinto musáceas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación del patógeno

**Sintomatología.** En una plantación de plátano ‘Hartón Gigante’ ubicada en la unidad de producción ubicada en el Sector el Mahomo II, Santa Cruz, Municipio José Ángel Lamas, estado Aragua Venezuela, se encontraron plantas presentado síntomas externos: inicio de amarillamiento en las hojas más viejas en la base del peciolo que se extiende por el borde de la hoja. Amarillamiento de las hojas más viejas hacia la más joven y posterior muerte de hojas, quedando colgadas en la planta como falda (síndrome de la hoja amarilla). Recortamiento de entrenudos, en algunos casos rajaduras en el pseudotallo, el síndrome de hoja verde; las hojas más viejas permanecen verdes

hasta que los peciolos se doblan y quedan colgando como una falda. Síntomas internos: de un corte longitudinal del pseudotallo: necrosis a lo largo de los haces vasculares de color vinotinto-rojizo, corte transversal puntos discontinuos color vinotinto-rojizo. En corte transversal de cormos infectados se observaron bandas de color marrón oscuro o negro en forma de media luna alrededor de tallo floral.

Al comparar la sintomatología encontrada en plantaciones de plátano en esta investigación y la reportada por la literatura, coinciden en lo señalado por Pérez-Vicente et al. (2014), quienes mencionan que la marchitez por fusarium y/o mal de Panamá en banano, causan síntomas típicos o clásicos como síndrome de hoja amarilla y síndrome de hoja verde. Además, dentro de los síntomas externos más característicos de la marchitez en banano causada por FOCR4T están; clorosis y amarillamiento de las hojas más viejas. Este amarillamiento por lo general inicia por el borde de la hoja y rajadura del pseudotallo. Cuando se hizo corte longitudinal del pseudotallo, se observaron lesiones rojizas a marrón en los haces vasculares.

**Identificación del patógeno por técnicas convencionales.** Del análisis de plantas con los síntomas de enfermedad, se aisló un hongo y se identificó por sus características morfológicas (tamaño y forma de conidios, macroconidios, conidiogoros y clamidosporias), y características culturales de la colonia (tasa de crecimiento y pigmentación) a *Fusarium oxysporum* sp f. *cubense*.

**Identificación molecular del patógeno.** Se evidencio la presencia de bandas de pesos moleculares 463 pb y 456pb, respectivamente que coinciden con los reportadas y descritas por y Dita et al. (2010) (superior) y Li et al. (2013) (inferior), dichas ampliaciones corresponden a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical raza 4 (Foc TR4). Estos resultados coinciden con Mejías et al. 2023 en cuanto a la presencia la FOCR4T en banano en Venezuela.

#### **Aislamiento del antagonista *Trichoderma* spp.**

De las muestras de suelo se lograron aislar 7 cepas de *Trichoderma* spp.; una de Mérida y 6 de Aragua (cuadro 1). Todas identificadas por las características morfológicas del hongo, estructuras reproductivas; micelio, conidióforos, conidios observadas al microscopio y por las características culturales de la colonia, utilizando las claves taxonómicas para el género *Trichoderma*.

**Cuadro 1.** Codificación de cepas de *Trichoderma* spp. y procedencia.

|   | <b>Código</b> | <b>Procedencia</b>               |
|---|---------------|----------------------------------|
| 1 | AGCTA         | Estado Aragua - Girardot         |
| 2 | AGTPA         | Estado Aragua - Girardot         |
| 3 | AGCT5         | Estado Aragua - Girardot         |
| 4 | AZPICU        | Estado Aragua - Zamora           |
| 5 | AZ27          | Estado Aragua - Zamora           |
| 6 | AL43          | Estado Aragua – José Ángel Lamas |
| 7 | MLTLB         | Estado Mérida                    |

### **Enfrentamiento *in vitro* entre *Fusarium* y *Trichoderma***

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. provienen de diferentes zonas del país, estos mostraron PIC entre 56,1 – 63,60 y PIE entre 70 – 92,8%. Según el análisis estadístico, se encontró que no hubo diferencias significativas entre tratamiento en ninguna de las variables evaluadas: PIC y PIE (Cuadro 2). Resultados parecidos a los encontrados en esta investigación están los de Taribuka et al. (2017), donde evaluaron cepas endófitas de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* mostrando PIC entre 49.67 y 60.61% concluyendo que no todas las cepas de *Trichoderma* son capaces de inhibir de la misma y por eso se obtienen diferentes porcentajes. Por su parte Bubici et. al. (2019), menciona que el género *Trichoderma* tiene varios mecanismos de acción; antibiosis, competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo frente a diferentes hongos fitopatógenos e inducen la resistencia de la planta. Género que resulta ser de los antagonistas con mayores habilidades biocontrolador de enfermedades de planta.

**Cuadro 2.** Porcentaje de inhibición (PIC) y Porcentaje de Inhibición de Esporulación (PIE) de FocR4T ante la presencia de aislamientos de *Trichoderma* spp. provienen de diferentes zonas del país.

| <b>Nº</b> | <b>TRATAMIENTOS</b> | <b>PIC</b> | <b>PIE</b> |
|-----------|---------------------|------------|------------|
| 1         | MIPLxAGCTA          | 56,05 b    | 69,93 b    |
| 2         | MIPLxMLTLB          | 62,27 b    | 79,84 b    |
| 3         | MIPLxAGT5           | 63,60 b    | 88,85 b    |
| 4         | MIPLxAGTPA          | 56,95 b    | 80,52 b    |
| 5         | MIPLxAZ27           | 58,72 b    | 92,80 b    |
| 6         | MIPLxAZPICU         | 59,25 b    | 85,25 b    |
| 7         | MIPLxAL43           | 57,17 b    | 92,45 b    |
| 8         | TESTIGO             | 0 a        | 0 a        |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). CV PIC=12,77. CV PIE=10,60

## CONCLUSIONES

La presente investigación muestra a 7 cepas de *Trichoderma* spp. con la capacidad de inhibir el crecimiento entre (PIC) 56,05 – 63,60 e inhibir la esporulación (PIE) entre 69,93 – 92,8% sobre FOCR4T aislado de plátano

## REFERENCIAS

1. Bubici, G., Kausahl, M., Prodigallo, M., Gómez, C. y Blanco J. 2019. Agentes de control biológico contra la marchitez por *Fusarium* del banano. *Fronteras en Microbiología*, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00616
2. Dita, M.A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I.W., Souza, M.T. and Kema, G.H.J. 2010. A molecular diagnosis for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology* 59: 348–357.
3. FAOSTAT. 2021. Estadísticas producción de plátano. <http://www.fao.org/faostat/es/> (consulta de junio 27, 2023).
4. INE (Instituto Nacional de Estadísticas). 2014. Encuesta de Seguimiento al Consumo de Alimentos. Venezuela. Disponible en [www.\[Consultado: junio 27 2023\].](http://www.ine.gov.ve/index.php?option=com_content&id=740&Itemid=38&tmpl=component)  
[http://www.ine.gov.ve/index.php?option=com\\_content&id=740&Itemid=38&tmpl=component](http://www.ine.gov.ve/index.php?option=com_content&id=740&Itemid=38&tmpl=component).
5. Li CY; Mostert G; Zuo CW; Beukes I; Yang QS; Sheng O; Kuang RB; Wei YR; Hu CH; Rose L; Karangwa P; Yang J; Deng GM; Liu SW; Gao J; Viljoen A; Yi GJ. 2013. Diversity and distribution of the banana wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense in China. *Fungal Genom Biol*, 3:111. <http://doi.org/10.4172/2165-8056.1000111>
6. Martínez-Solorzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Rodríguez, D., Jiménez, C., Rodríguez, Y., Rumbos, R., Pargas-Pichardo, R. E., Manzanilla, E. y Martínez, E. 2020. Análisis de la situación fitopatológica actual de las musáceas comestibles en Venezuela. *Agronomía Tropical* 70:1-20.
7. Mejías, R., Y. Hernández, F. Magdama, D. Mostert, S. Bothma, E. Paredes, D. Terán, E. González, R. Angulo, L. Angel, Y. Rodríguez, R. Ortega, A. Viljoen, E. Marys, Pérez-Vicente, L.; Dita, M.A.; Martínez de la Parte, E. 2014. Technical Manual for Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4). Prepared for the Regional Workshop on the Diagnosis of *Fusarium* Wilt (Panama disease) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4: Mitigating the Threat and Preventing its Spread in the Caribbean.
8. Pérez-Vicente, L., M. Dita, E. Martínez-de la Parte. 2014. Technical Manual Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt(Panama Disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4(TR4). [https://www.researchgate.net/publication/273632807\\_Technical\\_Manual\\_Prevention\\_and\\_diagnostic\\_of\\_Fusarium\\_WiltPanama\\_Disease\\_of\\_banana\\_caused\\_by\\_Fusarium\\_oxysporum\\_f\\_sp\\_cubense\\_Tropical\\_Race\\_4TR4](https://www.researchgate.net/publication/273632807_Technical_Manual_Prevention_and_diagnostic_of_Fusarium_WiltPanama_Disease_of_banana_caused_by_Fusarium_oxysporum_f_sp_cubense_Tropical_Race_4TR4).

9. Suárez, M., Carol, L., Fernández B., Reinel JV., Nelson, O, Gámez C., Rocío M., Páez R., Alberto R., (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, X (2) ,35-43.
10. Taribuka, J., Wibowo, A., Widyastuti, S. y Sumardiyono, C. (2017). Potencial de seis aislados endófitos de *Trichoderma* como agentes de biocontrol contra el marchitamiento por *Fusarium* en el banano. *Revista de gestión de terrenos degradados y mineros*, 4 (2). DOI:10.15243/jdmlm.2017.042.723