

Bioprospección de especies nativas de *Trichoderma*, como agente biocontrolador de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (FocR4T)

Jessica Rodríguez Escobar¹; Catherine Rodriguez Mogollon²; Monica Betancourt Vásquez³; Aslenis Melo Ríos²; Gustavo Adolfo Rodríguez Yzquierdo³

¹CI Tecnicas Baltime de Colombia S.A “Tebaco”. ²Universidad Popular del Cesar. ³Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria- Agrosavia.

*Autor de

Correspondencia:

Jessica Rodríguez Escobar
jrodriguez1@tebaco.com

Contribución:

Tecnológica

Sección:

Fitosanidad

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

16 Abril, 2024

Cita:

Rodríguez EJ, Rodríguez MC, Betancourt VM, Melo RA y Rodríguez YGA. 2024. Bioprospección de especies nativas de *Trichoderma*, como agente biocontrolador de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 Tropical (FocR4T). *Acorbat Revista de Tecnología y Ciencia* 1(1): 53
<https://doi.org/10.62498/AR.TC.2453>

RESUMEN

Establecer estrategias de manejo biológicas que permitan reducir y mitigar la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) raza 4 tropical en banano, ha sido uno de los temas de interés para la industria de banano y comunidad científica, en Colombia la presencia de este patógeno devastador se confirmó en 2019 en plantaciones de la Guajira, por tanto para obtener aislados nativos de *Trichoderma*, se tomaron 250 muestras de suelo rizosférico y se sembraron en medio PDA, en total se obtuvieron 20 aislados de *Trichoderma*, de los cuales seis aislados (Th1, Th2, Th3, Th4, Th5, Th6) se evaluaron mediante la técnica de enfrentamiento doble frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) raza 1, encontrando diferencias estadísticas entre los aislados siendo Th2 y Th4 los que presentaron mayor porcentaje de inhibición del patógeno 93,6% y 92,3 % respectivamente, a partir de esta prueba seleccionaron los cuatro aislados de *Trichoderma* que presentaron porcentajes de inhibición de FocR1 superiores al 87% (Th1, Th2, Th4, Th6) para evaluar mediante prueba de enfrentamiento doble con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (Foc R4T), obteniendo porcentajes de inhibición de superiores al 80%, a estos aislados se les realizó ANOVA y Tukey, encontrando diferencias significativas entre los aislados, estos cuatro aislados fueron caracterizados molecularmente encontrándose 98,78% a 100 % de similitud con *T. asperellum*, así mismo los cuatro aislados fueron sometidos a fermentación sólida y evaluación de viabilidad (germinación y concentración de conidios) en el tiempo, los resultados de esta prueba fueron sometidos a análisis de regresión lineal múltiple, encontrando que existe una fuerte correlación de los días después del almacenamiento (DDA) y el % de germinación, además con el desarrollo de esta investigación se logró registro ICA como productor del bioinsumo *T. asperellum* para uso agrícola.

Palabras clave: *Trichoderma*, actividad antagónica, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* R4T, inhibición, germinación, Fitosanidad.

ABSTRACT

Establish biological management strategies to reduce and mitigate wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) tropical race 4 in bananas, has been one of the topics of interest



for the banana industry and scientific community, in Colombia the presence of this devastating pathogen is granted in 2019 in plantations of La Guajira, therefore to obtain isolates native *Trichoderma*, 250 rhizospheric soil samples were taken and planted in PDA medium, a total of 20 *Trichoderma* isolates were acquired, of which six isolates (Th1, Th2, Th3, Th4, Th5, Th6) were evaluated using the technique double challenge against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) race 1, finding statistical differences between the isolates, being Th2 and Th4 those that appeared the highest percentage of inhibition of the pathogen 93.6% and 92.3% respectively, from this test they selected the four *Trichoderma* isolates that appeared FocR1 inhibition percentages greater than 87% (Th1, Th2, Th4, Th6) to be evaluated by double challenge test with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (Foc R4T), obtaining inhibition percentages higher than 80%, ANOVA and Tukey were performed on these isolates, finding significant differences between the isolates, these four isolates were molecularly characterized, finding 98.78% to 100% of similarity with *T. asperellum*, likewise the four isolates were subjected to solid fermentation and viability evaluation (germination and concentration of conidia) over time, the results of this test were subjected to multiple linear regression analysis, finding that there is a strong connections of the days after storage (DDA) and the germination %, in addition with the development of this research the ICA registry as a producer of the bio-input *T. asperellum* for agricultural use will be respected

Keywords: *Trichodema*, antagonistic activity, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4, phytosanitary.

INTRODUCCIÓN

El banano se encuentra dentro de las frutas más se consume a nivel mundial, y junto al plátano, son el alimento básico de aproximadamente 400 millones de personas a nivel mundial (Dita et al., 2018), el área sembrada de banano se ha incrementado cada año, y para el 2070 se espera un incremento del 50 % del área sembrada, en los países tropicales y subtropicales (Bubici et al., 2019). Colombia se encuentra dentro de los diez países productores de banano a nivel mundial, siendo fundamental para la economía del país la industria (Rodriguez et al., 2023). Sin embargo, este cultivo se encuentra amenazado por diversos problemas fitosanitarios como, Sigatoka negra, Moko y Marchitez ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (Foc R4T) (Dita et al., 2018). En Colombia fue reportado por primera vez en 2019 (Garcia et al., 2019) y la llegada de *Foc* R4T, al continente americano, activo las alarmas no solo en Colombia, donde la enfermedad aún se considera cuarentenaria y distribución restringida, sino a nivel regional, ya que se encuentran siete de los 10 principales países exportadores de banano. (Izquierdo et al., 2021)

Esta enfermedad se encuentra clasificada dentro de las diez enfermedades vegetales más importantes en la historia de la agricultura, así como la más letal del cultivo de banano, ya que no existe control químico eficiente, y el hongo genera estructuras de resistencia (clamidosporas) que pueden permanecer en el suelo durante muchos años (Dita et al., 2018).

Dentro de las estrategias de manejo de la marchitez en banano se plantea el uso de agentes biocontroladores (Prigigallo et al., 2022). *Trichoderma* se encuentra dentro de los agentes biocontroladores más exitosos en la agricultura, y de mayor uso, debido a que forma parte de más del 60% de los insumos biológicos registrados y se puede encontrar en el mercado como biofungicida (controlador de hongos fitopatógenos) o bioestimulante (puede promover el crecimiento vegetal por la producción de auxinas y ácidos orgánicos que favorecen la solubilización de nutrientes). (Bader et al 2020) así mismo algunas especies de *Trichoderma* han sido reportadas como, útiles para contrarrestar el efecto de *Foc* R4T (Rahman et al., 2021), El presente estudio tiene como objeto, seleccionar especies nativas de *Trichoderma* que sean eficientes en el control de patógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (*Foc*R4T), mediante su aislamiento, identificación, prueba de antagonismo vitro, caracterización molecular y capacidad de escalonamiento para producción comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la determinación de la capacidad antagónica de especies de *Trichoderma* sobre *Foc* raza 1 y *Foc* R4T, se realizaron muestreos de campo para la obtención de cepas nativas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelo rizosférico fincas de banano ubicadas en departamento del Magdalena, se colectaron 250 muestras y se seleccionaron 6 aislados de *Trichoderma* para las pruebas de antagonismo

Aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 1 y Raza 4 Tropical (*Foc* R4T). Para las pruebas de antagonismo en condiciones *in vitro* se emplearon aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y raza 4 tropical (*Foc* R4T) perteneciente al banco de hongos de AGROSAVIA CI Tibaitatá.

Determinación de la capacidad antagónica de las especies de *Trichoderma* aisladas Frente a *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* en condiciones *in vitro*. La prueba de antagonismo frente a *Fusarium oxysporum* raza 1, se realizó en el laboratorio de insumos de CI Técnicas Baltime. En esta prueba se evaluaron seis aislados de *Trichoderma* (Th1, Th2, Th3, Th4, Th5 y Th6).

El montaje de la prueba frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4, se realizó en el laboratorio de patógenos cuarentenarios de CI AGROSAVIA, Tibaitatá, y para esta prueba se evaluaron los aislados de *Trichoderma* que presentaron porcentaje de inhibición superior al 87% frente a *Fusarium oxysporum* raza 1. Para ambas pruebas se siguió la metodología de Izquierdo et al 2020, que consiste en pruebas de doble enfrentamiento, donde el patógeno se coloca en el centro y el biocontrolador en los dos extremos, Se realizaron cinco repeticiones con 5 réplicas por tratamiento, para un total de 25 cajas por tratamiento. Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno se empleó la fórmula de Singh et al 2009.

$$PI = \frac{[(a - b)]}{a} * 100$$

Donde,

PI= Porcentaje de inhibición de crecimiento diametral

a = crecimiento diametral de la colonia del patógeno en el control

b = crecimiento diametral de la colonia del patógeno expuesto al tratamiento del agente de control biológico.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el paquete R, realizando comparación de medias de porcentaje de inhibición de micelio obtenido en cada tratamiento mediante ANOVA unidireccional y prueba Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siete días después del montaje de la prueba se realizó la medición del crecimiento de las cepas empleando un calibrador pie de rey; encontrándose porcentaje de inhibición entre 83 y 93 % frente a FocR1, siendo los aislados Th2 y Th4 los de mejor inhibición con valores de 93,6% y 92,3% respectivamente. Por su parte, el aislado Th5 presentó el porcentaje de inhibición más bajo con 83,2%, como se observa en la Figura 1. Los datos experimentales se analizaron estadísticamente (Cuadro 1).

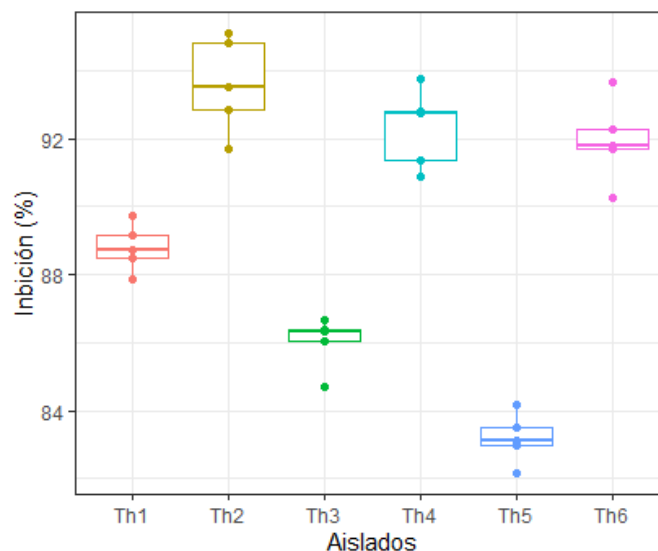


Figura 1. Efecto antagónico de diferentes aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* raza 1, *in vitro*.

Cuadro 1. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de seis aislados de *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum* raza 1.

	Df	Sum sq	Mean sq	F value	Pr(>F)
Aislados	5	413,5	82,71	76,83	5,7E-14 ***
Residuals	24	25,8	1,08		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Siendo $p\text{-value} < 0,05$, se rechaza la hipótesis nula, indicando que existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente a Foc Raza 1. Así mismo la prueba post-hoc de Tukey (Figura 2), permite observar las diferencias de las medias estadísticas mediante el agrupamiento de los tratamientos.

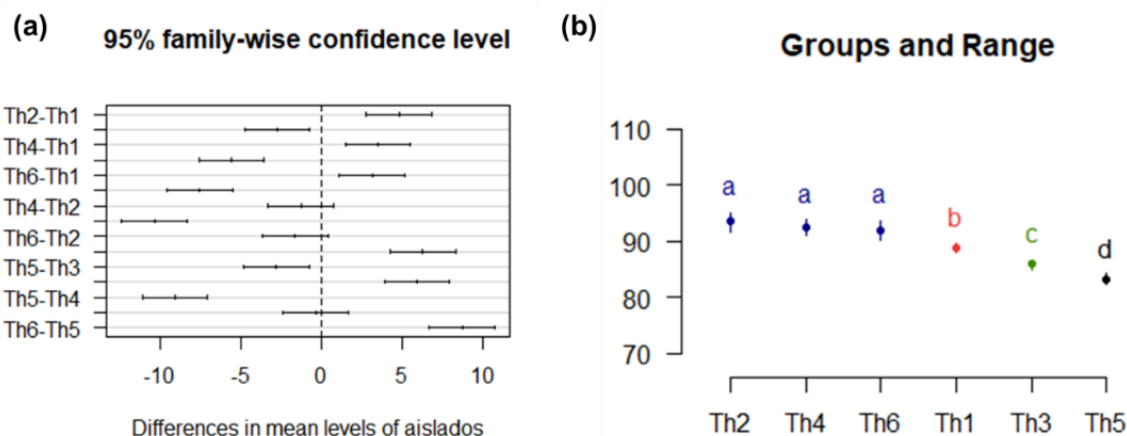


Figura 2. Prueba de post-hoc de Tukey para el porcentaje de inhibición de FocR1 obtenido con cada aislado de *Trichoderma* evaluado.

De la comparación de medias pareadas del gráfico 2a, se puede concluir que no existe diferencia significativa entre Th2-Th4, Th2-Th6 y Th4-Th6. Así mismo, se observa que la inhibición de las cepas de *Trichoderma* Th1, Th3 y Th5 presentan diferencias significativas con respecto al total de aislados, siendo Th3 y Th5 las de menor inhibición con un porcentaje inferior al 87%.

Especies de *Trichoderma* aisladas frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (FocR4T)

De los resultados de antagonismo obtenidos frente a FocR1, se seleccionaron los aislados con inhibición superior al 87%, correspondientes a los tratamientos (Th1, Th2, Th4 y Th6) y se determinó el porcentaje de inhibición de FocR4T en interacción con cada uno de los aislados de *Trichoderma* (Figura 3).



Figura 3. Actividad antagónica de cuatro aislados de *Trichoderma*, en doble prueba de confrontación contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Raza 4, tropical, 8 días después de la siembra. Nota: Crecimiento control de Foc R4T y en interacción con cuatro aislados de *Trichoderma*.

En la Figura 4, se evidencia que los cuatros aislados presentaron porcentajes de inhibición superiores al 80% para el caso de Th1 y Th6 el promedio del porcentaje de inhibición fue de 84%, y para el caso de Th2 y Th4 el porcentaje de inhibición se encuentra en rango de 85 y 87%, respectivamente. Estos datos fueron sometidos a análisis estadísticos, para validar si existen diferencias entre los aislados de *Trichoderma* frente a FocR4T.

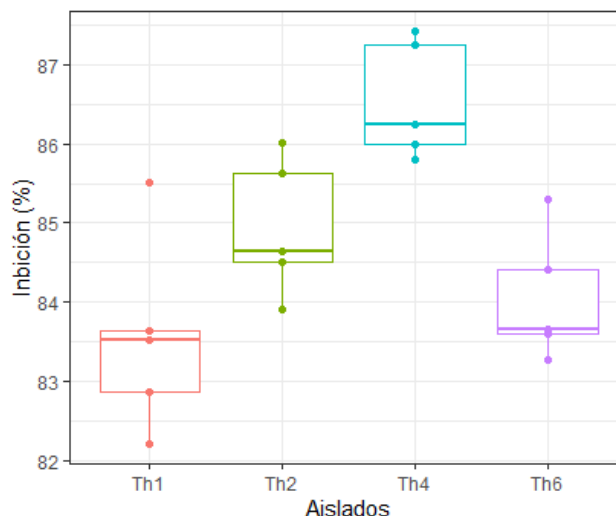


Figura 4. Efecto antogonico de diferentes aislados nativos de *Trichoderma asperellum* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* FocR4T, *in vitro*.

Cuadro 2. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de los aislados cuatro aislados de *Trichoderma* frente Foc R4T

Analysis of variance (ANOVA)						
	Df	Sum sq	Mean sq	F value	Pr(>F)	
Aislados	3	25,92	8,640	9,897	0,000626	***
Residuals	16	13,97	0,873			
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Dado que el p-value < 0,05, se evidencia que existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de los aislados de *Trichoderma* frente FocR4T.

La prueba post-hoc de Tukey (figura 5), permite observar que las diferencias significativas se presentan entre los aislados Th1-Th4 y Th4-Th6, lo cual guarda relación con el agrupamiento del gráfico 5b. Así mismo, se evidencia que la cepa de

Trichoderma Th4, presenta el mayor porcentaje de inhibición frente a FocR4T. Sin embargo, el agrupamiento permite concluir que el total de aislados fueron efectivos en la inhibición del patógeno de estudio.

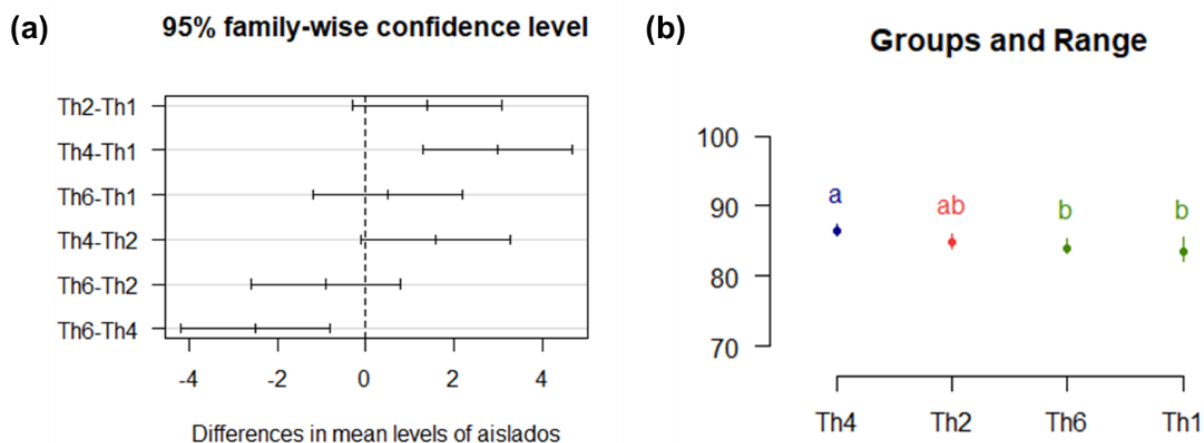


Figura 5. Prueba de post-hoc de Tukey para el % de inhibición de Foc R4T obtenido con cada aislado de *Trichoderma* evaluado. *Nota:* en la prueba de post.hoc de Tukey se puede observar que existen diferencias estadísticas entre las medias de los % de inhibición obtenido por cada tratamiento evaluado.

Estos resultados se asemejan a los resultados de un estudio realizado en Malasia por Rahman et al 2021, quienes en prueba de enfrentamiento dual encontraron que tres aislamientos de *Trichoderma asperellum* B1902 (84,85%), T2007 (77,78% y C1667 (75,76%), presentaron altos porcentajes de inhibición de crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* aislado 9888. Así mismo, Chand et al 2021, evaluaron cuatro agentes de biocontrol aislado en la India para el control de FocR4T en condiciones in vitro a través de prueba de enfrentamiento dual y diez días después del montaje, encontraron que el mayor porcentaje de inhibición sobre el control lo registraron dos cepas de *Trichoderma asperellum* 1 (Tr1) y *Trichoderma asperellum* 2 (Tr2) con porcentajes de 64,82% y 62,70% respectivamente, mientras que los porcentajes de inhibición más bajos los obtuvieron con *Aspergillus flavus* (35,00%) y mínima en *Penicillium chrysogenum* (22,62%).

En Filipinas Catambacan (2021), determinó la actividad antagónica de hongos endófitos aislados de malezas que crecen en fincas bananeras Cavendish contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 (FocR4T), con una alta actividad inhibidora en pruebas de enfrentamiento dual y obteniendo un porcentaje de inhibición del patógeno de 87% con aislado endófito de *Trichoderma asperellum*.

REFERENCIAS

1. Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Cabanás, C. G. L., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
2. Catambacan, D. G., & Cumagun, C. J. R. (2021). Weed-associated fungal endophytes as biocontrol agents of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense TR4 in cavendish banana. *Journal of Fungi*, 7(3), 224.
3. Chand, K., Singh, S. K., Meena, R., Nain, Y., & Verma, S. (2021). Antagonistic Effects of Different Soil Isolate Bio-agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense TR4 In vitro and Molecular Characterizations. *Journal of Experimental Agriculture International*, 43(12), 29-36.
4. Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science*, 871(October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
5. García-Bastidas, F. A., Quintero-Vargas, J. C., Ayala-Vasquez, M., Schermer, T., Seidl, M. F., Santos-Paiva, M., Noguera, A. M., Aguilera-Galvez, C., Wittenberg, A., Hofstede, R., Sørensen, A., & Kema, G. H. J. (2020). First report of *Fusarium* Wilt Tropical race 4 in Cavendish Bananas Caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. In *Plant Disease* (Vol. 104, Issue 3). <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>
6. Izquierdo-García, L.F.; Carmona, S.L.; Zuluaga, P.; Rodríguez, G.; Dita, M.; Betancourt, M.; Soto-Suárez, M. Efficacy of disinfectants against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 isolated from La Guajira, Colombia. *J. Fungi* 2021, 7, 297. <https://doi.org/10.3390/jof7040297>.
7. Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., Mercado-Blanco, J., & Bubici, G. (2022). Designing a synthetic microbial community devoted to biological control: The case study of *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 13, 967885.
8. Rahman, S. S. M. S. A., Zainudin, N. A. I. M., & AZIZ, N. A. A. (2021). Evaluation of *Trichoderma asperellum* B1902 in Controlling *Fusarium* Wilt of Cavendish Banana Cultivar. *Sains Malaysiana*, 50(9), 2549-2561.
9. Rodríguez-Yzquierdo, G., Olivares, BO, Silva-Escobar, O., González-Ulloa, A., Soto-Suarez, M., & Betancourt-Vásquez, M. (2023). Mapeo de la susceptibilidad de las tierras musáceas colombianas a una enfermedad mortal: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4. *Horticulturae*, 9 (7), 757.
10. Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F., & Consolo, V. F. (2020). Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 867–873