

ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. EN HONGOS ASOCIADOS AL DAÑO DE *Diatraea saccharalis* Fabricius. (LEPIDOPTERA : CRAMBIDAE) EN MAIZ

(*ANTAGONISM OF Trichoderma* spp. IN FUNGI ASSOCIATED WITH DAMAGE OF *Diatraea saccharalis* Fabricius. (LEPIDOPTERA : CRAMBIDAE) IN CORN

José Luis Arispe V.¹, Abiel Sánchez A.^{1*}, Ma. Elizabeth Galindo C.¹, Mario Ernesto Vázquez B.¹, Arnoldo Oyervides G.¹, Raúl Rodríguez G.²

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México.

²INIFAP General Terán, Nuevo León, México.

*Autor para correspondencia: abielsanchez@hotmail.com

RECIBIDO: 20 de Julio de 2019

APROBADO: 24 de Septiembre de 2019

DOI: 10.22370/bolmicol.2019.34.2.1802

LOS AUTORES DECLARAN NO TENER CONFLICTO DE INTERESES

Palabras claves: Capacidad; Hongos; Software; Fórmula; Maíz.

Key words: Capacity; Fungi; Software; Formula; Corn.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo, fue evaluar *in vitro*, mediante cultivo dual la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma asperellum* T11, *Trichoderma harzianum* T1 4, y *Trichoderma longibrachiatum* T1 40 sobre hongos asociados; *Alternaria arborescens*, *Bipolaris shoemakeri*, *Bipolaris victoriae*, *Epicocum sorghinum*, *Exserohilum longirostratum*, *Fusarium brevicatenuatum*, *Penicillium polonicum*, *Phaeocytostroma ambiguum* y *Fusarium equiseti*, el muestreo se realizó en Tepalcingo, Morelos en tallos de maíz y el experimento se estableció en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el mes de abril de 2018. La evaluación se realizó bajo un diseño factorial AxB,

con nueve niveles en A y tres en B con cuatro repeticiones por tratamiento, siendo A las cepas de hongos fitopatógenos y B las tres cepas de *Trichoderma*, se colocó en el extremo de la placa de Petri un explante de PDA con micelio de *Trichoderma* spp. de 5 mm de diámetro, y en el extremo opuesto un explante del hongo fitopatógeno, las siembras fueron incubadas a 25 ± 2 °C por 120 h, evaluándose las medias del Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento del Micelio (PICM) mediante la fórmula de Fakhrunnisa modificada y se determinó el área de desarrollo de los hongos mediante el software GeoGebra Classic versión 5.0.473.0-d, los resultados se analizaron con el programa (FAUANL) versión 2.5, mediante Tukey con nivel de significancia de 0.05, con efectos de antagonismo mayores del 67.74%.

ABSTRACT

The objective of the present work, was to evaluate *in vitro*, by dual culture, the antagonistic capacity of the strains of *Trichoderma asperellum* T11, *Trichoderma harzianum* T1 4, and *Trichoderma longibrachiatum* T1 40 on *Alternaria arborescens*, *Bipolaris shoemakeri*, *Bipolaris victoriae*, *Epicocum sorghinum*, *Exserohilum longirostratum*, *Fusarium brevicatenulatum*, *Penicillium polonicum*, *Phaeocystostroma ambiguum* and *Fusarium equiseti*, the sampling was done in Tepalcingo, Morelos in corn stalks and the experiment was established in the Phytopathology laboratory of the Antonio Narro Autonomous Agrarian University in the month of April 2018. The evaluation was carried out under an AxB factorial design, with nine levels in A and three in B with four repetitions per treatment, being A the strains of phytopathogenic fungi and B the three strains of *Trichoderma*, was placed at the end of the Petri dish a explant of PDA with mycelium of *Trichoderma* spp. 5 mm in diameter, and at the opposite end an explant of the phytopathogenic fungi, the sowings were incubated at 25 ± 2 ° C for 120 h, evaluating the means of the Percentage of Mycelium Growth Inhibition (PICM) using the Fakhrunnisa formula modified and the fungi development area was determined using GeoGebra Classic software version 5.0.473.0-d, the results were analyzed with the program (FAUANL) version 2.5, using Tukey with a significance level of 0.05, with greater antagonism effects 67.74%.

INTRODUCCIÓN

El maíz tiene para México una importancia económica y cultural, debido a que gran parte de la fuerza laboral campesina se dedica al cultivo del grano y su consumo. Más allá de la contribución a la dieta, tiene origen en las tradiciones y costumbres que conforman una cultura ancestral¹.

En el año agrícola 2017, la producción de maíz grano en México fue de 27,762,480.90 t², sin embargo, las pérdidas provocadas como daño indirecto de *Diatraea saccharalis* alcanzan en promedio una disminución del rendimiento de 9.6%³, si se toma el 9.6% de pérdidas como referencia, durante el 2017 se perdieron 2,665,198.1664 t por este insecto.

Las pérdidas en el rendimiento de maíz debido a las enfermedades en los Estados Unidos y Ontario, Canadá del año 2012 al 2015 variaron del 2 al 15%⁴, en este caso la pudrición del tallo (*Fusarium verticillioides*) es la quinta o sexta causa más importante de pérdida de rendimiento relacionados con enfermedades, mientras que la pudrición de la mazorca (*Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp.) se clasificó como la principal que causó la pérdida de rendimiento en el año 2012. En general, el total estimado de pérdidas económicas debidas a las enfermedades durante los cuatro años fueron de 27.4 millones de dólares⁵.

El control biológico de hongos mediante *Trichoderma* spp. puede ser una posibilidad viable y eficiente⁶. Los avances han demostrado el efecto de *Trichoderma* en plantas, incluyendo inducción sistémica o resistencia localizada, en adición para la inducción de rutas de resistencia en la planta, incrementa el crecimiento y disponibilidad de nutrientes, en maíz incrementa la respuesta al crecimiento en genotipos específicos⁷. Reportaron que *T. asperellum* induce resistencia sistémica en plantas de pepino mediante elevado nivel de etileno y ácido jasmónico, teniendo efecto protector contra *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*⁸.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras vegetales

El muestreo se realizó en el Ejido el Marranero ubicado en Tepalcingo Mérolos cuyas coordenadas son 18°37'39.9" N 98°52'08.0" W del 3

al 6 de febrero del 2018, en un cultivo de maíz de 160 días. Se recolectaron larvas del barrenador del tallo de diferentes estadios, colocándolas en pequeños frascos, para luego llevarlas al Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para su posterior identificación, mediante las claves taxonómicas de la Universidad de Florida⁹, se muestrearon los cuatro genotipos siendo H-515, Zapata 7, H-507 y un Criollo con 20 repeticiones cada uno y se eligieron al azar 10 plantas por repetición, se prosiguió a cortar cada tallo de forma longitudinal y con esto se observó si el daño estaba o no presente por *D. saccharalis*, y de los tallos dañados se extrajeron pequeños cortes de 10 cm, los cuales fueron puestos en bolsas y éstas se identificaron de acuerdo al genotipo, para su traslado al laboratorio de fitopatología del Departamento de Parasitología en la UAAAN para su posterior análisis.

Aislamiento de los hongos fitopatógenos

Las muestras de tallos se llevaron a una campana de flujo laminar y con ayuda de un bisturí se hicieron cortes de ± 1 cm (tejido dañado y sano), se lavaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min, se retiraron y después se enjuagaron por tres veces durante 1 min en agua destilada estéril, y con una pinza estéril se colocaron cuatro cortes de manera equidistante por cada placa Petri con medio de cultivo PDA, sellándose las placas con cinta clean pack y llevándolas a una incubadora a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 días.

De cada colonia de hongos que creció por cada placa de Petri con los cuatro cortes, con la ayuda de un sacabocados estéril se retiró un explante y se transfirió a una nueva placa de Petri con PDA sintético, las cuales se sellaron con cinta clean pack y se llevaron a una incubadora a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 días.

Identificación

La identificación de los hongos se hizo micro y macroscopicamente, mediante claves taxo-

nómicas¹⁰ y un microscopio compuesto (Olympus CX21LED) con los objetivos 5x, 10x, 40x y 100x, debido a poca esporulación de los hongos se realizaron análisis moleculares en el Laboratorio Gisena Texcoco, en donde se extrajo ADN de los hongos, utilizando cultivo monospórico y para la amplificación de la región ITS4 e ITS5 se utilizaron los iniciadores ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC) e ITS5 (5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG) y posteriormente secuenciándose en el centro de investigación y de estudios avanzados del IPN unidad Cinvestav Irapuato y las secuencias obtenidas se analizaron en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para secuencias altamente similares.

Antagonismo de *Trichoderma* spp. en hongos asociados al daño de *D. saccharalis* en cultivo dual

El experimento se estableció en un diseño factorial AxB, nueve niveles en A y tres en B con cuatro repeticiones por tratamiento, siendo A las cepas de fitopatógenos y B las cepas de *T. asperellum* T11, *T. harzianum* T1 4, y *T. longibrachiatum* T1 40 (Figura 1), colocándose en el extremo de la placa de Petri un explante de PDA con micelio de *Trichoderma* spp. de 5 mL de diámetro, y en el extremo opuesto un explante del hongo fitopatógeno, las siembras fueron incubadas a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y evaluadas diariamente cada 24 h hasta las 120 h. Las medias de Porcentaje de Inhibición en el Crecimiento del Micelio (PICM) mediante la fórmula de Fakhrunnisa¹¹, en este caso modificada, se determinó el área de desarrollo de los hongos mediante el software GeoGebra Classic versión 5.0.473.0-d¹² (Figura 2 y 3), los resultados se manejaron en términos de porcentaje y se ajustaron mediante la transformación del arco seno de la raíz cuadrada y se analizaron con el programa (FAUANL) versión 2.5¹³, mediante Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

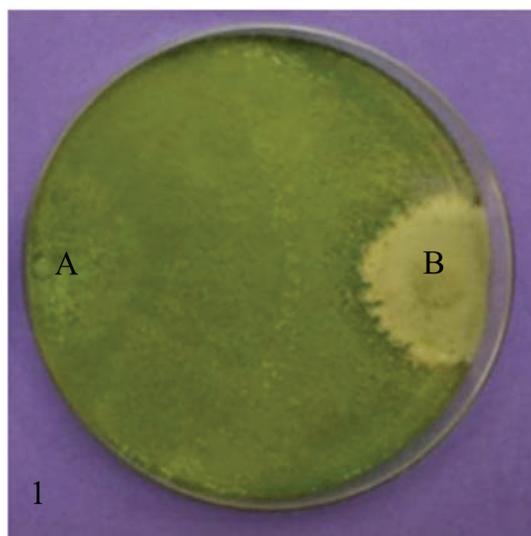
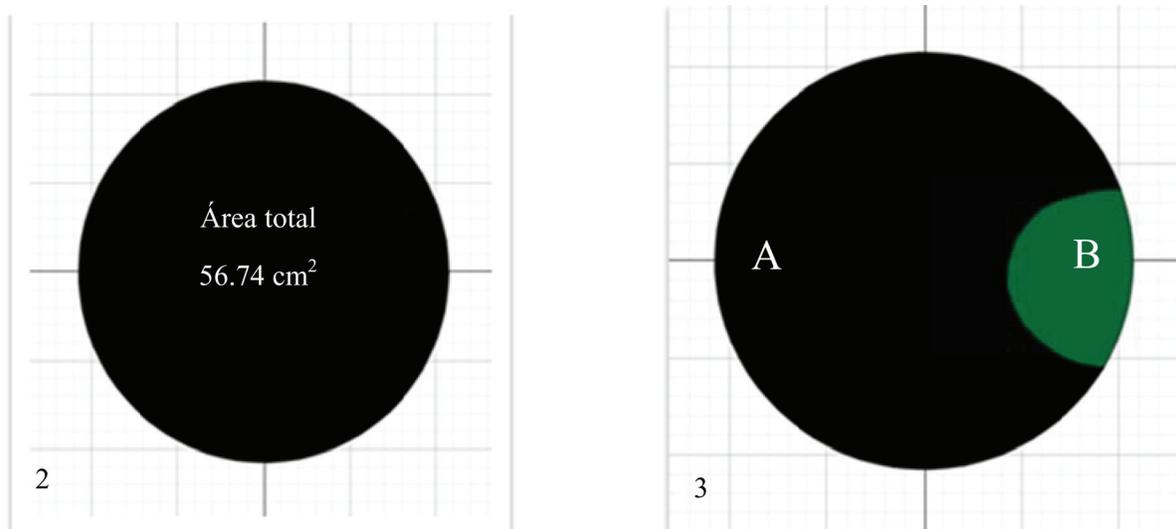


Figura 1. Cultivo dual real, **A-** *T. longibrachiatum*, **B-** *E. sorghinum*



Figuras 2 y 3. 2. Área total de la placa de Petri; 3. Área del desarrollo de los hongos digitalizada en el software GeoGebra, **A-** *T. longibrachiatum*, **B-** *E. sorghinum*.

$$I = (R1 - R2) / R1 * 100$$

Formula de Fakhrunnisa

$$I = (A1 - A2) / A1 * 100$$

Formula de Fakhrunnisa modificada

Donde:

I = Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio

R1 = Crecimiento radial del hongo asociado sobre el lado opuesto, evaluado en la placa de Petri

R2 = Crecimiento radial del patógeno en enfrentamiento

A1 = Área del hongo asociado sobre lado opuesto evaluado en la placa de Petri

A2 = Área del patógeno en enfrentamiento

RESULTADOS

La identificación de los hongos fitopatógenos asociados

Las cepas de hongos obtenidas e identificadas se obtuvieron mediante secuenciación de la región intergénica ITS1 e ITS4, las secuencias obtenidas comparadas en BLAST dieron como resultado a las siguientes especies de hongos (Tabla 1).

Antagonismo de *Trichoderma* spp. en hongos asociados al daño de *D. saccharalis* en cultivo dual

Las tres especies de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos en porcentajes del 67.74 al 87.56% (Figura 4), con coeficiente de variación del 3.61% no encontrándose diferencia estadística entre las especies de *Trichoderma* $P > 0.592$, sobresaliendo *T. longibr-*

chiatum T1 40 con una media de 75.77, pero sí hubo diferencia en el área de control de los hongos fitopatógenos $P > 0.000$ (Figura 4), en donde se muestran cinco grupos estadísticos, existiendo interacción entre los factores A y B, es decir, las tres cepas de *Trichoderma* inhiben mayor a *B. shoemakeri*, con una media de 87.56, de modo similar reportan un 67.1% de inhibición in vitro de *Bipolaris oryzae* por *T. harzianum*¹⁴. Igualmente reportan porcentajes de inhibición de 60 a 92%¹⁵, midiendo con el área de desarrollo de las confrontaciones en el medio de cultivo PDA para evaluar la inhibición de los aislamientos nativos de *Trichoderma* vs *T. harzianum*, cepa T22, esto debido a los diferentes mecanismos de acción antagonista de *Trichoderma*, antibiosis, competencia, micoparasitismo, desactivación de enzimas de los patógenos¹⁶, y en este caso sobresaliendo la competencia por nutrientes, la velocidad de esporulación y crecimiento.

Tabla 1. Identificación de Hongos.

Hongo	Llave de acceso	Máximo puntaje	% de identidad
<i>Bipolaris victoriae</i>	NR_147489.1	992	99.27%
<i>Alternaria arborescens</i>	MH145449.1	983	100.00%
<i>Fusarium equiseti</i>	MG897463.1	933	99.80%
<i>Bipolaris shoemakeri</i>	KX452453.1	992	99.10%
<i>Phaeocytostroma ambiguum</i>	FR748044.1	1000	99.82%
<i>Penicillium polonicum</i>	KX610157.1	1003	99.82%
<i>Epicoccum sorghinum</i>	MG969893.1	913	99.80%
<i>Exserohilum rostratum</i>	LT837830.1	1044	100%
<i>Fusarium brevicatenulatum</i>	GU205411.1	894	97.51%

En la literatura se reportan datos positivos donde evaluaron el porcentaje de antagonismos *in vitro*¹⁷ midiendo el crecimiento radial del fitopatógeno confrontado con el antagonista, teniendo resultados de inhibición in vitro en cultivos duales de 66.6% para *Sclerotium rolfsii*, 56.7% para *F. solani* y 30.9% para *F. oxysporum* utilizando *T. harzianum*, en el mismo sentido mencionan que *T. harzianum* mostró una inhibición

de 88% sobre *Rhizoctonia solani* en cultivos duales¹⁸, siendo todos estos resultados positivos para *Trichoderma*, esto podría ser debido a los diferentes mecanismos de acción entre especies, por ejemplo: alta producción de enzimas degradadoras, siendo un gran competidor de nutrientes y espacio, dentro de los nutrientes principalmente por carbono, nitrógeno y hierro, de la misma manera reportan que *Trichoderma* spp. generan

enzimas, como glucanasas, quitinasas, celulasas, proteasas y amilasas, que les dan una alta capacidad para dañar o destruir la pared celular de distintos hongos fitopatógenos^{19, 20}. *T. longibrachiatum* coloniza toda la superficie del medio en

una placa de Petri y reduce la colonia del patógeno en cultivo dual²¹, sin embargo, la importancia de *T. longibrachiatum* ha sido cuestionada, debido que su uso puede representar un grave peligro para la salud de las personas^{22, 23}.

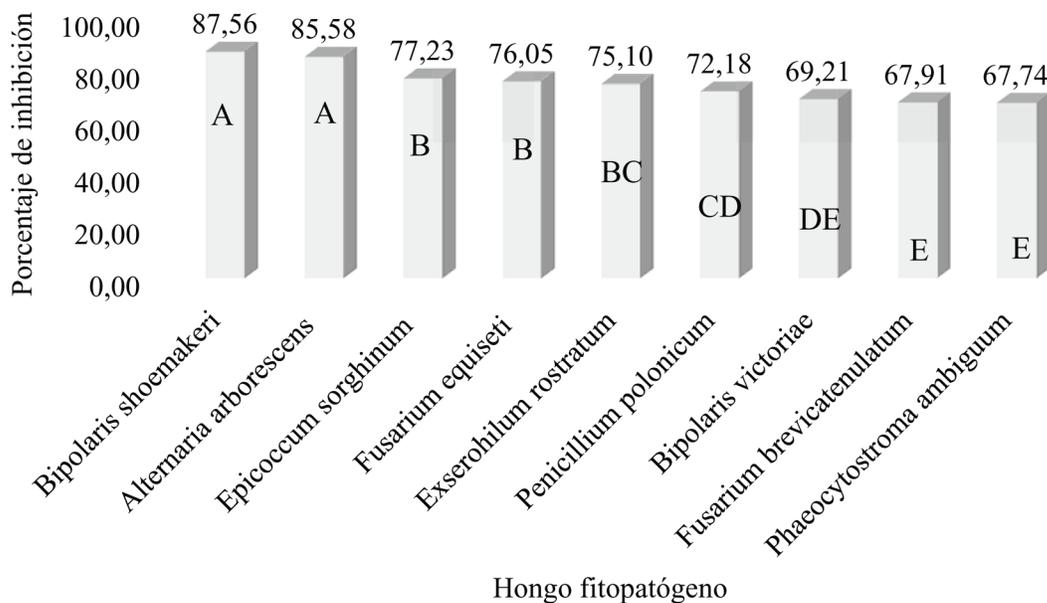


Figura 4. Porcentaje de inhibición en los hongos fitopatógenos. Letras iguales no son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

CONCLUSIONES

- El antagonismo por parte de *Trichoderma* en cultivo dual con cepas de hongos asociados al daño de *D. saccharalis* fue mayor del 67.79%.
- Presentaron una media de inhibición de 75.18, 75.22 y 75.77, *T. asperellum* T11, *T. harzianum* T1 4 y *T. longibrachiatum* T1 40 respectivamente.
- La cepa que inhibe mayor a los hongos fitopatógenos en estudio fue *T. longibrachiatum* T1 40,

probablemente se debe a que esta cepa en comparación con las otras, coloniza la superficie del medio de cultivo en placa de Petri más rápido, limitando el desarrollo de los hongos fitopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y al Laboratorio Gisena, Texcoco por su apoyo.

REFERENCIAS

1. **FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura.** Programa Agroalimentario Maíz 2016 [Internet]. México: FIRA; 2016 [Citado 2 Feb 2019]. _Disponible_en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2016.pdf
2. **SIAP.** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [Internet]. México: Gobierno de México [citado 21 mar 2019]. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola [aprox. 1 pantalla]. Disponible en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
3. **Leiva, D. y Iannone N.** Bioecología y daños del barrenador del tallo *Diatraea saccharalis* Fab. en maíz. 1993. Carpeta de producción vegetal. INTA, Maíz, Pergamino. Bs As. XII (113). pp 5
4. **Munkvold, G. P. and White, D. G.** Compendium of Corn Diseases. 4th edition. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 2016.
5. **Mueller, D., Wise, K., Sisson, A., Allen, T., Bergstrom, G., Bosley, D., et al.** Corn Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada from 2012 to 2015. Plant Health Progress.2016; 17: 211-222.
6. **Papavizas, G. C. and Lumdsen, R. D.** Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Plant Disease. 1982; 66(11): 1019-1020.
7. **Harman, G. E.** Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 2016; 96(2):190-194.
8. **Shoresh, M., Yedidia, I. and Chet, I.** Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. Phytopathology. 2005 95(1):76-84.
9. **UF, Universidad de Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences** [Internet]. Florida: UF/IFAS; c2001 [actualizado Jun 2019; citado 10 may 2019]. Feature Creatures, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae) [aprox. 1 pantalla]. Disponible en: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/sugarcane_borer.htm.
10. **Barnett, H. y Hunter B.** Illustrated genera of imperfect fungi. 3a edition. Lincoln United Kingdom: Burgess Publishing Company, 1972.
11. **Fakhrunnisa, H. and Ghaffar, A.** *In vitro* interaction of *Fusarium* spp., with other fungi. Pak. J. Bot. 2006; 38(4): 1317-1322.
12. **GeoGebra** [internet]. Linz, Austria: GeoGebra GmbH; c2019 [citado 8 ene 2019]. Dynamic Mathematics for Everyone. Mathematical applications [aprox 1 pantalla]. Disponible en: <https://www.geogebra.org/?lang=es>.
13. **Olivares, S. E.** Paquete de diseños experimentales FAUANL, 1994. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N. L.
14. **Pérez E., Milanés P., Bernal A., Leiva M., García G., Lobato L., et al.** Antagonismo “*in vitro*” de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagüeyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. Centro Agrícola. 2013; 40(3): 29-36.
15. **Ortiz, J. M., Hernández, R. G., Cruz, T. M., Figueroa, R. K. A., Figueroa, S. B. y Hernández, R. F.** Inhibición *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa comercial T22. Rev. colomb. biotecnol. 2013; 15(1):126-136.
16. **Martínez, B., Infante, D., y Reyes, Y.** *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. 2013; 28(1): 1-11.
17. **Srinivasa, R.D., Naveena, H., Pushpa, L.M.** Antagonic activity and shelf life study of *Trichoderma harzianum* (Rifai). Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2017; 6(7): 2611-2615.

- 18. Küçük, Ç. y Kivanç, M.** Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turk. J. Biol.* 2003; 27: 247- 253.
- 19. De Marco, J. L., Valadares, I. M. C., Felix, C. R.** Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis perniciosa*. *Applied Microbiology Biotechnology.* 2004; 64(1): 70–75.
- 20. González, I. Infante, D., Martínez, B., Arias, Y., González, N., Miranda, I., et al.** Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Biotechnol. Apl.* 2012; 29(1): 12-16.
- 21. Epifanio, C. D.A.** Control de *Fusarium verticillioides* en genotipos de maíz con especies de *Trichoderma* bajo condiciones de campo [internet]. Cohauila, México: 2013. [citado 18 sep 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7086>
- 22. Chouaki, T., Lavarde, V, Lachaud, L. Rac-curt, C. P. and Hennequin, C.** Invasive Infections Due to *Trichoderma* Species: Report of 2 Cases, Findings of *in vitro* Susceptibility Testing, and Review of the Literature. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35(11): 1360–1367.
- 23. Sánchez, V., Rebolledo, O., Picaso, R. M., Cárdenas, E., Córdova, J., González, O., et al.** *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia.* 2007; 163:49–58.