

Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas

Arturo Reyes Ramírez, Jairo Cristóbal Alejo, Esaú Ruiz Sánchez y José María Tun Suárez

Instituto Tecnológico de Conkal, Km 16,3 antigua carretera Mérida-Motul, Conkal, Yucatán, C. P. 97345, areyes.itconkal@gmail.com

RESUMEN

Las especies de *Fusarium* sp. son agentes causales de enfermedades fúngicas que ocasionan síntomas en raíz, tallo y hoja en diferentes cultivos, incluido chile. Por otro lado, los hongos antagonistas como *Trichoderma* son una alternativa en el control de hongos fitopatógenos, por lo que se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis* Jacq.) por medio de hongos antagonistas. Para los ensayos se usaron dos cepas de colección *Trichoderma harzianum* denominada *Th-itver* y *Trichoderma* sp. cepa H2; tres cepas nativas (L2, P3 y P4), aisladas de muestras de suelo del estado de Yucatán, México, identificadas como pertenecientes al género *Trichoderma*; y la cepa nativa H3, identificada como perteneciente al género *Aspergillus*. La evaluación de actividad antagónica se realizó mediante ensayo de confrontación dual en medio papa-dextrosa-agar (PDA). Todas las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. entre el 40 y el 82 %. Con base al área de inhibición del crecimiento, el antagonista *Trichoderma* sp. cepa H2 causó significativamente mayor porcentaje de inhibición (82,2 %). Las cepas de *Trichoderma* H2, P3 y P4 presentaron la capacidad de crecer sobre el patógeno, lo que mostró un proceso de parasitismo.

Palabras claves: *Trichoderma*, actividad antifúngica, parasitismo

ABSTRACT

Fusarium species are causal agents of plant diseases causing symptoms in root, stem and leaf in different crops included pepper. Antagonists such as the fungus *Trichoderma* are an alternative in the control of plant pathogens fungi. The percentage of radial growth inhibition of *Fusarium* sp. isolated from habanero pepper (*Capsicum chinensis* Jacq.) by fungal antagonists was evaluated. For the bioassay were evaluated two reference strains *Trichoderma harzianum*, named *Th-itver* and *Trichoderma* sp. H2; three natives isolates (L2, P3 and P4) isolated from soil samples of Yucatán, México, identified as *Trichoderma*; and H3 native strain, identified as belonging to the genus *Aspergillus*. The evaluation was carried out by dual confrontation test in potato-dextrose-agar (PDA). All *Trichoderma* strains inhibited the radial growth of *Fusarium* sp. from 40 to 82%. The growth inhibition zone caused by *Trichoderma* H2 (82.2 %) was higher compared to that caused by the rest of the isolates. The isolates H2, P3 and P4 showed the ability for growing on the pathogen suggesting that the mechanism of antagonistic activity is by parasitism.

Key words: *Trichoderma*, antifungal activity, parasitism

INTRODUCCIÓN

La marchitez de plantas de chile por pudrición de raíz es una de las enfermedades más importantes en este cultivo. Dentro del complejo de agentes causales se encuentra con frecuencia *Fusarium*, que en muchos casos se ha reportado como causante primario de marchitez en chile (*Capsicum annuum* L.) [Vásquez-López *et al.*, 2009], y asociado también se ha encontrado *Alternaria* sp. en el mismo cultivo [Avelar-Mejía *et al.*, 2011]. Los síntomas por *Fusarium* también se han identificado en

tallo, cotiledones y hojas [Gray y Achenbach, 1996; Herrera *et al.*, 2011; Avelar-Mejía *et al.*, 2011]. Una de las principales alternativas en el control de hongos fitopatógenos es el empleo de hongos antagonistas; especies de *Aspergillus* y *Trichoderma* han mostrado inhibir el crecimiento de fitopatógenos [Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2012]. Las propiedades antagónicas por la que las cepas de *Trichoderma* actúan como agentes de control biológico se basan en la activa-

ción de múltiples mecanismos, como la competencia por nutrientes y espacio, la modificación de las condiciones ambientales, el estímulo del crecimiento y la activación de mecanismos defensivos de las plantas, por antibiosis y micoparasitismo. Estos mecanismos implican la producción de componentes y metabolitos como factores de crecimiento, enzimas hidrolíticas, sideróforos y antibióticos [Benítez *et al.*, 2004]. En conjunto, *Trichoderma* reduce el estrés biótico y abiótico al que es sometido la planta [Mastouri *et al.*, 2010]. Algunos estudios recientes muestran que *Trichoderma* es un antagonista efectivo contra hongos fitopatógenos. Por ejemplo, se observó que la cepa de *Trichoderma harzianum* A34 fue eficaz en el control de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la marchitez de banano, y mostró una significativa inhibición de la frecuencia y severidad de la enfermedad [Pérez *et al.*, 2009]. Cepas nativas y comerciales de *Trichoderma harzianum* controlaron hasta el 100 % la pudrición seca en raíz del maracuyá causada por *Fusarium solani* [Cubillos *et al.*, 2011]. Especies de *Aspergillus* son reportadas como antagonistas. *A. ochraceus* y *A. wentii* inhiben el crecimiento de cepas de *Fusarium* spp. entre el 40 y el 80% [Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008]. Una de las primeras actividades en la exploración de nuevas cepas de antagonistas es la evaluación *in vitro*. En este caso, el antagonismo directo de la inhibición del crecimiento se estima por medio de confrontación en cultivo dual y principalmente por la medición radial del crecimiento del hongo fitopatógeno, y como testigo el crecimiento del patógeno sin confrontación [Chakraborty y Chatterjee, 2008], o al tomar como testigo la distancia más larga del crecimiento en ensayo de confrontación [Escobar *et al.*, 2004]. El presente trabajo tiene como objetivo estimar el porcentaje de inhibición de *Fusarium* sp. por cepas de hongos antagonistas por confrontación directa en ensayo dual en medio agar-papa-dextrosa (PDA), mediante la medición del área de inhibición con el equipo para la medición de área foliar, ya que la determinación del área de crecimiento dará una mejor estimación del efecto antagonístico que solo con la medición del crecimiento radial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de estudio. La cepa de *Fusarium* sp. fue aislada de raíz de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), con síntomas de marchitez, en el Laboratorio de

Fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán. Como referencia se tomó la cepa de *Trichoderma harzianum* (Th-itver) donada por el doctor Mario Ramírez Lepe de la UNIDA-ITVER, México. Previamente se aisló la cepa *Trichoderma* H2 y forma parte de la colección del cepario del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Conkal. Las cepas nativas fueron aisladas a partir de muestras de suelo del estado de Yucatán, México, y se utilizó el método de dilución en placa en PDA. Un gramo de suelo se diluyó en 10 mL de agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-4} . Cada dilución se sembró en medio PDA y se incubaron a 30 °C durante diez días. Los aislados con un crecimiento de color verde se sembraron en medio PDA y se incubaron durante cinco días. La identificación a nivel de género de los aislados utilizados se realizaron con base a claves dicotómicas [Barnett y Hunter, 1999].

Pruebas de confrontación dual. La actividad antifúngica se realizó por el método de bioensayo dual en medio PDA reportado por diferentes autores [Bell *et al.*, 1982; Abdel-Fattah *et al.*, 2007]. Las cepas de hongos se sembraron en placas de Petri de 100 mm x 15 mm con medio PDA, y se inoculó un disco de 5 mm de micelio de *Fusarium* sp. de un cultivo de 10 días de crecimiento a una distancia de 2 cm del borde de la placa Petri y en dirección opuesta la cepa antagonista, la cual fue inoculada por picadura para evitar que las esporas se dispersaran sobre el medio. La inoculación se realizó dos días después debido a que las cepas antagonistas tienen un crecimiento más rápido que la cepa de *Fusarium* sp. Como testigos se sembraron las cepas de antagonistas y de *Fusarium* sp. en forma individual. Las placas Petri se incubaron a 30 °C durante ocho días. Se registró el crecimiento radial mediante la medición lineal de la distancia de crecimiento del hongo a partir del punto de inoculación. Se determinó el área de inhibición con el equipo de medición de área foliar. Para esto se transfirió manualmente el área de crecimiento del fitopatógeno de la placa de Petri del ensayo como una imagen en una hoja transparente de acetato, y posteriormente se analizaron en el equipo. Con los datos anteriores se calculó el porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos y se tomó como testigo la superficie de crecimiento de *Fusarium* sp. sin confrontación. Se determinó el tipo de antagonismo de acuerdo con la escala reportada por Bell *et al.* (1982), donde:

1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno crecen aproximadamente la mitad de la superficie y ninguno domina al otro
4	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y resiste la invasión por <i>Trichoderma</i>
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio

Análisis de datos. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Los resultados de porcentaje de inhibición del crecimiento se transformaron con la fórmula $\arcsen(\sqrt{x/100})$ y se sometieron a análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de Tukey ($p = 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron un total de 79 muestras de suelo de diferentes fuentes en 22 poblados del estado de Yucatán, México; no se determinó el tipo de suelo muestreado. De acuerdo con características morfológicas de crecimiento micelial de coloración verde, se aislaron cuatro cepas fúngicas, de las cuales, por sus características microscópicas, una fue identificada como perteneciente al género *Aspergillus* y tres al género *Trichoderma* (Tabla 1). La mayoría de las cepas se aislaron en el municipio de Conkal, Yucatán, debido a que el 58 % de las muestras colecta-

das provienen de esta localidad. Los aislados se codificaron y resembraron en PDA hasta cultivos axénicos para su uso. Como prueba preliminar se realizó confrontación dual contra *Fusarium* sp., incluido el aislado de *Aspergillus* sp. (Tabla 1). Todas las cepas inhibieron significativamente el crecimiento de *Fusarium* sp. en comparación al testigo sin la confrontación de la cepa antagonista, en donde tres cepas de *Trichoderma* (H2, P3 y P4) disminuyeron significativamente el crecimiento radial de *Fusarium* sp. en comparación a la cepa de *Aspergillus* sp., por lo que el aislado de *Aspergillus* sp. fue descartado, y solo se continuó el trabajo con las cepas identificadas como pertenecientes al género *Trichoderma*; sin embargo, se han reportado cepas de *Aspergillus* sp. con potencial en el control de *Fusarium* y *Penicillium*, y se ha observado principalmente un efecto de inhibición por competencia [Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008], lo cual también se observó en la cepa de *Aspergillus* utilizada en el presente trabajo.

Tabla 1. Cepas de hongos utilizadas en la inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* sp. a los seis días de inoculación del fitopatógeno

Cepa	Origen/localidad	Crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp. (mm) ¹
<i>T. harzianum</i> cepa Th-itver	Cepario ITVer, Veracruz	16,3 (± 1,5) bc
<i>Trichoderma</i> sp. cepa L2	Conkal, Yucatán	16,0 (± 3,6) bc
<i>Trichoderma</i> sp. cepa H2	Cepario ITConkal, Yucatán	11,7 (± 0,6) cd
<i>Aspergillus</i> sp cepa H3	Conkal, Yucatán	19,5 (± 0,7) b
<i>Trichoderma</i> sp. cepa P3	Dzoyaxché, Mérida, Yucatán.	11,8 (± 0,8) cd
<i>Trichoderma</i> sp. cepa P4	Dzoyaxché, Mérida, Yucatán	10,3 (± 0,6) d
<i>Fusarium</i> sp. cepa ITC12 ²	Conkal, Yucatán.	29,5 (± 0,7) a

¹ Crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en prueba de confrontación; ² Testigo: crecimiento micelial de *Fusarium* sp. sin confrontación. Medias (± error estándar) con literales iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

Se realizó un segundo ensayo de confrontación contra *Fusarium* sp., para lo que se utilizaron las cepas identi-

ficadas como *Trichoderma*, donde las analizadas inhibieron el crecimiento de *Fusarium* sp. entre el 40,9

y el 82,2 %, calculado a partir de la medición del área de inhibición (Tabla 2). La cepa L2 y la cepa de referencia Th-itver mostraron similar porcentaje de inhibición y antagonismo, al crecer aproximadamente la mitad de la superficie y aparentemente ninguno domina al otro, sin un crecimiento visible sobre *Fusarium* sp., en comparación con las cepas H2, P3 y P4, que sobrecrecieron

las dos terceras partes de la superficie del medio. La cepa H2 presentó la mayor capacidad de sobrecrecer al patógeno a los doce días, sin llegar a cubrir en su totalidad al fitopatógeno; mas de acuerdo con la clasificación de Bell *et al.* (1992) sería categoría 2, a pesar de sobrecrecer más de las dos terceras partes de la superficie del medio, pero no el total de la superficie.

Tabla 2. Actividad antifúngica *in vitro* de hongos antagonistas contra *Fusarium* sp.

Cepa	Inhibición del crecimiento a los ocho días (%)		Escala (a los doce días)
	Crecimiento radial ¹	Superficie de crecimiento ²	
<i>T. harzianum</i>	53,3 (± 4,5) a	48,2 (± 7,2) a	3
L2	47,4 (± 3,7) a	40,9 (± 5,4) a	3
H2	64,5 (± 3,4) b	82,2 (± 1,9) c	2
P3	69,1 (± 1,3) b	66,0 (± 2,5) b	2
P4	73,0 (± 1,3) b	72,0 (± 0,5) bc	2

¹ Porcentaje de inhibición calculado a partir del crecimiento radial, ² Porcentaje de inhibición calculado a partir de la superficie de crecimiento. Medias (± error estándar) con literales iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

Los informes del porcentaje de inhibición de *Fusarium* por *Trichoderma* muestran valores del 22,5 al 86,44 % [Paez y Sanabria, 2007; Chakraborty y Chatterjee, 2008]; la cepa H2 mostró un valor similar al mayor porcentaje reportado cuando se estimó el porcentaje de inhibición a partir del área de crecimiento. Por otro lado, se consideró la velocidad de crecimiento de los hongos utilizados sobre el medio PDA, ya que en el caso de los testigos correspondientes a las cepas de *Trichoderma* se observó un crecimiento radial a los tres días de incubación de 65,3 (±1,1) mm que corresponde al crecimiento total sobre el medio PDA en la placa Petri en comparación de un crecimiento radial de 10,6 (±1,1) mm en el caso de *Fusarium* sp. al mismo tiempo de incubación, por lo que en los ensayos dual se decidió inocular la cepa de *Fusarium* sp. dos días antes que las cepas de *Trichoderma*, y de esta forma evitar obtener valores de inhibición elevados por efecto de la velocidad de crecimiento de los hongos utilizados. El mismo ensayo permite determinar el fenómeno de micoparasitismo de *Trichoderma* por el crecimiento sobre del hongo fitopatógeno, lo que daría una mejor estimación de la actividad antagonista y posible mecanismo cuando se analizan masivamente aislados con la finalidad de selección de cepas antagonistas con mayor actividad.

Un criterio importante es la acción rápida del antagonista en superar la inhibición del patógeno y poder parasitar [Sharman, 2011]. En el presente trabajo, en todos los casos se observó que el crecimiento radial del *Trichoderma* se detiene en el punto de contacto con la cepa de *Fusarium* sp., y a partir de tres a cuatro días después del contacto se observa el sobrecrecimiento indicativo del proceso de parasitismo. Esto se advirtió en las cepas H2, P3 y P4. El ensayo dual es un método rápido y directo para estimar el antagonismo de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos; sin embargo, el porcentaje de inhibición depende del parámetro a medir, ya que puede haber diferencias significativas, como se observó en el presente trabajo. En este caso la cepa H2 es similar el porcentaje de inhibición de las cepas P3 y P4 cuando se estimó con base al crecimiento radial, pero significativamente mayor cuando se estimó con base al área de crecimiento (Tabla 2). Las cepas H2, P3 y P4 muestran potencial para utilizarse en el control biológico por su actividad antifúngica y capacidad para crecer sobre la cepa de *Fusarium* sp., lo que sugiere un mecanismo de tipo parasitismo.

CONCLUSIONES

- El aislamiento de cepas de *Trichoderma* fue bajo con respecto al número de muestras de suelo y rizosfera procesados.

- El mismo ensayo de confrontación puede dar resultados con diferencias significativas cuando es estimado con diferentes parámetros de medición.
- Tres cepas de *Trichoderma* (H2, P3 y P4) inhibieron *in vitro* significativamente el crecimiento de *Fusarium* sp., muestra de un fenómeno de parasitismo sobre *Fusarium* sp., y en el caso de la cepa de *Aspergillus* sp. inhibió el crecimiento *in vitro* del fitopatógeno por competencia por espacio.

AGRADECIMIENTOS

Al PROMEP por el financiamiento otorgado a este trabajo (Proyecto: DGEST CKL-LB2011-101). A Silverio del Jesús Pérez Canul y Hugo Alejandro Méndez Hernández por su colaboración técnica.

REFERENCIAS

- Abdel-Fattah, G. M.; M. Shabana; A. E. Ismail; Y. M. Rashad: «*Trichoderma harzianum*: a Biocontrol Agent Against *Bipolaris oryzae*», *Mycopathologia* 164: 81-89, Holanda, 2007.
- Avelar-Mejía, J. J.; M. Galindo-Oliva; A. Lara-Herrera1; J. J. Llamas-Llamas; M. Luna-Flores; M. A. Salas-Luevano; M. Cabral-Enciso: «Hongos asociados con la enfermedad miada de perro en el cultivo de Chile», *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2 (1): 155-160, México, 2011.
- Barnett, H. L.; B. B. Hunter: *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 3rd ed., Burgess Publishing, Minnesita, EE. UU., 1999.
- Bell, D. K.; H. D. Well; C. R. Markham: «*In vitro* Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens», *Phytopathology* 72: 379-382, EE. UU., 1982.
- Benítez, T; A. M. Rincón; M. C. Limón; A. C. Codón: «Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains», *International Microbiology* 7: 249-260, España, 2004.
- Chakraborty, M. R.; N. C. Chatterjee: «Control of *Fusarium* Wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. », *Biología Plantarum* 52: 582-586, Holanda, 2008.
- Cubillos, J. G.; A. Páez; L. Mejía: «Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo Secadera en Maracuyá, bajo condiciones de invernadero», *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 64 (1): 5821-5830, Colombia, 2011.
- Escobar, P.; J. Montealegre; R. Herrera: «Respuesta *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* frente a Fe³⁺, salinidad, pH y temperatura, con el fin de ser utilizadas en control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate», *Boletín Micológico* 19: 95-102, Chile, 2004.
- Gray, L. E.; L. A. Achenbach: «Severity of Foliar Symptoms and Root and Crown Rot of Soybean Inoculated with Various Isolates and Inoculum Rates of *Fusarium solani*», *Plant Dis.* 80: 1197-1199, EE. UU., 1996.
- Hasan, M. M.; S. M. E. Rahman; G. H. Kim; E. Abdallah; D. H. Oh: «Antagonistic Potentiality of *Trichoderma harzianum* Towards Seed-Borne Fungal Pathogens of Winter Wheat cv. Protiva *In Vitro* and *In Vivo*», *J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (5): 585-591, Corea del Sur, 2012.
- Herrera, E.; I. M. Bacab; J. Cristóbal; J. M. Tun; E. Ruiz: «Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*», *Fitosanidad* 15 (4): 231-236, Cuba, 2011.
- Mastouri, F.; T. Björkman; G. E. Harman: «Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* Alleviates Biotic, Abiotic, and Physiological Stresses in Germinating Seeds and Seedlings», *Phytopathology*, 100 (11): 1213-1221, EE. UU., 2010.
- Paez, M. E.; N. A. Sanabria: «Evaluation of the Antagonistic Capacity of *Trichoderma koningii* Above *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*», *Rev. Fav. Agron.* 24 (1): 27-31, Venezuela, 2007.
- Pérez, L.; A. Battle; J. Chacón; V. Montenegro: «Eficacia de *Trichoderma harzianum* a34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o mal de panamá de los bananos en Cuba», *Fitosanidad* 13 (4): 259-263, Cuba, 2009.
- Quiroz-Sarmiento, V. R.; R. Ferrera-Cerrato; A. Alarcón; M. E. Lara-Hernández: «Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo de ajo», *Revista Mexicana de Micología* 26: 27-34, México, 2008.
- Sharman, P: «Complexity Complexity of *Trichoderma*- *Fusarium* Interaction and Manifestation of Biological Control», *Australian Journal of Crop Science* 5 (8): 1027-1038, Australia, 2011.
- Vásquez-López, A.; B. Tlapal-Bolaños; M. J. Yáñez-Morales; R. Pérez-Pacheco; M. Quintos-Escalante: «Etiología de la marchitez del Chile de agua (*Capsicum annum* L.) en Oaxaca, México», *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (2): 127-134, México, 2009.