

Detección de *Fusarium verticillioides* en genotipos de maíz y su biocontrol *in vitro* con especies de *Trichoderma*

Detection of *Fusarium verticillioides* in Maize Genotypes and *in vitro* Biocontrol with *Trichoderma* species

Epifanio Castro-del Ángel^{1*}, Abiel Sánchez-Arizpe¹, María Elizabeth Galindo-Cepeda¹,
Mario Ernesto Vázquez-Badillo²

Departamento de Parasitología Agrícola¹, Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas², Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coah., México. E-mail: pifas_ros@live.com.mx (*Autor responsable).

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la incidencia de *F. verticillioides* en cuatro genotipos de maíz y la evaluación de cepas de *Trichoderma* como biocontrol bajo condiciones de laboratorio, 400 semillas asintomáticas tomadas al azar se desinfectaron por inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 1% por 3 min y se sembraron en medio de cultivo verde de malaquita agar, se incubaron a 28 ± 2 °C por dos semanas. Se utilizó un diseño completamente al azar para la distribución del experimento, con cuatro repeticiones para cada genotipo (100 semillas por repetición). Se determinó la incidencia de *F. verticillioides*, mediante el conteo de los granos que habían sido colonizados por el hongo, expresándose en términos de porcentaje, también se evaluaron *Trichoderma longibrachiatum* T1 40, *T. asperellum* T11, *T. harzianum* T1 4 en cultivos duales contra el patógeno, obteniendo los siguientes resultados para cada caso; se detectó la presencia de *F. verticillioides* en los cuatro genotipos de maíz con diferentes niveles de incidencia ($p < 0.01$), el material criollo mostró la incidencia más alta con 86.03%, seguido por H520 79.75%, mestizo 75.5% y UAAAN-ISP-173 con 72.07%. Se obtuvo un 35.69% de inhibición para *T. longibrachiatum* T1 40, mientras que para *T. asperellum* T11, 32.68% y *T. harzianum* T1 4, 32.61%. Los resultados muestran que las tres cepas de *Trichoderma* inhibieron el desarrollo del patógeno haciendo contacto a los dos y tres días, respectivamente.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., *F. verticillioides*, antagonismo, incidencia.

ABSTRACT

The present study was designed to determine the incidence of *F. verticillioides* in four maize genotypes and to evaluate strains of *Trichoderma* as biocontrol under laboratory conditions. Asymptomatic maize seeds chosen at random were disinfected by immersion, sowed in green malachite agar culture medium and incubated at 28 ± 2 °C for two weeks. A completely randomized design with four replicates for each genotype (100 seeds per replicate) was used. Incidence of *F. verticillioides* was determined by counting the grains colonized by the fungus, expressed in percentage; also assessed strains of *Trichoderma longibrachiatum* T1 40, *T. asperellum* T11 and *T. harzianum* T1 4 in dual cultures against the pathogen. The following results were obtained: in each case, the presence of *F. verticillioides* was detected in the four maize genotypes with different levels of incidence ($p < 0.01$). Creole material showed the highest incidence (86.03%), followed by H520 (79.75%), mestizo (75.5%) and UAAAN-ISP-173 (72.07%). With the *T. longibrachiatum* T1 40 strain has been a 35.69% of *F. verticillioides* inhibition, while with *T. asperellum* T11 it was 32.68% and *T. harzianum* T1 4 it was 32.61%. The results show that the three *Trichoderma* strains inhibited the development of the pathogen by contacting at the two and three days respectively.

Key words: *Trichoderma* spp., *F. verticillioides*, antagonism, incidence.

Recibido: Mayo 2013 • Aprobado: Mayo 2014.

INTRODUCCIÓN

F*usarium verticillioides* es el hongo más importante que limita en gran medida la producción de maíz, causando considerables pérdidas económicas, así como cambios en su contenido nutritivo, sabor de los productos y contaminación de los granos con micotoxinas (Damaris *et al.*, 1976).

Diversos autores señalan que el hongo tiene una amplia distribución geográfica y un rango de hospederos importante, ataca cultivos como: sorgo, maíz, higo, espárrago y caña de azúcar, entre otros (Boot, 1971; Gilbertson *et al.*, 1981).

La entrada del patógeno a la mazorca de maíz puede ocurrir a través de heridas causadas por insectos o aves (Attwater *et al.*, 1983; Sutton *et al.*, 1980) o por crecimiento de micelio sobre los vellos del jilote y de esporas que germinan sobre ellos (Hesseltine *et al.*, 1977; Koehler, 1942; Sutton, 1982).

La infección inicia con la formación de micelio blanco, que va descendiendo desde la punta de la mazorca hasta provocar una coloración de rojiza a rosada en los granos infectados (Levin *et al.*, 2003).

Algunas cepas de *F. verticillioides* producen infecciones asintomáticas de la semilla, la cual se transmite a la plántula afectando su emergencia (Yates *et al.*, 1997).

Para el control del patógeno se emplean diferentes técnicas, siendo el control químico una de las más utilizadas, pero tienen desventajas, ya que aumenta significativamente la residualidad de los productos en los granos. El empleo de antagonistas como bacterias y especies de *Trichoderma* podría ser una alternativa para el control biológico de *F. verticillioides*.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la incidencia de *F. verticillioides* en cuatro genotipos de maíz y la evaluación de cepas de *Trichoderma* para su control bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coah., México.

Cepas de antagonistas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron *Trichoderma longibrachiatum* T1 40, *T. asperellum* T11 y *T. harzianum* T1 4, tomadas del cepario del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología.

Cepa de *Fusarium verticillioides*

Se aisló de granos de maíz criollo de la cosecha 2012, procedente de Chapopote, Chalma, Ver., México, en medio de cultivo verde de malaquita agar.

Genotipos de maíz

Se utilizaron dos criollos y dos híbridos, los híbridos H-520 F1 y Mestizo diamante fueron proporcionados por el Grupo Hernández Montiel y Asociados S.P.R de R.L. cosecha 2012; un criollo se adquirió con productores de Chapopote, Chalma, Ver., cosecha 2012, y el otro corresponde al material UAAAN-ISP-173, proporcionado por el Banco Nacional de Germoplasma de Maíces de México, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de la cosecha de 2008, recolectado en Tenampulco, Puebla.

Determinación de incidencia de *F. verticillioides*

Se desinfectaron 400 semillas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril para remover los residuos del desinfectante y se secaron con corriente de aire en cámara de flujo laminar.

Para la siembra se utilizaron cajas petri de plástico, se sembraron cuatro muestras de maíz en medio de cultivo verde de malaquita agar, en cada caja se colocaron 10 semillas equidistantemente una de otra. Las muestras se incubaron a 28 ± 2 °C durante dos semanas.

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por cada genotipo.

La identificación macroscópica se realizó en un microscopio estereoscópico, se observaron todos los granos que habían sido colonizados por el patógeno.

Para la identificación microscópica, se realizaron montas en portaobjetos y se observó en el microscopio compuesto en aumento de 40X, se siguió la metodología de Warham *et al.* (1996) y Nirenberg y O'Donnell (1998) para la identificación del patógeno.

Análisis estadístico

La incidencia se ajustó mediante transformación arcoseno y se procesó mediante un análisis de varianza en un diseño completamente al azar, la separación de medias fue por la prueba de Tukey ($p > 0.01$), con el programa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) versión 2.5.

Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *F. verticillioides*

Para las tres cepas se evaluó el por ciento de inhibición de crecimiento radial y la capacidad antagónica en cultivo dual en medio de cultivo PDA, el experimento se estableció en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento y un testigo para el patógeno, se colocó en el extremo de la caja petri un disco de PDA con micelio de *F. verticillioides* de 8 mm de diámetro y en el extremo opuesto un disco de *Trichoderma* spp., las siembras fueron incubadas a 28 ± 2 °C durante 10 d. El crecimiento micelial se midió diariamente.

La capacidad antagónica se determinó a los 10 d empleando la escala de Bell *et al.* (1982), también se calcularon los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) a las 120 h de acuerdo con Corrêa *et al.* (2007), se empleó la fórmula de Samaniego *et al.* (1989), donde $PICR = R1 - R2 / R1$, siendo R1 el radio mayor (radio del patógeno testigo) y R2 el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

Análisis estadístico

Las medias de PICR se ajustaron mediante transformación arcoseno y se procesaron por un análisis de varianza, la separación de medias fue por la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, con el programa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Olivares, 1994) versión 2.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *F. verticillioides*

Se detectó la presencia de *F. verticillioides* en los cuatro genotipos de maíz, se observó con frecuencia micelio extenso algodonoso en el medio de cultivo, con algo de tinte rosa, púrpura o amarillo en el medio. Se encontraron microconidios abundantes simples y en cadenas, generalmente hialinos unicelulares, bicelulares, con forma oval y de garrote que estaban generalmente aplanados en cada extremo. Los macroconidios, con paredes delgadas y su forma de curvos en forma de canoa a casi rectos; con 3-7 septos y la célula basal en forma de pie. No hubo formación de clamidosporas en el micelio y las características coincidieron con los diferentes autores (Warham *et al.*, 1996; Nirenberg and O'Donnell, 1998).

Incidencia de *F. verticillioides*

La incidencia se presentó en los cuatro genotipos: el criollo mostró la más alta (86.03%), seguido por H520 (79.75%), mestizo (75.5%) y UAAAN-ISP-173 la más baja (72.07%).

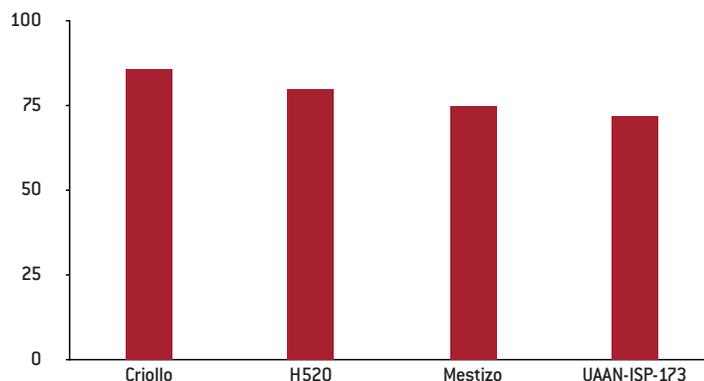


Figura 1. Incidencia de *Fusarium verticillioides* en cuatro genotipos de maíz. Letras iguales son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.01$).

Los resultados obtenidos por Hernández *et al.* (2007) son similares a los encontrados en esta investigación, ellos encontraron una incidencia de 76.9% de *Fusarium* en maíces de campo recolectados en el norte de Tamaulipas; mientras que Bucio *et al.* (2003) encontraron incidencia de *Fusarium* de 30.7% en diferentes municipios del estado de Guanajuato. Kedera *et al.* (1999) reportaron incidencia de *F. verticillioides* de 71 a 72% en tres muestras de maíz en Kenya, niveles de incidencia similares a los encontrados en este trabajo. Gallardo *et al.* (2006) encontraron la presencia de *Fusarium* con 67% de incidencia en el Valle de Mayo, Sonora.

Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *F. verticillioides* en cultivo dual

La actividad antagonista de *Trichoderma* spp., determinada por el método de cultivo dual fue favorable para el control *in vitro* de *F. verticillioides*. Las tres cepas inhibieron el crecimiento de *F. verticillioides* y lograron detener al patógeno al hacer contacto a los dos y tres días. El antagonismo fue de 32.61 hasta 35.69%, aunque no hubo diferencia ($p > 0.01$) entre cepas, las tres se comportaron de manera similar.

Guigón *et al.* (2010) reportan que en la evaluación de *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* contra *Fusarium* sp. el antagonismo no fue significativo en comparación con los demás patógenos, estas cepas no fueron capaces de detener el crecimiento del hongo tal como sucedió en esta investigación, pareciera

ser que las especies de *Fusarium* resisten la invasión de los antagonistas.

La especie *T. longibrachiatum* T1 40 presentó la actividad antagonista más elevada (35.69%) sobre *F. verticillioides* a las 120 h, haciendo contacto a los dos días, por lo que se le asignó una calificación de 1 en la escala de Bell *et al.* (1982). El antagonista *T. asperellum* T11 inhibió el 32.68%, mientras que *T. harzianum* T1 4, el 32.61%, ambos mostraron buen potencial como antagonistas contra el patógeno ensayado y recibieron calificación de 2 en la misma escala, haciendo contacto hasta el día tres. Se logró observar enrollamiento y lisis de micelio, pero las cepas no fueron capaces de colonizar sobre *F. verticillioides*, tal como se muestra en la Figura 2.

Michel (2001) encontró una inhibición de 40.1% de *F. oxysporum* y 35.9% de *F. subglutinans* con cepas de *T. longibrachiatum* en cultivos apareados evaluados a los seis días después de la siembra, los reportes de estos autores concuerdan con lo encontrado en esta evaluación.

Esparza (2009) reporta que de acuerdo con la clasificación de antagonismo, propuesta por Bell *et al.* (1982), ubicó a *T. asperellum* en la clase 1 con 94.20% de inhibición según la media y a *T. longibrachiatum* en la clase 2 con 89.01% contra *Phytophthora parasitica*. También logró observar como principal mecanismo de acción a la competencia por el sustrato y al micoparasitismo; dichos hongos indujeron lisis de micelio y la presencia de antibiosis, mientras que



Figura 2. Escala de clasificación de Bell *et al.* (1982), clase 1: *T. longibrachiatum* T1 40 [derecha]; clase 2: *T. Harzianum* T1 4 [izquierda], *T. asperellum* T11 [centro]. Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2013.

en esta investigación se observó lisis y colapso de micelio, pero no se detectó antibiosis en los cultivos duales, siendo un patógeno completamente diferente al ensayado en esta investigación, por lo que no se pueden comportar de forma similar.

CONCLUSIONES

El hongo *Fusarium verticillioides* se encontró en todos los genotipos analizados con diferentes niveles de incidencia. Las tres especies de *Trichoderma* redujeron la colonización de *F. verticillioides* en cultivo dual haciendo contacto a los dos y a los tres días.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo Hernández Montiel y Asociados S.P.R de R.L. y al Banco Nacional de Germoplasma de Maíces de México de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por proporcionar los genotipos de maíz.

LITERATURA CITADA

- ATTWATER, W.A. and L.V. Busch. 1983. Role of the sap beetle *Glischochilus quadrisignatus* in the epidemiology of *Gibberella* corn ear rot. *J. Plant Pathol.* 5: 158-163.
- BELL, D.K., H.D. Well, and C.R. Markham. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathol.* 72: 379-382.
- BOOT, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 pp.
- BUCIO V., C.M., J.O.A. Martínez y G.R.H. Morales. 2003. Contaminación con hongos en maíz recién cosechado en el estado de Guanajuato durante el año 2003, pp. 425-431, en: VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto., México.
- CORRÊA, M. M. S., Z. Ávila, B.L. Minaré, R.R. Pádua y D. Gomes. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. *Fitosanidad* 11(1): 3-9.
- DAMARYS M., C. Medina y Z. Zenteno. 1976. Morfología de mazorcas de maíz. México. II boletín de la Sociedad de Microbiología 10: 71-72.
- ESPARZA L., L.L. 2009. Efectividad *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en aislados de *Phytophthora parasitica* D. obtenidos en plantas de jamaica. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. Mex., México. 69 pp.
- EZZIYANI, M., S.C. Pérez, S.A. Ahmed, M.E. Requena y M.E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anal. Biol.* 26: 35-45.
- GALLARDO R., E.D., M.G.M. Ibarra, M.R.I. Sánchez, C.G. Cuamea, G.D. Molina, V.N.V. Parra, B.E.C. Rosas y R.M.O. Cortez. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24(1): 27-34.
- GILBERTSON, R.L., J.P. Damicone and W.J. Manning. 1981. *Fusarium* crown rot of asparagus: sources of inoculums. *Phytopathology* 71: 212.
- GUIGÓN, L.C., P.V. Guerrero, A. F. Vargas, M.E. Carvajal, Q.G.D. Ávila, L.L. Bravo, M.L.S. Ruocco, S. Woo y M. Lorito. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 28(2): 87-96.
- HERNÁNDEZ, D.S., L.M.A. Reyes, O.J.G. García, P.N. Ma-yeck y M.C.A. Reyes. 2007. Incidencia de hongos potencialmente tóxicos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25(2): 127-133.
- HESSELTINE, C.W. and R.J. Bothast. 1977. Mold development in ears of corn from tasseling to harvest. *Mycologia* 69(2): 328-340.
- KEDERA, C.J., R.D. Plattner and A.E. Desjardins. 1999. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin b1 in maize in western Kenya. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1): 41-44.
- KOEHLER, B. 1942. Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. *J. Agric. Res.* 64(8): 421-442.
- LEVIN, L., A. Ridao y F. Castaño. 2003. Fusariosis de la espiga en el maíz. INTA: 20ª Jornada de actualización profesional en cultivos de verano. Mar del Plata, 19 de septiembre de 2003. 165 p.
- MICHEL A., A.C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Euscomycetes: Hipocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinanas* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hiphales). Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, Col., México.
- NIRENBERG, H.I. and K. O'Donnell, 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90(3): 434-458.
- OLIVARES, S.E. 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía, UANL. Marín, N.L., México.
- SAMANIEGO, G., S. Ulloa y S. Herrera. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 1989. 8: 86-95.
- SUTTON, J.C., W. Baliko and H.J. Liu. 1980. Fungal colonization and zearalenone accumulation in maize ears injured by birds. *Canadian J. Plant Sci.* 60(2): 453-461.
- SUTTON, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian J. Plant Pathol.* 4(2): 195-209.

WARHAM, E.J., L.D. Butler y B.C. Sutton. 1996. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT. México, D. F. 84 pp.

YATES, I.E., C.W. Bacon and D.M. Hinton. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium verticillioides* on corn growth and cellular morphology. Plant Disease 81(7): 723-728.