

## **CAPACIDAD ANTAGONISTA DE HONGOS CELULOLÍTICOS FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.***

**Néstor Leopoldo Tarazona Meza<sup>1</sup>, Ángel Monserrate Guzmán Cedeño<sup>2</sup>,  
Diego Efren Zambrano Pazmiño<sup>2</sup>, Sergio Miguel Vélez Zambrano<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Carrera de Agrícola, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Calceta-Manabí, Campus El Limón Ubicado en el Km 2.7 vía Calceta-El Morro-Gramal.

<sup>2</sup>Coordinación de Investigación Científica, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, Km 2.7 Vía Calceta-El Limón

<sup>3</sup>Becario SENESCYT, Universidad Nacional de Brasilia, Campus Universitario Darcy Ribeiro-Brasilia-Brasil

Contacto: [taramenes1@hotmail.com](mailto:taramenes1@hotmail.com)

### **RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antagónica de ocho hongos celulolíticos nativos frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* En primera instancia se determinó la cepa promisorio del hongo celulolítico, para lo cual, en caja Petri se colocó un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio de una cepa antagonista y en el extremo opuesto, a una distancia de 5 cm aproximadamente, otro disco de 4 mm con micelio de un patógeno. La capacidad antagónica se determinó por el grado de micoparasitismo y la competencia por nutrientes y espacios, registrando el porcentaje de inhibición del crecimiento radial. Con la cepa del hongo celulolítico que tuvo el mejor comportamiento antagonista se realizó un cocultivo independiente con cada patógeno, aquí se evaluó las Ln UFC, crecidas en medio PDA. En la evaluación cualitativa, la cepa A.O-5 mostró una invasión y esporulación total en la superficie en ambos patógenos; mientras que en el cocultivo inhibe el crecimiento de los patógenos a las 96 h. Por lo encontrado, se estima que la cepa A.O-5 es un potencial agente antagonista de los fitopatógenos evaluados.

**PALABRAS CLAVE:** invasión, cocultivo, crecimiento radial, fitopatógenos

## 1. INTRODUCCIÓN

Los estudios existentes en el Ecuador, sobre este tipo de hongos, sirven como pauta para determinar en la práctica la capacidad antagonista frente a hongos fitopatógeno. Un ejemplo de estos trabajos lo reportan Guzmán *et al.* (2014), quienes aislaron un grupo de hongos de diferentes ambientes de Manabí-Ecuador con la intención de seleccionar los de mayor actividad celulolítica; además, se vienen evaluando otras posibles aplicaciones agronómicas en fases de laboratorio y campo en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí.

Las especies de *Trichoderma* son importantes como agentes de biocontrol y es uno de los géneros fúngicos con mayor potencial para el control de las plagas que afectan a la agricultura. Estos hongos son empleados en numerosas ocasiones, con o sin registro legal, para el control de enfermedades de las plantas. Diversas especies de este género se utilizan en el tratamiento de semillas e incluso contra hongos que causan la degradación de la madera. Además las especies de *T. viride* y *T. harzianum* se han reconocido como bioplaguicidas principalmente contra *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Sclerotinia* y *Botrytis* (Santamarina *et al.*, 2001).

Las especies de *Fusarium* están referenciadas como hongos de campo, pero no es extraño encontrarlos, ocasionalmente, como hongos de almacén, sobre todo cuando la disponibilidad de agua es alta y las temperaturas bajas. Por ello suelen estar involucradas en el desarrollo de distintas fitopatologías, concretamente son los causantes de los marchitamientos vasculares (fusariosis vascular), de las podredumbres de cuello y raíces, y los mohos amarillos y rosados de las enfermedades de poscosecha (Roselló, 2003). Un ejemplo de ello es la pudrición de la raíz cuyo agente causante de esta enfermedad es *Macrophomina phaseolina*.

## 2. DESARROLLO

### 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en el sitio El Limón.

Se estudió ocho cepas de hongos celulolíticos como agente antagónico de *Fusarium* y *Macrophomina*. La investigación se condujo mediante dos experimentos que se detallan a continuación.

### 2.1.1 Capacidad antagónica de los hongos celulolíticos frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* a nivel *in vitro*.

Se confrontaron cada uno de los hongos celulolíticos contra cada una de los patógenos (Cuadro 1), colocándose en un extremo de la caja Petri un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio del hongo celulolítico y en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio del patógeno, a una distancia de 5 mm aproximadamente entre ellos, posteriormente se incubaron bajo las mismas condiciones, y se realizaron evaluaciones diarias durante diez días.

**Cuadro 1.** Combinación de los factores en estudio

N°		
1	A.O-1	<i>Fusarium sp.</i>
2	A.O-1	<i>Macrophomina sp.</i>
3	A.O-2	<i>Fusarium sp.</i>
4	A.O-2	<i>Macrophomina sp.</i>
5	A.O-3	<i>Fusarium sp.</i>
6	A.O-3	<i>Macrophomina sp.</i>
7	A.O-5	<i>Fusarium sp.</i>
8	A.O-5	<i>Macrophomina sp.</i>
9	A.O-6	<i>Fusarium sp.</i>
10	A.O-6	<i>Macrophomina sp.</i>
11	A.O-8	<i>Fusarium sp.</i>
12	A.O-8	<i>Macrophomina sp.</i>
13	A.Q-8	<i>Fusarium sp.</i>
14	A.Q-8	<i>Macrophomina sp.</i>
15	R.C-3	<i>Fusarium sp.</i>
16	R.C-3	<i>Macrophomina sp.</i>

Se evaluó la capacidad antagónica por el porcentaje de inhibición de crecimiento radial mediante la fórmula que consiste en  $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$ , donde R1 es el radio mayor (radio patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista) y grado de micoparasitismo de acuerdo a la escala de capacidad antagónica (Cuadro 2) propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004).

**Cuadro 2.** Escala para evaluación de la capacidad antagónica

<b>Escala</b>	<b>Capacidad antagónica</b>
<b>1</b>	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
<b>2</b>	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
<b>3</b>	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
<b>4</b>	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
<b>5</b>	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno (esporulación sobre ella).

### **2.1.2. Determinar la actividad antagónica de los hongos celulolíticos seleccionados frente a *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* a través de cocultivos en medio líquido**

Una vez seleccionado la cepa del experimento anterior que demostró la mejor capacidad antagónica y se mezcló por separado con *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* en Erlenmeyer que contuvieron 90 mL de caldo papa dextrosa. Estos cocultivos fueron inoculados a partir de cultivos frescos de cada cepa en PDA por 72 h a 30 °C en incubadoras hasta que estas estuvieron totalmente esporuladas, las cuales se homogenizaron con 10 mL de solución salina para una concentración de 6 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. Se realizaron estos ensayos a las 48, 72 y 96 h contra ambos patógenos y se efectuó el conteo de las UFC a través del método de las diluciones seriadas (de -1 a -3) y el conteo en placas con medio PDA, donde se utilizaron contador de colonias, estas se incubaron a 30 °C por 72 h en incubadora.

## **2.2. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **2.2.1. Capacidad antagónica *in vitro***

La capacidad antagónica *in vitro* de las cepas en estudio presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0,001$ ) en todas las evaluaciones realizadas. En el cuadro 3 se observa que las cepas R.C-3, A.O-1 y A.O-6 presentaron igualdad estadística, el mismo que se mantuvo en todas las evaluaciones. La cepa R.C-3 obtuvo 61,48; 60 y 60 %; la A.O-1 con 61,48; 60,37 y 60,37 %; y A.O-6 con 63,7; 62,59 y 62,22 % en cada evaluación respectivamente. El tratamiento A.O-

3 obtuvo los menores valores obteniendo 38,15 % en la primera evaluación y 16,3 y 11,11 % en la segunda y tercera evaluación.

Con estos datos se tiene indicios fuertes del antagonismo de las cepas en estudio frente a *Macrophomina*. Pineda y Gonnella (1988) al confrontar *Aspergillus* y *Trichoderma* contra *M. phaseolina* observaron capacidad para inhibir el desarrollo y la producción de esclerocios del patógeno in vitro. Entre las investigaciones relacionadas se tiene que Reyes *et al.* (2011) encontraron que cepas de *Bacillus* inhibieron a *Macrophomina*, con un de promedio 38,1 %. Así mismo Sosa *et al.* (2012) al evaluar in vitro 13 cepas del genero *Bicillus* todas presentan inhibición a *Macrophomina phaseolina* con porcentajes desde 48 a 73,7 %.

**Cuadro 3.** Porcentaje de inhibición radial de *Macrophomina*

Tratamientos	Evaluaciones (días)		
	3	6	9
A.O-1	61,48 a	60,37 a	60,37 a
A.O-2	36,67 b	35,93 bc	34,44 b
A.O-3	38,15 b	16,30 c	11,11 c
A.O-5	52,22 ab	51,48 ab	51,48 ab
A.O-6	63,70 a	62,59 a	62,22 a
A.O-8	54,44 ab	55,19 ab	51,48 ab
A.Q-8	51,11 ab	51,11 ab	51,11 ab
R.C-3	61,48 a	60,00 a	60,00 a
Probabilidad	0,001	<0,001	<0,001
Error estándar	4,07	4,32	4,5

a, b, c letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas según Tukey 0,05.

Para el caso de *Fusarium* los porcentajes de inhibición fueron superiora los 70 % en la mayoría de casos. Algunas cepas mantuvieron su porcentaje mostrado con *Macrophomina* y otras aumentaron su capacidad antagónica con respecto a *Macrophomina*. Por lo que es posible que la actuación de una cepa tenga relación directa con el patógeno.

En el cuadro 4 se observa que la cepa con mayor porcentaje fue A.O-1 en todas las evaluaciones con 81,11 y 80 %. Los menores promedios fueron variables en cada evaluación y no coincidió con lo ocurrido en *Macrophomina*. La cepa R.C-3 presento el menor promedio en la tercera evaluación, después de haber alcanzado un promedio superior al 70 % en las anteriores

evaluaciones descendió a 27,04 %. Lo que hace presumir que la competencia por alimento y sobrevivencia de ambos patógeno la gana el *Fusarium*. Otra cepa se notó similar comportamiento fueron la A.O-8 y A.O-6 aunque con menor descenso (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Porcentaje de inhibición radial de *Fusarium*

Tratamientos	Evaluaciones (días)		
	3	6	9
A.O-1	81,11 a	80,00 a	80,00 a
A.O-2	68,89 ab	68,15 abc	68,15 abc
A.O-3	68,15 ab	67,41 abc	66,37 abc
A.O-5	71,37 ab	66,67 abc	66,67 abc
A.O-6	62,22 b	58,15 c	51,11 c
A.O-8	61,11 b	48,89 bc	56,67 bc
A.Q-8	71,48 ab	70,74 abc	70,74 ab
R.C-3	74,07 ab	72,96 ab	27,04 bc
Probabilidad	0,003	0,0015	0,0014
Error estándar	2,83	2,92	3,69

a, b, c, letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas según Tukey 0,05.

Los porcentajes encontrados fueron superiores a los reportados por Suárez *et al.* (2008) que al evaluar 12 cepas de *Trichoderma* (comercial y nativo) todas presentaron inhibición con porcentajes no mayores al 71 %. Por otro lado Michel *et al.* (2001) y Michel *et al.* (2005), al evaluar el efecto antagónico de aislados nativos de *Trichoderma spp*, sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, los valores máximos de inhibición fueron del 47,6 %. Arzate *et al.* (2006), al evaluar a *Trichoderma.*, sobre *Mycosphaerella fijiensis*, seleccionaron 6 de 25 aislados que inhibieron al menos el 45 % el crecimiento del micelio del fitopatógeno.

Sin embargo, en estudios de antagonismos de *Trichoderma* con otros patógenos se han encontrado porcentajes del orden de 80 % (Michel *et al.*, 2008). Por lo antes expuesto no es raro encontrar una alta variabilidad de antagonismo de cepas de diferentes o igual géneros o especies.

Al evaluar las cepas por la metodología de Ezziyyani *et al.* (2004) se encontraron cierta variación con respecto al porcentaje de inhibición radial. Es necesario mencionar que en este caso se evalúa visualmente la invasión del

antagonista sobre el patógeno. Para el caso de *Macrophomina* la mayoría de cepas no se identifica ninguna invasión por parte del antagonista. La cepa A.O-5 y R.C-3 en la primera evaluación presentan  $\frac{1}{4}$  de invasión, sin embargo, solamente la cepa A.O-5 aumenta su invasión en las siguientes evaluaciones llegando a la invasión total. En *Fusarium* se tuvo similar comportamiento, acentuando la acción de la cepa A.O-5 sobre el patógeno presentado en *Macrophomina*, la misma que fue creciendo progresivamente hasta finalmente lograr la invasión total y esporulación sobre ella. Las demás cepas no presentaron invasión ninguna (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Evaluación cualitativa de la capacidad antagónica contra *Macrophomina*

Tratamientos	Evaluaciones		
	3 días	6 días	9 días
A.O-1	1	1	1
A.O-2	1	1	1
A.O-3	1	1	1
A.O-5	1-2	2	5
A.O-6	1	1	1
A.O-8	1	1	1
A.Q-8	1	1	1
R.C-3	1-2	1	1

Suárez *et al.* (2008) encontraron un parasitismo variable que en algunas cepas también llegaron a la esporulación del antagonista sobre el patógeno. Sin embargo, se debe rescatar que la mayoría de las cepas tuvieron la mitad de la superficie cubierta de parasitismo, siendo consistente con la evaluación del porcentaje de inhibición radial. Al contrario de lo encontrado en esta investigación donde la inhibición radial no concordó con el parasitismo ya que la mayoría de cepa solo llegó a  $\frac{1}{4}$  de la superficie del patógeno cubierta. Hoyos *et al.* (2008) al evaluar *Trichoderma* de diferentes especie frente a *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* obtuvieron un 100 % de micoparasitismo (totalidad de la superficie cubierta por el antagonista) en la gran mayoría de las cepas.

**Cuadro 6.** Evaluación cualitativa de la capacidad antagónica contra *Fusarium*

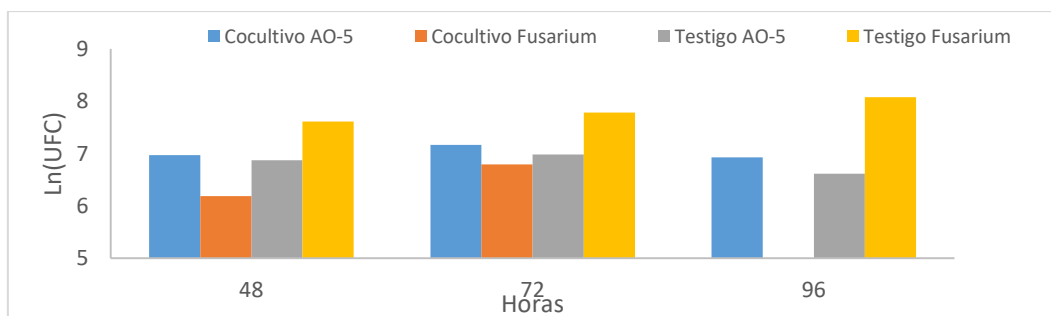
Tratamientos	Evaluaciones		
	3 días	6 días	9 días
A.O-1	1	1	1
A.O-2	1	1	1
A.Q-8	1	1	1
A.O-5	1-2-3	4-5	5

A.O-6	1	1	1
A.O-3	1	1	1
A.O-8	1	1	1
R.C-3	1	1	1

### 2.2.2. Actividad antagónica

Con los datos y observaciones realizados en la evaluación anterior se toma la decisión de evaluar a la cepa A.O-5 en medio líquido como cocultivo, con los patógenos *Macrophomina* y *Fusarium*. El gráfico 1 muestra el crecimiento de la cepa A.O-5 y *Fusarium* tanto en cultivos aislados como en cocultivo. El crecimiento del patógeno es progresivo en el cultivo aislado sin el antagonista, pero al cultivarlo con el antagonista este interrumpe el crecimiento del patógeno a las 96 horas a diferencia de lo reportado por Fernández y Suárez (2009) quienes encontraron una inhibición a los cuatro días.

Es probable que la cepa A.O-5 actúe a partir de las 72 horas debido a la competencia generada por la escasez de alimento y su máximo poder antagonista lo muestre en esta necesidad. Además, no hay que dejar de lado la posible resistencia del patógeno en las primeras horas. La cepa A.O-5 tanto en cultivo asilado como dual tiene el mismo comportamiento con un pico máximo en 72 horas y un pequeño descenso a las 96 horas. Similar comportamiento encontró Fernández y Suárez (2009) al evaluar cepas de *Trichoderma* como antagonista de *F. oxysporum*.

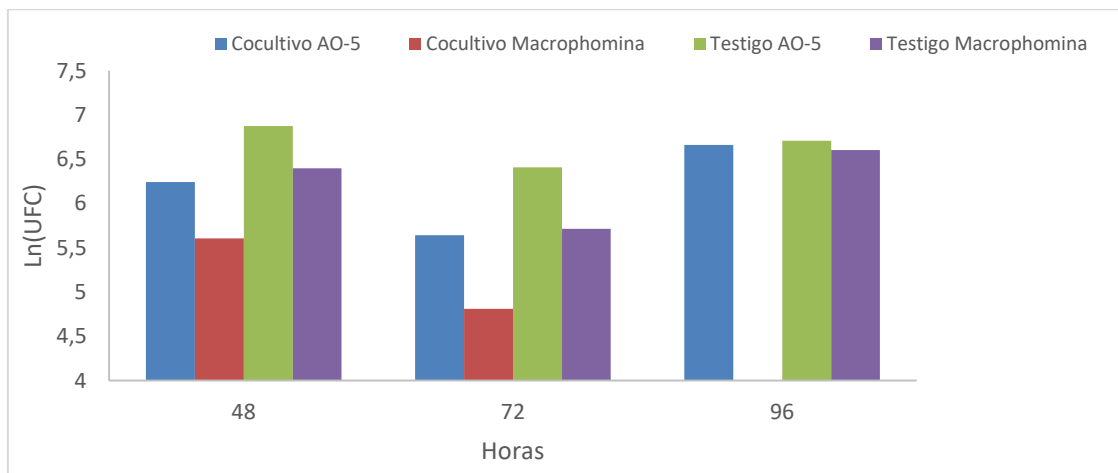


**Gráfico 1.** Actividad antagonista de la cepa A.O-5 frente a *Fusarium* en cocultivo medio líquido

A diferencia del *Fusarium*, *Macrophomina* desde el inicio presenta una tendencia a disminuir al cultivarla con el antagonista, coincidiendo en ambos patógenos que a las 96 horas sucede la eliminación total. Es posible



que este patógeno sea más susceptible a la acción de microorganismos antagonistas. Aunque, al cultivarlo solo, presenta a las 72 h una disminución para luego aumentar su crecimiento, de manera que al tomar en cuenta este comportamiento propio del patógeno, se puede decir que el antagonista actuó mayormente al momento que el patógeno estuvo más susceptible.



**Gráfico 2.** Actividad antagonista de la cepa A.O-5 frente a *Macrophomina* en cocultivo medio líquido.

### 3. CONCLUSIONES

- Todas las cepas de hongos celulolíticos evaluadas ejercieron inhibición radial frente a los patógenos.
- En la evaluación cualitativa del parasitismo solamente la cepa A.O-5 presenta un cubierto total y esporulación sobre el patógeno.
- La cepa A.O-5 en crecimiento dual en medio líquido inhibe el desarrollo de *Fusarium* y *Macrophomina* a las 96 horas de incubación.

### 4. LITERATURA CITADA

Arzate-Vega, J.; Michel-Aceves, A. C.; Domínguez-Márquez, V. M. y Santos-Eméstica, O. A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma spp.*, sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoca negra del

plátano (*Musa sp.*) *in vitro* e invernadero. Rev. Mex. Fitopatol. 24: 98-104.

Ezziyyani, M.; Perez, S. C.; Requena, M. E.; Rubio, L. y Candela, M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomycesrochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: p 69-78.

Fernández R; y Suárez C. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 62(1): 4743-4748.

Guzmán, A.; Zambrano, D.; Rondón, A.; Silva, M.; Pérez, M.; León, R y Rivera, R. 2014. Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. Revista Facultad de Ciencias Agrarias UNCUYO. 46(2): 177-189.

Hoyos, L; Chaparro, P; Abramsky, M; Chet, I; Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Agronomía Colombiana. 26(3): 451-458.

Michel, A. C.; Otero, M. A.; Martínez, R. D.; Rebolledo, O.; Lezama, R. y Ariza, R. 2005. Actividad micoparasítica *in vitro* de *Trichoderma Pers.: Fr. spp.*, sobre *F. subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) P.E. Nelson, T. A. Toussoun y Marasas y *F. oxysporum Schlechtend.: Fr.* Rev. Mex. Fitopatol. 23(3). 253-261.

Michel, A. C.; Rebolledo, O. y Lezama, R. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Rev. Mex. Fitopatol. 19 (2): 154-160.

Michel, A; Otero, M.; Martínez, R; Ariza, R; Barrios, A; Rebolledo, A. 2008. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Avances en Investigación Agropecuaria.12 (3):55-68.

- Pineda J. 2001. Evaluación de métodos de aplicación de *Trichoderma harzianum* al suelo para el control de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí. *Fitopatología venezolana*. 14(2):31-34.
- Pineda, J; Gonnella E. 1988. Evaluación del control biológico de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Agronomía tropical*. 38(4-6):43-48.
- Reyes A, Ruiz E, Yam C, Dzul M. 2011. selección de *Bacillus Spp.* con actividad antagonista in vitro contra *Macrophomina phaseolina* (TASSI) Goid en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad*. 15(2):117-121.
- Roselló, J. 2003. Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos. Tesis de grado doctoral. Universidad de Valencia. ES. p 4- 26- 38
- Santamarina, MP; Sanz, I; Roselló, J; García, J. 2001. Una cepa de *Trichoderma harzianum* con un fuerte potencial para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y hongos productores de micotoxinas. Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de
- Sosa, M; Ruiz E, Mejía M, Reyes A, Cristóbal J, Valencia A, Gutiérrez O. 2012. Actividad antagonista in vitro de aislados de la clase *Bacillus* de la península de yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. *Universidad y ciencia*. 28 (3):279-284.
- Suárez C L; Fernández, R; Valero O, Gámez, R; Páez, A. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(2): 35-43.