

Capacidad antagónica de aislamientos nativos y comerciales de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus* aislados de maíz

Iraima Concepción Rodríguez Martínez

¹Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay 2101, Aragua. Venezuela

RESUMEN

Para comparar la capacidad antagónica *in vitro* de 17 aislamientos de *Trichoderma*, 13 nativos (AN) (T_1 , $T_{1,1}$, $T_{1,2}$, $T_{2,1}$, $T_{2,4}$, T_3 , $T_{4,2}$, $T_{4,3}$, $T_{6,2}$, $T_{9,1}$, $T_{16,1}$, T_{va} , T_{vc}) y 4 comerciales (AC) {A (*T. viride*), B (*T. lignorum*), C (*T. harzianum*), D (*T. harzianum*)} frente a *Fusarium verticillioides* (Fv) y *Aspergillus flavus* (Af), se utilizó el método de cultivo dual en PDA, y se midió dicha capacidad, mediante las variables de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIC) y de esporulación (PIE). Se evaluaron 34 pruebas de enfrentamiento con su testigo (sólo Fv o Af), bajo un Diseño Completamente Aleatorizado, con 5 repeticiones/tratamiento y mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$). Se identificaron a nivel de especie los 4 aislamientos de *Trichoderma* que resultaron destacados, sobre la base de sus características macroscópicas, microscópicas y comparación con claves micológicas. Los resultados indicaron diferencias entre los aislamientos de *Trichoderma* en las variables medidas, para ambos patógenos en estudio (Fv y Af). En las interacciones entre Fv y AN de *Trichoderma*, los PIC variaron desde 2,18% hasta 43,33%, mientras que los PIE desde 10,89% hasta 92,74%, destacando T_{va} , T_{vc} , $T_{2,1}$ y $T_{2,4}$. Dentro de los AC sobresalieron *T. viride* (PIC: 44,4% y PIE: 93,78%), y *T. harzianum* (D) (PIC: 12,5% y PIE: 90,24%). En los enfrentamientos Af vs AN, el PIC varió entre 22,4 y 55,1%, siendo los mejores $T_{9,1}$ y $T_{4,3}$ con 55,15 y 53,1%, respectivamente. Dentro de los AC, se halló que el PIC estuvo entre 36,70% {*T. harzianum* (D)} hasta 47,55% (*T. lignorum*). Se concluye que los aislamientos promisorios de *Trichoderma* frente a los patógenos en estudio fueron T_{va} (*T. aureoviride*) y T_{vc} (*T. viride*) sobre Fv y $T_{9,1}$ (*T. harzianum*) y $T_{4,3}$ (*T. atroviride*) en Af, los cuales pudieran ser ensayados solos o combinados en diferentes condiciones (*in vitro*, umbráculo y campo).

Palabras clave: control biológico, hongos antagónicos, hongos patógenos.

Antagonistic capacity of native and commercial isolates of *trichoderma* spp. against *fusarium verticillioides* and *aspergillus flavus* isolated from corn

ABSTRACT

To compare the *in vitro* antagonistic capacity of 17 *Trichoderma* isolates, 13 native isolates (AN) (T_1 , $T_{1,1}$, $T_{1,2}$, $T_{2,1}$, $T_{2,4}$, T_3 , $T_{4,2}$, $T_{4,3}$, $T_{6,2}$, $T_{9,1}$, $T_{16,1}$, T_{va} , T_{vc}) and 4 commercial isolates (AC) {A (*T. viride*), B (*T. lignorum*), C (*T. harzianum*), D (*T. harzianum*)} versus *F. verticillioides* (Fv) and *A. flavus* (Af) the method of dual cultures in PDA was used and this capacity was measured using variables mycelial growth inhibition (PIC)

*Autor de correspondencia: Iraima Rodríguez

E-mail: iraima1408@gmail.com

and sporulation (PIE). The evaluation consists of 34 confrontation tests with their control (only Fv or Af) under a Completely Randomized Design with 5 repetitions / treatment and by Tukey test ($\alpha = 0.05$). The 4 isolates of *Trichoderma* that were highlighted were identified at the species level, based on their macroscopic, microscopic characteristics and comparison with mycological clues. The results indicated differences between the isolates of *Trichoderma* in the measured variables, for both pathogens under study (Fv and Af). In the interactions between Fv and AN of *Trichoderma*, the CIP varied from 2.18% to 43.33%, while the PIE from 10.89% to 92.74%, distinguish T_{va}, T_{vc}, T_{2,1} and T_{2,4}. Within CA, *T. viride* (PIC: 44.4% and PIE: 93.78%), and *T. harzianum* (D) (PIC: 12.5% and PIE: 90.24%) stood out. In the Af vs. AN clashes, the PIC varied between 22.4 and 55.1%, with the best T9.1 and T4.3 with 55.15 and 53.1%, respectively. Within the CA, it was found that the PIC was between 36.70% {*T. harzianum* (D)} up to 47.55% (*T. lignorum*). It is concluded that the promising isolates of *Trichoderma* against the pathogens under study were Tva (*T. aureoviride*) and Tvc (*T. viride*) on Fv and T_{9,1} (*T. harzianum*) and T_{4,3} (*T. atroviride*) on Af, which could be tested alone or combined in different conditions (*in vitro*, umbraculum and field) conditions.

Key words: biological control, antagonistic fungi, pathogenic fungi.

INTRODUCCIÓN

En las siembras de maíz (*Zea mays* L.), ubicadas en el sur del estado Aragua; así como, en otras zonas productoras del país localizadas en Portuguesa, Guárico y Yaracuy, se presentan problemas de diversa índole, entre ellos los ocasionados por hongos, con su consecuente efecto en el rendimiento y la calidad de los granos que se cosechan. Para inhibir su desarrollo, se ha empleado de manera tradicional la aplicación de productos químicos que evitan la germinación de las esporas, así como el crecimiento del micelio en el sustrato susceptible a ser contaminado con micotoxinas (Moreno y Vásquez, 2000).

El uso de fungicidas en la producción de maíz y otros cultivos, implica la acumulación de residuos tóxicos en los alimentos y en el ambiente, con serias consecuencias para la salud humana y animal (González, 1995; Rodríguez, 2002). Para disminuir el uso de los agroquímicos, se ha tratado de implementar dentro del manejo integrado de algunos cultivos, el uso del control biológico, el cual se basa en la utilización de microorganismos antagonistas para el control de hongos que ocasionan enfermedades en plantas cultivadas, sin ocasionar contaminación al medio ambiente. *Trichoderma* es un género fúngico de gran interés biotecnológico por ser un agente de biocontrol que se adapta a numerosos ambientes y cultivos, por ser una fuente considerable de genes y de enzimas hidrolíticas de diferentes sustratos. Posee varios mecanismos de control, que no sólo incluyen la acción directa sobre los patógenos, sino también, la emisión de compuestos volátiles y no volátiles (Inojosa *et al.*, 2013).

La aplicación de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos y mohos productores de micotoxinas, (géneros *Aspergillus* y *Fusarium*) se hace principalmente a nivel de campo y no sobre la masa de granos, ya que es allí donde los granos de maíz se contaminan con sus esporas (Stefanova *et al.*, 1999). Si se aplica *Trichoderma* sobre los granos, se comportaría igual que otro hongo, compitiendo por espacio y nutrientes, y por tanto contribuirá con su deterioro y pérdida de calidad.

En condiciones favorables, los hongos *Fusarium* y *Aspergillus* colonizan el maíz de forma endofítica, sin causar síntomas. Sin embargo, cuando las plantas padecen estrés por sequía, deficiencias de nutrientes y altas temperaturas, estos hongos producen grandes cantidades de micotoxinas (Mahuki y Mejía, 2010).

Dentro del manejo integrado, el uso de microorganismos antagonistas es una alternativa muy importante, ya que estos no generan daños a los cultivos, a la salud del consumidor y al medio ambiente y por tanto puede ser considerada una opción para tratar de resolver los problemas de contaminación con estos hongos (*A. flavus* y *F. verticillioides*) y las micotoxinas producidas por ellos. En función a lo mencionado, se planteó evaluar la capacidad antagonista de diferentes aislamientos nativos y comerciales de *Trichoderma* sobre *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg y *Aspergillus flavus* Link aislados de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía, UCV. Trabajo que consistió en obtener a partir de muestras de suelo, los aislamientos de *Trichoderma* spp. y medir su capacidad

antagónica “*in vitro*” frente a *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus* mediante el empleo de pruebas de enfrentamiento (cultivo dual). Una vez culminadas tales pruebas se pudo observar cuáles de los aislamientos antagonistas controlaron mejor el crecimiento de los hongos mencionados y la producción de conidios de *Fusarium* a los 7 días de enfrentamiento. Para ello se cumplieron los siguientes pasos:

Aislamiento e identificación de *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus*. Los aislamientos de *F. verticillioides* y *A. flavus* se obtuvieron a partir de maíz amarillo recolectado en una finca del sur del estado Aragua y una del estado Guárico. Los granos se sembraron por el método de siembra directa, de 10 a 12 granos sobre el medio malta sal agar (pH 5,8), previa desinfección con NaClO al 3,27% durante 30 seg. A los 7 días de incubación a temperatura ambiente del laboratorio, se examinaron bajo una lupa estereoscópica, para seleccionar los hongos en referencia y confirmar posteriormente cada especie (Castillo, 2005). Para ello se utilizó el método tradicional de identificación, el cual consistió en la descripción de las características macroscópicas de los hongos en un medio de cultivo (PDA), medición de las estructuras fúngicas de valor taxonómico y comparación con claves micológicas especializadas (Booth, 1971; Onions, *et al.*, 1981; Samson *et al.*, 1995; Leslie y Summerell, 2006). Esta descripción se realizó a los 7 días de haberse efectuado la siembra (Rodríguez y Flores, 2018).

Aislamiento e identificación del *Trichoderma*. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. se obtuvieron a partir de muestras de suelo procedentes de zonas productoras de maíz. Se seleccionaron al azar 30 plantas de maíz, y de la base de cada una de ellas se tomó una muestra de suelo con raíces. Ello se repitió en las 2 fincas que se visitaron (Cuadro 1). El método de siembra utilizado fue el de incorporación en placas y el aislamiento se efectuó en el medio papa dextrosa agar (PDA). La incubación de las cajas Petri se realizó a 28 °C por un período de 3 a 5 días. Para la identificación a nivel de género, se procedió a hacer observaciones macroscópicas de las colonias obtenidas y microscópicas de las estructuras fúngicas así como la comparación con ilustraciones alusivas al hongo (Bissett, 1991a, 1991b), mientras que para la identificación a nivel de especie, se efectuó además de la descripción de las colonias formadas en PDA, la medición de las estructuras de valor taxonómico y el cotejo de la información obtenida con claves micológicas

(Rifai, 1969; Bissett, 1991a, 1991b). Esto último fue realizado en 4 aislamientos de *Trichoderma*, diferenciados de los restantes en base a su capacidad antagónica frente a *F. verticillioides* y *A. flavus*.

Cuadro 1. Denominación y procedencia de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

| Aislamiento (s) | Ubicación de la Finca estado/municipio |
|---|--|
| T ₁ , T _{1,1} , T _{1,2} , T _{2,1} , T _{2,4} , T ₃ | Guárico, municipio Julián Mellado |
| T _{4,2} , T _{4,3} , T _{6,2} , T _{9,1} , T _{16,1} , T _{va} , T _{vc} | Aragua, municipio Urdaneta |

Prueba de efectividad antagónica. Para comparar la capacidad antagónica *in vitro* de los 13 aislamientos de *Trichoderma* obtenidos a nivel de campo (nativos) y los aislados de 4 formulaciones comerciales {A (*T. viride*), B (*T. lignorum*), C (*T. harzianum*) y D (*T. harzianum*)} frente a los hongos *F. verticillioides* y *A. flavus* se utilizó el método de cultivo dual en el medio PDA. Para el montaje de los enfrentamientos, se tomaron placas de Petri de 9 cm con el medio PDA, las cuales fueron sembradas en uno de sus extremos con un disco de 0,5 cm de diámetro del antagonista (*Trichoderma* nativo o comercial) y en el otro con un disco del hongo patógeno (Fv o Af) en todas las combinaciones posibles, además de los testigos correspondientes (Rodríguez y Flores, 2018). La variable evaluada fue tamaño de la colonia medida en centímetro (cm) y para el caso de las interacciones con *Fusarium*, se determinó además la concentración de esporas (esporulación) expresado en número de conidios/ml de solución a los 7 días de enfrentamiento. La misma se determinó, separando las colonias de *Trichoderma* obtenidas de cada interacción y cuantificando por separado el número de esporas/ml. Para ello se realizó un lavado del crecimiento fúngico presente en la superficie del medio, mediante el uso de una varilla de vidrio y la incorporación de 10 ml de agua destilada estéril. La mezcla obtenida se filtró, siendo el volumen recogido la dilución 10⁰. A partir de esta suspensión de esporas, se realizaron diluciones seriadas (10⁰ hasta 10⁸) y con la ayuda de la cámara de Neubauer se hicieron los contajes correspondientes siguiendo los criterios establecidos por French y Hebert (1980).

Las variables señaladas se expresaron en porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) (Ezziyani, *et al.*, 2004) y porcentaje de inhibición de esporulación (PIE). Ambos porcentajes se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

Porcentaje de inhibición de crecimiento:

$$\text{PIC (\%)} = \frac{(\text{crecimiento del testigo} - \text{crecimiento del trat.}) \times 100}{(\text{crecimiento del testigo})}$$

Porcentaje de inhibición de esporulación:

$$\text{PIE (\%)} = \frac{(\text{esporulación del testigo} - \text{esporulación del trat.}) \times 100}{(\text{esporulación del testigo})}$$

Análisis estadístico. Se realizaron 34 pruebas de enfrentamiento (17 aislamientos de *Trichoderma* vs *F. verticillioides* o *A. flavus*, según corresponda) con su testigo correspondiente (5 placas sólo con *F. verticillioides* o *A. flavus* según el caso). Se utilizó un diseño completamente al azar de 36 tratamientos y cada tratamiento constó de 5 repeticiones, donde cada cápsula Petri se consideró una unidad experimental, siendo 180 el total de placas sembradas. Tanto el PIC de los patógenos (Af y Fv) y el PIE (Fv) fueron analizados vía paramétrica, previa comprobación de los supuestos de ANAVAR y se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$). En este último caso (PIE-Fv), también se cotejaron los valores obtenidos en las interacciones con el testigo mediante la prueba de Dunnett ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus*. En el caso de *F. verticillioides* (Booth, 1971; Leslie y Summerell, 2006), las características de crecimiento en PDA fueron: colonia de lento crecimiento, de color rosado pálido con ligeras tonalidades púrpura conforme avanza en madurez, presenta micelio aéreo ligeramente denso, en su reverso se aprecian áreas violáceas en alternancia con tonalidades crema; mientras que la descripción y medición de las estructuras de valor taxonómico es la siguiente: conidióforos no ramificados con 2 a 3 fiálides simples; microconidios de 4,1 x 3,0 μm , clavados y con base truncada, con 0 a 1 septo y dispuestos en cadenas o en falsas cabezuelas; macroconidios escasos con 3 a 4 septos, delgados y ligeramente curvos, de 35 x 2,9 μm , no formó clamidosporas.

En lo que respecta a *A. flavus* (Onions *et al.*, 1.981; Samson *et al.*, 1995), desarrolla colonias en PDA de crecimiento rápido, de 3 a 5 días alcanzan los 9 cm; comienzan con una tonalidad blanco-amarillenta, algodonosas; con el tiempo se tornan pulverulentas y con tonalidades verdosa o verde-amarillentas. En cuanto a sus características microscópicas, presenta un micelio septado, hialino, ramificado, con conidióforos largos (estipes), cenocíticos, de 1,1 mm de longitud y de 12 a 14 μm de diámetro, cerca de la vesícula se observa algo rugoso. Las vesículas son esféricas con diámetro de 25 a 35 μm , cubiertas en su totalidad por 2 series de fiálides (biseriada), de las cuales se desprenden conidios globosos a subglobosos, finamente rugosos, de 4,5-5,0 x 3,5-4,4 μm .

Aislamiento e identificación de *Trichoderma*.

De las 60 muestras de suelo recolectadas a nivel de campo, se obtuvieron por el método de incorporación en placas 13 aislamientos de *Trichoderma* ($T_1, T_{1,1}, T_{1,2}, T_{2,1}, T_{2,4}, T_3, T_{4,2}, T_{4,3}, T_{6,2}, T_{9,1}, T_{16,1}, T_{va}, T_{vc}$), los cuales se identificaron a nivel de género tomando en consideración algunas características de crecimiento en medio de cultivo (colonias de rápido crecimiento, de color verde en diferentes tonalidades) y observación de estructuras fúngicas típicas del hongo en referencia (micelio hialino y septado, con conidióforos ramificados y fiálides curvados ligeramente y en forma de botella, conidios de color verde y de pared lisa, clamidosporas en su mayoría elípticas e intercalares) (Rifai, 1969; Bissett, 1991a, 1991b). De los 13 aislamientos se identificaron sólo 4 sobre la base de su capacidad antagonica frente a cada hongo patógeno evaluado (2 para el caso de *F. verticillioides* y 2 para *A. flavus*). El resto de los aislamientos se conservaron en PDA inclinado, bajo refrigeración y forman parte de la colección de hongos antagonicos del Laboratorio de Microbiología, FAGRO-UCV.

Prueba de capacidad antagonica (*Trichoderma* spp. vs *F. verticillioides*). En el Cuadro 2, se presentan los resultados obtenidos al confrontar por el método de cultivo dual, a *F. verticillioides* frente a 13 aislamientos nativos y 4 especies comerciales de *Trichoderma*. Si bien se conoce, que la acción del biocontrolador puede diferir al interactuar con otra especie del patógeno (aun siendo del mismo género, por ejemplo, *Fusarium*) y aislado de otro cultivo, vale la pena comparar los resultados obtenidos de esta investigación frente a los señalados por otros autores. En el caso de

F. verticillioides, los PIC variaron desde 2,18% hasta 43,33%, siendo estos valores entre bajos e intermedios si se les compara con los señalados por Castillo (2005) y Altuna *et al.* (2003) quienes trabajando por separado en pruebas de enfrentamiento *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y 2 formas especiales de *F. oxysporum* [*cubense* (musáceas) y *lycopersici* (tomate)], alcanzaron un PIC de 16 a 20% el primer autor, mientras que los segundos obtuvieron un PIC promedio de 49%. Dentro del grupo de aislamientos probados, T_{4,3} fue el aislamiento que causó el mayor PIC sobre *Fusarium* con un 43,33%, seguido de T_{vc} con 41,59% y T_{va} con 39,34%. El menor PIC se obtuvo con T_{4,2} (2,18 %).

En cuanto a los PIE, variaron desde 10,89% hasta 92,74%, destacando particularmente T₁, T_{1,1}, T_{4,2}, T_{9,1} y T_{16,1}, los cuales lograron reducir significativamente la cantidad de esporas formadas del patógeno en relación al testigo (Dunnett P≤0,05), desde 61,81 hasta 92,74% (Cuadro 2). Los mejores PIE se alcanzaron en las interacciones con T_{va} y T_{vc}, con 92,74 y 90,82%, respectivamente, mientras que la menor se presentó con T₁ (10,89%). Igualmente se presentaron 3 enfrentamientos, en donde se observó excepcionalmente una mayor producción de esporas en *Fusarium* (T_{1,1}, T_{4,2} y T_{16,1}), respecto al cuantificado en las placas testigo (sólo Fv), lo que condujo a obtener valores negativos en el cálculo del PIE y por tanto fueron indicados dentro del Cuadro 2 con el superíndice 2.

Al compararse los resultados de PIC (desde 2,18 hasta 43,33%) y PIE (desde 10,89% hasta 92,74%) obtenidos con los referidos por Rodríguez y Flores, 2018 (PIC entre 46,66 hasta 70,83% y PIE desde 65,59% hasta 95,42%), se observan que fueron bajos. Ello puede estar relacionado con diferencias en la capacidad antagonica de los aislamientos de *Trichoderma* utilizados en ambas investigaciones así como en la agresividad, virulencia y velocidad de crecimiento de los aislamientos de *F. verticillioides* ensayados. Sin embargo, una vez consideradas las variables evaluadas (PIE y PIC) destacan del grupo T_{va}, T_{vc}, T_{2,1} y T_{2,4} por reducir aceptablemente el crecimiento micelial (PIC: desde 21,52 hasta 41,59%) y disminuir significativamente la cantidad de esporas formadas de *Fusarium* en comparación a su testigo (PIE: desde 61,81 hasta 92,74%).

Con relación a las pruebas antagonicas efectuadas con 4 especies comerciales de *Trichoderma* frente a *F. verticillioides*, se obtuvo que el PIC varió entre 5,6 hasta 44,4%; mientras que el PIE fluctuó entre 2,55 hasta 96,30% (Cuadro 2). Dentro de las especies de *Trichoderma* probadas, destacaron *T. viride* con un PIC de 44,4% y PIE de 93,78%, y *T. harzianum* (D) con un PIC de 12,5% y PIE de 90,24%. Si bien los PIC alcanzados por cada una de estas especies resultaron de bajos a intermedios, son similares algunos de ellos a los obtenidos por Castro (2013), quien encontró valores

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIC) y de la esporulación (PIE) de *Fusarium verticillioides* en 17 combinaciones de enfrentamiento con 13 aislamientos nativos y 4 especies comerciales de *Trichoderma*, bajo condiciones de laboratorio.

| Aislamiento de <i>Trichoderma</i> (nativo) | PIC ¹ | PIE ¹ | Aislamiento de <i>Trichoderma</i> (nativo o especie comercial) | PIC | PIE |
|---|----------------------|--------------------------------|---|---------------------|--------------------------------|
| T ₁ | 24,33 ^{ef} | 10,89 ^{ij} | T _{9,1} | 25,36 ^e | 13,58 ⁱ |
| T _{1,1} | 22,54 ^{fg} | ² 4,24 ^m | T _{16,1} | 39,00 ^{bc} | ² 2,28 ^l |
| T _{1,2} | 23,35 ^{efg} | 38,19 ^g | T _{va} | 39,34 ^{bc} | *92,74 ^{ab} |
| T _{2,1} | 30,04 ^d | *61,81 ^e | T _{vc} | 41,59 ^{ab} | *90,82 ^{bc} |
| T _{2,4} | 21,52 ^{fgh} | *79,49 ^d | A (<i>T. viride</i>) | 44,4 ^a | *93,78 ^{ab} |
| T ₃ | 16,46 ⁱ | 51,77 ^f | B (<i>T. lignorum</i>) | 5,6 ^l | 2,55 ^k |
| T _{4,2} | 2,18 ^m | ² 6,54 ⁿ | C (<i>T. harzianum</i>) | 7,2 ^k | *96,30 ^a |
| T _{4,3} | 43,33 ^a | 36,63 ^g | D (<i>T. harzianum</i>) | 12,5 ^j | *90,24 ^{bc} |
| T _{6,2} | 20,82 ^{ghi} | 29,27 ^h | | | |

Medias con superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas de acuerdo a la Prueba de Tukey (p;0,05)

Los asteriscos en la columna de PIE indican diferencias significativas con el testigo según la prueba de Dunnett (P≤0,05)

¹Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), porcentaje de inhibición de la esporulación (PIE)

²Aumento de la esporulación.

de PIC entre 32,61 y 35,59% al enfrentar en cultivo dual a *Trichoderma* spp. y *F. verticillioides*, aislado de maíz. Este mismo autor pero en 2011, observó que *T. longibrachiatum* y *T. asperellum* redujeron el crecimiento del mismo patógeno en 57,23 y 42,64%, respectivamente, los cuales están ligeramente por encima de los resultados alcanzados en esta investigación. Esta divergencia pudiera estar relacionada con las cepas utilizadas tanto del antagonista como del patógeno. Con relación al PIE se puede indicar que tanto *T. viride* como *T. harzianum* (D) lograron inhibir considerablemente la cantidad de esporas formadas por *F. verticillioides* respecto al testigo, lo cual es muy importante, ya que influye de manera significativa en la capacidad de diseminación y perpetuación del hongo en el campo, así como es un criterio relevante al considerar posibles aislamientos promisorios de biocontroladores a nivel de laboratorio.

Cabe destacar además, la poca capacidad antagónica *in vitro* demostrada por la especie comercial *T. lignorum* frente a *F. verticillioides* (PIC = 5,6% y PIE = 2,55%), la cual estuvo almacenada durante meses previo a su utilización y bajo condiciones de almacenamiento inadecuadas (alternancia de temperatura y de humedad), lo que pudiera haber afectado la viabilidad y efectividad de las estructuras reproductivas del hongo, a diferencia del resto de los aislamientos comerciales que fueron donados o adquiridos con fecha reciente de elaboración y de los nativos que se obtuvieron de las muestras de suelo recolectadas.

Al comparar todos los aislamientos nativos y especies comerciales de *Trichoderma* frente al patógeno en referencia, se puede señalar que la especie comercial *T. viride* fue la que manifestó en mayor medida su habilidad para inhibir tanto la formación de micelio como la producción de esporas, seguido de los aislamientos nativos T_{va} y T_{vc} , los cuales por su naturaleza autóctona serían considerados como promisorios para la búsqueda de antagonistas en el control de *F. verticillioides* por ser aislados de suelos donde se siembra el cultivo de maíz.

Prueba de efectividad antagónica (*Trichoderma* spp. vs *A. flavus*). En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos de PIC al enfrentar bajo condiciones de laboratorio, al hongo *A. flavus* y a

diferentes aislamientos nativos y especies comerciales de *Trichoderma*. Con relación a los aislamientos nativos, se puede indicar que el PIC varió entre 22,4 y 55,1%, siendo $T_{9,1}$ y $T_{4,3}$ los que presentaron los valores más altos con 55,1 y 53,1%, respectivamente. Le siguieron en orden de importancia, T_{vc} (51%), T_1 (48,6%) y los aislamientos $T_{2,1}$, $T_{4,2}$, $T_{6,2}$ y $T_{16,1}$ con 46,9%. Con respecto a las especies comerciales, se encontró que el PIC estuvo entre 36,70% (*T. harzianum* (D)) hasta 47,55% (*T. lignorum*), siendo esta última especie, la que evidenció el mayor PIC contra *A. flavus*. Otros autores también han comprobado la reducción del crecimiento o de la producción de aflatoxinas por *A. flavus* mediante el uso de *Trichoderma* (*T. viride*) (Aliabadi *et al.*, 2013). Inojosa *et al.* (2013) aunque no trabajaron con el método de cultivo dual, demostraron mediante pruebas de efectividad antagónica, el efecto de compuestos volátiles emitidos por 4 aislamientos de *Trichoderma* [2 de *T. harzianum* (BAPSOS, I9), uno de *T. croseum* (06142) y otro de *T. koningii* (Santa María)], sobre el tamaño de la colonia (TC) y la densidad de esporulación (DE) de *A. flavus* aislado de maíz, logrando con el uso de I9 (*T. harzianum*) una disminución del PIC y del PIE, en un 16,67% y un 71,71% respectivamente.

La efectividad antagónica de *Trichoderma* sobre *A. flavus* medida en la capacidad de reducir el crecimiento y producción de aflatoxinas ha sido señalada particularmente para la especie *Trichoderma viride* en condiciones de laboratorio (Aliabadi *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2013), lo cual indica que es posible obtener especies de *Trichoderma* que podrían controlar aceptablemente a este hongo en condiciones controladas, tal como fue demostrado en esta investigación. Queda por tanto pendiente el probar su eficacia en los campos de maíz, sitios en los cuales se presenta la mayor contaminación de las mazorcas con esporas de hongos, previa a la cosecha y almacenamiento de los granos.

Una vez consideradas las variables estudiadas (PIC y PIE) para medir la eficacia en la capacidad antagónica de *Trichoderma* frente a los 2 hongos en estudio (*F. verticillioides* y *A. flavus*) se evidencia que el aislamiento T_{vc} (*T. viride*) demostró ser adecuado para el biocontrol de ambos hongos, sin embargo valdría la pena considerar la posibilidad de aplicarlo en el campo

Cuadro 3. Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* en 17 combinaciones de enfrentamiento con 13 aislamientos nativos y 4 especies comerciales de *Trichoderma*, bajo condiciones de laboratorio.

| Aislamiento de <i>Trichoderma</i> (nativo) | PIC ¹ | Aislamiento de <i>Trichoderma</i> (nativo o especie comercial) | PIC |
|---|---------------------|---|----------------------|
| T ₁ | 48,6 ^b | T _{9,1} | 55,1 ^a |
| T _{1,1} | 22,4 ^g | T _{16,1} | 46,9 ^{bc} |
| T _{1,2} | 44,9 ^{bcd} | T _{va} | 44,9 ^{bcd} |
| T _{2,1} | 46,9 ^{bc} | T _{vc} | 51,0 ^{ab} |
| T _{2,4} | 28,6 ^f | A (<i>T. viride</i>) | 39,59 ^e |
| T ₃ | 38,8 ^e | B (<i>T. lignorum</i>) | 47,55 ^b |
| T _{4,2} | 46,9 ^{bc} | C (<i>T. harzianum</i>) | 45,11 ^{bcd} |
| T _{4,3} | 53,1 ^a | D (<i>T. harzianum</i>) | 36,70 ^e |
| T _{6,2} | 46,9 ^{bc} | | |

Medias con superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas de acuerdo a la Prueba de Tukey (p;0,05)

¹Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC).

combinado con los otros aislamientos seleccionados {T_{va} (*T. aureoviride*), T_{9,1} (*T. harzianum*) y T_{4,3} (*T. atroviride*)} para así poder incrementar las posibilidades de reducir el crecimiento y la esporulación de los hongos patógenos mencionados, previa comprobación de su compatibilidad *in vitro* y en condiciones de umbráculo.

Identificación de las especies de *Trichoderma* utilizadas. En el Cuadro 4 se presentan las características morfométricas que permitieron identificar las 4 especies de *Trichoderma* seleccionadas de los ensayos de capacidad antagonista. Los aislamientos de *Trichoderma* T_{va} (*T. aureoviride*) y T_{vc} (*T. viride*) destacaron en cuanto a su magnitud de controlar *in vitro* el crecimiento y producción de estructuras reproductivas de *F. verticillioides*, mientras que para el caso de *A. flavus* resultaron promisorios T_{9,1} (*T. harzianum*) y T_{4,3} (*T. atroviride*) sobre la base de su capacidad de inhibición del crecimiento micelial. La caracterización de los aislamientos de *Trichoderma* a nivel de especie se realizó mediante la descripción macroscópica de la colonia, medición de estructuras fúngicas microscópicas y la comparación con claves micológicas especializadas

(Rifai, 1969; Bissett, 1991a, 1991b).

Los 17 aislamientos de *Trichoderma* entre nativos y comerciales probados en esta investigación, manifestaron diferentes niveles de capacidad antagonista, presentando algunos de ellos valores de PIC entre bajos a intermedios y PIE por encima del 90%. Los aislamientos de *Trichoderma* que resultaron ser los mejores frente a los patógenos en estudio fueron T_{va} (*T. aureoviride*) y T_{vc} (*T. viride*) sobre *F. verticillioides* y T_{9,1} (*T. harzianum*) y T_{4,3} (*T. atroviride*) sobre *A. flavus*. Las especies comerciales de *Trichoderma* que demostraron mejor capacidad de biocontrol frente a *Fusarium*, fueron *T. viride* (PIC de 44,4% y PIE de 93,78%) y *T. harzianum* (D) (PIC de 12,5% y PIE de 90,24%), mientras que para *Aspergillus* lo fueron *T. harzianum* (PIC=45,11%) y *T. lignorum* (PIC=47,55%), lo cual hace pensar en la necesidad de ensayarlos solos o combinados frente a los patógenos en estudio y en diferentes condiciones (*in vitro*, umbráculo y campo).

Cuadro 4. Características morfológicas diferenciales de las 4 especies de *Trichoderma* identificadas.

| Aislamiento/ Especie 'Secciones | Conidióforo(s) Características/ L (µm) | Fiálide(s) Características/ Largo x ancho (µm) | Conidio(s) (Forma/ color/ superficie/Largo x ancho (µm) | Clamidoporas Características/ diámetro (µm) | Colonia/ color/ Formación de pústulas |
|--|--|--|---|--|---|
| T _{va} / <i>T. aureoviride</i> / Trichoderma | Liso, simple, se ramifica a lo largo de su longitud en forma verticilada /95,3 | Divergentes (opuestos), dispuestos irregularmente a lo largo del conidióforo, formando un penicilo en la punta/ 13 x 3,8 | Elipsoidal y subglobosa, verde, lisa/ 4,1 x 1,7 | Ausentes | Amarillo verdoso, Pústulas ausentes |
| T _{vc} / <i>T. viride</i> / Trichoderma | Flexuosos con ramificaciones pareadas o no/115 | Verticilos de 2 a 3 en el extremo de las ramas laterales cortas o en la punta del conidióforo/ cilíndricos y ampuliformes/ 9,3 x 3,3 | Globosa / verde/ con irregularidades en la superficie/ 4,0 x 3,6 | Globosas, intercalares/ 9,1 | Verde intenso/ Pústulas algodonosas |
| T _{9,1} / <i>T. harzianum</i> / Pachybasium | Con ramas en pares/145/ | En verticilos de 2-3/ampuliformes, cilíndricos/ 6.2 x 3,1 | Sub-globosa/ verde/ lisa /2,5 x 2,3 | Escasas, Subglobosas, terminales e intercalares/6,8 | Amarillo verdoso a verde oscuro/sin pústulas |
| T _{4,3} / <i>T. atroviride</i> / Trichoderma | Sistema de ramificación por pares, rectos o sinuosos | En verticilos de 2-4 la fiálide del extremo del verticilo cilíndrico y las restantes ampuliformes, / 8.57 x 3,2 | Sub-globosa/ verde/ lisa/ 3.2 x 3,5 | Abundantes globosas, terminales e intercalares/ 8,6 | Verde/Pústulas escasas |

l Claves micológicas utilizadas en la identificación de las especies de *Trichoderma*: Rifai, 1969; Bissett, 1991a, 1991b.

AGRADECIMIENTO

La autora agradece al CDCH-UCV por el financiamiento de la investigación, al personal técnico que labora en el Laboratorio de Microbiología de la UCV-FAGRO, por haber colaborado con la elaboración de los medios y reactivos necesarios para el aislamiento y observación de los hongos y particularmente al Ing. Pedro Ramón Delgado por su apoyo y acompañamiento durante los muestreos en el campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliabadi, M.; F. Alikhani; M. Mohammadi; R. Darsanaki. 2013. Biological control of aflatoxins. *European Journal of Experimental Biology* 3:162-166.
- Altuna, G.; N. Sanabria; C. Jiménez; M. Alcano. 2003. Control biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* causante de la marchitez en tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Fitopatología Venezolana* 16(2): 49. (Resumen del XVIII Congreso Venezolano de Fitopatología)
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botanic* 69: 2373-2417.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botanic* 69: 2418-2420.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Ken, England. 273 p.

- Castillo, Y. 2005. Control biológico de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en el cultivo del cambur manzano (*Musa AAB* subgrupo Silo) mediante la aplicación de *Trichoderma* spp. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 54 p.
- Castro del A. E. 2011. Interacción de *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg (Sin. *Fusarium moniliforme* Sheld.) en diferentes materiales de maíz y evaluación *in vitro* con *Trichoderma* spp. como biocontrol. Tesis Profesional UAAAN. Saltillo, Coahuila, México, 61p.
- Castro del A. E. 2013. Control de *Fusarium verticillioides* en genotipos de maíz, con especies de *Trichoderma* bajo condiciones de campo. Tesis de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 72 p.
- Ezziyani, M.; S. C. Pérez; M. E. Requena; L. Rubio; M. E. Candela. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78
- French, E.; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Editorial IICA. pp.176-179.
- González, U. 1995. El maíz y su conservación. Distrito Federal, México. 320 p.
- Inojosa, A; R. Silva; I. Rodríguez; N. Rumbos; R. Figueroa. 2013. Efecto de compuestos volátiles emitidos por *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg y *Aspergillus flavus* Link aislados de maíz. Fitopatol. Venez. 26:34-38.
- Leslie J. F.; B. A Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual: Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, EEUU, 388 p.
- Mahuki, G.; S. Mejía. 2010. Generación y validación de variedades de maíz tolerantes a sequía como medio de estabilizar productividad y disminuir el daño por micotoxinas como consecuencia del cambio climático (en línea). Informe CIMMYT. México. Consultado Feb. 2011. Disponible en: www.fontagro.org/category/proyecto/andes
- Martínez, H.; S. Hernández; C. Reyes; G. Vázquez. 2013. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. Rev. Mex. Fitopatol. 31(2): 126-146.
- Moreno, E.; M. Vásquez. 2000. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. Agrociencia 34 (49): 477-484.
- Onions, A.; D. Allsopp; H. Eggins. 1981. Smith's Introduction to Industrial Mycology. 7th ed. London, Edward Arnold (Publishers) Ltd. 398 p.
- Rifai, C. 1969. A revision of the *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Survey, England. Mycological Papers. 116: 1156.
- Rodríguez, V. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del damping off en plantas de tomate. Tesis Magister. Scientiarum. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú. 105 p.
- Rodríguez, I; J. Flores. 2018. Capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp., frente a *Rhizoctonia solani* Kühn y *Fusarium moniliforme* Sheldon. Revista Bioagro 30(1):49-58
- Samson, R.; E. Hoekstra; J. Frisvad; O. Filtenborg. 1995. Introduction to food- Borne fungi, 4ta Edición. Oficina central para cultivos de hongos, Baarn y Delft, Países Bajos. pp. 60-119.
- Stefanova, M.; A. Leiva; L. Larrinaga; F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía (LUZ) (16): 509-516.