

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

Luis Pérez Vicente,¹ Alicia Batlle Viera,¹ Julio Chacón Benazet² y Virgen Montenegro Moracén³

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, lperezvicente@sanidadvegetal.cu; lperezvicente@live.com

² UBPC Caney del Sitio. Palma Soriano, Santiago de Cuba

³ Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera Siboney Km 6, Ternerito Lindo, Santiago de Cuba

RESUMEN

El mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) es una de las enfermedades más nocivas de las musáceas. El remplazo en Cuba de los clones resistentes Cavendish y los plátanos (AAB) por clones FHIA, el Pisang Awak y el clon Burro CEMSA (ABB) debido al impacto de la Sigatoka negra dio lugar a la reemergencia de la enfermedad. Se estudió la eficacia de *Trichoderma harzianum* aislado A34 en contenedores y campos de producción previamente devastados por la enfermedad. El inóculo se reprodujo en erlenmeyers con 20 g de arroz esterilizado y agua en una proporción 1:1 (v/p), y se inoculó con 2 mL de una suspensión de conidios de cultivos puros de Foc. El antagonista se reprodujo en un sustrato compuesto por una mezcla 2:1 (p/p) de residuos de arroz pulido con cáscara de arroz, bagazo de caña y agua en proporción 2:1 (p/v). Los tratamientos en campo se realizaron en plantaciones de El Sitio, Palma Soriano. Las áreas tratadas con *T. harzianum* A34 mostraron una marcada inhibición de la frecuencia y severidad de la enfermedad. En los experimentos en tanques, la aplicación del biocontrol una semana antes de la inoculación con Foc brindó un control completo. La aplicación de 20 g/planta de un formulado con 8×10^9 conidia $\cdot \text{mL}^{-1}$ del biocontrol al plantar, y después de eliminar plantas enfermas, brindó un control superior al 95% en parcelas de Burro CEMSA y FHIA 03 previamente destruidas por la enfermedad en suelos conducibles de plantaciones comerciales.

Palabras claves: Marchitez por *Fusarium*, mal de Panamá, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, biocontrol, *Trichoderma harzianum*

ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) is one of the most important diseases of banana. The replacement in Cuba of resistant Cavendish banana and plantains (AAB) by FHIA hybrids, Pisang awak and Burro CEMSA (ABB) due to the impact of black Sigatoka, lead to the re-emergence of the disease. The efficacy of *Trichoderma harzianum* isolate A34 was studied on containers and production fields previously devastated by the disease. Inoculum was reproduced in erlenmeyers with 20 g of sterilized rice and water at 1:1 (v/p), inoculated with 2 mL of Foc conidia from pure cultures. The reproduction of the antagonist were carried out on a sterilized solid substrate composed by a mixture 2:1 (w/w) of pulled rice residues with rice husk, sugarcane milled stalks residues and water in 1:1 (v/w) proportion. Treatments of control have been carried out in commercial plantations of El Sitio, Palma Soriano. *Trichoderma harzianum* A34 showed marked inhibition of *Fusarium wilt* frequency and severity. In experiments in tanks the application of the biocontrol a week before the inoculation with Foc gave complete control of the pathogen. The applications of 20 g of a formulation of 8×10^9 conidia $\cdot \text{mL}^{-1}$ of the biocontrol at planting and after removal of diseased plants, brought a control higher than 95% on plots of Burro CEMSA and FHIA 03 previously destroyed by the disease in conducive soils of commercial plantations.

Key words: *Fusarium wilt*; Panamá disease; *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense; biocontrol; *Trichoderma harzianum* A34

INTRODUCCIÓN

La marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) es en el mundo la más ampliamente distribuida, e históricamente importante enfermedad de los bananos y plátanos. En Cuba el primer informe oficial de la enfermedad fue el de Smith (1910). Johnston (1915) informó que el clon Gros Michel (AAA) y el Manzano (subgrupo Silk, AAB) se encontraban severamente afectados ya

en 1910, aunque hay antecedentes de incidencia de la enfermedad en el clon Manzano (subgrupo Silk, AAB) desde finales del siglo XIX. La única medida practica para su manejo consistía en la destrucción de las plantas afectadas y la quema de sus residuos, hasta que comenzó su sustitución paulatina por el clon Robusta (subgrupo Cavendish, AAA), al que localmente se nombró Inmune por su resistencia al mal de Pana-

má. El propio autor informó que la misma situación existió en el resto de las regiones del país.

A partir de la sustitución del Gros Michel por clones del subgrupo Cavendish y el cultivo masivo de clones de plátanos AAB, la marchitez por *Foc* perdió su importancia económica en Cuba, y quedó confinada a las pequeñas parcelas de agricultores y jardines de viviendas, donde se mantenía sobre plantas de los clones Burro Criollo (Bluggoe, ABB) y Manzano. La aparición de la Sigatoka negra en Cuba a finales de 1990 [Vidal, 1992] tuvo un fuerte impacto en los costos de producción, y particularmente en la estructura clonal de la superficie del país plantada de musáceas [Pérez *et al.*, 2002]. Los bananos Cavendish (AAA) fueron sustituidos por los clones FHIA 23 (AAAA), FHIA 18 (AAAB y el FHIA 3 (AABB), los cuales ocupan más de 11 000 ha. Asimismo, en la actualidad solo se mantiene el 18% de las más de 43 000 ha de plátanos (AAB) existentes en 1990. Los plátanos se han sustituido por el cultivo a gran escala del clon Burro CEMSA (ABB), que ocupa más de 60 000 ha, y por el FHIA 3 (AABB). Junto a esto se ha popularizado el cultivo del clon Burro Vietnamita (Pisang Awak, ABB) debido a su sabor, que se asemeja al del Manzano. Este drástico cambio en la composición clonal ha hecho que la marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá reemergiera como un problema de sanidad en las plantaciones de musáceas en Cuba. La falta de medidas regulatorias, y de material de plantación certificado libre de la enfermedad, ha provocado un paulatino pero consistente aumento de la distribución e intensidad de la enfermedad en las plantaciones estatales y de pequeños agricultores de Burro CEMSA, tanto en monocultivo como intercaladas con otros cultivos.

El biocontrol de fitopatógenos de suelo con especies de *Trichoderma* ha sido objeto de estudio desde 1930, y se ha aplicado a pequeñas escalas directamente al suelo o en el tratamiento de las semillas [Weindling, 1934; Papavizas, 1985; Harman, 1991]. Sivan y Chet (1989) encontraron que *T. harzianum* induce altos niveles de enzimas líticas (1-3 β glucanasa y quitinasa) sobre las células de las paredes de los patógenos *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum*. Hay informes sobre diversos intentos para el biocontrol de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* causantes de marchiteces en diferentes hospedantes. Sandoval *et al.* (1996) y Sandoval y López (2000; 2001) informaron de la eficacia de *Trichoderma harzianum* cepa A34 en el control de *Fusarium* spp. en frijol y claveles, así como de diferentes especies de hongos en tomate, tabaco y frijol.

Los informes de la eficacia de *T. harzianum* en el control de *Foc* son contradictorios, y la mayoría se refieren a la eficacia de ensayos *in vitro* o invernaderos bajo condiciones controladas [Ploetz, 2004a,b]. En Cuba Mitov y Oliva (1975) informaron de la actividad inhibitoria de cepas de *Trichoderma* spp. en tratamientos previos a inoculaciones con el patógeno en plantas susceptibles. Zhang *et al.* (2004) estudiaron el efecto inhibitorio de 150 aislamientos de *Trichoderma* spp. de 40 suelos diferentes y otros materiales, de los cuales 39 mostraron eficacia en la inhibición de *Foc* en experimentos de cultivo dual *in vitro*. La eficacia estuvo relacionada al micoparasitismo, inhibición enzimática y lisis. Nel *et al.* (2006) informaron una ligera supresión mediante uso de aislamientos de *Trichoderma* en el control de *Foc* en ensayos de invernaderos en bananos Cavendish, y refirieron la mejor eficacia como antagonistas del patógenos a cepas de *Fusarium oxysporum* no patogénicas y a bacterias del género *Pseudomonas* fluorescentes.

El objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia del antagonista *Trichoderma harzianum* cepa A34 en el control de *Foc* en suelos conducibles a la enfermedad de plantaciones afectadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la reproducción de *Foc* se colocaron 20 g de arroz en erlenmeyers de 250 mL, se añadió agua en proporción 1:1 (v/p) y se esterilizó a 1 atm durante 40 min. Se inoculó con 2 mL de una suspensión de conidios de *Foc* obtenidos de cultivos puros y se incubó dos semanas a 28°C.

La reproducción de *Trichoderma harzianum* se realizó a partir de un sustrato sólido compuesto por una mezcla en proporción 2:1 (p/p) de arroz partido con cáscara de arroz y bagacillo de caña de azúcar, al cual se le adicionó agua en proporción 1:1 (v/p) y se distribuyó en bandejas previo a su esterilización a 1 atm durante 40 min a un pH aproximado de 6. Se inocularon frascos de cultivo de 500 mL con 5 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 10^2 esporas/mL, obtenida de un cultivo esporulado de *T. harzianum* cepa A34 (preinóculo), los cuales fueron posteriormente incubados en posición horizontal por cuatro días a 28-30°C. Se inocularon las bandejas con una suspensión de conidios 10% (v/p) obtenidas de este preinóculo, y se incubaron hasta obtener una cobertura completa del micelio del antagonista en el sustrato (*Fig.*).

Se realizó un experimento en contenedores de 20 L con plantas del clon Burro Criollo (Bluggoe ABB), para lo cual se utilizó un diseño totalmente aleatorizado con los siguientes tratamientos: 1) testigo sin inoculación con *Foc* y sin biocontrol; 2) inoculación con *Foc* y sin biocontrol; 3) inoculada con *Foc* y tratamiento con

T. harzianum 10 g del biopreparado sólido en arroz de *T. harzianum* A34 a la base de las plantas el mismo día; 4) tratamiento con *T. harzianum* 10 g del biopreparado sólido en arroz de *T. harzianum* A34 a la base de las plantas una semana antes de la inoculación con *Foc*.



Reproducción de *T. harzianum* A34 en frascos Roux en medio agarizado y bandejas sobre sustrato sólido en el laboratorio.

Se determinó la frecuencia de plantas afectadas y la severidad del ataque de acuerdo con la escala de severidad de la infección de *Foc* propuesta por Inibap (2002), donde 1: sana, 2: clorosis ligera y marchitez sin afectación del pecíolo, 3: clorosis moderada, pecíolos doblados y marchitez con rajadura de la base de las vainas, 4: clorosis severa, pecíolos doblados, enanismo, rajadura de los pseudotallos, 5: planta muerta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* aparecen los datos del efecto del tratamiento con *T. harzianum* sobre la frecuencia y severidad de la marchitez por *Foc* en plantas inoculadas artificialmente. El antagonista tuvo un marcado efecto inhibitorio de la enfermedad, especialmente cuando este colonizó el suelo y el sistema radical antes de la infección. Los tratamientos con el antagonista *T. har-*

zianum cepa A34 previo a la infección redujeron de forma significativa la incidencia y severidad de la marchitez por *Foc*. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Mitov y Oliva (1975).

En la *Tabla 2* aparecen datos de la incidencia obtenidos de la aplicación en plantaciones de producción sobre suelos conducibles en tratamientos al suelo previos a la plantación y el uso de semillas obtenidas de plantaciones libres del patógeno. Los campos previamente diezmados por la incidencia de la enfermedad, plantados con semilla agámica sana de clones susceptibles, se mantuvieron en producción económica por más de cinco años mediante el uso combinado del tratamiento con el biocontrol. Este tratamiento, junto al uso de material de multiplicación sano, probó ser eficiente en la regulación de las poblaciones de *Foc* en suelos conducibles en condiciones de producción comercial en fincas previamente diezmadas por la enfermedad.

Tabla 1. Eficacia de *T. harzianum* en el control de *Foc*. Ensayo de contenedores

No.	Variante	Plantas afectadas (%)	Severidad (1 a 5)
1	Testigo sin inocular y sin tratar	0	0
2	Inoculada con <i>Foc</i> y sin tratar con <i>T. harzianum</i>	100	4,5
3	Inoculadas con <i>Foc</i> y tratadas con <i>T. harzianum</i> el mismo día	40	2,5
4	Inoculadas con <i>Foc</i> y tratadas con <i>T. harzianum</i> siete días antes	0	0

Tabla 2. Resultados de aplicaciones de *T. harzianum* en suelos conducibles a *Foc* en 170 ha en fincas comerciales de Caney del Sitio, Palma Soriano

<i>Variante</i>	<i>Variedad</i>	<i>Plantas afectadas (%)</i>	<i>Observaciones</i>
Sin tratamiento	Burro CEMSA	> 60	Campo fue destruido
20 g/planta con 8×10^9 conidios/g	Burro CEMSA	< 1	En producción por más de cinco años
Sin tratamiento	FHIA 03 FHIA 23	> 30	Campo fue destruido
20 g/planta con 8×10^9 conidios/g	FHIA 03 FHIA 23	< 1	En producción por más de cinco años

En Taiwán la incidencia y daño de los tifones y de la marchitez por *Foc* RT4 (VCG 01213-01216) determinó el cambio de los sistemas de cultivo perenne a bajas densidades por el cultivo anual a alta densidad de plantas por hectárea, de clones mutantes moderadamente resistentes a *Foc* derivados de Cavendish gigante, obtenidos mediante selección somaclonal [Hwang y Ko, 2004].

El clon Burro CEMSA, el FHIA 23, el FHIA 3 y el Burro Vietnamita (Pisang Awak) se encuentran con una alta frecuencia de plantas enfermas en las plantaciones comerciales y pequeños huertos de pequeños productores en Cuba, debido a la ausencia de un sistema de producción de semillas sanas y de medidas de manejo. Simultáneamente, el impacto de los ciclones y de la sigatoka negra en las plantaciones de Cuba ha llevado a establecer el cultivo anual de plátanos a altas densidades (> 3000 plantas/ha) [Álvarez, 2004]. Entre las ventajas planteadas por este sistema anual de plantación se encuentra el escape de las fechas de más frecuencia de huracanes y una menor incidencia de enfermedades debido a la destrucción anual de la plantación. Este sistema constituye en sí un procedimiento de escape a los niveles de daño económico de la enfermedad, siempre y cuando se parta de la utilización de semilla sana uniforme y disponibilidad de riego. El uso combinado de un sistema de semilla sana con la disminución o regulación de la población de *Foc* del suelo, por aplicaciones de *Trichoderma harzianum* en los suelos infectados en plantaciones de ciclo anual o bienal, puede contribuir al mantenimiento de la producción de bananos susceptibles de forma económicamente sostenible.

CONCLUSIONES

- El tratamiento al suelo al sitio de plantación con 20 g/planta de un formulado de *T. harzianum* cepa

A34 reproducido sobre granos de arroz con una concentración de 8×10^9 conidios/g hasta una semana antes de plantar, junto al empleo de material de plantación sano, el saneamiento de plantas enfermas y el retratamiento al suelo en el sitio de erradicación, permitieron un control eficiente del mal de Panamá en suelos conducibles.

- El uso de este sistema de manejo permitió mantener la productividad de la plantación por un período superior a los cinco años en plantaciones de los clones Burro CEMSA y FHIA 03 susceptibles a la enfermedad.

Agracedimiento

Los autores desean agradecer a INIBAP (hoy Bioversity International) en la persona del doctor Franklin E. Rosales por el financiamiento parcial del proyecto.

REFERENCIAS

- Álvarez, J. M.: «Una nueva concepción de producción de plátano fruta y vianda en Cuba (segunda versión)», impresiones del Ministerio de Agricultura, La Habana, 2004, pp. 1-16.
- Harman, G. E.: «Seed Treatment for Biological Control of Plant Diseases», *Crop Protection* 10:166-171, EE. UU., 1991.
- Hwang, S. C.; W. H. Ko: «Cavendish banana Cultivars Resistant to Fusarium Wilt Acquired Through Somaclonal Variation in Taiwan», *Plant Disease* 88:580-588, EE. UU., 2004.
- Inibap: «Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos», *Guías Técnicas Inibap*, 6. IPGRI, Montpellier, Francia, 2002.
- Johnston, J. R.: «La enfermedad del plátano en Cuba. Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas, Circ. 47, 1915.
- Mitov, N.; P. Oliva: «Estudios sobre el mal de Panamá del plátano en Cuba», *Revista de Agricultura* 8 (2): 6-11, La Habana, 1975.
- Nel, B.; C. Steinberg; N. Labuschagne; A. Viljoen: «The Potential of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and Other Biological Control Organisms for Suppressing Fusarium Wilt of Banana», *Plant Pathology* 55:217-223, EE. UU., 2006.
- Papavizas, G. C.: «*Trichoderma* and *Gliocadium*: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol», *Ann. Rev. Phytopathology* 75: 23-54, EE.UU., 1985.

Eficacia de Trichoderma harzianum A34 en el...

- Pérez, L.; J. M. Álvarez; M. Pérez: «Economic Impact and Management of Black Leaf Streak Disease in Cuba», *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook*, Proceedings of the International Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica, 2002, pp. 71-83.
- Ploetz, R. C.: «Biocontrol of *Fusarium* Wilt: What's Been Done and Will it Work (Ultimately)?», Proceedings of the International Banana Congress, Marik/INIBAP, Peenang, Malasia, 2004a.
- : «Fusarium Wilt of Banana is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*», Symposium on *Fusarium*-Induced Diseases of Tropical Perennial Crops, *Phytopathology* 96:653-656, EE. UU., 2004b.
- Sandoval, I.; M. O. López; T. Bonilla; Y. Tomás: «Hongos que atacan al clavel y antagonismo *in vitro* con *Trichoderma* spp.», *Fitosanidad* 2(3-4):41-43, La Habana, 1996.
- Sandoval, I.; M. O. López: «Antagonismo de *Trichoderma harzianum* cepa A34 sobre *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol», *Fitosanidad* 4(3-4):69-72, La Habana, 2000.
- Sandoval, I.; M. O. López: «Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. pseudokoningii* sobre diferentes hongos fitopatógenos», *Fitosanidad* 5(1):41-44, La Habana, 2001.
- Sivan, A.; I. Chet: «Biological Control of *Fusarium* Crown Rot of Tomato by *Trichoderma harzianum* Under Field Conditions», *Plant Disease* 71:587-692, EE. UU., 1987.
- Smith, E. F.: «A Cuban Banana Disease», (Abstr.), *Science* 31:754-755, EE. UU., 1910.
- Vidal, A.: «Sigatoka negra en Cuba. En nuevos focos de plagas y enfermedades», Boletín Fitosanitario de la FAO 40:(1-2), Italia, 1992.
- Weindling, R.: «Studies on a Lethal Principle Effective in the Parasitic Action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and Other Fungi», *Phytopathology* 24:1153-1179, EE. UU., 1934.
- Zhang, Y.; K. Liu; M. Xiang; R. Liu: «Studies on the Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* with *Trichoderma*», *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)* 30(4):406-406, 2004.