

Antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo



Antagonism of strains of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg against isolates of *Fusarium* spp. from chickpea

Benedicto Martínez-Coca^{1*}, Danay Infante¹, W. Caraballo¹, Yanisia Duarte-Leal¹, Anayza Echevarría-Hernández²

¹Grupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria CENSA. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional km 221/2. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Unidad Científico Tecnológica de Base “Los Palacios”, Km 1 ½ carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba.

RESUMEN: El trabajo tuvo como objetivo seleccionar cepas promisorias de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg para el control de aislamientos de *Fusarium* spp., patógenos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). La actividad antagonista (competencia por espacio, micoparasitismo y la antibiosis) de las cepas de *T. asperellum* se evaluó por el método del cultivo dual y la antibiosis por el método de suspensión (metabolitos volátiles) y mediante la obtención de filtrados (metabolitos no volátiles) del antagonista. Todas las cepas de *Trichoderma* analizadas mostraron alta capacidad competitiva por espacio frente a los aislados de *Fusarium*, excepto la cepa Ta.85. Las cepas de *Trichoderma* Ta.3, Ta.12, Ta.25, Ta.78 y Ta.79 se destacaron por su micoparasitismo frente a *Fusarium nygamai* (F-11) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50). La cepa Ta. 1 mostró su efecto micoparasítico sobre los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50) y (F-51). Las cepas Ta.1, Ta.28, Ta.78 y Ta.79 sobresalieron por su acción metabólica frente a todos los aislados de *Fusarium*. La acción de los metabolitos volátiles secretados por *Trichoderma* sobre el crecimiento de los aislados de *Fusarium* fue variable. Se destacan, por mostrar valores superiores de inhibición del crecimiento de *Fusarium* y de estabilidad en los resultados por la menor variabilidad de sus varianzas, las cepas Ta.56 frente a F-11, Ta.1 y Ta.28 frente a F-50; esta última, además, sobre F-51. Los metabolitos no volátiles de la cepa Ta.79 presentaron los mayores valores de inhibición frente a todos los aislados del patógeno. Se tomó esta cepa como la más estable debido a su menor varianza en los resultados. Del análisis integral de todos los mecanismos estudiados se infiere que la cepa Ta.79 fue la más promisoriosa para el control de *Fusarium* spp. en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: antibiosis, *Cicer arietinum*, control biológico, micoparasitismo.

ABSTRACT: The objective of this work was to select promising strains of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg for the control of *Fusarium* spp. pathogens of chickpea (*Cicer arietinum* L.). The antagonistic activity (competition for space, mycoparasitism, and antibiosis) of the *Trichoderma* strains was evaluated by the dual culture method and the antibiosis by the suspension method (volatile metabolites) and by filtrates (non-volatile metabolites) of the antagonist. All the *Trichoderma* strains tested showed high competitive capacity for space vs *Fusarium* isolates, except Ta.85. *Trichoderma* strains Ta.3, Ta.12, Ta.25, Ta.78, and Ta.79 stood out for their mycoparasitism in *Fusarium nygamai* (F-11) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50). Strain Ta. 1 showed its mycoparasitic effect on the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (F-50) and (F-51). Strains Ta.1, Ta.28, Ta.78 and Ta.79 were outstanding due to their metabolic action against the *Fusarium* isolates. The action of the volatile metabolites excreted by *Trichoderma* on the *Fusarium* isolates growth was variable. Some *Trichoderma* strains, such as Ta.56 against F-11, Ta.1 against F-50, and Ta.28 against F-50, and F-51, stood out for showing higher values of inhibition of *Fusarium* growth and stability in the results, due to the lower variability of their variances. The non-volatile metabolites of the Ta.79 strain had the highest inhibition values against the pathogen isolates, being this strain the most stable. From the comprehensive analysis of all mechanisms studied, the strain Ta.79 was the most promising to control *Fusarium* spp.

Key words: antibiosis, biological control, *Cicer arietinum*, mycoparasitism.

*Autor para correspondencia: Benedicto Martínez-Coca. E-mail: bmcooca@censa.edu.cu

Recibido: 30/10/2017

Aceptado: 28/08/2018

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se considera una de las fuentes de alimentación más importantes en el mundo, tanto para humanos como animales, por su alto valor nutricional. En la actualidad se producen 14,2 millones de toneladas de garbanzo a nivel mundial, distribuidas en una superficie de 14,8 millones de hectáreas (1).

En Cuba, es un cultivo relativamente de nueva introducción, con bajos rendimientos por área, por lo que fue necesario para satisfacer el consumo interno realizar importaciones provenientes, mayoritariamente, de México, Canadá y España (2).

Los rendimientos del cultivo son afectados por diversas causas, entre estas las enfermedades juegan un papel relevante. En este sentido, la fusariosis es la de mayor significación debido a su amplia distribución a nivel mundial y severidad, con síntomas de pudrición de la raíz y marchitez vascular (3). Esta provoca pérdidas, tanto en el rendimiento del cultivo como económicas (4). Las pérdidas en la producción están alrededor del 10 % de las cosechas (5).

La causa de la Fusariosis en el garbanzo se debe a distintas especies del género *Fusarium* [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceri* (Padwik) Matuo & K. Sato, *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber, Snyder & Hansen y *Fusarium redolens* Wollenweber] (6). En Cuba, la identificación de las especies de este hongo se relacionó con la marchitez ascendente causada por *F. oxysporum* y, la descendente, por *F. solani* (7). El manejo de la enfermedad es difícil y en su ejecución se involucran diferentes tácticas, incluyendo el control químico. No obstante, su manejo no es satisfactorio y continúa la búsqueda de nuevos elementos que pudieran ayudar a limitar el desarrollo de esta enfermedad. Las mejores medidas de control son preventivas, ya que no existe un control curativo que sea efectivo y económicamente rentable (8). En concordancia con esto, se investigan cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como alternativa para incorporar en el programa de manejo integrado de la enfermedad (9), debido a los mecanismos de acción de este agente de control biológico

(competencia por sustrato o espacio, antibiosis y el micoparasitismo), que se desencadenan ante la presencia de un fitopatógeno (10). Además, las cepas de este hongo pueden poseer otros mecanismos de acción indirectos que participan en la inducción de resistencia y el aumento de la tolerancia de la planta ante diferentes estreses (9).

El laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) dispone de un grupo de cepas de *T. asperellum*, identificadas y caracterizadas morfofisiológica, patogénica y molecularmente. Estas cepas resultaron promisorias por su acción biocontroladora frente a agentes causales de enfermedades en arroz, tomate, melón, frijol y soya (11,12,13,14).

El objetivo del presente trabajo fue seleccionar cepas de *T. asperellum in vitro*, promisorias para el control de *Fusarium* spp. patógenas de garbanzo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (Latitud 22,991867 y Longitud -82,153892), municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba.

Antagonismo de las cepas de *T. asperellum* frente a los aislados de *Fusarium*

El efecto antagónico de 13 cepas de *T. asperellum* (Ta.1, Ta.3, Ta.12, Ta.13, Ta.17, Ta.25, Ta.28, Ta.56, Ta.75, Ta.78, Ta.79, Ta.85, Ta.90) se evaluó por el método de Cultivo Dual (CD) frente a dos aislamientos de *F. o. f. sp. ciceri* (F-50 y F-51) y un aislamiento de *Fusarium nygamai* Burgess & Trimboli, seleccionados por su agresividad en garbanzo (2,15), pertenecientes al Laboratorio de Micología Vegetal del CENSA.

Los diferentes mecanismos de acción: competencia por espacio, micoparasitismo y antibiosis, se determinaron mediante cultivo dual CD, según lo descrito por Martínez y Solano (16).

Las condiciones de conservación de los cultivos de los hongos fueron: cepas de *Trichoderma* en medio de cultivo Agar Malta, incubadas a una temperatura de 28°C±2°C y

oscuridad; y los aislamientos de *Fusarium* en Papa Dextrosa Agar (PDA), mantenidos a temperatura de 25°C±2°C y oscuridad. Los cultivos de las cepas de *T. asperellum* y los aislados de *Fusarium* spp. para la realización del CD tenían tres y siete días de edad, respectivamente. Los discos (cinco mm de Ø) de ambos hongos, para establecer el CD, se tomaron de la periferia de las colonias.

Competencia por espacio

Se sembraron, diametralmente opuestos, discos de las cepas de *T. asperellum* y de los aislados de *Fusarium* a cinco mm del borde de la placa Petri (9 cm de Ø), contentiva de 15 ml de PDA (BIOCEN), incubadas a 25°C±2°C y oscuridad, condiciones requeridas para el crecimiento del patógeno. Se realizaron tres réplicas por cepa de *T. asperellum* y se incluyó un control de cada aislamiento de *Fusarium*, sembrado en la misma posición que en el CD, pero sin el antagonista.

Las evaluaciones se hicieron a las 24, 48, 72 y 96 horas, midiendo el crecimiento micelial lineal de ambos hongos con una regla graduada, hasta que uno de los dos completara el área de la placa. La capacidad antagónica se valoró mediante una escala de grados (17). Además, se evaluó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) a las 96 h, con el empleo de la fórmula:

$$\text{PICR} = [(R1 - R2) / R1] * 100 \quad (I)$$

R1 - es el crecimiento radial del control

R2 - el crecimiento radial del hongo patógeno en el tratamiento.

Micoparasitismo

Del sitio de contacto entre los dos hongos se tomaron tres muestras por tratamiento (cepas de *T. asperellum*) a las 144 h, se depositaron sobre un portaobjeto con lactofenol-azul de algodón y se observaron al microscopio óptico (Zeiss), con aumento de 400x, para detectar el tipo de interacción hifal (penetración, granulación, vacuolización, lisis y/o enrollamiento), según Chet *et al.* (18). Se definió la sensibilidad de los aislados de *Fusarium* al parasitismo de las cepas de *T. asperellum* mediante el cálculo del porcentaje de parasitismo según la fórmula:

$$\% \text{ parasitismo de } Fusarium = (\text{No.P/TC}) * 100$$

No.P - Número de cepas de *T. asperellum* que penetraron las hifas de *Fusarium*

TC - Total de cepas de *T. asperellum* evaluadas.

Antibiosis

Se midió el crecimiento micelial lineal de los aislamientos de *Fusarium* con una regla graduada a las 72 h. Se halló la diferencia del crecimiento de este hongo en el control, menos el crecimiento del mismo en el cultivo dual con *T. asperellum*. Para determinar las cepas con mayor efecto inhibitorio del crecimiento de los aislamientos del patógeno se realizó un análisis de varianza y se compararon las medias por la prueba de la menor diferencia significativa (LSD Fisher). Además, se calculó la varianza entre las réplicas de cada tratamiento para determinar las cepas con mayor estabilidad. Se seleccionaron como promisorias las cepas de mayor eficacia y estabilidad frente a los aislamientos de *Fusarium* spp.

Efecto de los metabolitos volátiles de *T. asperellum* en la inhibición del crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp.

Para la evaluación de los metabolitos volátiles se desarrolló el método de suspensión (13). En una misma placa Petri de 7 cm de diámetro contentiva de 15 mL de PDA, se sembró en la tapa de la placa el fitopatógeno y en la base de la misma el antagonista. Las placas se sellaron con doble capa de parafilm y, además, se incluyó un control del patógeno sin el antagonista. Todos los tratamientos se incubaron a una temperatura de 25°C±2°C y oscuridad, incluyendo el control. Las evaluaciones se realizaron cada 24 h hasta que uno de los hongos completara el área de la placa.

A partir de los datos obtenidos, se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) en los aislados del patógeno, con la aplicación de la fórmula (I) descrita anteriormente. Los tratamientos con valores negativos se descartaron, ya que, desde el punto de vista biológico, no tienen perspectiva como agentes de control biológico. Para determinar la eficacia de los tratamientos se realizó un análisis de varianza con los datos de aquellos que tuvieron valores positivos; las medias se compararon por la prueba de la menor diferencia significativa (LSD Fisher). Además, se calculó la varianza de los tratamientos para determinar las cepas de mayor estabilidad. A partir de estos resultados se seleccionaron las cepas de mayor

eficacia y estabilidad para el control de los aislamientos de *Fusarium* spp.

Efecto de metabolitos no volátiles en los filtrados de cultivos de *T. asperellum* sobre el crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp.

Para la preparación del medio Caldo de Papa Dextrosa (CPD) se tomaron porciones de papa (200 g) de aproximadamente 1 cm, las cuales se hirvieron en agua destilada durante una hora. Posteriormente, al filtrado se le adicionó Dextrosa (20 g) y se agitó hasta disolverla completamente en el medio. Se esterilizó a 121°C por 15 min.

Se inocularon tres discos de 0,6 cm de diámetro de cada cepa de *Trichoderma*, de manera independiente en Erlenmeyers de cristal de 100 ml con 20 ml de medio líquido CPD, ajustado a pH 5,5 e incubados a 28°C±2°C por cinco días estáticamente y en oscuridad. Para cada cepa se realizaron tres réplicas.

Los filtrados de cada tratamiento se obtuvieron asépticamente con el uso de filtros miliporos (Sartorius) de 0,2 (m. Se embebieron por separado discos de micelio (0,6 cm de diámetro) de un cultivo puro de siete días del patógeno en los filtrados del antagonista, durante cinco min. Seguidamente, se sembró un disco por placa Petri (7 cm de diámetro), sobre medio de cultivo PDA, y se incubaron a 25°C±2°C y oscuridad. Se realizaron tres réplicas por tratamiento. Se incluyó un control de cada uno de los aislamientos de *Fusarium* embebido en medio CPD estéril, sembrado e incubado de igual forma que los tratamientos descritos anteriormente. La inhibición del crecimiento del patógeno se evaluó hasta las 90 horas.

Los datos obtenidos en el ensayo se procesaron siguiendo la metodología descrita en el acápite anterior.

Se realizó un análisis integral de los resultados por las cepas de *T. asperellum* para cada mecanismo de acción y, los de estabilidad, frente a los aislamientos de *Fusarium*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antagonismo de las cepas de *T. asperellum* frente a los aislados de *Fusarium*

Las trece cepas de *Trichoderma* evaluadas mostraron alta capacidad antagónica sobre los dos aislamientos de *F. o. f. sp. ciceri* y el de *F. nygamai* de garbanzo.

Competencia por espacio

Las cepas de *T. asperellum* evaluadas manifestaron un crecimiento más rápido que los aislamientos del patógeno, cubriendo completamente la colonia del patógeno a las 96 h, por lo que las mismas se ubicaron en la clase 1 de la escala de Bell *et al.* (17). Además, *T. asperellum* esporuló sobre la colonia del patógeno afectando su textura y esporulación (Fig. 1), lo que contribuyó a frenar el crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp. Resultados similares obtuvieron diferentes autores (19,20,21), que ubicaron cepas de *Trichoderma* spp. en la clase 1, al presentar mayor velocidad de crecimiento y colonizar mayor espacio en el CD que los aislados de *Fusarium* spp.

El PICR (Fig. 2) ratificó el análisis cualitativo obtenido por la escala de Bell *et al.* (17), donde la mayoría de las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de los aislamientos de *Fusarium* spp. en más de 40 %, respecto a sus controles.

Las cepas del antagonista frente a *F. nygamai* y *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) no mostraron diferencias estadísticas. No obstante, frente a *F. nygamai* se destacaron, con mayor porcentaje de inhibición, la cepa Ta.1 (53 %), y frente a (F-50) las cepas Ta.1, Ta.13 y Ta.78 (todas con 48 % de

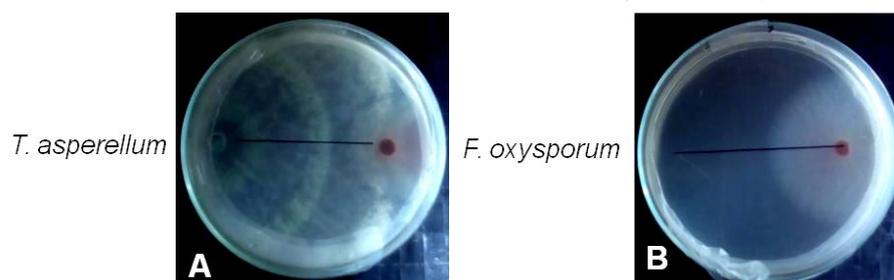
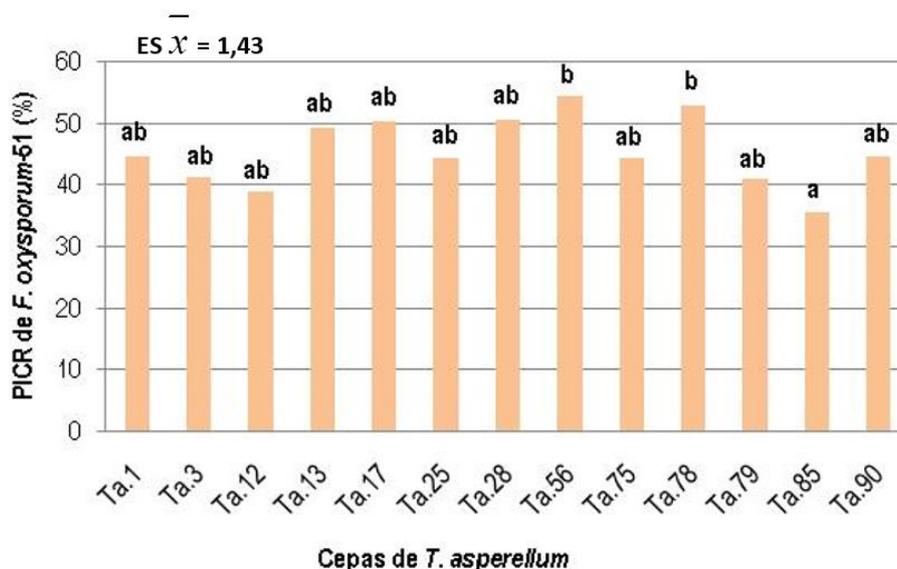


FIGURA 1. A.- Cultivo dual de *T. asperellum* (Ta.13) - *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) y B.-Control de *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) a las 96 h / Dual culture of *T. asperellum* (Ta.13) - *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) and B.-control of *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) at 96 h



Medias con letras diferentes difieren significativamente, según Duncan ($p \leq 0,05$)
FIGURA 2. Inhibición del crecimiento radial de *F. o. f. sp. ciceri* (F- 51) por la acción de las cepas de *T. asperellum*, a las 96 horas / Radial growth inhibition of *F. o. f. sp. ciceri* (F- 51) by the action of *T. asperellum* strains at 96 h

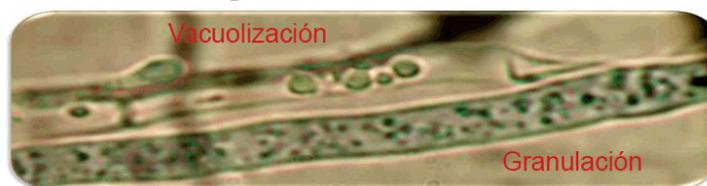


FIGURA 3. Granulación y vacuolización del citoplasma de hifas de F-50 por acción de la cepa Ta. 25 de *T. asperellum* / Cytoplasmic granulation and vacuolization of F-50 hypha by action of *T. asperellum* (Ta.25 vs F-50)

inhibición). Frente a *F. o. f. sp. ciceri* (F-51) (Fig. 2) sobresalieron las cepas Ta.56 y Ta.78 con una inhibición de 54 y 53 %, respectivamente, pero sin diferencias con el resto de las cepas, a excepción de la Ta.85. Todas las cepas de *Trichoderma* probadas, excepto esta última, mostraron alta capacidad competitiva por espacio frente a los aislados de *Fusarium*.

Estos resultados están en el intervalo (44-52 %) obtenido por Sanmartín-Negredo *et al.* (22) con cuatro aislados de *T. asperellum* frente a *Fusarium* sp. en CD.

Los resultados del presente trabajo se pueden considerar aceptables según los criterios de Mis-Mut *et al.* (21), que estiman como admisibles 40 % de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium moniliforme* J. Sheld. y 35 % para *F. oxysporum*, al enfrentarlos a aislados de *Trichoderma* spp. La velocidad de crecimiento de *Trichoderma* es un elemento importante en su competencia por el espacio con otros hongos, ya que limita o detiene completamente el desarrollo

del patógeno, al colonizar, con mayor rapidez, la zona de la rizosfera. (23)

No obstante, la inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp., por las especies del género *Trichoderma*, no solo se debe a la alta velocidad de crecimiento del antagonista, sino a la acción de metabolitos, volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos, aun sin haber contacto físico entre ellos (24).

Micoparasitismo

Las observaciones microscópicas de los fragmentos de micelios de la zona de contacto entre *Trichoderma* y el patógeno en CD evidenciaron que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* presentaron micoparasitismo, con dos o más tipos de interacción hifal, con predominio de vacuolización y granulación del contenido citoplasmático en las hifas del fitopatógeno (Fig. 3), seguido por la penetración y la lisis (Fig. 4) (Tabla 1).

Hifa de *Trichoderma* dentro de la de *Fusarium*

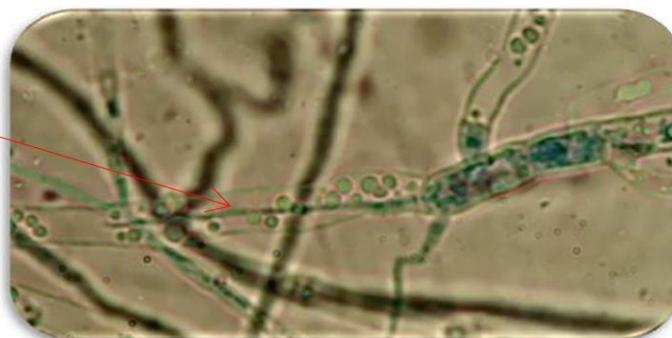


FIGURA 4. Hifas de *T. asperellum* (*Ta.25*) penetrando y causando lisis en hifas de *F. o. f. sp. ciceri* (*F-50*) / *Hyphae of T. asperellum (Ta.25) penetrating and causing lysis in hyphae of F. o. f. sp. ciceri (F-50)*

TABLA 1. Tipos de interacciones hifales entre cepas de *T. asperellum* y aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo / *Types of hyphal interactions between strains of T. asperellum and Fusarium spp. isolates from chickpea*

Cepas de <i>T. asperellum</i>	Interacciones hifales entre <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>		
	Aislamientos de <i>Fusarium</i>		
	<i>F. nygamai</i>	<i>F. o. f. sp. ciceri (F-50)</i>	<i>F. o. f. sp. ciceri (F-51)</i>
<i>Ta.1</i>	G	V, G, P	V, G, P
<i>Ta.3</i>	E, V, G, P	V, G, P, L	V, G
<i>Ta.12</i>	E, V, G, P, L	G, P	V, G
<i>Ta.13</i>	V, G	V, G, P	G
<i>Ta.17</i>	V	G, P	V, G
<i>Ta.25</i>	E, V, G, P	V, G, P	V, G
<i>Ta.28</i>	V, G	V, G	V, G
<i>Ta.56</i>	V, G	V, L	V, G, P
<i>Ta.75</i>	V, G	V, G	V, G
<i>Ta.78</i>	V, P	G, P, L	V, G, L
<i>Ta.79</i>	V, G, P	V, P	V, G
<i>Ta.85</i>	V, G, P	V, G	V, G
<i>Ta.90</i>	V, G	V, G, P, L	V, G

Leyenda: V - Vacuolización G - Granulación L - Lisis E - Enrollamiento P - Penetración

Las cepas mostraron diferencias en su actividad parasítica. No se observó una cepa de *T. asperellum* que sobresaliera por sus interacciones hifales frente a los tres aislados de *Fusarium* spp. No obstante, la cepa *Ta.12* tuvo el mayor número (cinco) de interacciones hifales frente a *F. nygamai*, seguida de *Ta.3* y *Ta.25*. La mayor cantidad de interacciones hifales con *F. o. f. sp. ciceri (F-50)* se ocasionó por las cepas *Ta.3* y *Ta.90*; mientras que sobre *F. o. f. sp. ciceri (F-51)* se destacaron *Ta.1*, *Ta.78* y *Ta.56* con tres cada una. De acuerdo con Harman (25) y Howell (26), la penetración de las hifas del antagonista en las del patógeno se considera la culminación del parasitismo, entonces se puede inferir que, aún cuando el aislado *F-51* de *F. o. f. sp. ciceri* se

afectó con alto porcentaje de vacuolización y granulación, es el menos sensible a la penetración de las hifas de *T. asperellum*, con 15,38 % de hifas de las cepas de *T. asperellum* detectadas en su organismo (Tabla 2), por lo que se debe tener en cuenta en las evaluaciones futuras de parasitismo.

En estas interacciones hubo penetración de las hifas de *T. asperellum* en las del fitopatógeno, al igual que detectaron Bernal *et al.* (27) e Infante *et al.* (20), en evaluaciones de interacciones hifales de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre diferentes especies de *Fusarium*, patógenos de varios cultivos, al observar penetración en las hifas de estos últimos. Durman *et al.* (28) y Howell (26) informaron para *Trichoderma* estos

TABLA 2. Porcentajes de interacciones hifales entre las cepas de *T. asperellum* y los aislamientos de *Fusarium* spp. de garbanzo en CD / *Percentages of hyphal interactions between T. asperellum strains and Fusarium spp. isolates of chickpea in CD*

Interacciones hifales	Aislamientos de <i>Fusarium</i>		
	<i>F. nygamai</i>	<i>F. o. f. sp. ciceri (F-50)</i>	<i>F. o. f. sp. ciceri (F-51)</i>
Vacuolización	92,31	76,92	92,31
Granulación	84,62	84,62	100
Enrollamiento	23,08	0	0
Lisis	7,69	30,77	7,69
Penetración	46,15	69,23	15,38

tipos de interacciones micoparasíticas y las consideran de gran importancia para la selección de biorreguladores altamente promisorios, sobre todo para el control de hongos patógenos cuyo hábitat sea el suelo.

Al hacer un análisis integral de los resultados de micoparasitismo, se observa que no existe una cepa de *Trichoderma* de las evaluadas que tenga penetración de sus hifas en los tres aislados de *Fusarium* spp. No obstante, se destacaron frente a los aislamientos *F-11* y *F-50*, las cepas *Ta.3*, *Ta.12*, *Ta.25*, *Ta.78* y *Ta.79*, y frente a *F-51*, la cepa *Ta.1*, que también tiene efecto sobre *F-50*.

Antibiosis

Alrededor de las 72 horas, previo al contacto físico entre los agentes fitopatógenos y la cepa del antagonista, se observó un efecto inhibitorio del crecimiento de los primeros, con respecto al control, en la mayoría de los tratamientos en el CD.

La acción metabólica de la cepa *Ta.78* mostró el mayor efecto inhibitorio frente a *F. nygamai* (Fig. 5-A1), aunque solo tuvo diferencias significativas con *Ta.13*, *Ta.17* y *Ta.85*. La consistencia de los resultados de las cepas, expresada mediante el análisis de las varianzas (Fig. 5-A2), arrojó que la cepa más estable fue *Ta.17*, difiriendo estadísticamente del resto que no se diferenciaron entre sí.

Los metabolitos de la cepa *Ta.79* resultaron ser los más efectivos en la inhibición del crecimiento del aislado de *Fusarium F-50* (Fig. 5-B1), no mostraron diferencias significativas con los de las cepas *Ta.1*, *Ta.13*, *Ta.25*, *Ta.28*, *Ta.56*, *Ta.75* y *Ta.78*, pero sí con los de las restantes. La cepa más estable en los resultados fue igualmente *Ta.79*, presentando diferencias significativas con el resto. (Fig. 5-B2)

Los metabolitos de la cepa *Ta.13* ejercieron la mayor inhibición del crecimiento del aislado de *Fusarium F-51*, pero solo con diferencias significativas con los de las cepas *Ta.3*, *Ta.12*, *Ta.25*, *Ta.56* y *Ta.85* (Fig. 5-C1). La cepa con mayor estabilidad en el efecto inhibitorio del crecimiento fue *Ta.28* (Fig. 5-C2) con diferencias estadísticas con el resto, que no difiere entre sí.

El análisis integral de la acción metabólica de las cepas de *Trichoderma* en CD demostró que las cepas que causaron mayor inhibición del crecimiento micelial lineal frente a los tres aislados de *Fusarium* spp. fueron *Ta.1*, *Ta.28*, *Ta.78* y *Ta.79*.

Efecto de metabolitos volátiles de *T. asperellum* en la inhibición del crecimiento micelial de los aislados de *Fusarium* spp.

Los metabolitos volátiles, secretados por las cepas de *T. asperellum* evaluadas, manifestaron efecto variable sobre el crecimiento de los aislados de *Fusarium*. Hubo metabolitos de algunas cepas que no inhibieron el crecimiento micelial del fitopatógeno, por lo que se descartaron, ya que estos no tienen perspectivas de uso desde el punto de vista de control biológico.

Los metabolitos volátiles de las cepas *Ta.56* y *Ta.85* presentaron los mayores efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *F. nygamai*, los cuales difirieron estadísticamente del resto (Fig. 6-A); los más estables fueron los de la primera cepa. (Fig. 6-A1)

Los mayores valores de inhibición del crecimiento micelial lineal de *F. o. f. sp. ciceri (F-50)* los ocasionaron los metabolitos volátiles de las cepas *Ta.1*, *Ta.28*, *Ta.75* y *Ta.90* sin diferencias estadísticas significativas entre ellos, pero sí con los de las restantes cepas (Figura 6-B). Los metabolitos de las dos primeras cepas se

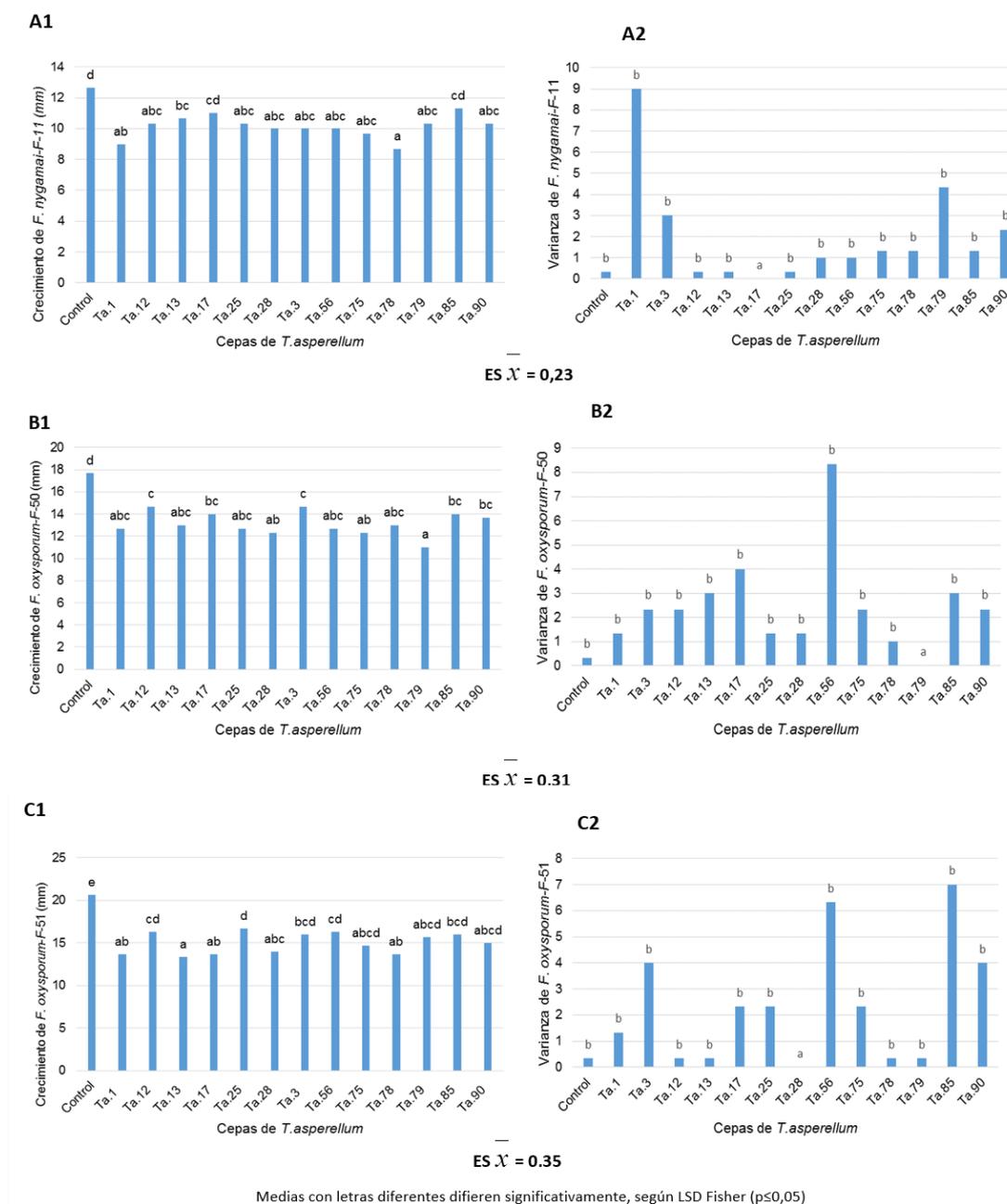


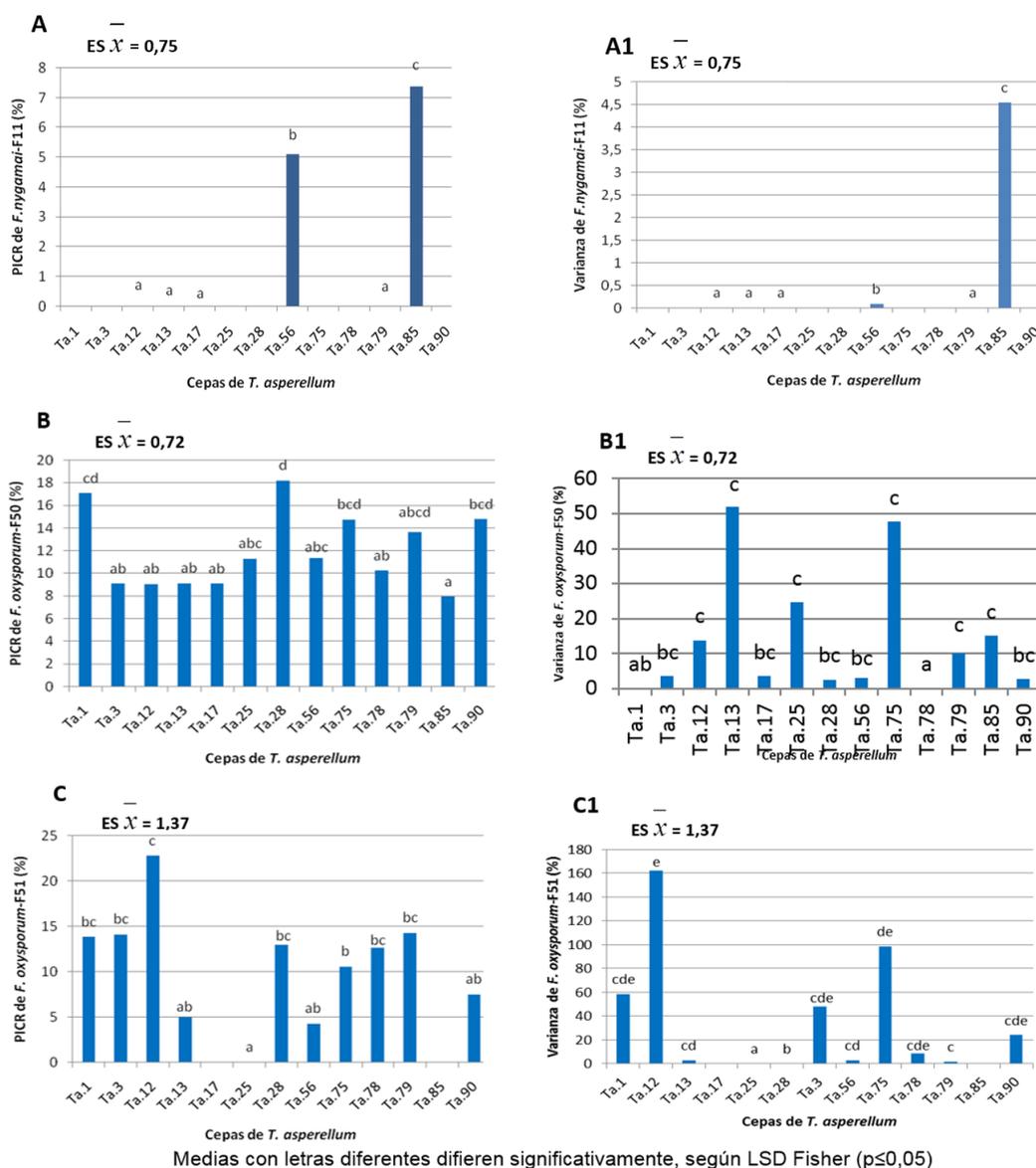
FIGURA 5. Crecimiento radial de *Fusarium* spp. (A1, B1, C1) y varianza de las réplicas del crecimiento de los aislados del patógeno (A2, B2, C2) en CD a las 72 horas [A1, A2: aislado *F. nygamai* (F-11), B1, B2: *F. o. f. sp. ciceri* (F-50), C1, C2: *F. o. f. sp. ciceri* (F-51)] / Radial growth of *Fusarium* spp. (A1, B1, C1) and growth replica variance of the pathogen isolates (A2, B2, C2) in CD at 72 h [A1, A2: isolate *F. nygamai* (F-11), B1, B2: *F. o. f. sp. ciceri* (F-50), C1, C2: *F. o. f. sp. ciceri* (F-51)].

comportaron como los más estables, aunque no tuvieron diferencias con los de la *Ta. 90* (Fig. 6-B1).

La cepa *Ta.12* secretó los metabolitos volátiles que provocaron la mayor inhibición del crecimiento del aislado de *F. o. f. sp. ciceri* (F-51), sin diferencias significativas con los de las cepas *Ta.1*, *Ta.3*, *Ta.28*, *Ta.78* y *Ta.79*, y sí

con los de las restantes (Fig. 6-C). De estas, los metabolitos de la *Ta.28* fueron los más estables. (Fig. 6-C1)

Los resultados para *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) y (F-51) se asemejan con los de Corallo (29), quien obtuvo una inhibición entre 1,3 y 20,6 % del crecimiento de *F. nygamai* frente a *Trichoderma* spp. con el uso del mismo método.



Medias con letras diferentes difieren significativamente, según LSD Fisher ($p \leq 0,05$)

FIGURA 6. Efecto de los metabolitos volátiles de *T. asperellum* sobre el crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp. (A, B, C) y varianza de las réplicas del crecimiento de los aislados del patógeno bajo tal efecto (A1, B1, C1), a las 48 horas [A, A1: aislado *F. nygamai* (F-11), B, B1: *F. o. f. sp. ciceri* (F-50), C, C1: *F. o. f. sp. ciceri* (F-51)] / Effect of *T. asperellum* volatile metabolites on growth of the *Fusarium* spp. isolates (A, B, C) and growth replica variance of the pathogen isolates under this effect (A1, B1, C1), at 48 h [A, A1: isolate *F. nygamai* (F-11), B, B1: *F. o. f. sp. ciceri* (F-50), C, C1: *F. o. f. sp. ciceri* (F-51)]

El análisis integral de los resultados de los metabolitos con mayor inhibición del crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp., y las varianzas del crecimiento de estos (Fig. 6), mostraron que los metabolitos de la cepa Ta.56 fueron los que causaron mayor inhibición del crecimiento de *F. nygamai*, para el de F-50 los de la cepa Ta.1, y para el de F-51 los de la cepa Ta.28.

No hay una única cepa de *Trichoderma* que secrete metabolitos que puedan inhibir el crecimiento de los tres aislados de *Fusarium*. Al

tener en cuenta el análisis de estabilidad de las cepas, se observa que los metabolitos de la cepa Ta.56 fueron los únicos que mantuvieron una inhibición estable del crecimiento del aislado F-11, mientras que, para F-50 y F-51, los más promisorios fueron los de la cepa Ta.28.

Efecto de metabolitos no volátiles en los filtrados de cultivos de *T. asperellum* sobre el crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp.

Los filtrados de *Trichoderma* no tuvieron un efecto inhibitorio similar sobre todos los aislados

de *Fusarium* de garbanzo. Al igual que, para el análisis del efecto de los metabolitos volátiles de *T. asperellum* sobre el crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp., se eliminaron los valores negativos por la razón planteada anteriormente.

Los metabolitos de las cepas *Ta.17*, *Ta.75* y *Ta.79* causaron la mayor inhibición del crecimiento micelial de *F. nygamai* (F-11), difiriendo significativamente de los del resto de las cepas; los de la cepa *Ta.79* mostraron la mayor inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. ciceri* (F-50), y con los mayores porcentajes de inhibición sobre *F. o. f. sp. ciceri* (F-51) sobresalieron los de las cepas *Ta.1*, *Ta.12*, *Ta.13*, *Ta.17*, *Ta.75* y *Ta.79*, difiriendo de los de *Ta.90*. (Fig. 7)

Según los resultados obtenidos, el aislado *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) fue el menos sensible a la acción de los metabolitos no volátiles de las cepas del antagonista (Fig. 7).

El análisis del efecto de estos metabolitos sobre los tres aislamientos de *Fusarium* spp. demostró que la cepa *Ta.79* de *T. asperellum* mostró los mejores atributos para el control del patógeno. Al analizar la estabilidad de las mejores cepas por la acción de los metabolitos no volátiles, se determinó que las cepas *Ta.17*, *Ta.75* y *Ta.79* frente a *F. nygamai* (F-11), y *Ta.12*, *Ta.17* y *Ta.79* frente a *F. o. f. sp. ciceri* (F-51) mostraron similar estabilidad, respectivamente. (Fig. 8)

Al integrar todos los resultados de los modos de acción de las cepas de *T. asperellum* frente a los aislados de *Fusarium* spp., se determinó a la cepa *Ta.79* como la más promisoría por su parasitismo, antibiosis y acción de los metabolitos no volátiles frente a estos patógenos. Sin embargo, respecto al parasitismo sobre *F. o. f. sp. ciceri* (F-51), se destacó la *Ta.1*, mientras que en la inhibición del crecimiento de este y el de *F. o. f. sp. ciceri* (F-50) por metabolitos volátiles, sobresalieron *Ta.1* y *Ta.28*, y en la de *F. nygamai* (F-11) *Ta.56*.

Según el estado del arte, no se dispone de literatura que avalen estos resultados relacionados con el efecto metabólico de *T. asperellum* sobre el crecimiento de *Fusarium* spp. de garbanzo. Estos constituyen un aporte al conocimiento del efecto metabólico de cepas de *T. asperellum* como inhibidoras del crecimiento de aislados de *F. nygamai* y *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* patógenos en garbanzo.

Desde el punto de vista práctico, se podría evaluar en condiciones de campo una formulación de un producto donde se mezclen las cepas *Ta.79* y *Ta.1*, a fin de tener mayor control y menor posibilidad de crear o inducir la aparición de formas resistentes en las especies de *Fusarium* evaluadas.

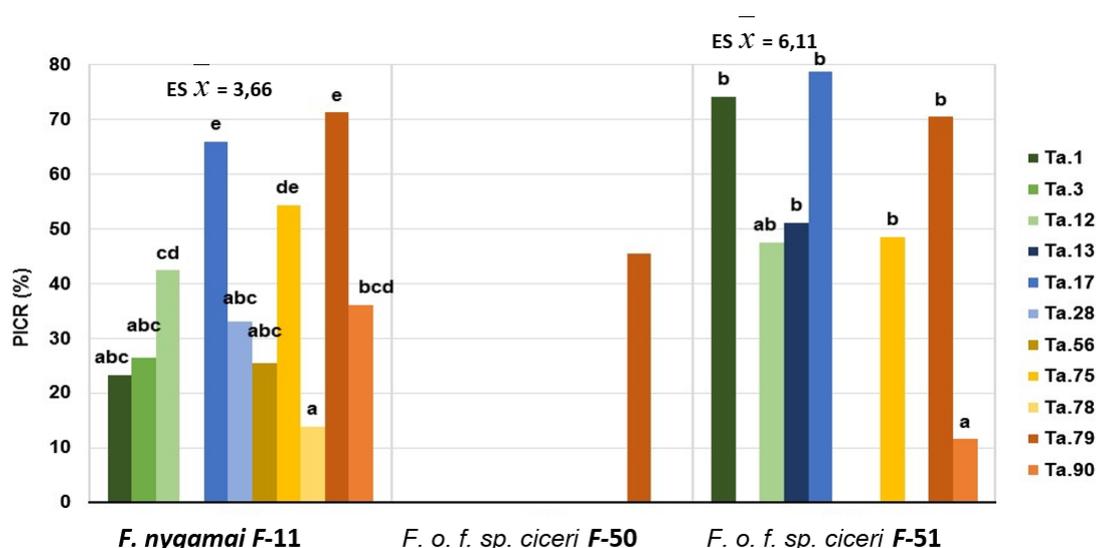
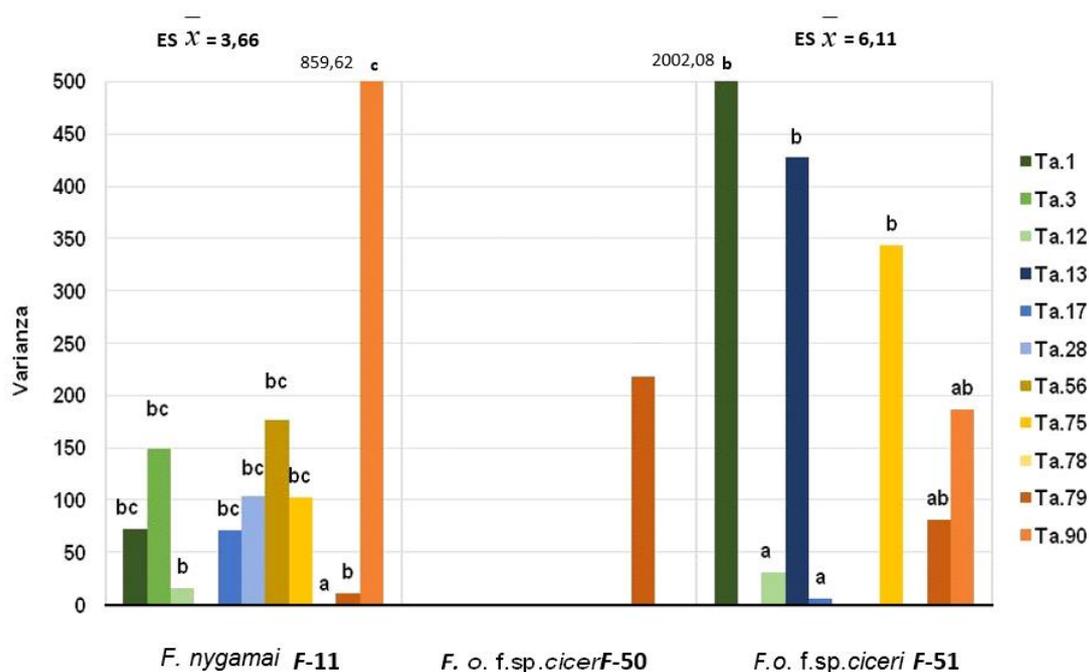


FIGURA 7. Efecto de los metabolitos no volátiles de filtrados de cultivos de *T. asperellum* en la inhibición del crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp. a las 90 h / Effect of the non-volatile metabolites of filtrates of *T. asperellum* cultures on growth inhibition of *Fusarium* spp. isolates at 90 h.



Medias con letras diferentes difieren significativamente, según LSD Fisher ($p \leq 0,05$)
FIGURA 8. Varianza de las réplicas del efecto de los metabolitos no volátiles de *T. asperellum* sobre el crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp. a las 90 h / Replica variance of the effect of *T. asperellum* non-volatile metabolites on growth of the *Fusarium* spp. isolates at 90 h.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos a Noreidys Fernández (Técnico de laboratorio) por su apoyo en el trabajo técnico, así como a la Dra. Ileana Miranda, ambas del CENSA, por su acertada colaboración en el análisis estadístico de los datos. Esta investigación se realizó bajo el auspicio del proyecto “Diagnóstico y Manejo de plagas en granos con énfasis en el desarrollo y uso de productos bioactivos”, aprobado por el Programa de Salud Animal y Vegetal del MINAGRI, Cuba.

REFERENCIAS

- Bernardi LA. Informe de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Argentina. 2016. p 1-7 Disponible en: <http://www.agroindustria.gob.ar/new/0-0/programas/dma/granos/Informe-Garbanzo2016.pdf>.
- Echevarría A. Identificación y alternativa biológica para el control de la Marchitez en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Tesis en Opción al Título Académico Máster en Sanidad Vegetal. Mención: Fitopatología. La Habana, Cuba. 2014.
- Hussein ME, Haroun NE, ELsiddig AMA. Control of Chickpea Wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with Botanical Extracts and Fungicides. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2016; 5(4):360-370.
- Mansoor A. Antagonistic Potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *J. of Biology, Agriculture and Healthcare*, 2012;2(8):72-76.
- Agrovoz. Retrocedió 70 por ciento la producción de garbanzo. Argentina. 2014. [Citado: 25 julio de 2014]. Disponible en: <http://www.agrovoz.com.ar/la-voz-del-campo/retrocedio-70-por-ciento-la-produccion-de-garbanzo>.
- Trapero CA, Jiménez DRM. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology*, 1985;75:1146-1151.
- Shagarodsky T, Morffi L, Chiang ML, Dueñas M, Vega M, López MR, et al. Producción de semilla de Garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT); Unidad de Semilla y Extensión Banao, Sancti Spiritus (INIFAT) y

- ETIAH, Velasco. Conferencia en Curso de Producción de Semillas, INIFAT. Holguín. 2007.
8. Merkuz A, Getachew A. Epidemic of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*) of chickpea at wilt sick plot in Adet-Ethiopia. *International Journal of Current Research*, 2012;4(5):135-141.
 9. Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.* 2013;28(1):1-11.
 10. Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 2009; 24(1):14-21.
 11. Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H y Cruz A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev. Protección Veg.* 2008;23(2):118-125.
 12. Infante D, González N, Reyes Y, Martínez B. Evaluación de la efectividad de doce cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels sobre tres fitopatógenos en condiciones de campo. *Rev. Protección Veg.* 2011;26(3):194-197.
 13. Martínez B, Pérez J, Infante D, Duarte Y, Moreno M. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Rev. Protección Veg.* 2013;28(3):192-198.
 14. Cruz A, Rivero D, Echevarría A, Infante D, Martínez B. *Trichoderma asperellum* en el manejo de hongos fitopatógenos en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L.). *Rev. Protección Veg.* 2015;30(suppl.1):87.
 15. Duarte Y, Echevarría A, Martínez B. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2016;31(3):173-183.
 16. Martínez B, Solano T. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones y Grout. *Rev. Protección Veg.* 1995; 10(3):221-225.
 17. Bell K, Wells D, Markham R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 1982;72(4):379-382.
 18. Chet I, Harman G, Baker R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbiol. Ecol.* 1981;7(1):29-38.
 19. Devi T, Linthoingambi W, Singh S. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for biological control of tomato wilt. *Indian Phytopath.* 2013;66(1):81-87.
 20. Infante D, Reyes Y, Peteira B, Martínez B. Variabilidad fisiológica y patogénica de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. *Métodos en Ecología y Sistemática.* 2015;10(3):41-52.
 21. Mis-Mut Del RM, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Reyes-Ramírez A, Moo-Koh FA. Identificación molecular de dos cepas de *Trichoderma* y su actividad in vitro antagónica contra *Fusarium* spp. *Rev. Protección Veg.* 2015;30(suppl.1):69.
 22. Sanmartín-Negredo P, López X, Pemberthy MP, Granada-Sinar D, Rueda-Lorza EA. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Rev. Tumb.* 2012;2(7):29-49.
 23. Guédez C, Cañizalez L, Castillo C, Olivar R. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2012;32(1):44-49.
 24. Hjeljord L, Tronsmo A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En: G. Harman y C. Kubicek, edits. *Trichoderma & Gliocladium. Volumen 2. Enzymes, biological control and commercial applications.* London, UK: Taylor & Francis. 1998:131-151.
 25. Harman G. Myths and dogmas of control. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease.* 2000;84(4):377-393.

26. Howell C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 2003;87(1):4-10.
27. Bernal A, Andreu C, Moya M. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* sp cubense (E.F. Smith) Snyder & Hans. *Fitosanidad*. 2007;83(1):26-29.
28. Durman S, Menendez A, Godeas A. Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* in vitro y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. *Revista Argentina de Microbiología*. 2003;31(1):13-18.
29. Corallo B. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. antagonistas del patógeno de sorgo *Fusarium nygamai*. Tesis presentada en opción al título de licenciada en Ciencias Biológicas. Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Uruguay. 2012.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.